

**Molekularbiologische Untersuchung der Diversität  
von Mikroorganismen in gefluteten  
und ungefluteten Pappelmikrokosmen**

Dissertation

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

dem  
Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

Andrea Graff  
aus Stade

Marburg / Lahn 2005

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von November 2000 bis November 2005 am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in Marburg/ Lahn unter der Leitung von Prof. Dr. Ralf Conrad durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen  
am: 09. November 2005

Erstgutachter: Prof. Dr. R. Conrad

Zweitgutachter: Prof. Dr. E. Bremer

Tag der Disputation: 16. Dezember 2005

Ein Großteil der in dieser Dissertation beschriebenen Ergebnisse ist in der folgenden Publikation veröffentlicht:

**Graff, A. und R. Conrad.** 2005. Impact of flooding on soil bacterial communities associated with poplar (*Populus* sp.) trees. FEMS Microbiol. Ecol. **53**:401-415.

**„Es ist des Lernens kein Ende“.**

Robert Schumann

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>ABKÜRZUNGEN.....</b>	<b>1</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>3</b>
<b>I. EINLEITUNG .....</b>	<b>5</b>
<b>1. Boden und Pappelpflanze als mikrobieller Lebensraum.....</b>	<b>5</b>
<b>2. Mikrobielle Diversität .....</b>	<b>8</b>
<b>3. Molekularbiologische Methoden zur Charakterisierung eines Habitats .....</b>	<b>11</b>
<b>4. Ziele der Arbeit.....</b>	<b>13</b>
<b>II. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>14</b>
<b>1. Materialien .....</b>	<b>14</b>
1.1. Chemikalien und Gase.....	14
1.2. Bodenmaterial und Pappelpflanzen .....	15
1.2.1. Boden.....	15
1.2.2. Herstellung der Pappelmikrokosmen.....	16
1.2.3. Definition der Habitate und Probennahme .....	17
<b>2. Inkubationsexperiment .....</b>	<b>19</b>
2.1. Ansatz der Bodenaufschlämmungen .....	19
2.2. Probenentnahme für chemische und physikalische Analysen.....	19
2.2.1. Gasproben.....	19
2.2.2. Flüssigproben .....	19
<b>3. Chemische und physikalische Methoden .....</b>	<b>20</b>
3.1. Gaschromatographische Analysen .....	20
3.1.1. Messung von Methan und Kohlendioxid .....	20
3.1.2. Messung von Wasserstoff.....	20
3.2. Berechnungen .....	21
3.3. Analyse organischer Säuren und Alkohole .....	22
3.4. Analyse anorganischer Ionen.....	23
3.5. Kolorimetrische Bestimmung von Eisen (II) .....	24
3.6. Bestimmung des pH-Wertes.....	24
3.7. Bestimmung des C/N-Gehaltes .....	25

3.8.	Bestimmung des Trockengewichts .....	25
<b>4.</b>	<b>Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>26</b>
4.1.	Extraktion von DNA.....	26
4.1.1.	Extraktion von Umwelt-DNA aus Boden und Pflanzenmaterial.....	26
4.1.2.	Extraktion von DNA aus <i>E.coli</i> -Klonen .....	28
4.2.	Reinigung der Umwelt-DNA von Huminsäuren .....	28
4.3.	Agarosegelelektrophorese .....	30
4.4.	Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen .....	31
4.5.	PCR (Polymerase Chain Reaction – Polymerase Kettenreaktion).....	31
4.5.1.	Primer .....	31
4.5.2.	Amplifikation der 16S rDNA .....	32
4.6.	Terminale-Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus-Analyse (T-RFLP-Analyse).....	35
4.6.1.	Restriktion der 16S rDNA-Amplifikate .....	35
4.6.2.	Elektrophorese .....	36
4.6.3.	Auswertung der T-RFLP-Analyse.....	37
4.7.	Erstellung von 16S rDNA-Klonbibliotheken .....	38
4.8.	Sequenzanalyse der klonierten 16S rDNA-Fragmente.....	40
4.8.1.	Sequenzierreaktion .....	40
4.8.2.	Reinigung der Sequenzierreaktions-Produkte .....	42
4.8.3.	Analyse der Sequenzierreaktions-Produkte.....	42
4.9.	Phylogenetische Analyse.....	44
4.9.1.	Sequenzverarbeitung .....	44
4.9.2.	Phylogenetische Einordnung der partiellen und der vollständigen 16S rRNA-Gensequenzen .....	44
<b>5.</b>	<b>Statistische Methoden .....</b>	<b>46</b>
5.1.	Abschätzung des Artenreichtums .....	46
5.2.	Statistische Auswertung der T-RFLP-Ergebnisse .....	47
<b>III.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>49</b>
<b>1.</b>	<b>Molekulare Analyse der mikrobiellen Lebensgemeinschaften in gefluteten und ungefluteten Pappelmikrokosmen.....</b>	<b>49</b>
1.1.	T-RFLP-Analyse der bakteriellen Lebensgemeinschaften.....	49

1.2.	Phylogenetische Identifikation einzelner bakterieller Gruppen .....	54
1.3.	Abschätzung des bakteriellen Artenreichtums .....	62
1.4.	Struktur und phylogenetische Diversität der <i>Archaea</i> .....	63
<b>2.</b>	<b>Inkubationsexperiment aus Pappelmikrokosmen und feldfrischen Bodenproben</b>	<b>70</b>
2.1.	Zeitlicher Verlauf geochemischer Parameter in Bodenaufschlämmungen .....	70
2.1.1.	Elektronenakzeptor-Konzentrationen .....	70
2.1.2.	Methan, Kohlendioxid und Wasserstoff.....	71
2.1.3.	Organische Säuren und pH-Wert.....	73
2.2.	Mikrobielle Gemeinschaften der Bodenaufschlämmungen .....	75
2.2.1.	Struktur und phylogenetische Diversität der <i>Bacteria</i> .....	75
2.2.2.	Struktur und phylogenetische Diversität der <i>Archaea</i> .....	82
<b>IV.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>89</b>
<b>1.</b>	<b>Pappel und Boden als mikrobieller Lebensraum .....</b>	<b>89</b>
<b>2.</b>	<b>Biogeochemische Prozesse in Bodenaufschlämmungen.....</b>	<b>91</b>
<b>3.</b>	<b>Bakterielle Diversität .....</b>	<b>94</b>
3.1.	Bodenaufschlämmungen .....	94
3.2.	Pappelmikrokosmen .....	97
<b>4.</b>	<b>Archaeelle Diversität in Bodenaufschlämmungen und Pappelmikrokosmen .....</b>	<b>104</b>
<b>5.</b>	<b>Vergleich der Böden .....</b>	<b>114</b>
<b>6.</b>	<b>Abschließende Betrachtung und Ausblick.....</b>	<b>116</b>
<b>V.</b>	<b>LITERATUR .....</b>	<b>117</b>
<b>Anhang A:</b>	<b>Zuordnung terminaler Restriktionsfragmente zu 16S rRNA- Klonsequenzen von Pappelmikrokosmen innerhalb der <i>Bacteria</i> .....</b>	<b>151</b>
<b>Anhang B:</b>	<b>Zuordnung terminaler Restriktionsfragmente zu 16S rRNA- Klonsequenzen von Pappelmikrokosmen innerhalb der <i>Archaea</i> .....</b>	<b>165</b>
<b>Anhang C:</b>	<b>Zuordnung terminaler Restriktionsfragmente zu 16S rRNA- Klonsequenzen einer Bodenaufschlämmung innerhalb der <i>Archaea</i> ...</b>	<b>170</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>.....</b>	<b>176</b>
<b>Dank</b>	<b>.....</b>	<b>178</b>

## Abkürzungen

ACC	„accession number“
APS	Ammoniumpersulfat
b	Rückwärts („backwards“)
BS	undurchwurzelter Boden („bulk soil“)
dest. H <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
et al.	und andere („et alii“)
F	geflutet
f	Vorwärts („forward“)
FAM	Carboxyfluorescein
FG	Feuchtgewicht
g	Erdbeschleunigung
IC	Ionenchromatograph
KA	Korrespondenzanalyse
n	Anzahl der Proben
OTU	operative taxonomische Einheit („operational taxonomic unit“)
p.A.	für analytische Zwecke („pro analysi“)
PBS	isotonischer Phosphatpuffer („phosphate buffered saline“)
ppm <sub>v</sub>	Mischungsverhältnis: „parts per million by volume“
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidon
RC	Rice Cluster
RH	Rhizosphäre
RP	Rhizoplane
SSU	kleine ribosomale Untereinheit („small subunit“)
sp.	Art („species“)
spp.	Arten
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TG	Trockengewicht
T-RF	terminales Restriktionsfragment

## Abkürzungen

---

T-RFLP	terminaler Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus („terminal restriction fragment length polymorphism“)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
U	ungeflutet
v/v	Volumen pro Volumen („volume per volume“)
w/v	Gewicht pro Volumen („weight per volume“)

Weitere Abkürzungen wurden entsprechend der „Information for Authors“ des European Journal of Biochemistry verwendet.

## Zusammenfassung

Auenböden unterliegen aufgrund temporärer Flutungen einem starken Wechsel im Wassergehalt. Als Folge adaptieren sich Pflanzen, wie beispielsweise Pappeln, und Mikroorganismen an diese anoxischen Bedingungen. Ziel dieser Arbeit war es die Auswirkungen von Flutung auf die mikrobiellen Lebensgemeinschaften (*Bacteria* und *Archaea*), die mit Pappeln assoziiert sind, in Mikrokosmen zu analysieren. Die Struktur der Lebensgemeinschaften wurde mittels terminaler Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus (T-RFLP)-Analyse, Klonierung und vergleichender Sequenzierung der 16S rRNA-codierenden Gene (16S rDNA) aufgeklärt.

Durch Inkubation (90 Tage) von undurchwurzelten Bodenproben aus ungefluteten (bodenfeuchten) und vorgefluteten Pappelmikrokosmen sowie aus feldfrischen Proben wurde ein Überblick der biogeochemischen Prozesse erhalten. Nach Aufschlammung dieser Proben wurden die vorhandenen Elektronenakzeptoren entsprechend ihrem Redoxpotential sequentiell reduziert. Im Vergleich unterschieden sich die Proben aus den Mikrokosmen von denen der feldfrischen Proben hinsichtlich der Konzentrationen der ermittelten Parameter, insbesondere war die Methanbildung in den feldfrischen Proben wesentlich stärker ausgeprägt. Die bakteriellen Lebensgemeinschaften in Bodenproben aus vorgefluteten und ungefluteten Mikrokosmen veränderten sich kaum mit der Zeit und wurden von *Bacillales* und *Acidobacteria*, welche typisch für Böden sind, dominiert. In den feldfrischen Proben waren zusätzlich *Actinobacteria* und *Alphaproteobacteria* dominant. Die archaeele Lebensgemeinschaft zeigte über den untersuchten Zeitraum in allen Ansätzen geringe Veränderungen. Die abundanten Gruppen innerhalb der *Archaea* zählten zu den nicht kultivierten *Crenarchaeota* der Linie 1.1b und den *Methanosarcinaceae*. Zum Ende der Inkubationen wurden mit abnehmender Acetatkonzentration *Methanosaetaceae* detektiert.

Weiterhin wurde der Einfluss der Pappelpflanze auf die mikrobiellen Gemeinschaften durch die Analyse der Kompartimente undurchwurzelter Boden, Rhizosphäre und Rhizoplane in einem weiteren Mikrokosmosexperiment untersucht. Für die bakterielle Gemeinschaft wurde eine Gesamtheit von 281 Klonsequenzen erhalten. Die Anzahl der verschiedenen Sequenzen (<97 % Ähnlichkeit) in den verschiedenen Habitaten repräsentierte jeweils zwischen 16-55 % des gesamten bakteriellen Artenreichtums wie sie mit Chao1 als Indikator abgeschätzt wurde. In Bezug auf die Anzahl der verschiedenen

terminalen Restriktionsfragmente zeigten alle Habitate jeweils ca. 20 verschiedene „operational taxonomic units“ (OTUs), mit Ausnahme des Habitats der gefluteten Rhizoplane, welches eine geringere Anzahl an OTUs aufwies. Generell bestätigten sich die mittels Klonierung und T-RFLP-Analyse erzielten Ergebnisse gegenseitig. Die statistische Auswertung der gesamten T-RFLP-Profile mittels Korrespondenzanalyse zeigte, dass sich die bakteriellen Gemeinschaften in den Kompartimenten deutlich voneinander unterschieden und sich durch Flutung veränderten. Beispielsweise traten unter ungefluteten Bedingungen *Bacillus* spp. vermehrt im undurchwurzeltten Boden und in der Rhizosphäre auf. Hingegen waren Bakterien in nächster Verwandtschaft zu *Aquaspirillum* sp. nur an Pappelwurzeln und in der Rhizosphäre von gefluteten Mikrokosmen abundant. Die archaeelle Gemeinschaft wurde in allen Kompartimenten, sowohl geflutet als auch ungeflutet, zu 99 % von *Crenarchaeota*-Klonsequenzen der Linie 1.1b dominiert. Die Dominanz *crenarchaeotischer* Linien in den Bodenaufschlammungen und allen Kompartimenten der Mikrokosmen weist auf ihre physiologische Bedeutung nicht nur in Böden, sondern auch in der Rhizosphäre und an Wurzeln von Pappelpflanzen hin. Allein zwei Klonsequenzen aus dem Habitat der Rhizoplane wurden bisher unkultivierten *Euryarchaeota* zugeordnet. Im Gegensatz zu den Bodenaufschlammungen wurden keine Methanogenen mittels Klonierung detektiert.

In dieser Arbeit wurden erstmals in dem System der Pappelmikrokosmen Einblicke in die strukturelle Zusammensetzung der *Bacteria* und *Archaea*, auch in Abhängigkeit von Flutung, mit Hilfe molekularbiologischer Methoden erhalten und abundante Mikroorganismen konnten identifiziert werden. Dies stellt eine Basis für gezielte physiologische Fragestellungen in diesem Habitat dar.

## **I. Einleitung**

### **1. Boden und Pappelpflanze als mikrobieller Lebensraum**

Die Komplexität terrestrischer Systeme wird bestimmt durch Feststoffe wie Mineralien, Streu, Humus, sowie Biomasse. Die Heterogenität des Bodens, die unter anderem durch Bodenpartikelgröße (Ranjard et al., 2000) und Bodentyp (Griffiths et al., 1996; Latour et al., 1999) bestimmt wird, führt zum Vorhandensein von Bodenaggregaten und somit zu einer Vielzahl von Mikrohabitaten. In diesen ist eine große Bandbreite an Mikroorganismen in Mikrokolonien zu finden. Die Zusammensetzung der Bodenmikroflora wird durch weitere Faktoren wie Nährstoffangebot, Eintrag an organischem Material (Blackwood und Paul, 2003; Lynch, 1990) und physiko-chemische Bodenparameter wie pH-Wert, Temperatur, Wassergehalt und die Verfügbarkeit von Sauerstoff (Lüdemann et al., 2000) bestimmt.

Zusätzlich wird die Heterogenität des Bodenhabitats durch den Bewuchs von Pflanzen beeinflusst, da die Pflanze sowohl unmittelbar als auch durch indirekte Wechselwirkungen die Bodenstruktur ändert. Die Rhizosphäre stellt in terrestrischen Habitaten den Übergangsbereich zwischen der Wurzeloberfläche (Rhizoplane) höherer Pflanzen und dem nicht durchwurzelten Boden dar. Sie wird direkt von den Pflanzenwurzeln beeinflusst und beträgt mindestens einige Millimeter des wurzelumgebenden Bodens (Lynch, 1990). Die Wurzeln stimulieren die mikrobielle Population durch Eintrag von abgestorbenem Pflanzen- und Wurzelmaterial, sowie durch Wurzelexsudate wie Aminosäuren, Zucker und organischen Säuren, Sekreten und Lysaten (Dandurand und Knudsen, 1997; Grayston et al., 1998; Söderberg und Baath, 1998). Diese stellen relativ einfache und gut verwertbare Kohlenstoff- und Energiequellen dar und begünstigen dadurch mikrobielles Wachstum. Die Quantität und Art dieser Verbindungen variiert zwischen verschiedenen Pflanzenarten, mit dem Alter der Pflanze sowie zwischen verschiedenen Wurzelbereichen. Fast alle chemischen Verbindungen einer Pflanze konnten bisher im Rhizosphärenbereich wiedergefunden werden (Whipps, 1990). Dieser positive Einfluss der Wurzel wird auch als „Rhizosphäreneffekt“ bezeichnet.

Die verschiedenen Boden-Kompartimente, wie der undurchwurzelte Boden (auch als „bulk soil“ bezeichnet), die Rhizosphäre (Boden beeinflusst durch die Pflanzenwurzel) und die Rhizoplane (Wurzeloberfläche einschließlich Endorhizosphäre) können somit als

räumlich voneinander getrennte mikrobielle Habitate betrachtet werden (Blackwood und Paul, 2003; Dandurand und Knudsen, 1997). In der Praxis hängt diese strikte Trennung der Habitate jedoch von der verwendeten Methode ab und in situ lassen sich Übergangsbereiche zwischen den Kompartimenten feststellen (Mahaffee und Kloepper, 1997).

Verschiedene Pflanzenarten beeinflussen ebenfalls die Zusammensetzung mikrobieller Lebensgemeinschaften des Bodens und der Rhizosphäre. Unterschiede in der mikrobiellen Diversität wurden bei verschiedenen einjährigen Pflanzen erfasst (Söderberg et al., 2002; Smalla et al., 2001; Wieland et al., 2001; Grayston et al., 1998). Weiterhin konnten zwischen verschiedenen Baumarten, wie z. B. zwischen Lärche und Fichte (Grayston und Campbell, 1996), sowie zwischen Kiefer, Fichte und Birke (Priha et al., 2001) Unterschiede in der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft festgestellt werden.

Die Assoziation von bakteriellen Populationen mit Pappeln wurde bereits untersucht. Germaine und Mitarbeiter (Germaine et al., 2004) konnten eine enge Verbindung von bakteriellen Pappel-Endophyten (*Pseudomonas* spp.) mit deren Wirtspflanze nachweisen. *Enterobacter*- und *Clostridium*-Spezies wurden in Splintholz-Proben aus Pappelbaumstämmen detektiert (Scott, 1984) und kürzlich wurde ein neues, aerobes, fakultativ methylothropes Bakterium (*Methylobacterium populi*) aus Pappelbäumen isoliert (Van Aken et al., 2004).

Die Pappel ist ein schnell wachsender Weichholz-Laubbaum, welcher als überflutungstolerant gilt. Als eine Folge der Flutung findet ein pflanzeninterner Ethanol-Kreislauf statt. In den Wurzeln werden Zucker vermehrt zu Ethanol fermentiert und das gebildete Ethanol mit dem Transpirationsstrom in die Blätter transportiert (Kelsey, 1996; MacDonald und Kimmerer, 1991) und dort wieder in Kohlenhydrate eingebaut. Diese Zucker stehen dann erneut für den Phloemtransport zu den Wurzeln zur Verfügung. Ein geringer Teil der in das Blatt transportierten Metabolite (Ethanol) bzw. der dort aus Ethanol gebildeten Metabolite (Acetaldehyd) wird emittiert (Kreuzwieser et al., 2000; Kreuzwieser et al., 1999a; Kreuzwieser et al., 1999b). Eine Vergiftung der Wurzeln durch Fermentationsprodukte wird auf diese Weise verhindert (Vartapetian und Jackson, 1997) und gleichzeitig kann die in dem Ethanol enthaltene Energie zu großen Teilen wieder verwendet werden. Bei Überflutung kommt es in qualitativ und quantitativ unterschiedlichem Maße zur Abgabe von Fermentationsprodukten über die Wurzeln.

Inwieweit mögliche Exsudate die mikrobiellen Populationen in diesem Habitat bei Überflutung beeinflussen ist bisher jedoch noch nicht bekannt.

Auenböden sind Böden der Flusstäler und unterliegen während des Jahres einem starken Wechsel im Wassergehalt aufgrund periodischer Flutungen. Vorhandenes organisches Material wird zunächst aerob unter Verbrauch von Sauerstoff abgebaut. Nach dem Fluten wird der Boden zu einem anaeroben Ökosystem, da der Sauerstoffgehalt des Bodens aufgrund respiratorischer Prozesse schnell abnimmt. In Abwesenheit von Sauerstoff wird der Abbau des organischen Materials von einer komplexen mikrobiellen Gemeinschaft anaerob fortgesetzt. Zunächst werden Polymere (z. B. Cellulose, Xylan, Pectin) durch extrazelluläre Enzyme zu Monomeren (z. B. Monosaccharide, Aminosäuren) hydrolysiert (Chin et al., 1998; Lüders, 2001). Diese werden durch fermentierende Mikroorganismen (primäre Gärer) zu organischen Säuren, Alkoholen,  $H_2$  und  $CO_2$  vergoren. Organische Säuren und Alkohole werden durch sekundäre Gärer zu Acetat,  $H_2$  und  $CO_2$  umgesetzt, oder bei Anwesenheit alternativer Elektronenakzeptoren (Nitrat, Fe(III), Sulfat) direkt veratmet. Acetat kann zudem aus  $H_2/CO_2$ , Zuckern und anderen Substraten homoacetogen gebildet werden.

Die mikrobielle Oxidation organischer Verbindungen erfolgt in einer charakteristischen Sequenz von Reduktionsprozessen gemäß der thermodynamischen Theorie, wobei die Elektronenakzeptoren mit dem höchsten Redoxpotential zuerst reduziert werden (Ponnamperuma, 1978; Zehnder und Stumm, 1988). Dabei werden  $O_2$ ,  $NO_3^-$ , Mn(IV), Fe(III) und  $SO_4^{2-}$  nacheinander als Elektronenakzeptoren verwendet. Nach Verbrauch dieser alternativen Elektronenakzeptoren wird  $CO_2$  durch methanogene *Archaea* zu Methan reduziert (Conrad und Frenzel, 2002; Peters und Conrad, 1996; Achtnich et al., 1995). Eine simultane Reduktion von Nitrat, Sulfat und Eisen(III) sowie die Produktion von Methan ist möglich, wenn die jeweiligen mikrobiellen Populationen aktiv und die Substratkonzentrationen nicht limitierend sind (Achtnich et al., 1995; Holmer und Kristensen, 1994; Mountfort und Asher, 1981).

## 2. Mikrobielle Diversität

Neben Tieren und Pflanzen sind vor allem Mikroorganismen entscheidend an den biotischen Prozessen im Ökosystem Boden beteiligt. Die mikrobielle Ökologie beschreibt die Diversität, die Beziehungen zwischen den Organismen und deren Aktivität. Zeitliche Störungen haben einen Einfluss auf die Ausbildung von Lebensgemeinschaften (Begon et al., 1998). Dies lässt eine erhöhte funktionelle Diversität von Mikroorganismen erwarten, welche darauf spezialisiert sind, vorübergehend vorhandene ökologische Nischen auszunutzen. Die strukturelle Zusammensetzung unterschiedlicher, teilweise konkurrierender mikrobieller Populationen wird in dieser Arbeit anhand des Prozesses der Flutung in Pappelmikrokosmen untersucht.

Diversität und Struktur mikrobieller Lebensgemeinschaften werden molekular mit 16S rRNA-Gen-Analysen untersucht. Folgende Kriterien zeichnen die ribosomale RNA und deren Gene als idealen phylogenetischen Marker aus: Sie ist ubiquitär in allen Lebensformen präsent, ist funktionell hoch konserviert und es findet so gut wie kein horizontaler Gentransfer von 16S rDNA statt. Weiterhin existieren hochkonservierte, variable und hochvariable Regionen, da verschiedene Nukleotidsequenzpositionen mit unterschiedlichen Mutationsraten evolvieren. Bei Vergleichen sequenzierter rRNA oder der für sie codierenden Gene (rDNA) wurden außerdem solche Sequenzmotive oder einzelne Nukleotidpositionen gefunden, welche für eine Gattung, Familie oder für höhere Ordnungen charakteristisch sind (sogenannte Signatursequenzen). Das Ausmaß und die Art von Sequenzveränderungen bei Vergleichen mehrerer Organismen kann so als Grundlage zur Erstellung eines phylogenetischen Stammbaums herangezogen werden (Olsen und Woese, 1993). Die hochkonservierten Regionen der rRNA aller Organismen sind leicht als homologe Positionen bei einem Sequenzvergleich zu erkennen und ermöglichen eine gesicherte Zuordnung der homologen Positionen in den variablen Regionen des Moleküls. Basierend auf den Analysen der ribosomalen RNA (16S der Prokaryoten bzw. 18S der Eukaryoten) wurde das Konzept der drei Domänen *Bacteria*, *Archaea* und *Eukarya* entwickelt (Woese et al., 1990a).

Das Wissen über die bakterielle Diversität konnte durch Klonierung und Sequenzierung von 16S rRNA-Genen aus diversen aquatischen und terrestrischen Habitaten entscheidend erweitert werden. Dabei wurden Entwicklungslinien entdeckt, innerhalb derer es keine kultivierten Organismen gibt und deren Einordnung in das

bisherige phylogenetische System nicht exakt vorgenommen werden konnte. Diese werden als sogenannte neue Entwicklungslinien („candidate divisions“) bezeichnet (Hugenholtz et al., 1998a; Borneman und Triplett, 1997; Kuske et al., 1997; Liesack und Stackebrandt, 1992).

Seit 1987 haben sich die damals von Woese beschriebenen 12 Phyla (Woese, 1987) mehr als vervierfacht. Somit werden derzeit innerhalb der Domäne *Bacteria* 52 Phyla unterschieden, von denen allerdings nur 26 kultivierte Organismen in nächster Verwandtschaft aufweisen. Die anderen 26 Phyla werden nur durch Umweltklonsequenzen repräsentiert (Rappé und Giovannoni, 2003). Feldstudien weisen darauf hin, dass viele der unkultivierten Phyla in verschiedenen Habitaten detektiert werden und einige außergewöhnlich abundant sind. Wegen der Dominanz unkultivierter Phyla am gesamten Mikrobenspektrum in verschiedensten Habitaten, wie Salz- und Süßwasser und Boden, wachsen die phylogenetisch erhobenen Datenmengen schnell an.

Mitglieder der *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* und der zwei Gram-positiven Phyla *Actinobacteria* und *Firmicutes* sind durch kultivierungsabhängige Studien sehr gut untersucht. Diese vier Phyla machen 90 % aller kultivierten Bakterien aus, welche mittels 16S rRNA-Sequenzen charakterisiert wurden (Hugenholtz et al., 1998b). Die *Proteobacteria* sind die klassischen Gram-negativen Bakterien und sind sowohl auf Basis von kultivierungsabhängigen als auch kultivierungsunabhängigen Analysen als eine der erfolgreichsten mikrobiellen Gruppen auf diesem Planeten anzusehen (Zwart et al., 2002). Im Gegensatz dazu stehen Phyla, welche nur durch wenige kultivierte Organismen repräsentiert werden wie z.B. *Verrucomicrobia*, *Chloroflexi*, *Acidobacteria*, *Planctomycetes* und *Gemmatimonadetes*. Vergleichende phylogenetische Analysen haben gezeigt, dass Mitglieder der folgenden großen phylogenetischen Gruppen ein ubiquitäres Vorkommen in fast allen Bodenarten zeigen: die Klasse *Alphaproteobacteria* und die Phyla *Actinobacteria*, *Acidobacteria* und *Verrucomicrobia*. Diese vier Gruppen sind mit >75 % in 16S rDNA Klonbibliothek-Analysen von bakteriellen Lebensgemeinschaften des Bodens, vertreten (Hugenholtz et al., 1998b). Andere Klassen des Phylums *Proteobacteria* und Phyla wie *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Chloroflexi* und *Planctomycetes* wurden in 25 – 75 % der Studien detektiert (Hugenholtz et al., 1998b). Wenn auch nur durch wenige kultivierte Organismen repräsentiert, so sind Mitglieder der *Acidobacteria* jedoch zahlenmäßig dominant und aktive Mitglieder in den meisten Böden. Diese können bis zu

52 % der detektierten 16S rRNA-Gen Sequenzen in Klonbibliotheken ausmachen (Felske et al., 2000a; Felske et al., 2000b; Nogales et al., 1999; Kuske et al., 1997).

Die Domäne der *Archaea* unterteilt sich auf der Basis der 16S rDNA-Verwandtschaft in vier Königreiche. Die kultivierten Vertreter der *Euryarchaeota* und *Crenarchaeota* wurden zum größten Teil aus „extremen“ Habitaten isoliert. Die *Korarchaeota* und *Nanoarchaeota* konnten bisher jedoch nur durch die direkte 16S rDNA-Analyse in Umweltproben nachgewiesen werden (Huber et al., 2002; Barns et al., 1996; Barns et al., 1994). Die *Crenarchaeota* umfassen die drei Ordnungen *Thermoproteales*, *Desulfurococcales* und *Sulfolobales* (Itoh, 2003). Das Phylum der *Euryarchaeota* ist durch neun Ordnungen charakterisiert (*Halobacteriales*, *Archaeoglobales*, *Thermococcales*, *Thermoplasmatales*, *Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales* und *Methanopyrales*) und bildet eine physiologisch diverse Gruppe. Die meisten kultivierten Vertreter der *Archaea* kommen unter „extremen“ Lebensbedingungen, wie z. B. in hydrothermalen Schloten, sauren Schwefelquellen oder heißen Quellen vor (Barns et al., 1994; Olsen, 1994). Mit Hilfe molekularer Methoden wurden jedoch zunehmend Umweltsequenzen in nicht extremen Standorten wie marinen und terrestrischen Habitaten detektiert und es wurden Sequenzen bislang unkultivierter Linien innerhalb der *Eury-* und *Crenarchaeota* gefunden. Beispiele hierfür sind oxische Wald- und Agrarböden (Bintrim et al., 1997; Ueda et al., 1995) und anoxische Reisfeldböden (Chin et al., 1999a; Großkopf et al., 1998b). Über die Physiologie dieser Linien ist oft nur wenig bekannt.

Die größte physiologische Gruppe innerhalb der *Euryarchaeota* stellen die Methan bildenden *Archaea* dar. Sie nutzen Acetat, H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub>, Formiat und/oder andere C1-Verbindungen wie Methanol, Methylthiole und Methylamine als Energiesubstrate (Thauer, 1998). Alle Methanogenen sind strikt anaerob in ihrer Lebensweise. Methanogene *Archaea* kommen z. B. in natürlich anoxischen Habitaten wie Sedimenten (Salz- und Süßwasser), in Mooren und Überschwemmungsgebieten von Flüssen, im Verdauungstrakt von Tieren und auch als Endosymbionten in verschiedenen anaerob lebenden Protozoen vor. Auch anthropogen verursachte anoxische Standorte wie geflutete Reisfeldböden und Mülldeponien sind Quellen der Methanproduktion.

### 3. Molekularbiologische Methoden zur Charakterisierung eines Habitats

Die ganze Vielfalt der Mikroorganismen ist längst noch nicht bekannt. Schätzungen zu Folge sind bisher nur wenige Prozent aller existierenden Prokaryoten kultiviert worden (Amann et al., 1995; Ward et al., 1990). Anreicherungskulturen sind sehr selektiv und in der Regel überwiegen Organismen mit hohen Wachstumsraten und solche, die an das Medium adaptiert sind (Heuer und Smalla, 1997; Liesack et al., 1997). Diese stellen jedoch nur einen kleinen Anteil der mikrobiellen Gemeinschaft dar (Smalla, 1998; Staley und Konopka, 1985) und ihre Bedeutung in dem untersuchten Habitat ist fragwürdig (Großkopf et al., 1998a). Dieser Aspekt und zeit- und arbeitsaufwendige Nachteile der Kultivierung verdeutlichen die Bedeutung molekularbiologischer Methoden.

Häufig wird die 16S rDNA aus oben genannten Gründen als universeller phylogenetischer Marker eingesetzt und hat das Wissen über die in der Natur existierende Diversität der Mikroorganismen revolutioniert.

Eine routinemäßig angewendete Methode zur Untersuchung mikrobieller Lebensgemeinschaften ist die Erstellung von 16S rDNA-Klonbibliotheken (Felske und Weller, 2001; Dunbar et al., 1999; Hugenholtz et al., 1998a; Hugenholtz et al., 1998b; Stackebrandt et al., 1993). Ausgereifte Sequenzierungsmethoden erlauben eine zunehmend sichere Identifikation von Mikroorganismen. Dabei erwiesen sich die 16S rRNA-Gene, im Gegensatz zu 5S rRNA- und 23S rRNA-Genen als besonders vorteilhaft, da die 16S rRNA-Sequenzinformation von 1500 Basen einen ausreichenden Informationsgehalt aufweist, um aussagekräftige phylogenetische Zuordnungen durchführen zu können (Ludwig und Schleifer, 1994; Woese, 1987). Die Gesamtheit aller Biodiversitätsstudien hat dazu geführt, dass mehr als 175000 16S rRNA Sequenzdaten in öffentlichen Datenbanken zugänglich sind (RDPII, Release 9.31, 6. September 2005; <http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>), wobei die Mehrzahl dieser Sequenzen bei kultivierungsunabhängigen Studien direkt aus der Umweltprobe erzielt wurden.

Ein weiterer molekularer Ansatz zur Charakterisierung mikrobieller Lebensgemeinschaften ist die Analyse ihrer molekularen „Fingerprints“ (genetischer Fingerabdruck) ebenfalls basierend auf 16S rDNA. Diese ermöglichen einen schnellen Vergleich der Diversität, der strukturellen Zusammensetzung und der Dynamik verschiedener mikrobieller Gemeinschaften bei gleichzeitig hohem Probendurchsatz. Einige dieser Methoden sind z. B. die denaturierende/ thermische

Gradientengelelektrophorese (DGGE/ TGGE; (Muyzer, 1999)), die Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus-Analyse (SSCP; (Lee et al., 1996)) und die terminale Restriktionsfragmentanalyse (T-RFLP; (Kitts, 2001; Clement et al., 1998; Liu et al., 1997)). Hierbei werden gemischte PCR-Produkte anhand unterschiedlicher Charakteristika (Schmelzverhalten, elektrophoretische Mobilität, Schnittstellen) aufgetrennt. Die von diesen Methoden abgeleiteten genetischen Fingerabdrücke können nach Unterschieden und Übereinstimmungen verglichen werden.

Die hier verwendete kultivierungsunabhängige molekulare T-RFLP-Methode („Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism“) beruht auf einer PCR der 16S rRNA-Gene mit Hilfe von 5'-Fluoreszenz-markierten Primern. Anschließend wird das PCR-Produkt mit Restriktionsendonukleasen spezifisch geschnitten und die Fluoreszenz-markierten Restriktionsfragmente in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels automatischer Sequenzierer computergestützt auf ihre spezifischen terminalen Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen analysiert. Das Ergebnis dieser Analyse wird als T-RFLP-Chromatogramm dargestellt. Ein „Peak“ repräsentiert jeweils ein T-RF (terminales Restriktionsfragment) und somit entsteht ein für die untersuchte Umweltprobe charakteristisches Muster an T-RFs, wobei ein T-RF mit einer „OTU“ („operational taxonomic unit“) korrespondiert. Eine „OTU“ stellt im Folgenden eine durch spezifische Restriktionslängen der 16S rRNA-PCR-Produkte charakterisierte Einheit dar, welche ein oder mehrere bakterielle oder archaeelle Taxons beinhaltet (T-RF-Gruppe). Mit Hilfe der T-RFLP-Methode lassen sich Aussagen über die relativen Abundanzen der 16S rRNA-Gene von Organismen einer Population machen.

Da die T-RFLP-Analyse keine direkte phylogenetische Information liefert, werden vergleichende Sequenzanalysen durchgeführt, welche auch auf Basis der 16S rRNA-Gene durchgeführt werden. Eine Korrelation von phylogenetischer Information ist über die Sequenzdaten zu einzelnen terminalen Restriktionsfragmenten in einem T-RFLP-Profil, definiert durch die Schnittstelle des verwendeten Enzyms, möglich.

Lukow und Mitarbeiter (Lukow et al., 2000) bestätigten, dass die T-RFLP-Methode geeignet ist, um strukturelle Unterschiede (räumlich und zeitlich) hoch diverser bakterieller Gemeinschaften im Boden zu analysieren. Mit Hilfe dieser „Fingerprint“-Methode konnten die räumlichen (Lüdemann et al., 2000) und zeitlichen (Noll et al., 2005) Veränderungen der Struktur bakterieller Gemeinschaften innerhalb des vertikalen Sauerstoffgradienten von gefluteten Reisfeldböden nachgewiesen werden. Dies ist ebenfalls eine bewährte Methode

um die Zusammensetzung komplexer, mikrobieller Lebensgemeinschaften in der Rhizosphäre (Blackwood und Paul, 2003) und an Reiswurzeln (Scheid et al., 2004; Scheid et al., 2003; Scheid und Stubner, 2001) zu untersuchen. In Reisfeldböden wurde diese Methode auch zur Untersuchung der methanogenen *Archaea* angewandt (Fey und Conrad, 2000; Lueders und Friedrich, 2000; Ramakrishnan et al., 2000; Chin et al., 1999a;).

#### **4. Ziele der Arbeit**

Auenböden sind durch temporäre Flutungen charakterisiert, was eine Änderung der chemisch-physikalischen Bedingungen des Bodens zur Folge hat. Bisher wurden keine molekularbiologischen Untersuchungen zur Diversität von Mikroorganismen in diesem Habitat vorgenommen. Um ein möglichst umfassendes Bild der mikrobiellen Lebensgemeinschaften (*Bacteria* und *Archaea*) in diesem System zu bekommen, war es Ziel dieser Arbeit die mikrobielle Diversität in ungefluteten und gefluteten Pappelmikrokosmen molekular, mittels 16S rDNA-Analysen, zu charakterisieren und miteinander zu vergleichen.

Dafür sollten zuerst molekulare „Fingerprint“-Methoden wie die T-RFLP-Analyse durchgeführt werden. Um eine Aussage treffen zu können, um welche mikrobiellen Organismen es sich in den vorhandenen Lebensgemeinschaften handelt, sollte deren 16S rDNA kloniert, sequenziert und phylogenetisch eingeordnet werden.

Zur Analyse räumlicher Unterschiede sollten verschiedene Kompartimente der Pappelmikrokosmen, wie nicht durchwurzelter Pappelboden („bulk soil“), Rhizosphärenboden und Rhizoplane, auf die vorhandenen mikrobiellen Organismen (*Bacteria* und *Archaea*) untersucht werden.

Zeitliche Verläufe mikrobieller Populationen (*Bacteria* und *Archaea*) in diesem Habitat sollten mit Hilfe von Inkubationsexperimenten durchgeführt werden. Für die Bodenaufschlammungen wurde Boden („bulk soil“) aus ungefluteten und gefluteten Pappelmikrokosmen sowie aus feldfrischen Proben verwendet. Die biogeochemischen Prozesse sollten begleitend über den Zeitraum der Inkubation analysiert werden um diese später mit den vorhandenen mikrobiellen Organismen zu korrelieren.

## **II. Material und Methoden**

### **1. Materialien**

Die verwendeten Lösungen und Puffer wurden, soweit nicht anders angegeben, mit demineralisiertem Wasser angesetzt und durch Autoklavieren (30 min bei 121°C und 1 bar Überdruck) sterilisiert. Nicht autoklavierbare Bestandteile wurden steril filtriert (0,2 µm Porengröße, FP 30/3, Schleicher & Schuell, Dassel) und unter sterilen Bedingungen zugesetzt. Feste, thermostabile Materialien wurden durch Hitze sterilisiert (4 Stunden bei 180°C).

#### **1.1. Chemikalien und Gase**

Soweit im Text nicht gesondert aufgeführt, wurden alle verwendeten Chemikalien in p.A.-Qualität von folgenden Firmen bezogen:

Amersham Biosciences Europe GmbH (Freiburg)

Applied Biosystems (Weiterstadt)

Becton & Dickinson (Detroit, U.S.A.)

Bio-Rad Laboratories (München)

Biozym Diagnostik GmbH (Hessisch Oldendorf)

Invitrogen GmbH (Karlsruhe)

Merck (Darmstadt)

MWG Biotech (Ebersberg)

Promega (Mannheim)

Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)

Roth (Karlsruhe)

Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

Die eingesetzten technischen Gase wurden von der Firma Messer-Griesheim (Krefeld) bezogen. Als Eichgase dienten H<sub>2</sub> in Stickstoff und ein CH<sub>4</sub>-, CO<sub>2</sub>-, CO-Gemisch in Stickstoff. Zur Begasung von Bodenaufschlämmungen wurde N<sub>2</sub> verwendet.

## 1.2. Bodenmaterial und Pappelpflanzen

Das verwendete Boden- und Pflanzenmaterial wurde von Dr. Jürgen Kreuzwieser (Institut für Forstbotanik und Baumphysiologie, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg) zur Verfügung gestellt.

### 1.2.1. Boden

Um die Diversität der mit Pappeln assoziierten mikrobiellen Lebensgemeinschaft im Boden zu analysieren, wurden Pappelmikrokosmen hergestellt. Anschließend wurden Inkubationsexperimente mit Boden aus Pappelmikrokosmen als auch mit feldfrischen Bodenproben durchgeführt (s. Tabelle 1).

Der in den Mikrokosmos-Experimenten verwendete Boden wurde in den Jahren 2000 und 2002 aus einem Gebiet der Polder Altenheim, welche zwischen Rheinkilometer 278,3 und 283,1 direkt oberhalb Kehl/Sraßburg liegen, entnommen. Das Gelände liegt auf einer Höhe von ca. 142 - 147m üNN und unterliegt einem kontinental geprägten Klima im Regenschatten der Vogesen und im Einflussbereich warmer Westwinde durch die Burgundische Pforte. Geologisch handelt es sich bei dem Standort um quartären Schotter mit überwiegend braunen Aueböden (Vega) und Auengleyen. Unter heutigen Verhältnissen zeigt sich eine hartholzaeähnliche Vegetation (*Quercus Ulmetum*) mit weichholzaeähnlicher Vegetation entlang der Gewässer (Gewässerdirektion südlicher Oberrhein/Hochrhein, 2000); Jürgen Kreuzwieser, persönliche Mitteilung).

Der Boden wurde luftgetrocknet und bei Raumtemperatur gelagert. Die Korngrößenzusammensetzung in Prozent wurde am Institut für Bodenkunde und Waldernährung, Fakultät der Forstwissenschaften an der Georg-August-Universität Göttingen, durchgeführt. Der N- und C-Gehalt der Böden wurde durch das Routinelabor des Fachbereichs Chemie der Philipps-Universität Marburg analysiert.

Für das Inkubationsexperiment wurden weitere Bodenproben als Bodenkerne (Cores, 12 cm) im Oktober 2002 feldfrisch mit Hilfe von Plastikröhren (Ø 3,6 cm) in dem Gebiet der Polder Altenheim in der Nähe eines Pappelbestandes gestochen. Die Röhren wurden unter vorsichtigem Drehen aus dem Boden gezogen und mit Gummistopfen verschlossen und bis zur Weiterverarbeitung bei 4°C gelagert. Das Bodenmaterial aus drei Bodenkernen (2 - 12 cm) wurde ohne die Streu-Auflage (0 – 2 cm) homogenisiert. In Tabelle 1 sind charakteristische Eigenschaften der verwendeten Böden dargestellt.

**Tabelle 1:** Beschreibung der untersuchten Böden.

Proben- entnahme	Textur	Sand- gehalt [%]	Schluff [%]	Ton [%]	pH	C [%]	N [%]	Versuchs- reihe
2000	Lehm	39,7	45,1	15,2	nb	5,60	0,34	M
2002	sandiger Lehm	53,7	39,5	6,8	7,5	4,13	0,07	M, I
2002 (Cores)	nb	nb	nb	nb	7,7	7,04	0,32	I

nb: nicht bekannt

M: Mikrokosmos

I: Inkubationsexperiment

### 1.2.2. Herstellung der Pappelmikrokosmen

Die Untersuchungen dieser Arbeit wurden mit 19 Wochen alten Hybrid-Pappelpflanzen (*Populus tremula* x *P. alba*) durchgeführt, welche in einem Gewächshaus in Freiburg gezogen wurden (Kreuzwieser et al., 2000; Kreuzwieser et al., 1999a). Die verwendeten Pflanzen wurden mittels Mikropropagation, wie von Strohm und Mitarbeitern (Strohm et al., 1995) beschrieben, amplifiziert. Acht Wochen alte Pflanzen wurden von sterilen Agarkulturen in Plastiktöpfe (12x10x10 cm) überführt. Diese enthielten als Substrat eine Mischung aus Perlite, Sand und Pflanzerde (2/1/1 [v/v/v]). Nach weiteren fünf Wochen wurden die Pflanzen (ca. 10 cm Höhe) in 12 l Plastiktöpfe auf Standortboden aus dem Jahr 2000 umgetopft. In das obere Drittel der Erde wurde ein Langzeitdünger hinzugegeben (36 g/Topf, Osmocote Plus, Bayer, Leverkusen). Die Pflanzen wurden täglich mit Leitungswasser gegossen und im Gewächshaus (Lufttemperatur ca. 20 ± 3°C, relative Luftfeuchtigkeit 70 ± 10 %) mit einem definierten Hell/Dunkel-Rhythmus (16 h Licht) inkubiert. Gegen den Befall von pathogenen Pilzen wurden die Pflanzentriebe einmal im Monat mit einem Fungizid behandelt (Netz-Schwefelit, Neudorff, Freiburg).

Nach weiteren drei Wochen wurden die Pappelpflanzen (ca. 30 cm Höhe) für die Flutungsexperimente samt Topf in eine Plastikwanne (50 cm Höhe) gestellt. Diese wurde mit Leitungswasser gefüllt, so dass die Bodenoberfläche ca. 5 cm überdeckt wurde.

Nach einer Kultivierungszeit von insgesamt 19 Wochen, beginnend mit der Mikropropagation, wurden die Proben entnommen. Die ungefluteten Pappelpflanzen

wiesen zu diesem Zeitpunkt eine Höhe von ca. 50 cm auf, die gefluteten Pflanzen nach einer Flutungszeit von drei Wochen eine Höhe von ca. 35 cm.

Für die Inkubationsexperimente (Bodenaufschlammungen) wurde Standortboden aus dem Jahre 2002 verwendet. In diesem Fall stammte der geflutete Boden aus Pappelmikrokosmen, welche eine Woche geflutet waren.

### **1.2.3. Definition der Habitate und Probennahme**

Für die molekulare Charakterisierung mikrobieller Lebensgemeinschaften im Auenboden und an Pappelwurzeln wurden Proben aus drei unterschiedlichen Kompartimenten des Mikrokosmos-Habitats, aus zwei gefluteten und drei ungefluteten Mikrokosmen, untersucht.

## LÖSUNGEN UND MATERIALIEN

<u>PBS-Puffer:</u>		Endkonzentration
NaCl	8,00 g/l	137,0 mM
KCl	0,20 g/l	2,7 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,44 g/l	10,0 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,20 g/l	1,7 mM
pH 7,0 - 7,2		

## DURCHFÜHRUNG

### Undurchwurzelter Boden („bulk soil“)

Diese Bodenfraktion wurde jeweils aus dem undurchwurzelten Randbereich des Pflanztopfes entnommen. Im Falle des gefluteten Bodens wurde zunächst das Flutungswasser entfernt. Mit einer sterilen 50 ml Spritze, von welcher die Spitze entfernt worden war, wurden zwei Bodenkerne aus dem Boden gestochen (Entnahme mindestens 2 cm unterhalb der Bodenoberfläche), welche in einer Kristallisierschale vereinigt und mit einem Spatel durchmischt wurden. Anschließend wurden die Bodenproben in einem sterilen 50 ml Reaktionsgefäß aufbewahrt.

Rhizosphärenboden

Rhizosphärenboden war der Boden, welcher sich nach dem Herausziehen der Pappelwurzel aus dem Boden ohne mechanische Behandlung abtrennen ließ. Dazu wurden die Pappelpflanzen direkt oberhalb der Bodenoberfläche abgeschnitten und die Wurzeln sorgfältig freigelegt. In den gefluteten Ansätzen wurde zuvor das Wasser aus den Pflanztöpfen entfernt. Die Erde um die Pappelwurzeln wurde mit wenig dest. H<sub>2</sub>O abgelöst, in einer Kristallisierschale vereinigt, mit einem Spatel durchmischt und anschließend in einem sterilen 50 ml Reaktionsgefäß gesammelt.

Rhizoplane (Pappelwurzel)

Die Wurzeln der Pappelpflanzen wurden zunächst mit dest. H<sub>2</sub>O sorgfältig von Bodenpartikeln befreit und anschließend mit PBS gewaschen. Mit einer Schere wurden die Wurzeln in ca. 5 - 10 mm lange Stücke geschnitten und in einem sterilen 50 ml Reaktionsgefäß aufbewahrt.

Alle Proben wurden auf Eis transportiert und langfristig bei -20°C gelagert. Eine Zusammenfassung des molekular analysierten Materials der Pappelmikrokosmen ist Tabelle 2 zu entnehmen.

**Tabelle 2:** Boden und Pflanzenmaterial. Dabei bedeutet U = ungeflutet, G = geflutet, BS = bulk soil, RH = Rhizosphäre und RP = Rhizoplane.

Pflanzenbezeichnung	Flutung	untersuchtes Habitat
1 U	nein	BS1 U, RP1 U
2 U	nein	BS2 U, RH2 U, RP2 U
3 U	nein	BS3 U, RH3 U, RP3 U
1 G	ja	BS1 G, RH1 G, RP1 G
2 G	ja	BS2 G, RH2 G, RP2 G

## **2. Inkubationsexperiment**

### **2.1. Ansatz der Bodenaufschlammungen**

Für die Bodenaufschlammungen wurde Boden („bulk soil“) aus ungefluteten und gefluteten (eine Woche) Pappelmikrokosmen, sowie aus feldfrischen Bodenkernen (s. Tabelle 1 und II.1.2.) verwendet. Die Bodenproben aus fünf ungefluteten oder gefluteten Mikrokosmen, sowie drei Bodenkernen, wurden jeweils in einem Becherglas vereinigt, gut gemischt und im feuchten Zustand auf eine Korngröße von  $\leq 2$  mm (Retsch, Haan) gesiebt. Die Bodenaufschlammungen wurden in 60 ml Serumflaschen mit feuchtem Boden entsprechend 5 g Trockengewicht (Mikrokosmos-Proben) oder 2,5 g Trockengewicht (Cores) angesetzt. Mit sterilem, anoxischem, bidestilliertem Wasser wurde bis auf 10 g bzw. 5 g aufgefüllt. Die Probengefäße wurden mit Butylgummi-Stopfen verschlossen, die Aufschlammungen 10 min mit  $N_2$  begast und statisch bei 25°C im Dunkeln inkubiert. Jeweils drei parallele Flaschen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten geöffnet und analysiert.

### **2.2. Probenentnahme für chemische und physikalische Analysen**

#### **2.2.1. Gasproben**

Vor jeder Gasanalyse wurden die Inkubationsgefäße von Hand geschüttelt um ein Gleichgewicht zwischen Bodensuspension und Gasphase herzustellen. Die Entnahme des Probenvolumens aus dem Gasraum über den Bodenaufschlammungen (0,5 ml für  $CH_4/CO_2$ -Messung und 0,25 ml für  $H_2$ -Messung) erfolgte unsteril mit einer gasdichten „Pressure-Lock“ Spritze (SEG GmbH, Weiterstadt) unmittelbar vor der Analyse im Gaschromatographen.

#### **2.2.2. Flüssigproben**

Nach Schütteln der Inkubationsgefäße und anschließendem Entfernen der Butyl-Stopfen wurden die Flüssigproben mittels einer Pipette aus den Bodenaufschlammungen entnommen. Die Proben (1 ml) für die HPLC- und IC-Messungen wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei  $-20^\circ C$  gelagert. Für die Fe(II)-Bestimmung wurden die Bodenaufschlammungsproben (0,5 ml) in 4,5 ml 0,5 M HCl gegeben und bis zur

kolorimetrischen Messung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert (s. II.3.5.). Die Proben für die molekularen Analysen (0,5 ml) wurden bis zu ihrer Verwendung in 2 ml Schraubdeckelgefäßen bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3. Chemische und physikalische Methoden

#### 3.1. Gaschromatographische Analysen

##### 3.1.1. Messung von Methan und Kohlendioxid

$\text{CH}_4$  und  $\text{CO}_2$  wurden an einem GC-8A Gaschromatographen (Shimadzu, Kyoto, Japan; Tabelle 3) mit Flammenionisationsdetektor (FID) gemessen (Roy et al., 1997).  $\text{CO}_2$  wurde nach Reduktion im Methanisator als  $\text{CH}_4$  detektiert. Die Eichungen wurden mit einem Gasgemisch aus jeweils 1000 ppm<sub>v</sub>  $\text{CO}$ ,  $\text{CO}_2$  und  $\text{CH}_4$  in  $\text{N}_2$  durchgeführt.

**Tabelle 3:** Betriebsdaten des Gaschromatographen GC-8A.

Säule	2 m Edelstahlsäule, $\text{Ø}$ 1/8'' Trägermaterial: Porapak QS 50/100 mesh
Trägergas	Wasserstoff 5.0
Detektor	FID, Brenngase: FID-Mix (mit $\text{N}_2$ und $\text{O}_2$ ) und $\text{H}_2$ , Quenchgas: Stickstoff 5.0
Temperatur	Injektor, Säule: $40^{\circ}\text{C}$ ; Detektor: $110^{\circ}\text{C}$
Integrator	C-R A6 (Shimadzu, Kyoto, Japan)
Nachweisgrenze	1 ppm <sub>v</sub> $\text{CH}_4$
Methanisator	Eigenbau, Säule: NiCr-Ni-Katalysator (Chrompack, Middelburg, Niederlande), 20 cm Edelstahlsäule, $\text{Ø}$ 1/8'', Betriebstemperatur: $350^{\circ}\text{C}$

##### 3.1.2. Messung von Wasserstoff

Niedrige  $\text{H}_2$ -Konzentrationen ( $<100$  ppm<sub>v</sub>) wurden an einem Gaschromatographen mit Reduktivgasdetektor (RGD2, Trace Analytical, Techmaton Vertriebsgesellschaft für Umweltanalytik, Düsseldorf; Tabelle 4) gemessen. Die Eichungen wurde mit 50 ppm<sub>v</sub>  $\text{H}_2$  in  $\text{N}_2$  durchgeführt.

**Tabelle 4:** Betriebsdaten des RGD2-Gaschromatographen.

Säule	1,4 m Edelstahlsäule, Ø 1/2'' Trägermaterial: Molsieb 5 Å, 80 - 100 mesh
Trägergas	Synthetische Luft
Detektor	HgO-Konversions-Detektor
Temperatur	Säule: 65°C; Detektor: 280°C
Integrator	C-R A6 (Shimadzu, Kyoto, Japan)
Nachweisgrenze	1 ppm <sub>v</sub> H <sub>2</sub>

### 3.2. Berechnungen

Zur Berechnung des gebildeten CH<sub>4</sub> bzw. CO<sub>2</sub> wurden die am GC gemessenen Konzentrationen [ppm<sub>v</sub>] in die Stoffmenge [μmol] umgerechnet und auf die Trockensubstanz des Bodens bezogen.

$$F_x = \frac{M_v \times p \times (V_g + V_w \times \alpha)}{R \times T \times TS} \quad [1]$$

- F<sub>x</sub>: CH<sub>4</sub>- bzw. CO<sub>2</sub>-Menge [μmol CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> TS] bzw. [μmol CO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> TS]  
M<sub>v</sub>: Mischungsverhältnis CH<sub>4</sub> bzw. CO<sub>2</sub> [bar] (1 ppm<sub>v</sub> = 1x10<sup>-6</sup> bar)  
p: Druck [bar]  
V<sub>g</sub>: Volumen des Gasraumes im Reaktionsgefäß [l]  
V<sub>w</sub>: Volumen der wässrigen Phase im Reaktionsgefäß [l]  
α: Bunsenkoeffizient (Werte aus Encyclopedie des Gaz – L'Air Liquide)  
R: allgemeine Gaskonstante (0,083144 [l bar K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>])  
T: Temperatur bei 25°C (298,15 K)  
TS: Trockensubstanz [g]

Die gemessenen H<sub>2</sub>-Konzentrationen [ppm<sub>v</sub>] wurden in den jeweiligen Partialdruck (Pa) umgeformt.

$$p = \frac{M_v}{10} \quad [2]$$

M<sub>v</sub>: Mischungsverhältnis H<sub>2</sub> [bar] (1 ppm<sub>v</sub> = 1x10<sup>-6</sup> bar = 0,1 Pa)

p: Druck [Pa] (1 bar = 10<sup>5</sup> Pa)

### 3.3. Analyse organischer Säuren und Alkohole

Die Konzentrationen von organischen Säuren und Alkoholen im Porenwasser wurden mittels HPLC (High Performance Liquid Chromatography) (Sykam, Fürstfeldbruck; Tabelle 5) bestimmt (Krumböck und Conrad, 1991). Vor der Analyse wurden die eingefrorenen Proben aufgetaut, zentrifugiert (10 min, 18000 g, 25°C) und das Porenwasser nach Filtration (0,2 µm Porengröße, Rezist 13/0,2 PTFE, Schleicher & Schuell, Dassel) in die Analyse eingesetzt. Als Eichstandard diente eine 1 mM Mischung der Natriumsalze von Lactat, Formiat, Acetat, Propionat, Butyrat, Valerat und Caproat und Ethanol. Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit dem Programm PEAK SIMPLE (Version 2.66, SRI-Instruments, Torrence, U.S.A).

**Tabelle 5:** Betriebsdaten der HPLC-Anlage.

Säule	30 cm Edelstahlsäule, Ø 7,8 mm
Pumpe	SP1000
Säulenofen	S4110
Trägermaterial	ORH-801 Ion-exclusion form, H <sup>+</sup> (Interaction, Vertrieb Schambeck SFD GmbH, Bad Honnef)
Fließmittel	1 mM H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Flussrate	0,5 ml/min
Detektor	Brechungsindex- (RI-) Detektor 2000F (Schambeck, Bad Honnef), Betriebstemperatur 40 °C UV-Detektor Linear UVIS 200 (Linear, Reno, U.S.A.) Wellenlänge 205 nm
Ofentemperatur	60°C
Probenaufgeber	Jasco 851-AS (Jasco, Japan)
Nachweisgrenze	3 µM

### 3.4. Analyse anorganischer Ionen

Zur Messung von SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> und NO<sub>3</sub><sup>-</sup> wurde ein Ionenchromatograph (IC) (Sykam, Fürstenfeldbruck; Tabelle 6) eingesetzt (Bak et al., 1991). Vor der Analyse wurden die eingefrorenen Proben aufgetaut, zentrifugiert (10 min, 18000 g, 25°C) und das Porenwasser nach Filtration (0,2 µm Porengröße, Rezist 13/0,2 PTFE, Schleicher & Schuell, Dassel) in die Analyse eingesetzt. Sulfat wurde über einen Leitfähigkeitsdetektor, Nitrat am UV/VIS-Detektor bestimmt. Als Eichstandard diente eine 1 mM Mischung der Natriumsalze von Chlorid, Bromid, Nitrat, Phosphat und Sulfat. Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit dem Programm PEAK SIMPLE (Version 2.66, SRI-Instruments, Torrence, U.S.A.).

**Tabelle 6:** Betriebsdaten der IC-Anlage.

Säule	6 cm Edelstahlsäule, Ø 4,6 mm
Pumpe	S1121
Säulenofen	S4110
Trägermaterial	Styrol/Divinobenzol, 10 µm Korngröße
Fließmittel	5 mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> + 1 ml/l Modifier <sup>a</sup>
Flussrate	1,5 ml/min
Detektor	Leitfähigkeitsdetektor S3111 UV/VIS Detektor Linear UVIS 204 (Linear, Reno, U.S.A.)
Ofentemperatur	70°C
Probenaufgeber	S5200 (Schambeck SFD GmbH, Bad Honnef)

<sup>a</sup> 1 g 4-Hydroxybenzonnitril/100 ml Methanol

### 3.5. Kolorimetrische Bestimmung von Eisen (II)

Zur kolorimetrischen Bestimmung der Fe (II)-Konzentrationen in den Bodenaufschlammungen wurde die Ferrozin-Methode angewendet (Achnich et al., 1995). Das Reagenz Ferrozin<sup>®</sup> (3-[2-Pyridyl]-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-4'-4''-disulfonsäure Mononatriumsalz) wurde 0,1 % [w/v] in 200 mM HEPES-Puffer (N-[2-Hydroxyethyl] piperazine N'-[2-ethansulfonsäure]) gelöst und mit NaOH auf pH 7 eingestellt. Vor der Analyse wurden die in 4,5 ml 0,5 M HCl eingefrorenen Proben aufgetaut (s. II.2.2.2.). Die Extraktion erfolgte für 24 h bei 25°C. Anschließend wurden 100 µl des Extraktes (oder einer 1/10 Verdünnung davon) mit 1 ml Ferrozin<sup>®</sup>-Reagenz vermischt, zentrifugiert (5 min, 20000 g, 25°C) und die Extinktion des Überstandes bei 562 nm in einem Uvikon 930 Spektrophotometer (Kontron Instruments GmbH, Stuttgart) gemessen. Als Blindwert wurde die Extinktion von 1 ml Ferrozin<sup>®</sup>-Reagenz plus 100 µl 0,5 M HCl bestimmt und von allen gemessenen Werten subtrahiert. Als Eichstandard diente eine Verdünnungsreihe einer 4 mM Fe(II) (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O-Lösung in 0,5 M HCl.

### 3.6. Bestimmung des pH-Wertes

Der pH-Wert in den Bodenaufschlammungen wurde mit einem pH-Meter (Microprozessor pH Meter 539, Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim) mit einer pH-Elektrode (InLab 427, pH 2 bis 11, Mettler Toledo, Gießen) direkt

nach dem Öffnen der Serumflaschen gemessen. Die Eichung erfolgte vor der Messung mit Eichpuffern (Technische Puffer, WTW, Weilheim) der pH-Werte 7 und 4.

### 3.7. Bestimmung des C/N-Gehaltes

Zur Charakterisierung der untersuchten Böden wurde das C/N-Verhältnis bestimmt. Dieses stellt den Quotienten aus Gesamtkohlenstoff ( $C_{org}$ ) und Gesamtstickstoff ( $N_t$ ) dar (Scheffer und Schachtschabel, 2002). Getrocknete Proben wurden mit einem Mörser zerkleinert und homogenisiert. Der Kohlenstoff- und Stickstoffanteil der Bodenproben wurde durch das Routinelabor des Fachbereichs Chemie der Philipps-Universität Marburg analysiert.

### 3.8. Bestimmung des Trockengewichts

Die Bestimmung des Trockengewichts des Bodens erfolgte gravimetrisch (Schlichting et al., 1995). Es wurden jeweils 2 g Boden (Feuchtgewicht, je drei Parallelen) in Aluminiumschalen eingewogen und für 36 h bei 105°C in einem Trockenschrank (Heraeus Instruments, Hanau) bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Nachdem die Proben über ein Trockenmittel in einem Exsikkator abgekühlt waren, wurden sie erneut gewogen. Die Differenz des Netto- und Bruttogewichts der Aluminiumschalen ergab das Gewicht der Trockensubstanz.

$$TS = B - N \quad [3]$$

TS: Gewicht der Trockensubstanz [g]

B: Bruttogewicht des Gefäßes mit getrockneter Einwaage [g]

N: Nettogewicht des Gefäßes [g]

Mit Hilfe des Trockengewichtes kann der Wassergehalt (WG) der Probe in Prozent berechnet werden (Schinner et al., 1991):

$$\frac{\text{Einwaage} - TS}{\text{Einwaage}} \times 100 = \% \text{ WG} \quad [4]$$

#### 4. Molekularbiologische Methoden

##### 4.1. Extraktion von DNA

##### 4.1.1. Extraktion von Umwelt-DNA aus Boden und Pflanzenmaterial

Zur Extraktion der Gesamt-DNA aus Boden und Wurzelmaterial wurde eine direkte Lyse-Technik angewandt, bei welchem die Mikroorganismen direkt in dem zu untersuchenden Material aufgeschlossen wurden. Die Methode wurde nach Moré et al., (1994) modifiziert und von Henckel et al., (1999) beschrieben.

#### LÖSUNGEN UND MATERIALIEN

##### SDS-(Natriumdodecylsulfat)-Lösung:

SDS	10 % [w/v]
Tris-HCl (pH 8,0)	0,5 M
NaCl	0,1 M

Natrium-Phosphat-Puffer: 120 mM  
pH 8,0

Tris-Lösung: 10 mM  
pH 8,0

Ammonium-Acetat-Lösung: 7,5 M  
(Fluka, Buchs, Schweiz), steril filtriert

100 % Isopropanol

70 % Ethanol

Zirkonium/Silizium Kugeln (Ø 0,1 mm; Biospec Products Inc., Bartlesville, OK, U.S.A.)

2 ml Schraubdeckelreaktionsgefäße

Zellmühle (FastPrep™ FP 120, Bio 101, Savant Instruments Inc., Farmingdale, NY, U.S.A.)

DNA Speed Vac® DNA 110 (Savant Instruments, Inc., Holbrook, NY, U.S.A.)

## DURCHFÜHRUNG

0,7 g hitzesterilisierte (180°C für 6 h) Zirkonium/Silizium Kugeln wurden in 2 ml Schraubdeckelreaktionsgefäße gegeben. Es folgte die Zugabe von 700 µl Natrium-Phosphat-Puffer (120 mM, pH 8,0) und 230 µl SDS-Lösung. Anschließend wurde das entsprechende Probenmaterial in das Reaktionsgefäß hinzugegeben (Boden: 1 g FG, Bodenaufschlammung: 0,5 g FG; Rhizoplane: 0,5 g FG) und durch vortexen homogenisiert. Der mechanische Aufschluss der Zellen wurde in der Zelmühle für 45 s bei einer Geschwindigkeit von  $6,5 \text{ m s}^{-1}$  durchgeführt. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße auf Eis gestellt. Zur Sedimentation der Festbestandteile wurde das Homogenisat für 10 min bei 20000 g und Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand abgenommen und in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Das aus Boden und Zirkoniumkugeln bestehende Pellet wurde ein zweites Mal in bis zu 600 µl Natrium-Phosphat-Puffer (120 mM, pH 8,0) resuspendiert. Nach erneuter Zelllyse und einer weiteren Zentrifugation wurde der Überstand der zweiten Extraktion mit dem der ersten vereinigt (ca. 1,2 ml). Proteine, Zellbestandteile und andere Verunreinigungen wurden durch einen Präzipitationsschritt von 10 - 15 min auf Eis mit 0,4 Volumenanteilen Ammonium-Acetat-Lösung (7,5 M) aus dem Rohextrakt gefällt. Nach einer Zentrifugation von 10 min bei 20000 g und 4°C wurde der Überstand in zwei separate 1,5 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt. Die DNA wurde jeweils mit 0,7 Volumenanteilen 100 %igem Isopropanol und anschließender Zentrifugation von 60 min bei 20000 g und Raumtemperatur gefällt. Der Überstand wurde sofort dekantiert. Abschließend wurde das DNA-Pellet mit 500 µl eiskaltem 70 %igem Ethanol gewaschen. Es folgte eine weitere Zentrifugation von 10 min bei 20000 g und 4°C. Das Pellet wurde für 1 - 3 min in der „Speed Vac“ getrocknet und danach in 50 µl Tris-Lösung (10 mM) aufgenommen. Nach dem Resuspendieren wurden die zusammengehörenden Überstände in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß vereinigt und der DNA-Extrakt bei -20°C aufbewahrt.

Zur Überprüfung der Extraktion wurden 5 µl des DNA-Extraktes mittels Gelelektrophorese (s. II.4.3.) auf einem 1 %igen 1× TAE-Agarosegel kontrolliert.

#### 4.1.2. Extraktion von DNA aus *E.coli*-Klonen

##### LÖSUNGEN UND MATERIALIEN

Tris-EDTA (TE)-Puffer (Sambrook et al., 1989):

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

Heizblock DRI-Block<sup>®</sup> DB·2D (Techne LTD., Duxford Cambridge, U.K.)

##### DURCHFÜHRUNG

Der Zellaufschluss der *E. coli*-Klone erfolgte durch Hitze. Zellmaterial des betreffenden *E. coli*-Klons wurde mit einem sterilen Zahnstocher von der Nährmediumagarplatte in ein mit 25 µl sterilem TE-Puffer gefülltes Reaktionsgefäß (0,5 ml) überführt und in Suspension gebracht. Die Zellsuspension wurde für 10 min bei 100°C im Thermoblock erhitzt. Durch Zentrifugation (15 min bei 20000 g und 4°C) wurden Zelltrümmer pelletiert. 20 µl des DNA-haltigen Überstandes wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

#### 4.2. Reinigung der Umwelt-DNA von Huminsäuren

Aufgrund ähnlicher chemischer Eigenschaften werden aus den Umweltproben zusammen mit der DNA auch Huminsäuren extrahiert. Diese können die in vitro DNA-Synthese in der PCR inhibieren und müssen deshalb entfernt werden. Die aus dem Rhizosphärenboden und der Rhizoplane extrahierte DNA enthielt geringe Anteile an Huminsäuren. Nach einer Standardreinigung mittels QIAquick<sup>™</sup>-Säulen nach Herstelleranweisung und Verdünnung der DNA (bei Bedarf bis 1:100 in PCR-Wasser) war eine Amplifikation mittels PCR möglich.

Der „bulk soil“-Boden enthielt dagegen hohe Huminsäurekonzentrationen. Hier wurde die Reinigung des Extraktes durch Absorption der Huminstoffe an Polyvinylpyrrolidon (PVPP) durchgeführt (Henckel et al., 2000; Berthelet et al., 1996; Holben et al., 1988).

## LÖSUNGEN UND MATERIALIEN

### Tris-EDTA (TE)-Puffer (Sambrook et al., 1989):

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

### Tris-Lösung: 10 mM

pH 8,0

HCl (3M)

PVPP (Polyvinylpolypyrrolidon, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)

Chromatographie-Säulen (Micro Bio-Spin<sup>®</sup> Chromatography Columns, Bio-Rad, München)

## DURCHFÜHRUNG

Die PVPP-Suspension wurde wie folgt vorbereitet. 7,5 g PVPP wurden in 100 ml 3 M HCl für 12 - 16 Stunden durch Rühren mit einem Magnetrührer in Suspension gebracht und anschließend in 10 mM TE-Puffer (pH 8,0) äquibriert (Holben et al., 1988). Nachdem sich das PVPP abgesetzt hatte, ersetzte man den Überstand durch TE-Puffer und ließ die Suspension 30 min rühren. Dieser Vorgang wurde mindestens fünfmal wiederholt. Die PVPP-TE-Suspension wurde mit NaOH auf einen pH-Wert von 8,0 eingestellt und bei 4°C gelagert. Jede frisch zubereitete PVPP-Suspension wurde mittels bakterieller SSU-Standard-PCR auf eine Kontamination getestet.

Die Chromatographie-Säulen wurden mit 2 - 3 ml vorbereiteter PVPP-Suspension befüllt und durch Zentrifugation (1 min, 425 g) blasenfrei gepackt. Vor Zugabe der DNA wurde die gepackte Säule zweimal mit 100 µl 10 mM Tris (pH 8,0) gewaschen (Zentrifugation 1 min, 425 g). Anschließend wurde die Säule für 2 min bei 425 g trocken zentrifugiert. Die Chromatographie-Säule wurde in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß gestellt. 100 µl der in 10 mM Tris gelösten DNA wurden auf die Säulenmatrix pipettiert und für 1 min bei 425 g durch die PVPP-Matrix zentrifugiert. Bei Bedarf wurde die „bulk soil“-DNA für die Amplifikation 1:10 in PCR-Wasser verdünnt.

### 4.3. Agarosegelelektrophorese

#### LÖSUNGEN UND MATERIALIEN

Agarose (SeaKem LE, Biozym, Hess.Oldendorf)

#### Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer (1×):

(eurobio, Les Ulis Cedex B, Frankreich)

Tris 40 mM

Natriumacetat 20 mM

EDTA 1 mM

pH 8,3

#### Auftragspuffer:

Saccharose 40,00 % [w/v]

Bromphenolblau 0,25 % [v/v]

Xylencyanol FF 0,25 % [v/v]

Größenstandard („Smart Ladder“, EUROGENTEC, Seraing, Belgien)

Ethidiumbromidlösung 0,001 % [v/v] in H<sub>2</sub>O

Videokamera Gel Jet Imager (INTAS, Göttingen)

#### DURCHFÜHRUNG

Aliquots aller PCR-Amplifikate der extrahierten Umwelt-DNA sowie der Klon-DNA wurden zur Abschätzung der Qualität und Konzentration der DNA auf ein 1 % [w/v] 1× TAE-Agarosegel aufgetragen. Die Aliquots wurden zuvor mit 0,2 Volumenanteilen Auftragspuffer gemischt. Als Größen- und Konzentrationsstandard wurde parallel „Smart Ladder“ aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in einer mit 1× TAE-Puffer gefüllten Gelkammer bei 120 V und einer Laufzeit von ca. 1 h. Das Gel wurde in Ethidiumbromidlösung für ca. 15 min gefärbt und mit einer Videokamera aufgenommen.

#### **4.4. Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen**

##### LÖSUNGEN UND MATERIALIEN

Eppendorf BioPhotometer (Eppendorf AG, Hamburg)

##### DURCHFÜHRUNG

Die DNA-Konzentration wurde durch Bestimmung der Absorption ( $A_{260}$ ) einer 1:16 Verdünnung in dest.  $H_2O$  bei 260 nm in einem Biophotometer ermittelt. Wobei die Konzentration doppelsträngiger DNA nach folgender Formel berechnet wurde (Sambrook et al., 1989):

$$C [\text{ng } \mu\text{l}^{-1}] = 50 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times A_{260} \quad [5]$$

#### **4.5. PCR (Polymerase Chain Reaction – Polymerase Kettenreaktion)**

Die PCR (Polymerase Chain Reaction) ermöglicht die spezifische Vermehrung von definierten Genfragmenten (16S rRNA) in Nukleinsäureextrakten (aus Bodenproben). Die erhaltenen PCR-Produkte wurden für die Klonierung (s. II.4.7.), T-RFLP- (Terminaler-Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus)-Analysen (s. II.4.6.) und Sequenzanalysen (s. II.4.8.) eingesetzt. Bei jeder PCR wurde als Negativkontrolle ein Reaktionsansatz mit Wasser anstelle von Matrizen-DNA mitgeführt. Als Positivkontrolle diente ein DNA-Extrakt mit dem zu amplifizierenden Zielmolekül.

##### **4.5.1. Primer**

Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer sind in Tabelle 7 aufgeführt. Alle Primer-Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) bezogen.

**Tabelle 7:** Beschreibung der verwendeten Primer zur Amplifikation der 16S rRNA-Gene von *Bacteria* und *Archaea* mittels universeller PCR (=PCR), für die T-RFLP-Analyse (=T-RFLP), die Sequenzierung (=Seq) und zur Amplifikation des Vektorinserts von Klonen (=Klon). Die Primer-Bezeichnungen entsprechen den korrespondierenden Positionen der 16S rRNA-Gensequenz von *E.coli* (Brosius et al., 1978). K=G/T; M=A/C; S=G/C; W=A/T; Y=C/T. f: Vorwärtsprimer, b: Rückwärtsprimer, \*: mit 5' 6-Carboxyfluorescein (FAM) markierter Primer für die T-RFLP-Analyse.

Primer-Bezeichnung	Sequenz 5'→3'	Zielgruppe	Verwendung	Referenz
9-27f*	GAG TTT GMT CCT GGC TCA G	<i>Bacteria</i>	PCR, T-RFLP	(Weisburg et al., 1991)
1492-1512b	ACG GYT ACC TTG TTA CGA CTT	<i>Bacteria</i>	PCR, T-RFLP	(Weisburg et al., 1991)
343-357f	TAC GGG ASG CAG CAG	<i>Bacteria</i>	Seq	(Lane, 1991)
536-519b	GWA TTA CCG CGG CKG CTG	<i>Bacteria</i>	Seq	(Lane, 1991)
1115-1100b	AGG GTT GCG CTC GTT G	<i>Bacteria</i>	Seq	(Lane, 1991)
926-907f	AAC TYA AAK GAA TTG ACG G	<i>Bacteria</i>	Seq	(Lane, 1991)
A109f	ACK GCT CAG TAA CAC GT	<i>Archaea</i>	PCR, T-RFLP	(Großkopf et al., 1998a)
A934b*	GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT	<i>Archaea</i>	PCR, T-RFLP	(Großkopf et al., 1998a)
M13f	GTA AAA CGA CGG CCA G	Vektor	Klon	pGEM <sup>®</sup> -T Vector System II (Promega, Mannheim)
M13b	CAG GAA ACA GCT ATG AC	Vektor	Klon, Seq	pGEM <sup>®</sup> -T Vector System II (Promega, Mannheim)
T7f	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	Vektor	Seq	pGEM <sup>®</sup> -T Vector System II (Promega, Mannheim)

#### 4.5.2. Amplifikation der 16S rDNA

Zur Analyse der mikrobiellen Gemeinschaft des Auenbodens und der Pappelwurzeln wurden universelle Primer für die allgemeine Amplifikation der 16S rRNA-Gene eingesetzt. Diese Primer binden an hochkonservierte Sequenzbereiche des rRNA-Gens, so dass ein Großteil der Domäne *Bacteria* oder *Archaea* erfasst und ein großer Abschnitt des jeweiligen 16S rRNA-Gens amplifiziert wird. Für die Amplifikation der bakteriellen 16S rRNA-Gene wurde das Oligonukleotid-Primerpaar 9-27f und 1492-1512b (Weisburg et al., 1991), für die archaeellen 16S rRNA-Gene das Primerpaar A109f und A934b (Großkopf et

al., 1998a) verwendet. Wurden die Amplifikate in die T-RFLP-Analyse eingesetzt, war jeweils ein Primer pro Primerpaar 5'-fluoreszenzmarkiert (Tabelle 7).

Für die Amplifikation des im Vektor enthaltenen Inserts wurden Primer (M13f und M13b; s. Tabelle 7) verwendet, die komplementär zu Plasmidabschnitten sind, welche die Klonierungsregion des verwendeten Plasmidvektors pGEM<sup>®</sup>-T flankieren.

Die DNA der *E. coli*-Klone wurde wie unter II. II.4.1.2. beschrieben extrahiert und Aliquots (1 µl) in die PCR-Amplifikation eingesetzt.

### LÖSUNGEN UND MATERIALIEN

Vorwärts- und Rückwärtsprimer (MWG Biotech, Ebersberg)

10× PCR-Puffer (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

MgCl<sub>2</sub> (50mM, Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

Desoxyribonukleosidtriphosphate (Eppendorf AG, Hamburg)

*Taq*-Polymerase (*Taq* DNA Polymerase recombinant (5 U/µl), Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)

Gerät MWG-Primus 25 (MWG Biotech, Ebersberg)

QIAquick PCR Purification Kit, (QIAGEN GmbH, Hilden)

### DURCHFÜHRUNG

Die PCR-Ansätze zur Amplifikation der Umwelt-DNA wurden in einem Gesamtvolumen von 100 µl durchgeführt. Das Reaktionsgemisch für eine PCR-Reaktion enthielt 1 µl der jeweiligen Ziel-DNA, 10 µl des 10× Reaktionspuffers, 4 mM MgCl<sub>2</sub> (*Bacteria*) bzw. 2 mM MgCl<sub>2</sub> (*Archaea*) bzw. 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (M13-PCR), 200 µM von jedem Desoxynukleosidtriphosphat, 0,3 µM von jedem Primer und 1,25 U *Taq*-Polymerase. Mit sterilem H<sub>2</sub>O wurden die Ansätze auf das Endvolumen von 100 µl aufgefüllt. Das für die DNA-Amplifikation der *Bacteria* und *Archaea* verwendete Temperaturprofil ist in Tabelle 8 und das in der M13-PCR verwendete Temperaturprofil ist in Tabelle 9 wiedergegeben.

Zur Amplifikation der klonierten 16S rRNA-Gene aus aufgereinigten M13-PCR-Produkten der *E. coli*-Klone für die T-RFLP-Analyse wurde der PCR-Ansatz in einem

Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt. Das Reaktionsgemisch für eine PCR-Reaktion enthielt in diesem Fall 1 µl der jeweiligen Ziel-DNA, 5 µl des 10× PCR-Puffers, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM von jedem Desoxynukleosidtriphosphat, 0,3 µM von jedem Primer und 0,6 U *Taq*-Polymerase. Mit sterilem H<sub>2</sub>O wurden die Ansätze auf das Endvolumen von 50 µl aufgefüllt. Das Temperaturprofil dieser PCR unterschied sich von dem in Tabelle 8 beschriebenen in der Anzahl der Zyklen (18 - 22 Zyklen).

**Tabelle 8:** Temperaturprofil zur Amplifikation der bakteriellen und archaeellen 16S rRNA-Gene.

Schritt	Temperatur	Dauer	Funktion
1	94°C	2 min	Denaturierung der DNA
2a	94°C	30 s	Denaturierung
2b	52°C	30 s	Primer-Anlagerung
2c	72°C	1 min	DNA-Synthese
Schritte 2a - 2c wurden 30 - 35x wiederholt			
3b	72°C	7 min	DNA-Synthese
4	8°C	∞	Kühlprogramm

**Tabelle 9:** Temperaturprofil zur Amplifikation des Plasmidinserts.

Schritt	Temperatur	Dauer	Funktion
1	94°C	2,45 min	Denaturierung der DNA
2a	94°C	45 s	Denaturierung
2b	55°C	1 min	Primer-Anlagerung
2c	72°C	2 min	DNA-Synthese
Schritte 2a - 2c wurden 25x wiederholt			
3b	72°C	7 min	DNA-Synthese
4	8°C	∞	Kühlprogramm

Zur Überprüfung der erfolgreichen Amplifikation wurden 5 µl der erhaltenen PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese (s. II.4.3.) auf einem 1 %igen 1× TAE-Agarosegel kontrolliert.

Die 16S rDNA-Amplifikate wurden mittels QIAquick™-Säulen nach Herstelleranweisung aufgereinigt um Nukleotide und nicht gebundene Primer zu entfernen. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Ansätze bei 4°C aufbewahrt.

#### 4.6. Terminale-Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus-Analyse (T-RFLP-Analyse)

Um die Komplexität der mikrobiellen Populationen von *Bacteria* und *Archaea* in dem Habitat der Pappelmikrokosmen und des Auenbodens zu untersuchen wurde die T-RFLP-Analyse („Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism“; (Lukow et al., 2000; Chin et al., 1999a; Liu et al., 1997) als molekulare „Fingerprint“-Analyse gewählt. Diese basiert auf einer elektrophoretischen Auftrennung von Restriktionsfragmenten, welche mittels Amplifikation der 16S rRNA-Gene mit einem 5'-fluoreszenzmarkierten Vorwärts-Primer (*Bacteria*) bzw. Rückwärts-Primer (*Archaea*) (s. II.4.5.; Tabelle 7) und anschließender Restriktion erzeugt wurden. Je nach Sequenztyp schneidet das Restriktionsenzym die DNA in verschieden lange Fragmente, welche jeweils für einen Genotyp bzw. eine Gruppe von Genotypen charakteristisch sind. Der Einsatz eines automatischen Sequenziergerätes ermöglicht die spezifische Detektion des fluoreszenzmarkierten terminalen Restriktionsfragments und somit die Analyse komplexer mikrobieller Gemeinschaften.

##### 4.6.1. Restriktion der 16S rDNA-Amplifikate

Die 16S rDNA-Amplifikate der *Bacteria* wurden mit dem Restriktionsenzym *HhaI* (eine Endonuklease von *Haemophilus haemolyticus*) und die 16S rDNA-Amplifikate der *Archaea* mit dem Restriktionsenzym *TaqI* (eine Endonuklease von *Thermophilus aquaticus*) verdaut. *HhaI* schneidet an der Erkennungssequenz GCG↑C und *TaqI* an der Erkennungssequenz T↑CGA, wobei der Pfeil die Schnittstelle markiert.

#### LÖSUNGEN UND MATERIALIEN

H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)

Restriktionsenzym *HhaI* (*Bacteria*) oder *TaqI* (*Archaea*) (Promega, Mannheim)

Heizblock DRI-Block<sup>®</sup> DB·2D (Techne LTD., Duxford Cambridge, U.K.)

10x Reaktionspuffer inkl. BSA (Promega, Mannheim):

10x Puffer	100 µl
BSA (10 µg/µl)	10 µl

## DURCHFÜHRUNG

Der Restriktionsansatz enthielt ca. 60 ng (*Bacteria*) bzw. 40 ng (*Archaea*) PCR-Produkt (s. II.4.5.2.), 1,1 µl 10× Reaktionspuffer inkl. BSA, 9 U des Restriktionsenzym *HhaI* (*Bacteria*) bzw. *TaqI* (*Archaea*) und wurde mit H<sub>2</sub>O auf ein Reaktionsvolumen von 10 µl aufgefüllt. Die Reaktion verlief 3 h bei 37°C (*Bacteria*) bzw. 65°C (*Archaea*) in einem Heizblock. Die Restriktionsansätze der PCR-Produkte der Klon-DNA wurden bei Bedarf vor der Elektrophorese mit 10 mM Tris-Lösung 1:3 verdünnt.

### **4.6.2. Elektrophorese**

Die Restriktionsfragmente wurden in einem 6 %igen Polyacrylamidgel, welches nach Herstelleranweisung gegossen wurde, unter denaturierenden Bedingungen (8 M Harnstoff) aufgetrennt.

## LÖSUNGEN UND MATERIALIEN

### Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer (10×):

Endkonzentration

(Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

Tris		1,0 M
Borsäure		0,9 M
EDTA		0,01 M
pH 8,3 - 8,5		

### Gelzusammensetzung:

Endkonzentration

Harnstoff	15 g	8 M
LiChrosolv <sup>®</sup> -H <sub>2</sub> O	11 ml	
10× TBE-Puffer	3 ml	
Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	5 ml	6 %
pH 7,0 - 7,2		

Harnstoff, Urea (Merck, Darmstadt)

LiChrosolv<sup>®</sup>-H<sub>2</sub>O (Merck, Darmstadt)

Acrylamid/Bisacrylamid (29:1), (Bio-Rad, München)

TEMED (Bio-Rad, München)

Ammoniumpersulfat-Lösung (APS) 10 % [w/v] in dest. H<sub>2</sub>O

Isopropanol

Formamide Loading Dye (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg)

interner Längenstandard (GeneScan™-1000 ROX™ Size Standard, Applied Biosystems, Weiterstadt)

Heizblock DRI-Block® DB·2D (Techne LTD., Duxford Cambridge, U.K.)

automatisches Sequenziergerät (Modell 373 DNA Sequencer, Applied Biosystems, Weiterstadt)

GeneScan Analysis Software Version 1.1 (Applied Biosystems, Weiterstadt)

### DURCHFÜHRUNG

Die Komponenten für das Polyacrylamidgel wurden wie in der oben beschriebenen Gelzusammensetzung zusammengegeben.

Die Polymerisierungsreaktion wurde durch Zugabe von 175 µl frisch angesetzter 10 %iger APS-Lösung und 17 µl TEMED gestartet. Die Zeit für die Polymerisierung betrug ca. 2 Stunden.

Vor dem Auftragen auf das Gel wurden 2,5 µl des verdauten PCR-Produktes mit 1,7 µl Formamide Loading Dye und 0,8 µl des internen Längenstandards vermischt, für 3 min bei 95°C im Heizblock denaturiert und danach sofort auf Eis gestellt.

Die Elektrophorese im automatischen Sequenziergerät wurde bei 2500 V, 30 W, 40 mA und einer Laufzeit von 6 h durchgeführt.

#### **4.6.3. Auswertung der T-RFLP-Analyse**

Die Auswertung der fluoreszenzmarkierten terminalen Fragmente erfolgte computergestützt (GeneScan Analysis Software Version 2.1, Applied Biosystems, Weiterstadt). Anhand des internen Längenstandards, welcher ROX-markierte DNA-Fragmente mit definierter Länge enthält, konnte die Größe eines jeden detektierten Fragments bestimmt werden. Gleichzeitig ermöglicht die Software die Intensität (Höhe) des einzelnen Fluoreszenzsignals eines Fragments zu bestimmen. Einzelne T-RFs wurden

als identisch angesehen und als eine OTU („operational taxonomic unit“) zusammengefasst wenn ihre jeweiligen Längen in einem Bereich von  $\pm 1 - 2$  bp zwischen verschiedenen Gelen und/oder Spuren des selben Gels variierten. Die Summe aller Peakhöhen eines Elektropherogramms diente als Maß für die Menge an eingesetzter DNA. Die auf diesem Wege ermittelten Mengen an eingesetzter DNA aller Elektropherogramme eines Experimentes wurden mit Hilfe eines Standardisierungsfaktors einander angeglichen. Dieser Faktor ergibt sich aus dem Verhältnis zwischen der Summe aller Peakhöhen des Elektropherogramms mit der geringsten Menge an eingesetzter DNA und der Summe aller Peakhöhen des jeweiligen anderen Elektropherogramms. Dadurch wurden in allen Elektropherogrammen, außer jenem mit der geringsten Gesamtsumme, die einzelnen Peakhöhen proportional reduziert. Signale mit einer Peakhöhe  $< 50$  Höheneinheiten wurden aus der Analyse ausgeschlossen. Die Standardisierung der eingesetzten DNA-Menge führt bei Elektropherogrammen mit einer hohen Gesamtsumme oft nachträglich zur Eliminierung einzelner Peaks. Somit wird eine höhere Diversität an unterschiedlichen Fragmentlängen korrigiert, welche nur auf den Einsatz einer größeren Menge an DNA zurückzuführen ist (Scheid et al., 2003; Dunbar et al., 2001). Zur Ermittlung der relativen Abundanz eines T-RFs wurde die Summe der Fluoreszenzsignale aller Fragmente ab einer Größe von 56 Nukleotiden bestimmt und der relative Anteil des Fluoreszenzsignals des einzelnen T-RFs in Prozent berechnet. Die Limitierung der zu berücksichtigenden Fragmentgröße ist notwendig, um Fluoreszenzsignale verursacht durch Primerdimere bei den Berechnungen nicht zu berücksichtigen. T-RFs bakteriellen Ursprungs mit einer Länge  $> 928$  bp wurden als ein T-RF ( $> 928$  bp) zusammengefasst.

#### **4.7. Erstellung von 16S rDNA-Klonbibliotheken**

Um die Diversität der bakteriellen und archaeellen Populationen in dem Pappelbodenhabitat genauer zu analysieren, wurden die 16S rDNA-Fragmente aus der Umwelt-DNA für eine phylogenetische Untersuchung mittels PCR amplifiziert (II.4.5.2), kloniert und anschließend sequenziert. Die sequenzierten 16S rDNA-Fragmente konnten dann über computergestützte Verrechnungsprogramme identifiziert und phylogenetisch analysiert werden.

## LÖSUNGEN UND MATERIALIEN

Klonierungs Kit (pGEM<sup>®</sup>-T Vector System II mit T4 DNA Ligase; Promega, Mannheim)

Nährmedium (im Media<sup>™</sup> Amp Blue, Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

### SOC-Medium (100 ml):

Trypton	2 g
Hefeextrakt	0,5 g
NaCl	1 ml einer 1 M Stammlösung
KCl	0,25 ml einer 1 M Stammlösung

Nach dem Autoklavieren wurden folgende Substanzen steril filtriert zugegeben:

MgCl <sub>2</sub>	1 ml einer 2 M Stammlösung
Glucose	1 ml einer 2 M Stammlösung
pH 7,0	

## DURCHFÜHRUNG

Die Ligation und die Transformation wurden nach Herstelleranweisung durchgeführt. Dabei wurden in die Ligation ca. 70 ng PCR-Produkt eingesetzt. Für die Transformation wurden kompetente *E. coli*-Zellen (JM 109) verwendet.

Die amplifizierte 16S rDNA wurde mit dem linearen Vektor pGEM<sup>®</sup>-T, welcher T-Überhänge besitzt, ligiert. Dabei wurde die Eigenschaft der *Taq*-Polymerase ausgenutzt, während der PCR-Reaktion einzelne überstehende Adenylsäurereste an den 3'-Enden beider DNA-Stränge anzuhängen.

Der verwendete Vektor enthält ein Ampicillin-Resistenzgen und ermöglicht nur transformierten *E. coli*-Zellen ein Wachstum in Gegenwart dieses Antibiotikums. Die erfolgreiche Ligation von Fremd-DNA in den verwendeten Vektor wird durch das Reportergen *lac Z*, welches für die  $\beta$ -Galactosidase codiert, sichtbar gemacht. Nach erfolgtem Einbau ist das *lac Z*-Gen unterbrochen und dessen Genprodukt ist inaktiviert. Als Folge wird das Lactoseanalogon X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid) nicht mehr umgesetzt und eine Farbselektion der zu untersuchenden Klone wird möglich (= Blau-Weiß-Selektion). Bakterienkolonien, welche DNA in das

Plasmid inseriert haben, bleiben in Gegenwart von X-Gal weiß. Blaue Bakterienkolonien weisen auf eine vorhandene  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität hin. Bei Verwendung des pGEM<sup>®</sup>-T Vektor Systems wird die Transkription des *lac Z*-Gens durch den Induktor IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactosid), welcher im Nährmedium enthalten ist, aktiviert.

Die *E. coli*-Zellen wurden nach der Transformation auf Agarplatten mit Ampicillin und X-Gal ausplattiert, welche nach Herstelleranweisung gegossen wurden, und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die weißen Kolonien mit sterilen Zahnstochern abgenommen und auf eine weitere Nährmediumagarplatte mit Ampicillin und X-Gal übertragen. Auch diese Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend bei 4°C aufbewahrt.

#### **4.8. Sequenzanalyse der klonierten 16S rDNA-Fragmente**

##### **4.8.1. Sequenzierreaktion**

Die Sequenzierung folgt dem Prinzip der „Kettenabbruch-Methode“ (Sanger et al., 1977). Diese basiert auf einem nukleotidspezifischen Kettenabbruch der DNA-Polymerase-Reaktion während der in vitro DNA-Synthese durch den Einbau eines 5'-fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotids (ddNTPs). Dadurch erhält man nach Abschluss der Sequenzierung statistisch DNA-Moleküle aller Fragmentlängen von 1 bis n Basen (n ist die Länge des zu sequenzierenden DNA-Moleküls) deren letzte Base fluoreszenzmarkiert ist. Die Sequenzierungen in dieser Arbeit wurden mit dem „ABI PRISM DNA Sequencing Big Dye<sup>™</sup> Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit“ mit AmpliTaq<sup>®</sup> DNA Polymerase, FS, (Applied Biosystems, Weiterstadt) nach Herstelleranweisung durchgeführt.

Die bei der Synthese entstehenden Fragmente unterschiedlicher Länge werden anschließend auf einem Polyacrylamidgel entsprechend ihrer Molekülgröße (Länge) aufgetrennt. Durch die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen, deren Emissionsmaxima in unterschiedlichen Wellenlängenbereichen (535 - 605 nm) liegen, ist es möglich, alle vier markierten Didesoxynukleotide in einem Ansatz einzusetzen. Produkte unspezifischer Kettenabbrüche werden nicht detektiert.

In die Sequenzierung wurden nur M13-PCR-Produkte (s. II.4.5.2.) von ca. 1500 bp (*Bacteria*) oder ca. 800 bp (*Archaea*) eingesetzt. Die in die Sequenzierung der 16S rDNA-Fragmente aus der Domäne *Bacteria* eingesetzten Primer (Lane, 1991; Weisburg et al.,

1991) sind in Tabelle 7 (s. II.4.5.1.) dargestellt. Für die erste phylogenetische Zuordnung wurde eine Teilsequenz mit dem Primer 1100b bestimmt (ca. 600 – 800 bp). Zur späteren phylogenetischen Verrechnung einzelner Vertreter von phylogenetischen Gruppen wurden weitere Primer eingesetzt (Tabelle 7), um eine möglichst vollständige 16S rDNA Sequenz (ca. 1400 bp) zu erhalten.

Für die Sequenzierung der 16S rDNA-Fragmente aus der Domäne *Archaea* wurden die Vektorprimer T7f und M13b verwendet (Tabelle 7).

### LÖSUNGEN UND MATERIALIEN

H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)

Primer (s. Tabelle 7; MWG Biotech, Ebersberg)

„Terminator Ready Reaction Mix“ („ABI PRISM DNA Sequencing Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit“ mit AmpliTaq® DNA Polymerase, FS, Applied Biosystems, Weiterstadt)

Gerät MWG-Primus 96 plus (MWG Biotech, Ebersberg)

### DURCHFÜHRUNG

Die mittels M13-PCR erzeugten aufgereinigten PCR-Produkte (s. II.4.5.2.) wurden in die Sequenzierreaktion als Matrizen-DNA eingesetzt.

Das Reaktionsgemisch für die zyklische Sequenzierung wurde in einem Gesamtvolumen von 10 µl angesetzt und enthielt ca. 70 ng Matrizen-DNA, 5 pmol des jeweiligen Sequenzierungsprimers (Tabelle 7) und 3 µl des „Terminator Ready Reaction Mix“, in welchem Enzyme (thermostabile Pyrophosphatase und AmpliTaq® DNA Polymerase, FS), Puffer, Desoxynukleotide und fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide bereits enthalten waren. Mit sterilem H<sub>2</sub>O wurden die Ansätze auf das Endvolumen von 10 µl aufgefüllt. Das Temperaturprofil für die zyklische Sequenzierung ist Tabelle 10 zu entnehmen.

**Tabelle 10:** Temperaturprofil der Sequenzierreaktion.

Schritt	Temperatur	Dauer	Funktion
1	96°C	30 s	Denaturierung der DNA
2a	96°C	10 s	Denaturierung
2b	50°C	5 s	Primer-Anlagerung
2c	60°C	4 min	DNA-Synthese
Schritte 2a - 2c wurden 25 x wiederholt			
3	4°C	∞	Kühlprogramm

#### 4.8.2. Reinigung der Sequenzierreaktions-Produkte

Die Produkte der Sequenzierreaktion wurden aufgereinigt, um Bestandteile wie nicht eingebaute fluoreszenzmarkierte Desoxynukleotide, Desoxynukleotide und Primer aus dem Reaktionsansatz zu entfernen.

### LÖSUNGEN UND MATERIALIEN

AutoSeq™ G-50-Chromatographiesäulen (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg)

Formamide Loading Dye (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg)

DNA Speed Vac® DNA 110 (Savant Instruments, Inc., Holbrook, NY, U.S.A.)

### DURCHFÜHRUNG

Der Sequenzieransatz wurde nach Herstelleranweisung gereinigt und das Eluat für 45 min unter Vakuum in der „Speed Vac“ getrocknet. Nach dem Trocknen wurde das DNA-Pellet in 2 µl „Formamide Loading Dye“ aufgenommen.

#### 4.8.3. Analyse der Sequenzierreaktions-Produkte

Die Produkte der Sequenzierreaktion wurden in einem 4,8 %igen Polyacrylamidgel mit 8 M Harnstoff aufgetrennt.

## LÖSUNGEN UND MATERIALIEN

LiChrosolv<sup>®</sup>-H<sub>2</sub>O (Merck, Darmstadt)

Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer (10x):

(Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

Tris	1,0 M
Borsäure	0,9 M
EDTA	0,01 M
pH 8,3 - 8,5	

Acrylamid, Page-Plus Concentrate (Amresco, Solon, Ohio; U.S.A.)

TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin) (Bio-Rad, München)

Ammoniumpersulfat-Lösung (APS) 10 % [w/v] in dest. H<sub>2</sub>O

Heizblock DRI-Block<sup>®</sup> DB·2D (Techne LTD., Duxford Cambridge, U.K.)

automatisches Sequenziergerät (Modell ABI PRISM<sup>™</sup> 377 DNA Sequencer, Applied Biosystems, Weiterstadt)

Analysesoftware (Apple Macintosh Modell Quadra 800, Applied Biosystems, Weiterstadt;  
ABI PRISM DNA Sequencing Analysis Software Version 3.4, Applied Biosystems,  
Weiterstadt)

## DURCHFÜHRUNG

Das Sequenziergel wurde nach Herstelleranweisung gegossen und in das Sequenziergerät eingesetzt. Die aufgereinigten Sequenzierreaktions-Produkte wurden 3 min bei 90°C im Thermoblock denaturiert, auf Eis gestellt und anschließend auf das Gel aufgetragen. Die Fragmentanalyse erfolgte durch eine gekoppelte Elektrophorese- und Detektionseinheit bei 9 h Elektrophoresedauer und einer konstanten Spannung von 1680 V. Während der Polyacrylamid-Gelelektrophorese bewegen sich die DNA-Moleküle in Abhängigkeit von ihrer Molekülgröße durch einen Gelbereich, welcher von einem Argonlaser (Hauptemission bei 514 und 488 nm) horizontal abgetastet wird und somit die durch den Detektionsbereich wandernden fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente zur

Sekundärstrahlung anregt. Diese Sekundärstrahlung wird von einem Photomultiplier erfasst und durch eine computergestützte Analysesoftware in Sequenzdaten umgesetzt.

#### **4.9. Phylogenetische Analyse**

Die phylogenetische Einordnung der 16S rDNA Sequenzen diente der Identifikation einzelner Klone aus den jeweiligen Klonbibliotheken. Bei den 16S rDNA Sequenzen handelte es sich um ca. 1000 – 1400 bp (*Bacteria*) bzw. ca. 800 bp (*Archaea*) lange Sequenzen mit denen eine Einordnung im Sinne der Darstellung und Aufklärung evolutiver Entwicklung und Ereignisse zulässig ist (Ludwig et al., 1998).

##### **4.9.1. Sequenzverarbeitung**

Die Rohsequenzen wurden computergestützt mit dem Programm „SeqMan™ II“ (Version 4.05) der Lasergene-Software (DNA-Star Inc., Madison, Wis, U.S.A.) bearbeitet. Primer- und Vektorsequenzen wurden eliminiert und nicht bei der phylogenetischen Berechnung berücksichtigt. Die einzelnen Partialsequenzen wurden mittels der Software zu Vollsequenzen zusammengesetzt.

##### **4.9.2. Phylogenetische Einordnung der partiellen und der vollständigen 16S rRNA-Gensequenzen**

Eine erste phylogenetische Identifikation der 16S rDNA-Klon-Sequenzen wurde mit Hilfe der EMBL-Nukleotid-Sequenz Datenbank ((Baker et al., 2000); <http://www.ebi.ac.uk>) mittels einer Wu-Blast2 Suche (Washington University Basic Local Alignment Search Tool Version 2.0) vorgenommen. Sequenzen der nächsten klonalen und kultivierten Verwandten wurden aus der GenBank Datenbank (<http://www.ncbi.nih.gov/Genbank>) in die eigene 16S rRNA-Gendatenbank importiert.

Die phylogenetische Verrechnung und die Darstellung der 16S rDNA-Sequenzdaten in phylogenetischen Stammbäumen wurde computergestützt mit Hilfe der ARB-Software (Ludwig et al., 2004) durchgeführt. Die 16S rDNA-Sequenzen wurden mit der ARB-Software gegen ca. 13000 16S/18S rDNA Sequenzen der Domänen *Bacteria*, *Archaea* und *Eucarya* angeordnet (Alignment), d.h. jeweils homologe Nukleotidpositionen des 16S rRNA Gens wurden in Spalten einander zugeordnet. Dieser Vergleich ermöglicht ebenfalls

eine weitgehend korrekte Zuordnung in den hypervariablen Regionen der 16S rRNA-Gene (Gutell et al., 1994). Das automatische Alignment wurde gegen die vom Programm ermittelten nächstähnlichen Sequenzen überprüft und gegebenenfalls manuell korrigiert.

Die Sequenzdaten wurden anschließend in einen bereits bestehenden Stammbaum, welcher einen Großteil der derzeit verfügbaren 16S rDNA-Sequenzen (ARB 2002: ca. 24000 Sequenzen) enthält, integriert. Diese Einordnung wurde nach „Maximum Parsimony“-Kriterien (Fitch, 1971) vorgenommen, bei der die Zielsequenz denjenigen Sequenzen zugeordnet wurde, für welche die geringste Anzahl an Nukleotidsubstitutionen berechnet wurde. Das Ergebnis dieser Einordnung gibt einen Hinweis auf die Zugehörigkeit der gefundenen Sequenzen zu schon etablierten phylogenetischen Gruppen. Dieser vorläufige Baum diente als Basis für die phylogenetischen Verrechnungen ausgewählter Sequenzen.

Zur Identifizierung von chimären Sequenzen, d.h. Mischprodukten aus Sequenzen phylogenetisch verschiedener Organismen, welche als Artefakte während der PCR entstehen können, wurde ein sogenanntes „fractional treeing“ (Ludwig et al., 1997) durchgeführt: Ergab sich unter Berücksichtigung der vorderen Hälfte einer Sequenz eine signifikant andere phylogenetische Einordnung als unter Berücksichtigung der hinteren Hälfte, so deutete dies auf eine chimäre Sequenz hin, welche aus der weiteren Analyse ausgeschlossen wurde.

Es wurden jeweils verschieden berechnete phylogenetische Stammbäume, basierend auf Distanzverfahren, verglichen. Diese Stammbäume wurden mit FastDNAm1 (Ludwig et al., 2004) basierend auf dem „Maximum-Likelihood“-Verfahren (Felsenstein, 1981) oder mit Parsimony (PHYLIP Software package, Version 3.6a2; J. Felsenstein, Department of Genetics, University of Washington; Seattle, USA, <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>) berechnet. Um die Topologie dieser Dendrogramme zu bestätigen wurden weitere Stammbäume mit der „Neighbor joining“-Methode (Saitou und Nei, 1987) mit einem Algorithmus basierend auf dem Felsenstein-Evolutionsmodell (Felsenstein, 1981) oder der Tree-Puzzle-Methode (Schmidt et al., 2002) mit einem Algorithmus basierend auf dem Tamura-Nei Evolutionsmodell (Tamura und Nei, 1993) konstruiert. Distanzverfahren ermöglichen eine genauere phylogenetische Einordnung und beruhen auf dem paarweisen Sequenzvergleich der zu analysierenden Sequenzen, wobei multiple Nukleotidsubstitutionen auf einer Position, basierend auf einem

in ARB implementierten Evolutionsmodell, berücksichtigt wurden. Die Distanzwerte wurden durch Algorithmen in ein Dendrogramm umgerechnet und dargestellt.

Um hochvariable Bereiche des 16S rRNA-Gens aus den phylogenetischen Untersuchungen auszuschließen, wurden entsprechende Basenfrequenz-Filter auf Basis der nächstähnlichen Sequenzen konstruiert und für die Verrechnungen eingesetzt. Die Berechnung solcher Filter erfolgte mit einem Invarianzkriterium von 50 %. Somit wurden nur Sequenzpositionen berücksichtigt, welche bei mindestens 50 % aller zur Berechnung verwendeten Organismen konserviert sind. In die Filter-Berechnung gingen die im jeweiligen Stammbaum dargestellten Sequenzen innerhalb der *Bacteria* und *Archaea* ein. Um die phylogenetische Stellung der eigenen Umweltsequenzen herauszustellen, wurden weitere Referenzsequenzen ihrer nächsten Verwandten aus öffentlichen Datenbanken in die Stammbäume integriert. Sequenzen, welche kürzer als 800 bp (*Archaea*) bzw. 1000 - 1400 bp (*Bacteria*) waren, wurden erst nachträglich mit der „Quick Add Maximum Parsimony“ Funktion des ARB-Programms eingefügt. Die generelle Topologie des erzeugten Baumes wurde dadurch nicht mehr verändert (Ludwig et al., 1998).

## 5. Statistische Methoden

### 5.1. Abschätzung des Artenreichtums

Der potentiell vorhandene Artenreichtum in den mit 16S rRNA-Gen Klonbibliotheken untersuchten Boden- und Wurzelproben (*Bacteria*) wurde mit Hilfe von Chao1 (Chao, 1984) als Indikator [6] abgeschätzt.

$$S_{Chao1} = S_{obs} + \frac{n_1^2}{2n_2} \quad [6]$$

$S_{Chao1}$ : geschätzte Anzahl von Arten (Chao1)

$S_{obs}$ : Anzahl tatsächlich gefundener Arten

$n_1$ : Anzahl einmal gefundener Arten

$n_2$ : Anzahl zweimal gefundener Arten

Ein Vergleich des geschätzten Artenreichtums mit der tatsächlich gefundenen Anzahl von Arten zeigt, inwieweit der klonale Ansatz mit seiner notwendigerweise beschränkten Anzahl von untersuchten Klonen die Diversität im untersuchten System erfasst hat. Als Arten wurden dazu Klone definiert, deren 16S rRNA-Gene mindestens zu 97 % übereinstimmten (Stackebrandt und Goebel, 1994). Die Berechnungen der Schätzwerte von Chao1 erfolgten mit Hilfe von EstimateS (version 5.0.1; R. Colwell, University of Connecticut [<http://viceroy.eeb.uconn.edu/estimates/>]).

Die Berechnung der 95 %-Konfidenzintervalle der Schätzwerte erfolgte mit Hilfe von [7] aus (Chao, 1987). Die für [8] benötigte Standardabweichung  $\sigma$  wird von EstimateS zusammen mit den Chao Schätzwerten ausgegeben. Die zugrunde liegende Formel ist in (Hughes et al., 2001) beschrieben.

$$[S + (N - S)/C, S + (N - S)C] \quad [7]$$

$$C = \exp\left\{1,96\left[\log\left(1 + \sigma^2 / (N - S)^2\right)\right]^{0,5}\right\} \quad [8]$$

- $S$ : Anzahl tatsächlich gefundener Arten
- $N$ : geschätzte Anzahl von Arten (Chao1)
- $C$ : Faktor, der nach [8] berechnet wird
- $\sigma$ : Standardabweichung

95 %-Konfidenzintervalle, welche sich nicht überlappen, deuten auf signifikante Unterschiede zwischen zwei Schätzwerten hin.

## 5.2. Statistische Auswertung der T-RFLP-Ergebnisse

Um die komplexen T-RFLP-Datensätze der bakteriellen Lebensgemeinschaft in den verschiedenen Habitaten zu analysieren wurde eine multivariate Statistikmethode angewendet um die gleichzeitige Veränderung der relativen Häufigkeiten zahlreicher T-RFs in Abhängigkeit verschiedener Variablen übersichtlich darzustellen. Zur statistischen Auswertung wurde eine Korrespondenzanalyse (KA) durchgeführt. Dazu wurde das Programm SPSS (Version10) verwendet und die Ordination erfolgte mit dem Programm CANOCO (Version 4.0, Microcomputer Power Inc., Ithaca, USA) (Ter Braak und Smilauer, 1998). Je näher zwei Punkte in dem Korrespondenz-Ordinationsdiagramm

zueinander angeordnet waren, desto ähnlicher waren die Fingerprintmuster in ihrer T-RF-Zusammensetzung und ihrer relativen Abundanz.

Für die Visualisierung der Ergebnisse der KA wurde das Programm Origin (Version 6.1; OriginLab Corp., Northampton, USA) verwendet.

Die Signifikanz des Flutungseffektes auf die Anzahl der T-RFs in dem jeweiligen untersuchten Habitat wurde anhand von einfaktoriellen Varianzanalysen (ANOVA) mit Hilfe des Programms SPSS getestet. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0,05$  festgelegt.

### III. Ergebnisse

#### 1. Molekulare Analyse der mikrobiellen Lebensgemeinschaften in gefluteten und ungefluteten Pappelmikrokosmen

##### 1.1. T-RFLP-Analyse der bakteriellen Lebensgemeinschaften

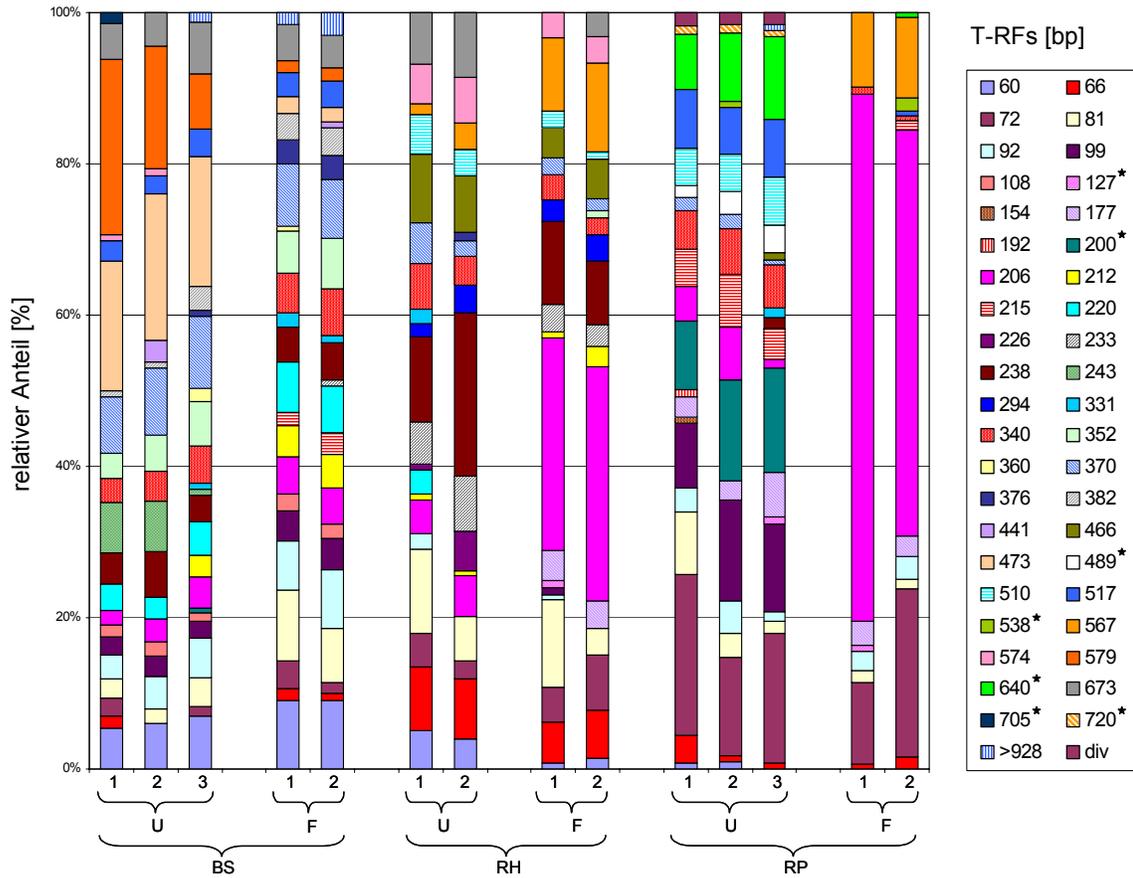
Die T-RFLP-Analyse („Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism“; (Liu et al., 1997)) ermöglicht eine schnelle Charakterisierung der strukturellen Zusammensetzung komplexer mikrobieller Lebensgemeinschaften über eine Restriktionsfragmentanalyse von PCR-vermittelten 16S rRNA-Gen-Amplifikaten und dient somit als „genetischer Fingerabdruck“. Für die Ermittlung eines T-RFLP-Musters einer Umweltprobe wurde die Gesamt-DNA extrahiert (s. II.4.1.1.) und mittels PCR amplifiziert (s. II.4.5.2.). Anschließend wurden die aufgereinigten bakteriellen PCR-Produkte mit *HhaI* geschnitten und die Restriktionsfragmente auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt (s. II.4.6.2.). Es wurden vergleichend T-RFLP-Analysen der bakteriellen Populationen des nicht durchwurzelten Bodens, des Rhizosphärenbodens und der Rhizoplane in gefluteten und ungefluteten Pappelmikrokosmen durchgeführt (Boden aus dem Jahr 2000). Die Analyse wurde an zwei gefluteten und drei ungefluteten Pappelmikrokosmen durchgeführt. Für die Untersuchungen wurden 19 Wochen alte Pappelpflanzen verwendet.

Um die T-RFLP Profile der verschiedenen Umweltproben miteinander zu vergleichen, wurden die relativen 16S rRNA-Gen Abundanzen einzelner T-RFs innerhalb der Umweltprofile berechnet und die Ergebnisse als Histogramme dargestellt (Abbildung 1). Jede Säule stellt die gemittelten Werte der relativen Abundanzen einzelner T-RFs aus drei parallelen DNA-Extraktionen dar. Verschiedene Säulen repräsentieren die Ergebnisse aus unabhängigen Mikrokosmen und verschiedenen Kompartimenten unter gefluteten und ungefluteten Bedingungen. Insgesamt wurden 43 verschiedene T-RFs in 42 bakteriellen T-RFLP- Profilen detektiert. In den Proben des undurchwurzelten Bodens, der Rhizosphäre und der ungefluteten Rhizoplane wurden jeweils 18 bis 25 T-RFs detektiert. Das für Chloroplasten charakteristische T-RF der Länge 777 bp (s. Kapitel III.1.2.) machte weniger als 0,5 % der relativen Abundanz in den verschiedenen Kompartimenten aus. Eine Ausnahme waren die ungefluteten und gefluteten Rhizoplane-Kompartimente, bei denen jeweils Werte von 50 % bzw. 15 % detektiert wurden. Dieses T-RF wurde aus der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Im Vergleich von ungefluteten und gefluteten Bedingungen veränderte sich die Anzahl der verschiedenen T-RFs in den „bulk soil“- und Rhizosphären-Proben nicht signifikant ( $p>0,5$ ). Die Flutung hatte jedoch einen signifikanten Einfluss auf die Anzahl der T-RFs an der Rhizoplane ( $p<0,01$ ), die hier deutlich abnahm.

Auch wenn zahlreiche T-RFs in den verschiedenen Kompartimenten und unter verschiedenen Bedingungen detektiert wurden, so sind die Kompartimente „bulk soil“, Rhizosphäre und Rhizoplane hinsichtlich der relativen Abundanz einzelner T-RFs deutlich zu unterscheiden. T-RFs mit einer Länge von 81 bp (1,3 - 11,5 %), 206 bp (1,1 - 69,7 %) und 340 bp (0,6 - 6,2 %) wurden in allen Kompartimenten detektiert (Abbildung 1). Einige T-RFs hingegen waren charakteristisch für ein bestimmtes Kompartiment. Die T-RFs der Längen 473 bp (1,9 - 19,4 %) und 579 bp (1,6 - 23,2 %) wurden nur im „bulk soil“ detektiert und zeigten nach Flutung eine geringere relative Abundanz. Das T-RF der Länge 294 bp (1,8 - 3,6 %) wurde nur im Rhizosphären-Kompartiment nachgewiesen und T-RFs der Längen 640 bp (0,7 - 11,0 %) und 720 bp (0,8 - 1,1 %) traten nur im Rhizoplane-Kompartiment auf (Abbildung 1).

Die deutlichste Veränderung wurde im gefluteten Rhizoplane-Kompartiment beobachtet. Dort zeigte das T-RF von 206 bp Länge die höchste relative Abundanz. Generell sind die Unterschiede in den Umwelt-T-RFLP-Profilen eher auf Unterschiede in der relativen Abundanz einzelner T-RFs als auf deren Vorhandensein oder deren Abwesenheit zurückzuführen.

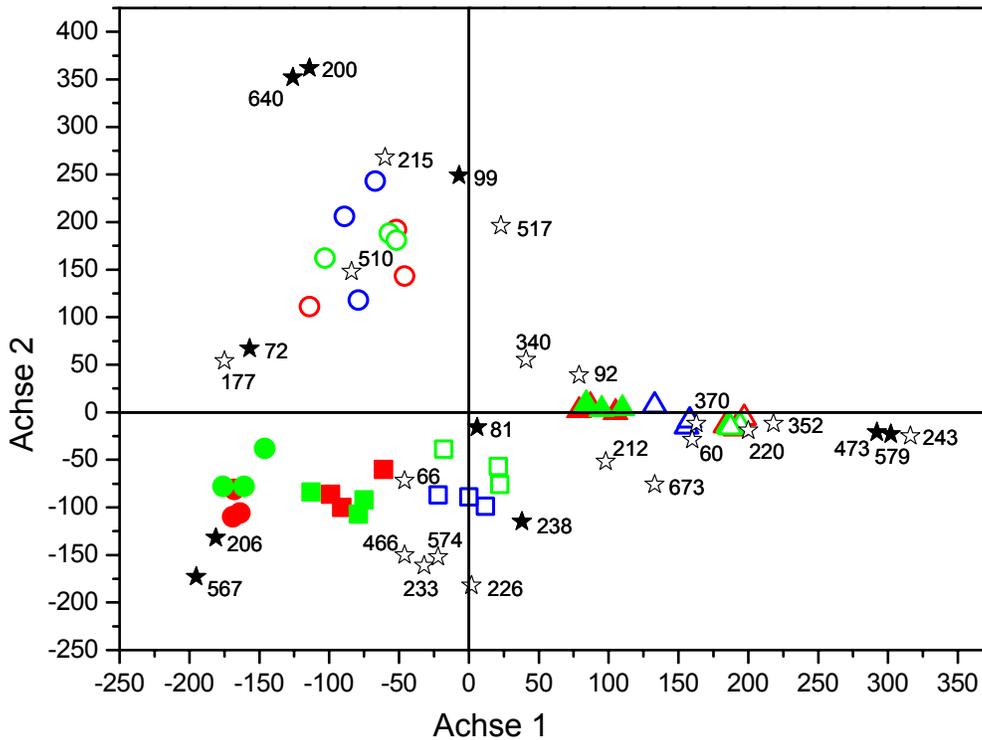


**Abbildung 1:** Verteilung der gemittelten relativen Abundanz von T-RFs amplifizierter 16S rRNA Gene innerhalb der *Bacteria* aus „bulk soil“ (BS), Rhizosphäre (RH) und Rhizoplane (RP) aus verschiedenen gefluteten (F) und ungefluteten (U) Pappelmikrokosmen (jeweils 2 - 3 Mikrokosmen). Dargestellt ist das Ergebnis nach Restriktion mit *HhaI*. Die relativen Anteile geben die prozentuale Peakhöhe einzelner T-RFs bezogen auf die Gesamtpeakhöhe wieder. Die Werte wurden jeweils aus Experimenten von drei parallelen DNA-Extraktionen gemittelt. Die Standardfehler einzelner T-RFs waren in der Regel  $\pm 5\%$ . Die Fragmentlängen der T-RFs sind in Basenpaaren [bp] angegeben. Mit einem Stern markierte T-RFs wurden nicht in den Klonbibliotheken detektiert.

Um Unterschiede zwischen den einzelnen Profilen der T-RFLP-Analyse zu analysieren und zu interpretieren wurde eine Korrespondenzanalyse (KA) als multivariate Ordinationstechnik genutzt. In diese Analyse ging die Anzahl der vorhandenen T-RFs und ihre relative Abundanz ein. Die einzelnen T-RFLP-Profile wurden als farbige Symbole in einem zwei-dimensionalen Ordinationsdiagramm anhand ihrer Ähnlichkeiten angeordnet (Abbildung 2). Je näher sich zwei farbige Symbole in diesem Ordinationsdiagramm sind, um so ähnlicher sind sich die beiden zu vergleichenden bakteriellen Lebensgemeinschaften in ihrer T-RF-Verteilung und T-RF-Abundanz.

Im ungefluteten Zustand waren die analysierten Fingerprintmuster der drei Kompartimente deutlich voneinander getrennt (Abbildung 2). Die Flutung hatte Einfluss auf alle drei Kompartimente, zeigte sich jedoch am deutlichsten im Kompartiment der Rhizoplane. Die Unterschiede der Fingerprintmuster von Rhizosphäre und Rhizoplane wurden durch die Flutung verringert. T-RFLP-Profile von verschiedenen Pflanzen (Mikrokosmen) waren ähnlich in ihrer Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft und gruppieren in der KA eng zusammen. In dem KA-Ordinationsdiagramm sind 28 OTUs (operational taxonomic units) mit einer relativen Abundanz >4 % dargestellt. Davon werden 10 OTUs durch T-RFs mit einer relativen Abundanz >10 % repräsentiert (72, 81, 99, 200, 206, 238, 473, 567, 579 und 640 bp). Diese OTUs waren verantwortlich für die Trennung der Habitate „bulk soil“, Rhizosphäre und Rhizoplane und verdeutlichen den Effekt der Flutung (Abbildung 2). Die T-RFs der Längen 473 und 579 bp waren dominant in dem ungefluteten „bulk soil“ Habitat. Das Kompartiment der ungefluteten Rhizosphäre wurde durch die T-RFs der Längen 81 und 238 bp charakterisiert. T-RFs der Längen 72, 99, 200 und 640 bp waren bedeutend im ungefluteten Rhizoplane-Habitat, während die Rhizoplane im gefluteten Zustand deutlich durch die T-RFs der Längen 206 und 567 bp beeinflusst wurde.

Die T-RFLP-Analyse von Klonsequenzen erlaubte die Zuordnung einzelner T-RFs (36 von 43) zu bestimmten phylogenetischen Gruppen (s. III.1.2.).



**Abbildung 2:** Korrespondenzanalyse (KA) der bakteriellen T-RFLP-Profile von amplifizierten 16S rRNA-Genen aus „bulk soil“ ( $\Delta$ ), Rhizosphäre ( $\square$ ) und Rhizoplane ( $\circ$ ) von Pappelmikrokosmen unter gefluteten (geschlossene Symbole) und ungefluteten Bedingungen (offene Symbole). Dargestellt sind jeweils die Ergebnisse von drei parallelen DNA-Extrakten (gleiche Symbole gleicher Farbe). Verschiedene Pflanzen sind durch verschiedene Farben dargestellt. Die Zahlen geben die Längen der T-RFs (Sterne) mit einer relativen Abundanz  $>4\%$  (offene Sterne) oder  $>10\%$  (geschlossene Sterne) in Basenpaaren [bp] an. Die Ordinationsdiagramme basieren auf der ersten und zweiten Achse der KA mit den Eigenwerten  $\lambda_1 = 0.59$ ,  $\lambda_2 = 0.50$ .

## 1.2. Phylogenetische Identifikation einzelner bakterieller Gruppen

Die Klonierung der bakteriellen 16S rRNA-Gene ermöglichte eine vergleichende Sequenzanalyse der erhaltenen Klone und die Identifikation der mikrobiellen Populationen in dem Pappelmikrokosmos-Habitat. Für die DNA aus den Kompartimenten „bulk soil“, Rhizosphäre und Rhizoplane unter ungefluteten bzw. gefluteten Bedingungen wurde jeweils eine Klonbibliothek erstellt. Die in die Klonierung eingesetzten PCR-Produkte wurden zunächst aus PCR-Amplifikaten einer DNA-Extraktion von jeweils zwei bis drei verschiedenen Pflanzen pro Kompartiment „gepoolt“ (s. Tabelle 2). Die in Klonen vereinzelt 16S rRNA-Genfragmente wurden in die T-RFLP-Analyse und die Sequenzanalyse eingesetzt. Dies erlaubte die Zuordnung von Klonsequenzen zu bestimmten T-RFs und deren phylogenetische Einordnung innerhalb der *Bacteria* mittels einer Wu-Blast2 Suche (EMBL-Datenbank) und anschließender phylogenetischer Berechnung. Dabei wurden mehrere T-RFs nicht nur einer phylogenetischen Gruppe zugeordnet (Tabelle 11).

In der Klonbibliothek der ungefluteten Rhizoplane (n = 31) wurden nur Klone entdeckt, welche Plastiden-DNA (T-RF: 777 bp) zugeordnet wurden und somit auf die Co-Extraktion von Pflanzen-DNA hinweisen. Hingegen wurden in der Klonbibliothek aus dem Habitat der gefluteten Rhizoplane nur 5 % der Klonsequenzen Plastiden-DNA zugeordnet. Diese Klone wurden aus der weiteren Analyse ausgeschlossen. Aus einer Gesamtheit von 314 analysierten bakteriellen Klonen wurden 33 Sequenzen von den weiteren Analysen ausgeschlossen, da diese Chimären darstellten (s. II.4.9.2.). Die verbliebenen 281 Klonsequenzen aus ungeflutetem „bulk soil“ (BSU: 55 Klone), geflutetem „bulk soil“ (BSF: 63 Klone), ungefluteter Rhizosphäre (RHU: 50 Klone), gefluteter Rhizosphäre (RHF: 78 Klone) und gefluteter Rhizoplane (RPF: 35 Klone) wurden bestimmten phylogenetischen Gruppen zugeordnet (Tabelle 11). Mit Hilfe der Klonbibliotheken wurden Unterschiede in der relativen Zusammensetzung der bakteriellen Populationen aufgezeigt. Eine statistische Auswertung war jedoch nicht möglich da die Klonbibliotheken nicht repliziert wurden.

Die meisten Klonsequenzen aus dem ungefluteten „bulk soil“ Habitat wurden den *Actinobacteria* (38 %) zugeordnet, gefolgt von Klonsequenzen, welche innerhalb der *Bacillales* (16 %) und den *Acidobacteria* (15 %) gruppieren. Unter gefluteten Bedingungen zeigte sich eine Zunahme von Klonen innerhalb der *Alpha-* und *Gammaproteobacteria*. In

der Rhizosphäre dominierten Klonsequenzen, welche den *Bacillales* (42 %) und *Alphaproteobacteria* (26 %) zugeordnet wurden, die Klonbibliothek. Nach Flutung zeigte sich ein relativer Anstieg an Klonsequenzen, welche innerhalb der *Betaproteobacteria* (47 %) gruppieren. Alle Klone aus der Klonbibliothek der gefluteten Rhizoplane wurden den *Betaproteobacteria* zugeordnet. Die meisten davon zeigten eine nahe Verwandtschaft zu *Aquaspirillum* sp..

Insgesamt betrachtet, wurden die meisten Klone (50 %) den *Proteobacteria* (*Alpha*, *Beta*, *Gamma*, *Delta*) zugeordnet, gefolgt von Klonen, welche innerhalb der *Bacillales*, *Actinobacteria* und *Acidobacteria* gruppieren. Die meisten Klonsequenzen in den Klonbibliotheken wurden durch T-RFs in den T-RFLP-Analysen der Umweltproben repräsentiert. Die Klone (n = 18), deren zugehörige T-RFs (12 verschiedene) nicht in der T-RFLP Analyse der Umweltproben detektiert wurden, sind in der Tabelle 11 markiert. Eine detaillierte Liste aller Klonsequenzen mit nächsten Verwandten, zugeordneten T-RFs und Referenzen ist in Anhang A zu finden.

Sieben T-RFs hingegen konnten keiner phylogenetischen Gruppe zugeordnet werden. Diese sind in der Legende der Abbildung 1 mit einem Stern gekennzeichnet.

## Ergebnisse

**Tabelle 11:** Einordnung von 16S rRNA-Gen Umweltsequenzen aus Klonbibliotheken von undurchwurzelter Boden, Rhizosphäre und Rhizoplane aus Pappelmikrokosmen unter gefluteten und ungefluteten Bedingungen zu phylogenetischen Gruppen der Domäne *Bacteria* und ihre Zuordnung zu bestimmten terminalen Restriktionsfragmenten (T-RFs). Die Längen der T-RFs sind in Basenpaaren [bp] angegeben.

Phylogenetische Gruppe	Verteilung von 16S rRNA-Gen Klonen in:				
	Undurchwurzelter Boden		Rhizosphäre		Rhizoplane
	ungeflutet (n = 55)	geflutet (n = 63)	ungeflutet (n = 50)	geflutet (n = 78)	geflutet (n = 35)
	T-RF [bp] (n)	T-RF [bp] (n)	T-RF [bp] (n)	T-RF [bp] (n)	T-RF [bp] (n)
unbekannte Zuordnung	740* (1)	740* (1)	-	-	-
<i>Bacillales</i>	238 (2)	233 (1)	206 (2)	72 (2)	-
	243 (1)	238 (4)	226 (1)	233 (3)	
	547* (1)		233 (3)	238 (7)	
	579 (5)		238 (8)	243 (1)	
			466 (5)	466 (2)	
			473 (1)	574 (1)	
			574 (1)		
<i>Clostridiales</i>	-	-	-	360 (1)	-
<i>Actinobacteria</i>	36 (3)	36 (2)	143* (2)	143* (1)	-
	173* (1)	184* (1)	370 (1)	220 (1)	
	184* (2)	370 (1)	673 (2)	370 (1)	
	238 (1)	441 (1)		441 (2)	
	360 (1)	673 (1)		673 (3)	
	370 (5)	1079 (1)			
	376 (1)				
	473 (4)				
	673 (2)				
	681* (1)				
<i>Verrucomicrobia</i>	99 (1)	60 (2)	-	-	-
	192 (1)	99 (6)			
	215 (1)	215 (1)			
<i>Planctomycetes</i>	-	81 (1)	-	-	-
<i>Nitrospira</i>	-	36 (1)	-	-	-
		370 (1)			
<i>Bacteroidetes</i>	92 (1)	66 (1)	233 (1)	294 (1)	-
		851* (2)		1094 (1)	
		1097 (1)			
<i>Chloroflexi</i>	36 (1)	-	-	36 (1)	-
<i>Chlorobi</i>	92 (1)	-	-	-	-
<i>Gemmatimonadetes</i>	-	-	352 (1)	-	-
<i>Acidobacteria</i>	220 (6)	154 (2)	220 (1)	-	-
	382 (1)	220 (5)			
	587* (1)	382 (1)			

## Ergebnisse

<i>Alphaproteobacteria</i>	60 (2)	60 (3)	60 (2)	60 (1)	-
	81 (1)	81 (2)	81 (3)	81 (2)	
	510 (1)	92 (1)	159* (1)	340 (5)	
	517 (1)	108 (1)	226 (2)	510 (1)	
		331 (1)	331 (2)		
		340 (1)	340 (2)		
		352 (1)	796* (1)		
		370 (1)			
-----					
<i>Betaproteobacteria</i>	60 (1)	206 (1)	206 (1)	66 (2)	66 (1)
	66 (1)	567 (1)	567 (3)	78* (1)	116* (1)
	206 (1)			206 (33)	177 (1)
				370 (1)	206 (32)
-----					
<i>Gamma</i> proteobacteria	206 (1)	66 (2)	66 (1)	177 (4)	-
		81 (1)	177 (1)		
		206 (3)	212 (1)		
		212 (1)	220 (1)		
		370 (1)			
-----					
<i>Deltaproteobacteria</i>	81 (1)	60 (3)	-	-	-
		92 (1)			
		370 (1)			

(n): Anzahl der 16S rRNA-Gen Klone, welche in verschiedenen Kompartimenten analysiert wurden.

-: nicht detektiert.

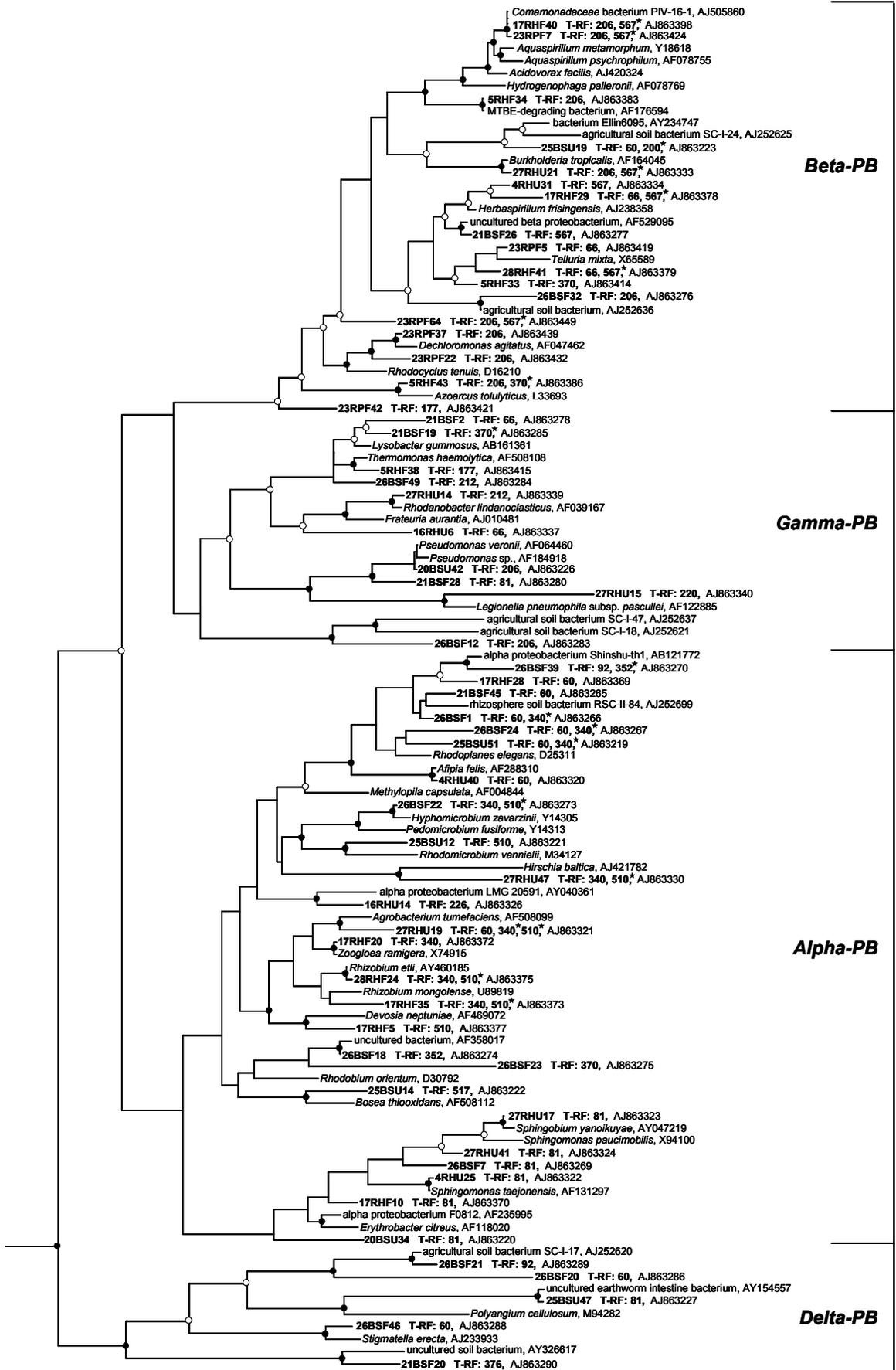
\*: T-RFs, welche mit einem Stern markiert sind, wurden nur in der Klonbibliothek und nicht in der T-RFLP-Analyse detektiert.

Terminale Fragmentlängen (T-RFs) wurden für alle Klonsequenzen sowohl *in silico* (anhand der 16S rRNA-Gen Sequenz) als auch *in vitro* (T-RFLP-Analyse) bestimmt. Die experimentelle Analyse erfolgte zur Detektion möglicher „Nebenpeaks“. Dieser als „Pseudo-T-RF“ beschriebene Artefakt (Egert und Friedrich, 2003) tritt immer dann auf, wenn das Restriktionsenzym nicht an der terminalen, sondern einer der folgenden (z.B. der zweiten und/oder dritten) Restriktionsschnittstelle schneidet. Dadurch entstehen zusätzliche Restriktionsfragmente im T-RFLP Profil, welche nicht den erwarteten terminalen Fragmenten entsprechen. Die Ursache für die Entstehung von „Pseudo-T-RFs“ sind einzelsträngige Teile des Amplikons, da (partiell) einzelsträngige DNA von Restriktionsendonukleasen nicht geschnitten wird. Diese „Pseudo-T-RFs“ führen eventuell dazu, dass die mikrobielle Diversität in einer Probe überschätzt wird. Es ist daher sinnvoll die Klonbibliotheken von 16S rRNA-Genen einzeln auf ihr *in vitro* T-RF-Bildungsverhalten zu testen. Tatsächlich zeigten 29 % von 281 Klonen die Bildung von „Pseudo-T-RFs“. Zum Beispiel zeigte sich im gefluteten Rhizoplane- und Rhizosphären-Kompartiment, dass das T-RF von 567 bp Länge vermutlich ein „Pseudo-T-RF“ von *Aquaspirillum* (T-RF: 206 bp) darstellt, da dieses T-RF in diesen Klonbibliotheken nicht detektiert wurde.

Um die phylogenetischen Positionen der erhaltenen Umweltsequenzen zu veranschaulichen und um eine detailliertere Beschreibung des Artenreichtums von Pappel-assoziierten bakteriellen Lebensgemeinschaften zu ermöglichen, wurden Stammbäume berechnet. In Abbildung 3 und Abbildung 4 sind Dendrogramme dargestellt, welche mit dem Maximum-Likelihood Verfahren erstellt wurden. In diese phylogenetischen Berechnungen wurden repräsentativ 114 der 281 erhaltenen Umweltsequenzen einbezogen, welche verschiedenen phylogenetischen Gruppen zugeordnet waren und deren T-RF in der T-RFLP-Analyse der Umweltproben eine relative Abundanz >4 % zeigten.

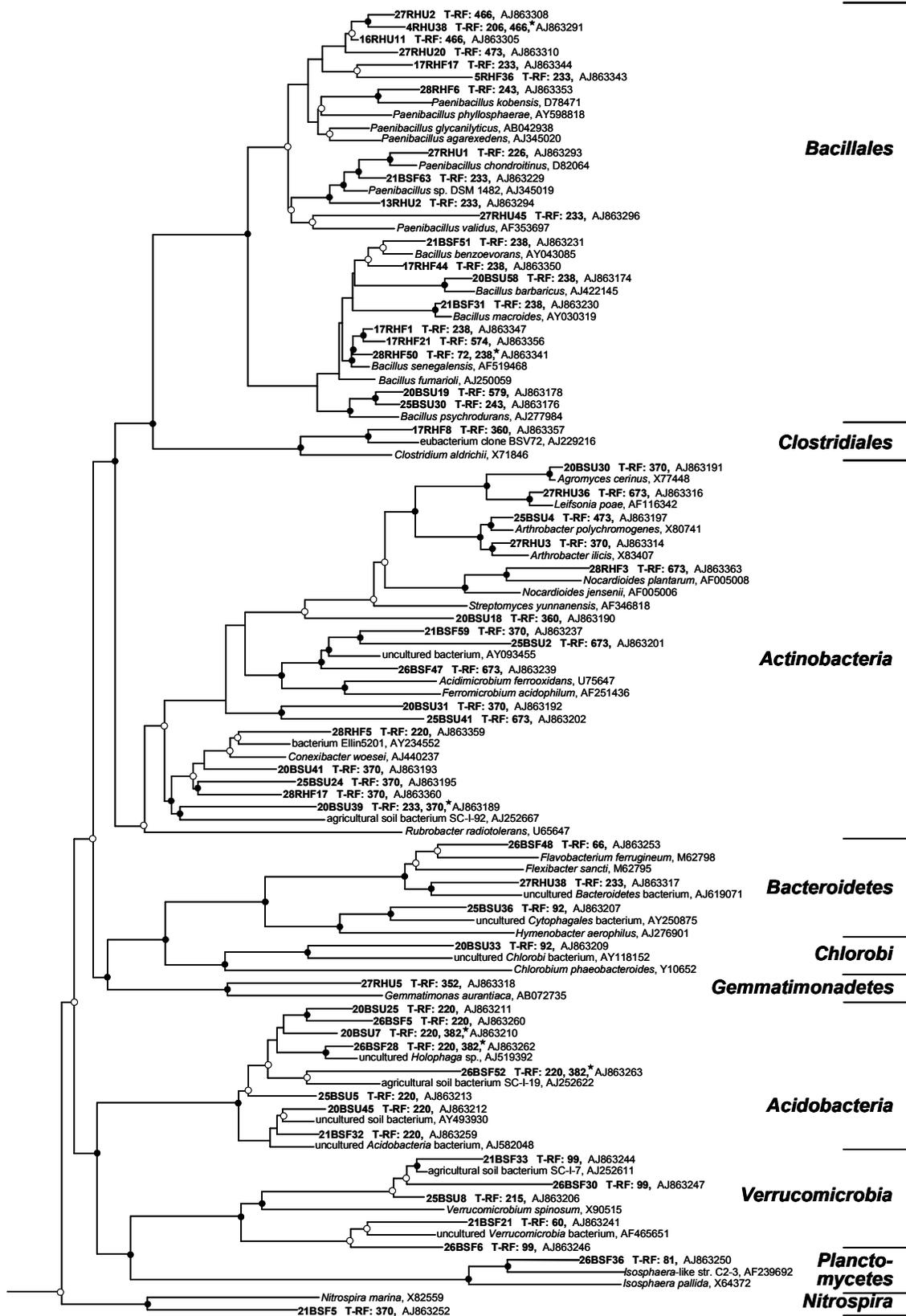
Das T-RF von 36 bp, welches Mitglieder der Phyla *Chloroflexi*, *Actinobacteria* oder *Nitrospira* repräsentiert, wurde in die weitere Analyse nicht mit einbezogen, da es nicht möglich war dieses T-RF in der T-RFLP-Analyse von Primerdimeren zu unterscheiden.

# Ergebnisse



**Abbildung 3:** Phylogenetische Verwandtschaft von bakteriellen 16S rRNA-Gen-Umweltsequenzen aus „bulk soil“ (BS), Rhizosphäre (RH) und Rhizoplane (RP) von gefluteten (F) und ungefluteten (U) Pappelmikrokosmen innerhalb der *Proteobacteria* (PB). Die Berechnungen des Dendrogramms wurden mit der Maximum-Likelihood Methode und einem Filter (50 %) für *Proteobacteria* durchgeführt. Die 16S rRNA-Gen-Sequenz von *Tropheryma whippelli* wurde verwendet, um die Wurzel des Dendrogramms zu bestimmen (nicht dargestellt). Der Maßstab entspricht 10 % Sequenzunterschied. Die „accession numbers“ der Referenzorganismen und der Umweltsequenzen sind angegeben. Die Längen der zugehörigen terminalen Restriktionsfragmente (T-RFs) nach in silico Restriktion mit *HhaI* sind in Basenpaaren dargestellt [bp]. Pseudo-T-RFs sind mit einem Stern markiert. Verzweigungspunkte, welche mit einem vollen Kreis gekennzeichnet sind wurden durch mindestens zwei weitere phylogenetische Berechnungen bestätigt, während offene Kreise für eine Bestätigung durch nur eine weitere Berechnung stehen.

Ergebnisse



0.10

**Abbildung 4:** Phylogenetische Verwandtschaft von bakteriellen 16S rRNA-Gen-Umweltsequenzen aus „bulk soil“ (BS), Rhizosphäre (RH) und Rhizoplane (RP) von gefluteten (F) und ungefluteten (U) Pappelmikrokosmen innerhalb der *Bacteria*. Die Berechnungen des Dendrogramms wurden mit der Maximum-Likelihood Methode und einem Filter (50 %) für *Proteobacteria* durchgeführt. Die 16S rRNA-Gen-Sequenz von *Pandoraea norimbergensis* wurde verwendet, um die Wurzel des Dendrogramms zu bestimmen (nicht dargestellt). Der Maßstab entspricht 10 % Sequenzunterschied. Die „accession numbers“ der Referenzorganismen und der Umweltsequenzen sind angegeben. Die Längen der zugehörigen terminalen Restriktionsfragmente (T-RFs) nach in silico Restriktion mit *HhaI* sind in Basenpaaren dargestellt [bp]. Pseudo-T-RFs sind mit einem Stern markiert. Verzweigungspunkte, welche mit einem vollen Kreis gekennzeichnet sind wurden durch mindestens zwei weitere phylogenetische Berechnungen bestätigt, während offene Kreise für eine Bestätigung durch nur eine weitere Berechnung stehen.

### 1.3. Abschätzung des bakteriellen Artenreichtums

Sequenzen, welche eine Ähnlichkeit  $\geq 97\%$  zeigten, wurden als eine Art definiert. Unter ungefluteten Bedingungen wurden die 16S rRNA-Gen Klone aus der „bulk soil“- und Rhizosphären-Klonbibliothek in 42 bzw. 32 verschiedene Spezies unterteilt. Der potentiell vorhandene Artenreichtum in den mit 16S rRNA-Gen-Klonbibliotheken untersuchten Boden- und Wurzelproben (*Bacteria*) wurde mit Hilfe von Chao1 (Chao, 1984) als Indikator abgeschätzt (s. II.5.1.). Die extrapolierten Zahlen waren höher als die Anzahl der tatsächlich gefundenen Arten, was auf eine große unentdeckte, bakterielle Diversität hindeutet. Dennoch konnte offensichtlich über ein Drittel der bakteriellen Arten, welche in der ungefluteten Rhizosphäre von Pappelmikrokosmen vorkamen, mittels des klonalen Ansatzes detektiert werden. Die 95 %-Konfidenzintervalle weisen darauf hin, dass der Artenreichtum im „bulk soil“ deutlich höher ist als in der Rhizosphäre (Tabelle 12).

Unter gefluteten Bedingungen enthielten die Klonbibliotheken aus „bulk soil“, Rhizosphäre und Rhizoplane jeweils 52, 33 oder 6 tatsächlich gefundene Arten. Die Anzahl der extrapolierten Arten war auch in diesen Fällen höher als die experimentell ermittelten (Tabelle 12). Im Fall der Pappel-Rhizoplane konnte unter gefluteten Bedingungen ungefähr die Hälfte der bakteriellen Lebensgemeinschaft detektiert werden. Der Artenreichtum in diesem Kompartiment kann als wesentlich geringer angesehen werden als in den anderen Kompartimenten.

**Tabelle 12:** Artenreichtum von 16S rRNA-Gen Klonen in Klonbibliotheken aus undurchwurzeltem Boden, Rhizosphäre und Rhizoplane von Pappelmikrokosmen unter ungefluteten und gefluteten Bedingungen.

	Artenreichtum von 16S rRNA-Gen Klonen in Klonbibliotheken von:				
	Undurchwurzelter Boden		Rhizosphäre		Rhizoplane
	ungeflutet (n = 55)	geflutet (n = 63)	ungeflutet (n = 50)	geflutet (n = 78)	geflutet (n = 35)
Anzahl der Arten repräsentiert durch Klone <sup>a</sup>	42	52	32	33	6
Anzahl der extrapolierten Arten <sup>a,b</sup>	258	190	85	146	11
95 % Konfidenzintervall <sup>a,b</sup>	140 - 517	128 - 304	57 - 143	83 - 289	7 - 25

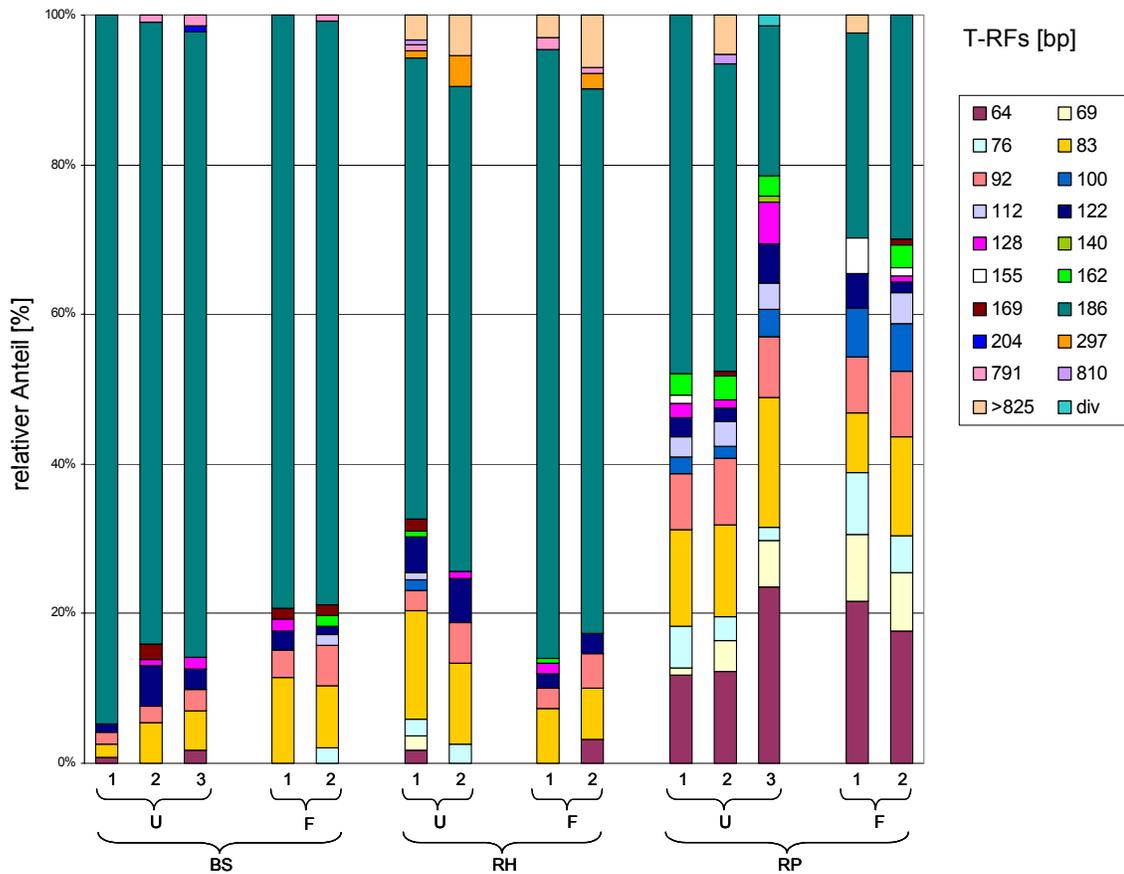
n: Anzahl der 16S rRNA-Gen Klone, welche in verschiedenen Kompartimenten analysiert wurden.

<sup>a</sup>: Anzahl der verschiedenen (<97 % Sequenzähnlichkeit) Klonsequenzen.

<sup>b</sup>: Anzahl der extrapolierten Arten (Chao1).

#### 1.4. Struktur und phylogenetische Diversität der *Archaea*

Mit Hilfe der genetischen Fingerabdruckmethode „T-RFLP“ (s. II.4.6.) wurden die Lebensgemeinschaften der *Archaea* in gefluteten und ungefluteten Pappelmikrokosmen mit Boden aus dem Jahr 2000 untersucht. Dazu wurden die fluoreszenz-markierten 16S rDNA-Amplifikate mit der Restriktionsendonuklease *TaqI* geschnitten und in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Es wurden vergleichend Analysen des undurchwurzelten Bodens, der Rhizosphäre und der Rhizoplane durchgeführt. Die Analyse wurde an zwei gefluteten und drei ungefluteten Pappelmikrokosmen durchgeführt. Zum Vergleich der T-RFLP-Profile der verschiedenen Umweltproben, wurden die Ergebnisse als Histogramme dargestellt (Abbildung 5), wobei jede Säule die gemittelten Werte der relativen Abundanzen einzelner T-RFs aus drei parallelen DNA-Extraktionen darstellt. Insgesamt wurden 19 verschiedene T-RFs in 42 archaeellen T-RFLP-Profilen detektiert. Dabei wurden T-RFs mit einer Länge >825 bp in einem T-RF zusammengefasst. In den „bulk soil“- und den Rhizosphäre-Proben zeigten die T-RFLP-Profile eine ähnliche Struktur der *Archaea* und es wurden jeweils zwischen 5 und 15 T-RFs detektiert. Die T-RFLP-Profile des Rhizoplane-Habitats waren diverser und die Anzahl der detektierten T-RFs schwankte zwischen 10 und 14 T-RFs.



**Abbildung 5:** Verteilung der gemittelten relativen Abundanz von T-RFs amplifizierter 16S rRNA Gene innerhalb der *Archaea* aus „bulk soil“ (BS), Rhizosphäre (RH) und Rhizoplane (RP) aus verschiedenen gefluteten (F) und ungefluteten (U) Pappelmikrokosmen (jeweils 2 - 3 Mikrokosmen). Dargestellt ist das Ergebnis nach Restriktion mit *TaqI*. Die relativen Anteile geben die prozentuale Peakhöhe einzelner T-RFs bezogen auf die Gesamtpeakhöhe wieder. Die Werte wurden jeweils aus Experimenten von drei parallelen DNA-Extraktionen gemittelt. Die Standardfehler einzelner T-RFs waren in der Regel geringer als 7 %. Die Fragmentlängen der T-RFs sind in Basenpaaren [bp] angegeben.

T-RFs mit einer Länge von 83 bp (1,8 - 17,4 %), 92 bp (1,5 - 8,9 %), 122 bp (1,0 - 5,8 %) und 186 bp (20,1 - 94,7 %) wurden in allen Kompartimenten sowohl unter gefluteten, als auch ungefluteten Bedingungen detektiert. Das T-RF von 186 bp Länge zeigte in den Umweltproben jeweils die höchste relative Abundanz und dominierte die archaeelle Population unabhängig von der Flutung (Abbildung 5). Im Habitat der Rhizoplane zeigte das T-RF von 186 bp im Vergleich mit den anderen Kompartimenten eine geringere relative Abundanz, während einige T-RFs wie z.B. T-RFs mit einer Länge von 64 bp (11,8 - 23,5 %); 69 bp (0,9 - 8,8 %); 76 bp (1,7 - 8,4 %) und 92 bp (7,5 - 8,9 %) eine höhere relative Abundanz aufwiesen.

Die phylogenetische Zuordnung der archaeellen T-RFs basiert auf sechs verschiedenen 16S rDNA-Klonbibliotheken aus den Kompartimenten „bulk soil“, Rhizosphäre und Rhizoplane unter ungefluteten und gefluteten Bedingungen. Die Klone wurden in die T-RFLP-Analyse und die Sequenzanalyse eingesetzt.

Insgesamt wurden 157 Klonsequenzen aus ungeflutetem „bulk soil“ (BSU: 42 Klone), geflutetem „bulk soil“ (BSF: 39 Klone), ungefluteter Rhizosphäre (RHU: 24 Klone), gefluteter Rhizosphäre (RHF: 32 Klone), ungefluteter Rhizoplane (RPU: 10 Klone) und gefluteter Rhizoplane (RPF: 10 Klone) erzeugt und nach Chimären-Analyse mittels einer Wu-Blast2 Suche (EMBL-Datenbank) und anschließender phylogenetischer Berechnung bestimmten phylogenetischen Linien der *Archaea* zugeordnet (Tabelle 13).

Nur zwei Klonsequenzen aus dem Habitat der Rhizoplane (T-RFs: 76 und 92 bp) wurden den *Euryarchaeota* zugeordnet. Alle anderen Klonsequenzen (n = 155) gruppierten innerhalb der *Crenarchaeota* (T-RFs: 92 und 186 bp). Dabei dominierten in allen Ansätzen Klonsequenzen mit dem für *Crenarchaeota* charakteristischen T-RF von 186 bp Länge sowohl unter ungefluteten als auch unter gefluteten Bedingungen. Dies bestätigte das Ergebnis der T-RFLP-Analyse, die in allen Umweltproben eine Dominanz des T-RFs von 186 bp Länge zeigte. Eine detaillierte Liste aller Klonsequenzen mit nächsten Verwandten, zugeordneten T-RFs und Referenzen ist in Anhang B zu finden.

Nur drei von 19 T-RFs aus den Umweltproben der Pappelmikrokosmen konnten mit Hilfe der Klonbibliotheken phylogenetisch korreliert werden (s. Tabelle 13). Dabei stellte sich heraus, dass das T-RF von 92 bp Länge charakteristisch für mehr als eine phylogenetische Linie ist. Dieses umfasst sowohl *Crenarchaeota* als auch *Euryarchaeota* Sequenzen. Im Habitat der ungefluteten Rhizoplane wurden zusätzlich zwei

Klonsequenzen mit diesem T-RF (92 bp) detektiert, welche bakteriellen (*Cyanobacteria*) bzw. pflanzlichen Ursprungs (Chloroplast) waren (nicht dargestellt). Dies zeigte eine unspezifische Amplifikation von bakterieller DNA mit dem verwendeten Primersystem. Eine mögliche unspezifische Amplifikation bakterieller 16S rRNA-Gene mit diesem Primerpaar bei der Analyse archaeeller Lebensgemeinschaften wurde bereits beschrieben (Kemnitz et al., 2004; Scheid et al., 2003). Einige der vermeintlich archaeellen T-RFs in den Umweltproben sind daher eventuell auf dieses methodische Problem zurückzuführen und unspezifischen bakteriellen Ursprungs.

**Tabelle 13:** Einordnung von 16S rRNA-Gen Umweltsequenzen aus Klonbibliotheken von undurchwurzeltem Boden, Rhizosphäre und Rhizoplane aus Pappelmikrokosmen unter gefluteten und ungefluteten Bedingungen zu phylogenetischen Gruppen der Domäne *Archaea* und ihre Zuordnung zu bestimmten terminalen Restriktionsfragmenten (T-RFs). Die Längen der T-RFs sind in Basenpaaren [bp] angegeben.

Phylogenetische Gruppe	Verteilung von 16S rRNA-Gen Klonen in:					
	Undurchwurzelter Boden		Rhizosphäre		Rhizoplane	
	ungeflutet (n = 42)	geflutet (n = 39)	ungeflutet (n = 24)	geflutet (n = 32)	ungeflutet (n = 10)	geflutet (n = 10)
	T-RF [bp] (n)	T-RF [bp] (n)	T-RF [bp] (n)	T-RF [bp] (n)	T-RF [bp] (n)	T-RF [bp] (n)
<i>Euryarchaeota</i>	-	-	-	-	76 (1)	92 (1)
<i>Crenarchaeota</i>	92 (1) 186 (41)	92 (1) 186 (38)	186 (24)	92 (1) 186 (31)	186 (9)	186 (9)

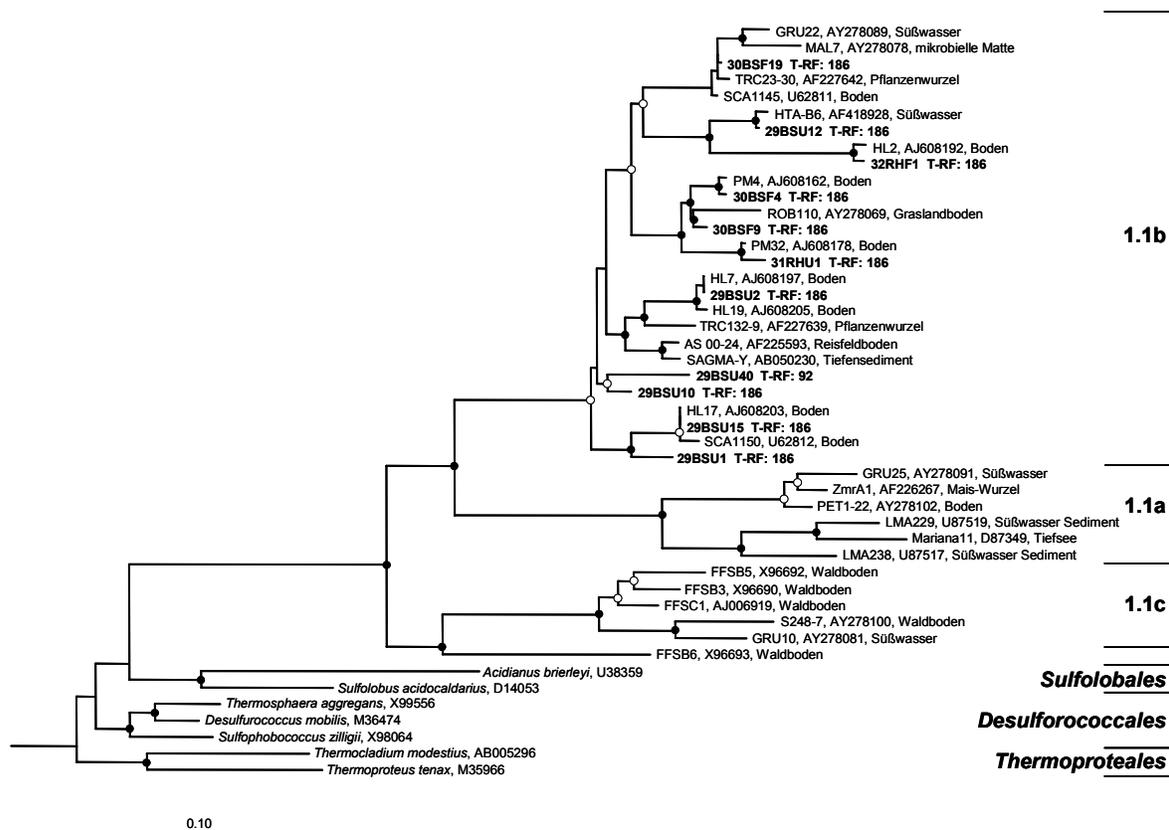
(n): Anzahl der 16S rRNA-Gen Klone, welche in verschiedenen Kompartimenten analysiert wurden.

-: nicht detektiert.

Die Abbildung 6 und Abbildung 7 zeigen die phylogenetische Verwandtschaft der Umwelt-Klonsequenzen innerhalb der *Cren-* und *Euryarchaeota*. Die gezeigten Dendrogramme wurden mit dem Maximum-Likelihood-Verfahren erstellt.

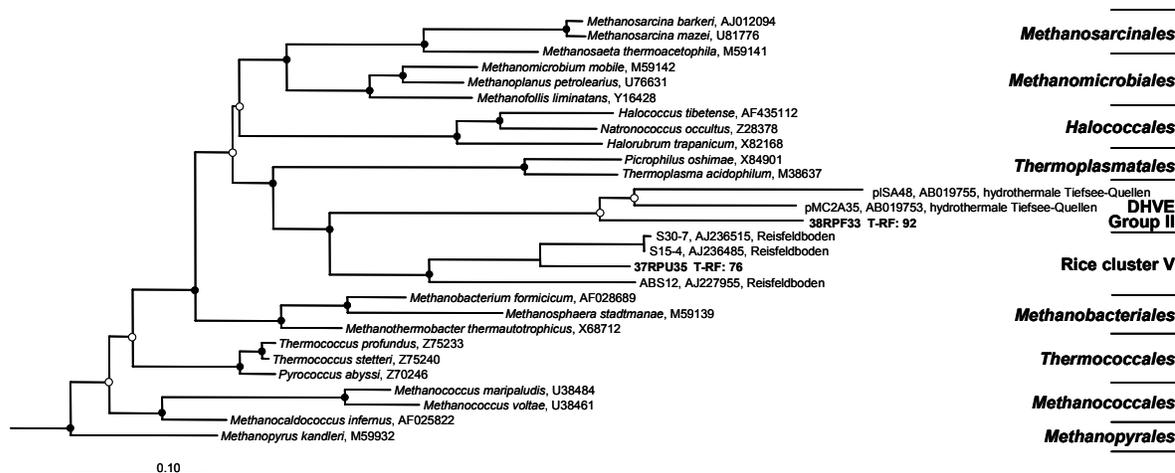
Alle Klonsequenzen innerhalb der *Crenarchaeota* (Abbildung 6) fielen in ein unkultiviertes Cluster, welches von DeLong (DeLong, 1998) als „Group 1.1b“ bezeichnet wurde und auch als Rice Cluster (RC)-VI bekannt ist (Chin et al., 1999a). Sequenzen, welche eine Ähnlichkeit  $\geq 97\%$  zeigten, wurden als eine Art definiert. Innerhalb der *Crenarchaeota*-Klonsequenzen wurden anhand dieses Kriteriums 10 verschiedene Gruppen detektiert. In die anschließende phylogenetische Berechnung dieses Dendrogramms wurden daher repräsentativ 11 der 155 erhaltenen *Crenarchaeota*-Umweltsequenzen einbezogen um deren phylogenetische Verwandtschaft zu Referenzsequenzen aus verschiedenen Habitaten darzustellen.

Die Klonsequenzen innerhalb der „Group 1.1b“ waren nah mit Umweltsequenzen aus Bodenproben des Überschwemmungsgebietes des Flusses Waal (Niederlande) verwandt, welche von Kemnitz und Mitarbeitern (Kemnitz et al., 2004) untersucht wurde. Ein Großteil der verwandten Umweltsequenzen wurde in Böden detektiert, aber auch im Süßwasser und an Pflanzenwurzeln konnte man Sequenzen dieser Gruppe nachweisen.



**Abbildung 6:** Phylogenetische Verwandtschaft von archaeellen 16S rRNA-Gen-Umweltsequenzen aus „bulk soil“ (BS) und Rhizosphäre (RH) von gefluteten (F) und ungefluteten (U) Pappelmikrokosmen innerhalb der *Crenarchaeota*. Die Berechnungen des Dendrogramms wurden mit der Maximum-Likelihood Methode und einem Filter (50 %), für die im Baum dargestellten Sequenzen, durchgeführt. Die 16S rRNA-Gen-Sequenz von *Methanopyrus kandleri* wurde verwendet, um die Wurzel des Dendrogramms zu bestimmen (nicht dargestellt). Der Maßstab entspricht 10 % Sequenzunterschied. Die „accession numbers“ der Referenzsequenzen sind angegeben. Die Längen der zugehörigen terminalen Restriktionsfragmente (T-RFs) nach in silico Restriktion mit *TaqI* sind in Basenpaaren dargestellt [bp]. Verzweigungspunkte, welche mit einem vollen Kreis gekennzeichnet sind, wurden durch mindestens zwei weitere phylogenetische Berechnungen bestätigt, während offene Kreise für eine Bestätigung durch nur eine weitere Berechnung stehen.

Die zwei Klonsequenzen innerhalb der *Euryarchaeota* waren mit dem „Rice Cluster V“ (Großkopf et al., 1998b) (T-RF: 76 bp) und einer als „Deep-sea Hydrothermal Vent Euryarchaeotic Group II“ (DHVE Group II) (Takai und Horikoshi, 1999) (T-RF: 92 bp) bezeichneten Gruppe verwandt (Abbildung 7), welche zusammen gruppieren und mit den *Thermoplasmatales* verwandt sind.



**Abbildung 7:** Phylogenetische Verwandtschaft von archaeellen 16S rRNA-Gen-Umweltsequenzen von der Rhizoplane (RP) aus gefluteten (F) und ungefluteten (U) Pappelmikrokosmen innerhalb der *Euryarchaeota*. Die Berechnungen des Dendrogramms wurden mit der Maximum-Likelihood Methode und einem Filter (50 %), für die im Baum dargestellten Sequenzen, durchgeführt. Die 16S rRNA-Gen-Sequenz von *Sulfolobus acidocaldarius* wurde verwendet, um die Wurzel des Dendrogramms zu bestimmen (nicht dargestellt). Der Maßstab entspricht 10 % Sequenzunterschied. Die „accession numbers“ der Referenzsequenzen sind angegeben. Die Längen der zugehörigen terminalen Restriktionsfragmente (T-RFs) nach in silico Restriktion mit *TaqI* sind in Basenpaaren dargestellt [bp]. Verzweigungspunkte, welche mit einem vollen Kreis gekennzeichnet sind, wurden durch mindestens zwei weitere phylogenetische Berechnungen bestätigt, während offene Kreise für eine Bestätigung durch nur eine weitere Berechnung stehen. DHVE bedeutet „Deep-sea Hydrothermal Vent Euryarchaeotic“.

## **2. Inkubationsexperiment aus Pappelmikrokosmen und feldfrischen Bodenproben**

### **2.1. Zeitlicher Verlauf geochemischer Parameter in Bodenaufschlammungen**

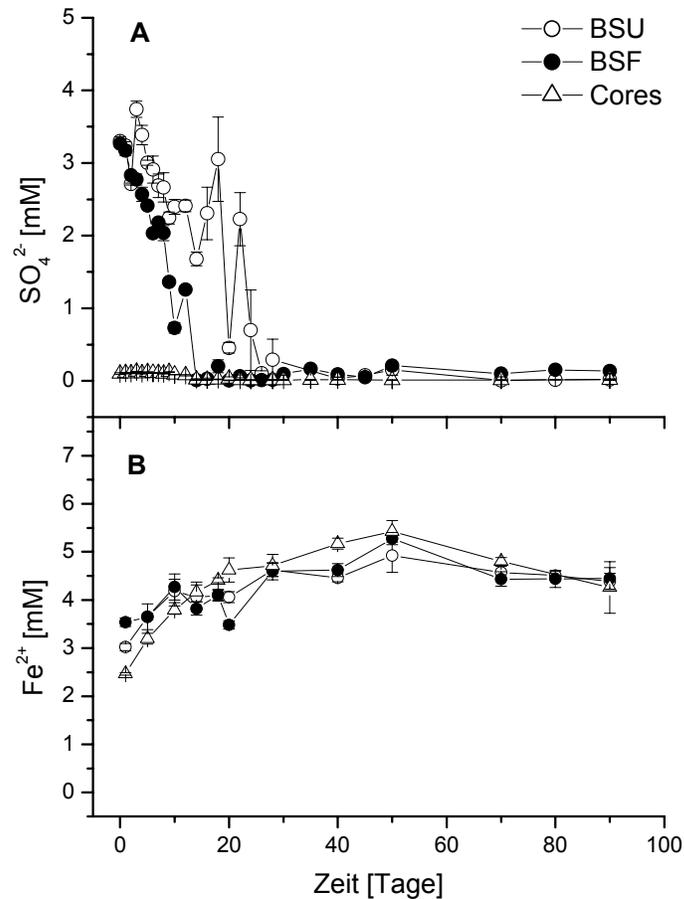
Zur Untersuchung mikrobiell gesteuerter Prozesse im verwendeten Boden (s. Tabelle 1) wurden Bodenaufschlammungen hergestellt (s. II.2.1.) und anaerob bei 25°C über einen Zeitraum von 90 Tagen inkubiert. Die Analysen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten der Inkubation durchgeführt. Für die Bodenaufschlammungen wurde Boden aus Pappelmikrokosmen unter ungefluteten oder gefluteten Bedingungen (1 Woche) verwendet. Zusätzlich wurde Boden aus feldfrischen Proben eingesetzt (s. Tabelle 1).

#### **2.1.1. Elektronenakzeptor-Konzentrationen**

In den Ansätzen des Pappelmikrokosmos-Bodens (ungeflutet und geflutet) wurden zu Inkubationsbeginn geringe Nitratkonzentrationen von <0,004 mM ermittelt, welche auf <0,001 mM während der Inkubation abnahmen (nicht dargestellt). Zu Inkubationsbeginn wurde in den Core-Proben bereits eine Nitratkonzentration von 0,26 mM nachgewiesen. Die Reduktion von Nitrat setzte in diesen Proben sofort mit dem Beginn der anoxischen Inkubation ein. Nach einem Tag war Nitrat vollständig reduziert.

Die Abbildung 8 stellt die zeitliche Änderung der Sulfat- und Fe(II)-Konzentrationen in den Bodenaufschlammungen während des untersuchten Inkubationszeitraumes dar. In den Ansätzen des ungefluteten Bodens nahm die Sulfatkonzentration von anfangs 3,3 mM über einen Zeitraum von 26 Tagen ab. In den Aufschlammungen mit vorgeflutetem Boden wurde Sulfat ebenfalls mit einer Anfangskonzentration von 3,3 mM ermittelt und nahm innerhalb von 14 Tagen ab. Die Core-Proben wiesen schon zu Beginn der Inkubation geringere Sulfatkonzentrationen von 0,1 mM auf, und ab Tag 22 wurden Werte um die 0,01 mM gemessen.

Mit Beginn der anoxischen Inkubation nahm die Fe(II)-Konzentration in allen Inkubationen zu. Die Eisenkonzentrationen stiegen bis zum Tag 50 an und erreichten maximal 4,9 mM (ungeflutet) und 5,3 mM (geflutet) in den Pappelmikrokosmos-Boden-Inkubationen bzw. 5,4 mM in den feldfrischen Core-Proben und blieben dann in allen Ansätzen im Bereich von 4,5 mM konstant.



**Abbildung 8:** Zeitliche Änderung der Sulfatkonzentrationen (A) und Fe(II)-Konzentrationen (B) in anaerob inkubierten Bodenaufschlämmungen mit Boden aus ungefluteten (BSU) und gefluteten Pappelmikrokosmen (BSF), sowie feldfrischem Boden (Cores), (Mittelwert  $\pm$  Standardfehler,  $n = 3$ ).

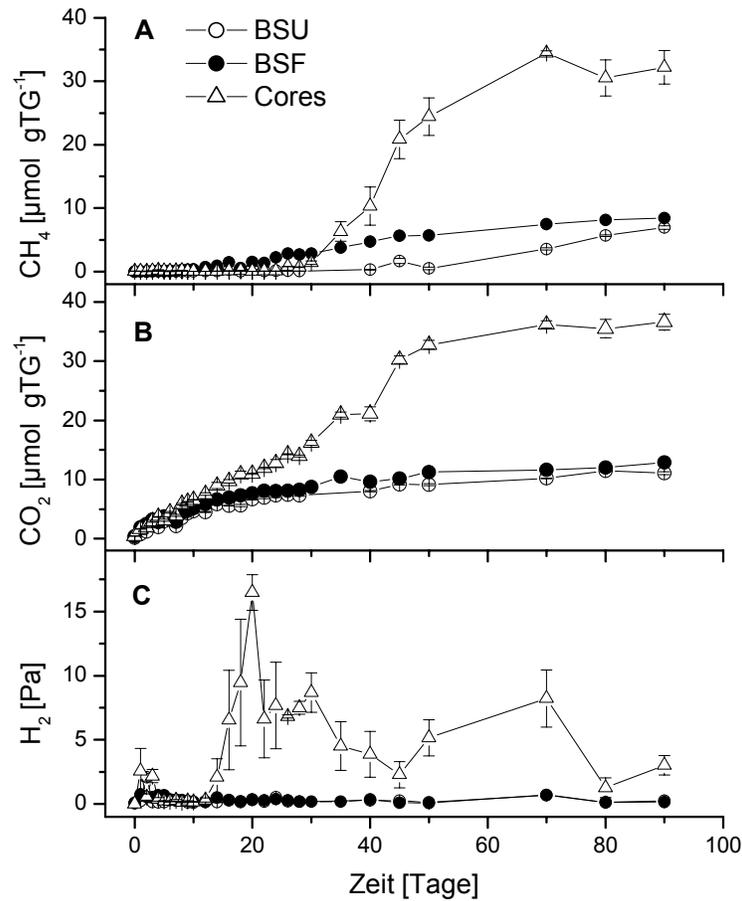
### 2.1.2. Methan, Kohlendioxid und Wasserstoff

Die Konzentrationen von  $\text{CH}_4$ ,  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2$  der Bodenaufschlämmungen während der Inkubation sind in Abbildung 9 dargestellt. In der Abbildung 9 A wird ersichtlich, dass die Methanproduktion in allen drei Bodenproben nach Abschluss der jeweiligen Sulfatreduktions-Phase (s. Abbildung 8), einsetzte und danach kontinuierlich anstieg. In den ungefluteten „bulk soil“-Ansätzen nahm die Methankonzentration ab Tag 40 zu, während in den Aufschlämmungen des vorgefluteten Mikrokosmos-Bodens die

Methanproduktion bereits ab Tag 16 einsetzte. In den Core-Proben stieg die Methankonzentrationen ab Tag 30 deutlich an. In den ungefluteten und gefluteten Pappelmikrokosmos-Bodenproben wurden nach einer Inkubationszeit von 90 Tagen Methankonzentrationen von 7 bzw. 8  $\mu\text{mol gTG}^{-1}$  nachgewiesen, während in den feldfrischen Proben (Cores) 32  $\mu\text{mol gTG}^{-1}$  ermittelt wurden.

Die Bildung von Kohlendioxid begann sofort nach Herstellen der Inkubationsansätze (Abbildung 9 B). Nach der 90-tägigen Inkubation war die  $\text{CO}_2$ -Konzentration in den Core-Ansätzen mit ca. 36  $\mu\text{mol gTG}^{-1}$  gegenüber den ungefluteten (11  $\mu\text{mol gTG}^{-1}$ ) und vorgefluteten (13  $\mu\text{mol gTG}^{-1}$ ) Ansätzen der „bulk soil“-Proben am höchsten.

In der Abbildung 9 C ist der zeitliche Verlauf der Wasserstoff-Partialdrücke während der Inkubation der Bodenaufschlammungen zu verschiedenen Zeitpunkten dargestellt. Nachdem in den ungefluteten „bulk soil“-Ansätzen ein maximaler Wert von 2 Pa nach zwei Tagen erreicht wurde, blieben die Wasserstoff-Partialdrücke in einem Bereich von 0,1 bis 0,7 Pa konstant. Die vorgefluteten „bulk soil“-Proben zeigten nach einem Tag einen geringen Anstieg auf 0,8 Pa Wasserstoff und erreichten während der weiteren Inkubation Wasserstoff-Partialdrücke zwischen 0,1 bis 0,7 Pa. Die Core-Ansätze zeigten ab Tag 14 der Inkubation einen Anstieg der Wasserstoff-Partialdrücke auf einen maximalen Wert von 16,5 Pa am Tag 20. Danach nahm der Wasserstoff-Partialdruck wieder ab, was mit dem Beginn der Methanproduktion in diesen Bodenaufschlammungen korrelierte (s. Abbildung 9 A).



**Abbildung 9:** Zeitliche Änderung der  $\text{CH}_4$ -Konzentration (A),  $\text{CO}_2$ -Konzentration (B) in  $[\mu\text{mol gTG}^{-1}]$  und  $\text{H}_2$ -Partialdruck in [Pa] (C) in anaerob inkubierten Bodenaufschlämmungen mit Boden aus ungefluteten (BSU) und gefluteten Pappelmikrokosmen (BSF), sowie feldfrischem Boden (Cores), (Mittelwert  $\pm$  Standardfehler,  $n = 3$ ).

### 2.1.3. Organische Säuren und pH-Wert

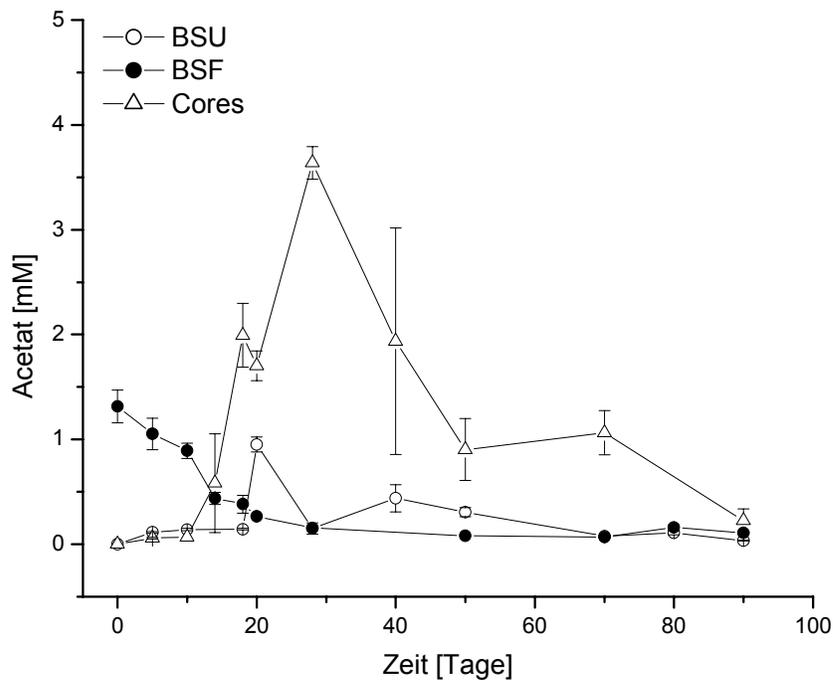
Während der Inkubation der Bodenaufschlämmungen wurden folgende organische Säuren nachgewiesen: Acetat, Propionat, Formiat und Laktat.

Der zeitliche Verlauf der Acetat-Konzentrationen während der 90-tägigen Inkubation der Bodenaufschlämmungen ist in Abbildung 10 dargestellt. In den Ansätzen des ungefluteten Pappelmikrokosmosbodens stieg die Acetat-Konzentration bis zum Tag 20 auf 0,95 mM an. Bis zum Ende der Inkubation nahm diese auf 0,04 mM ab. In den

Bodenaufschlammungen des vorgefluteten Bodens aus Pappelmikrokosmen sank die Acetat-Konzentration von 1,31 mM zu Beginn der Inkubation auf 0,11 mM nach 90-tägiger Inkubation ab. Die Acetat-Konzentration in den feldfrischen Core-Proben stieg bis zum Tag 28 auf 3,64 mM und sank danach bis zum Ende der Inkubationszeit auf 0,23 mM bis Tag 90. Die deutliche Konzentrationsabnahme von Acetat korrelierte in diesen Proben mit einem Anstieg der Methankonzentration ab Tag 30 (s. Abbildung 9).

Laktat- und Formiatkonzentrationen waren  $<0,08$  mM bzw.  $<0,29$  mM und blieben im Wesentlichen während der Inkubation stabil. Propionatkonzentrationen wurden in den gefluteten „bulk soil“-Proben mit  $<0,1$  mM nachgewiesen, während in den Core-Proben ein maximaler Wert von 0,5 mM detektiert wurde (nicht dargestellt).

Der pH-Wert der Bodenproben aus den Mikrokosmen und den Cores lag vor und nach der Inkubation im neutralen Bereich (zwischen 7,2 und 7,8).



**Abbildung 10:** Zeitliche Änderung der Acetatkonzentrationen in anaerob inkubierten Bodenaufschlammungen mit Boden aus ungefluteten (BSU) und gefluteten Pappelmikrokosmen (BSF), sowie feldfrischem Boden (Cores), (Mittelwert  $\pm$  Standardfehler,  $n = 3$ ).

## 2.2. Mikrobielle Gemeinschaften der Bodenaufschlammungen

Um einen Einblick in die zeitlichen Änderungen der beteiligten mikrobiellen Gemeinschaften der *Bacteria* und *Archaea* in den Bodenaufschlammungen zu bekommen, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten der Inkubation DNA-fingerprints mit Hilfe der T-RFLP-Analyse (s. II.4.6.) angefertigt.

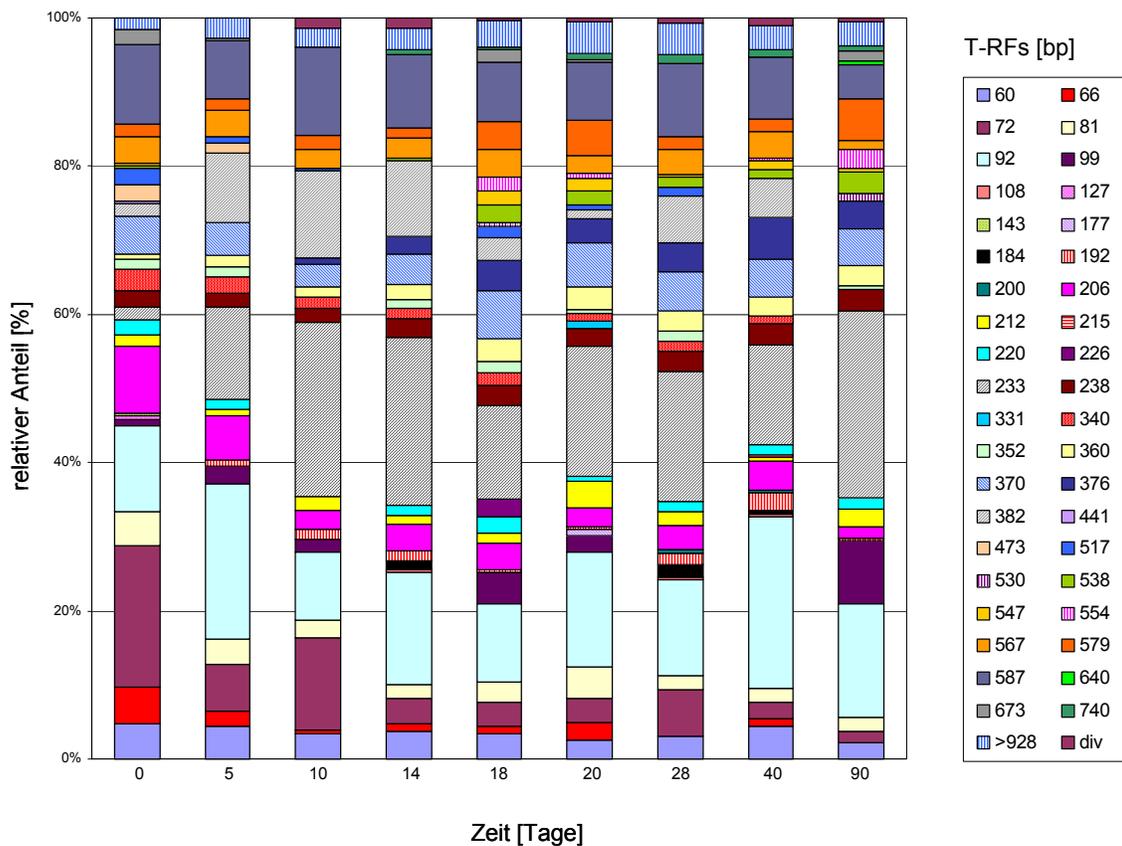
Für die molekulare Analyse wurde zu neun Inkubationszeitpunkten DNA aus Bodenaufschlammungen isoliert. Zu jedem Zeitpunkt wurde aus drei unter den gleichen Bedingungen inkubierten Bodenaufschlammungen jeweils ein DNA-Extrakt gewonnen und anschließend die Analyse der Zusammensetzung der bakteriellen und archaeellen Gemeinschaft in den jeweiligen Extrakten mittels T-RFLP-Analyse durchgeführt. Die relative Häufigkeit der einzelnen T-RFs wurde über die relative Peakhöhe aus allen Peaks der Gesamthöhe eines T-RF-Profiles berechnet. Dies resultierte in relativen Abundanzen einzelner T-RFs, welche in den Abbildungen 11 – 16 dargestellt sind. Die Normalisierung der Fluoreszenzsignale (s. II.4.6.3.) erfolgte innerhalb eines Datensatzes (ungefluteter, gefluteter und feldfrischer Boden). Um die T-RFLP-Profile miteinander zu vergleichen werden die Ergebnisse als Histogramme gezeigt, wobei jede Säule die gemittelten Werte der relativen Abundanzen einzelner T-RFs aus diesen drei parallelen DNA-Extraktionen darstellt. Die Säulen repräsentieren die Ergebnisse zu verschiedenen Zeitpunkten der Inkubation.

### 2.2.1. Struktur und phylogenetische Diversität der *Bacteria*

Der zeitliche Verlauf der relativen Abundanzen einzelner bakterieller T-RFs aus den Boden-Inkubationen der Pappelmikrokosmen ist in Abbildung 11 unter ungefluteten und in Abbildung 12 unter gefluteten Bedingungen dargestellt. Abbildung 13 zeigt diesen zeitlichen Verlauf aus Boden-Inkubationen mit feldfrischen Bodenproben.

Unter ungefluteten Bedingungen (Abbildung 11) wurden in den Inkubationsansätzen insgesamt 41 verschiedene T-RFs detektiert, davon jeweils zwischen 22 und 31 verschiedene T-RFs in den einzelnen Ansätzen. Jene T-RFs mit einer relativen Abundanz >4 % werden hervorgehoben, da sie charakteristisch für eine zeitliche Phase waren. 14 von 41 T-RFs erfüllen dieses Kriterium und zeigten somit ihre Dominanz in diesem Habitat (60, 66, 72, 81, 92, 99, 206, 233, 370, 376, 382, 579, 587 und >928 bp). Davon wiesen fünf T-RFs eine relative Abundanz >10 % auf (72, 92, 233, 382 und 587 bp) und konnten zu

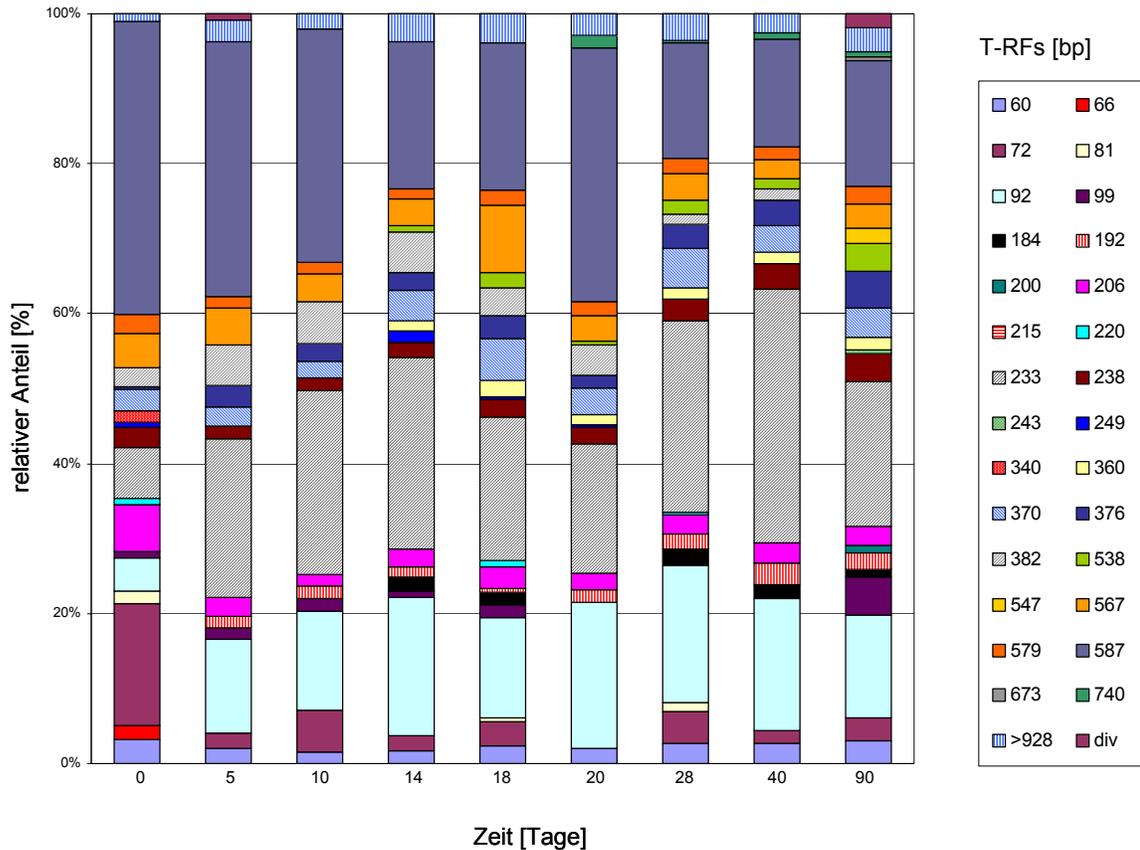
allen Inkubationszeitpunkten, mit Ausnahme des T-RFs von 382 bp Länge, nachgewiesen werden. Nach einer Inkubationsdauer von 90 Tagen wurde dieses T-RF nicht detektiert. Die relative Abundanz des T-RFs mit einer Länge von 72 bp (19,1 % - 1,6 %) nahm bis zum Tag 14 der Inkubation ab und blieb dann während der weiteren Inkubation im Wesentlichen stabil. Das T-RF von 233 bp (1,7 - 25,1 %) zeigte eine Zunahme bis zum Tag 5 und blieb dann ebenfalls stabil. Die T-RFs von 92 bp Länge (9,3 - 23,3 %) und 587 bp Länge (4,7 - 12,0 %) zeigten geringe sichtbare Schwankungen in ihrer relativen Abundanz über den gesamten Inkubationszeitraum. Das T-RF von 382 bp Länge (1,7 - 11,7 %) hingegen variierte stärker in seiner relativen Abundanz während der Inkubation.



**Abbildung 11:** Zeitlicher Verlauf der gemittelten relativen Abundanz von T-RFs amplifizierter 16S rRNA Gene innerhalb der *Bacteria* von Bodenaufschlämmungen („bulk soil“, ungeflutet) aus Pappelmikrokosmen. Dargestellt ist das Ergebnis nach Restriktion mit *HhaI*. Die relativen Anteile geben die prozentuale Peakhöhe einzelner T-RFs bezogen auf die Gesamtpeakhöhe wieder. Die Standardfehler einzelner T-RFs waren in der Regel geringer als 8 % (n =3). Die Fragmentlängen der T-RFs sind in Basenpaaren [bp] angegeben.

In den Inkubationsansätzen mit Boden aus zuvor gefluteten Pappelmikrokosmen (eine Woche) wurden zu verschiedenen Inkubationszeitpunkten jeweils 16 bis 24 T-RFs detektiert. Insgesamt wurden 29 verschiedene T-RFs detektiert (Abbildung 12). 10 T-RFs wurden durch eine relative Abundanz >4 % repräsentiert (72, 92, 99, 206, 233, 370, 376, 382, 567 und 587 bp), wovon vier T-RFs eine relative Abundanz >10 % aufwiesen (72, 92, 233 und 587 bp) und somit als charakteristisch für diesen Boden anzusehen sind, da sie auch in den ungefluteten Inkubationsansätzen die höchsten relativen Abundanzen zeigten (Abbildung 11). Wie auch in der Inkubationsreihe des ungefluteten Bodens beschrieben, zeigte sich eine deutliche Abnahme der relativen Abundanz des T-RFs mit einer Länge von 72 bp (16,1 - 1,6 %), allerdings schon ab Tag 5 der Inkubation. Das T-RF von 233 bp (6,8 - 33,6 %) zeigte, wie auch im Boden aus zuvor ungefluteten Pappelmikrokosmen, eine Zunahme bis zum Tag 5 und blieb dann im Wesentlichen stabil. Dies trifft auch für das T-RF der Länge 92 bp (4,3 - 19,4 %) zu. Das T-RF von 587 bp Länge (14,4 - 38,8 %) variierte in seiner relativen Abundanz während der Inkubation. Die T-RFs der Fragmentlängen 92, 233 und 587 bp zeigten in diesen Inkubationsansätzen die höchsten relativen Abundanzen. Im Vergleich zur Inkubationsreihe des ungefluteten Bodens zeigte sich hier eine deutlich höhere relative Abundanz des T-RFs der Fragmentlänge 587 bp.

Die niedrigere Anzahl an T-RFs in den jeweiligen Inkubationsansätzen unter gefluteten Bedingungen kann durch die interne Normalisierung innerhalb der jeweiligen Datenreihe zustande kommen, da T-RFs mit sehr geringen relativen Anteilen aufgrund dieser Vorgehensweise nicht berücksichtigt wurden. Vorrangig werden in dieser molekularen Analyse jedoch die T-RFs beschrieben, welche die Zusammensetzung der bakteriellen Lebensgemeinschaft dominieren.

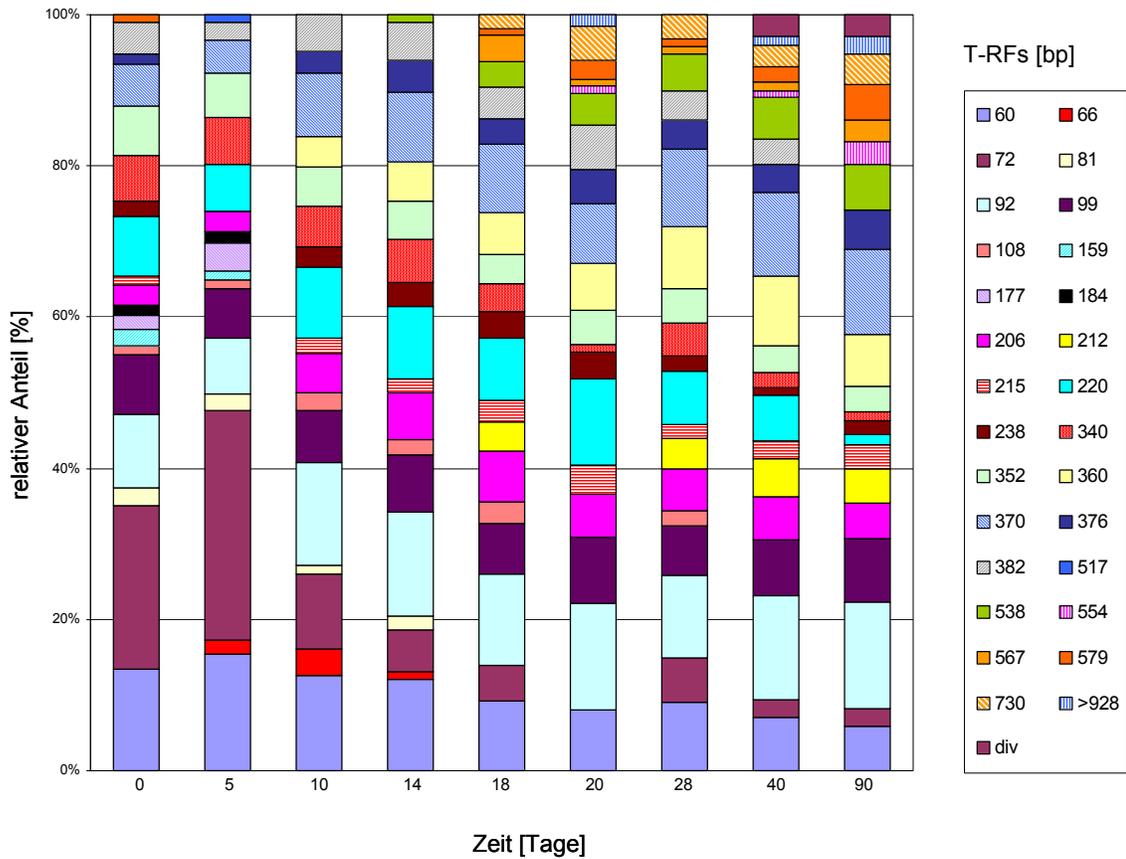


**Abbildung 12:** Zeitlicher Verlauf der gemittelten relativen Abundanz von T-RFs amplifizierter 16S rRNA Gene innerhalb der *Bacteria* von Bodenaufschlammungen („bulk soil“, geflutet) aus Pappelmikrokosmen. Dargestellt ist das Ergebnis nach Restriktion mit *HhaI*. Die relativen Anteile geben die prozentuale Peakhöhe einzelner T-RFs bezogen auf die Gesamtpeakhöhe wieder. Die Standardfehler einzelner T-RFs waren in der Regel als 6 % (n=3). Die Fragmentlängen der T-RFs sind in Basenpaaren [bp] angegeben.

Zum Vergleich mit Inkubationsansätzen mit Boden aus Pappelmikrokosmen wurde auch eine Inkubationsreihe mit Boden aus feldfrischen Proben molekular analysiert. In diesem Habitat wurden zu den untersuchten Inkubationszeitpunkten insgesamt 28 verschiedene T-RFs detektiert, davon jeweils 17 bis 21 in den jeweiligen Proben (Abbildung 13).

Die Entwicklung der gesamten bakteriellen Lebensgemeinschaft spiegelt sich in den T-RFLP-Profilen durch das Vorhandensein oder die Abwesenheit einzelner T-RFs wider. Auch wenn die meisten T-RFs über den gesamten Inkubationszeitraum detektiert wurden, so sind doch zeitliche Unterschiede im Erscheinen einiger T-RFs festzustellen. Das T-RF der Länge 360 bp (4,0 - 9,3 %) wurde z. B. erst ab Tag 10 der Inkubation nachgewiesen und das T-RF von 212 bp Länge (3,8 - 5,1 %) wurde ab Tag 18 detektiert, während das T-RF der Länge 81 bp (1,1 - 2,5 %) nur bis Tag 14 der Inkubation gefunden wurde. Am deutlichsten zeigt sich eine Abnahme der relativen Abundanz des T-RFs von 72 bp Länge (30,3 - 2,2 %) über den gesamten Zeitraum der Inkubation. Insgesamt betrachtet wiesen 16 T-RFs eine relative Abundanz >4 % auf (60, 72, 92, 99, 206, 212, 220, 340, 352, 360, 370, 376, 382, 538, 579 und 730 bp), wovon fünf T-RFs eine relative Abundanz >10 % zeigten (60, 72, 92, 220 und 370 bp). Diese T-RFs wurden über den gesamten analysierten Zeitraum nachgewiesen, mit Ausnahme des T-RFs von 72 bp Länge, welcher am Tag 20 der Inkubation nicht detektiert wurde.

Im Vergleich zu den T-RF-Profilen des Bodens aus Pappelmikrokosmen zeigt sich hier eine höhere relative Abundanz der T-RFs von 60, 220 und 370 bp Länge. Gemeinsam ist den Böden eine hohe relative Abundanz (>10 %) der T-RFs von 72 und 92 bp Länge. Die T-RFs der Fragmentlängen 233 und 587 bp, welche eine relative Abundanz >10 % in dem Boden aus Mikrokosmen zeigten, wurden in den Proben des feldfrischen Bodens hingegen nicht detektiert. Hinsichtlich der T-RFLP-Profile sind die untersuchten Böden deutlich zu unterscheiden.



**Abbildung 13:** Zeitlicher Verlauf der gemittelten relativen Abundanz von T-RFs amplifizierter 16S rRNA Gene innerhalb der *Bacteria* von Bodenaufschlämmungen mit feldfrischen Bodenproben aus dem Jahr 2002. Dargestellt ist das Ergebnis nach Restriktion mit *HhaI*. Die relativen Anteile geben die prozentuale Peakhöhe einzelner T-RFs bezogen auf die Gesamtppeakhöhe wieder. Die Standardfehler einzelner T-RFs waren in der Regel geringer als 5 % (n=3). Die Fragmentlängen der T-RFs sind in Basenpaaren [bp] angegeben.

Die phylogenetische Zuordnung der bakteriellen T-RFs basiert auf den Klonbibliotheken aus der molekularen Analyse der mikrobiellen Gemeinschaft in Pappelmikrokosmen (s. III.1.2., Tabelle 11) und ist in Tabelle 14 dargestellt.

Da die verschiedenen Böden aus dem gleichen Habitat stammen, liefern die im ersten Versuchsteil erstellten Klonbibliotheken Hinweise auf die eventuell vorhandene Population der *Bacteria*. Es ist dabei jedoch zu beachten, dass einige T-RFs von verschiedenen phylogenetischen Gruppen stammen können. Beispielsweise sind die T-RFs von 60 bp und 92 bp Länge unter anderem typisch für *Alpha*- und *Deltaproteobacteria*.

**Tabelle 14:** Zuordnung der T-RFs zu phylogenetischen Gruppen der Domäne *Bacteria*. Die Längen der T-RFs sind in Basenpaaren [bp] angegeben.

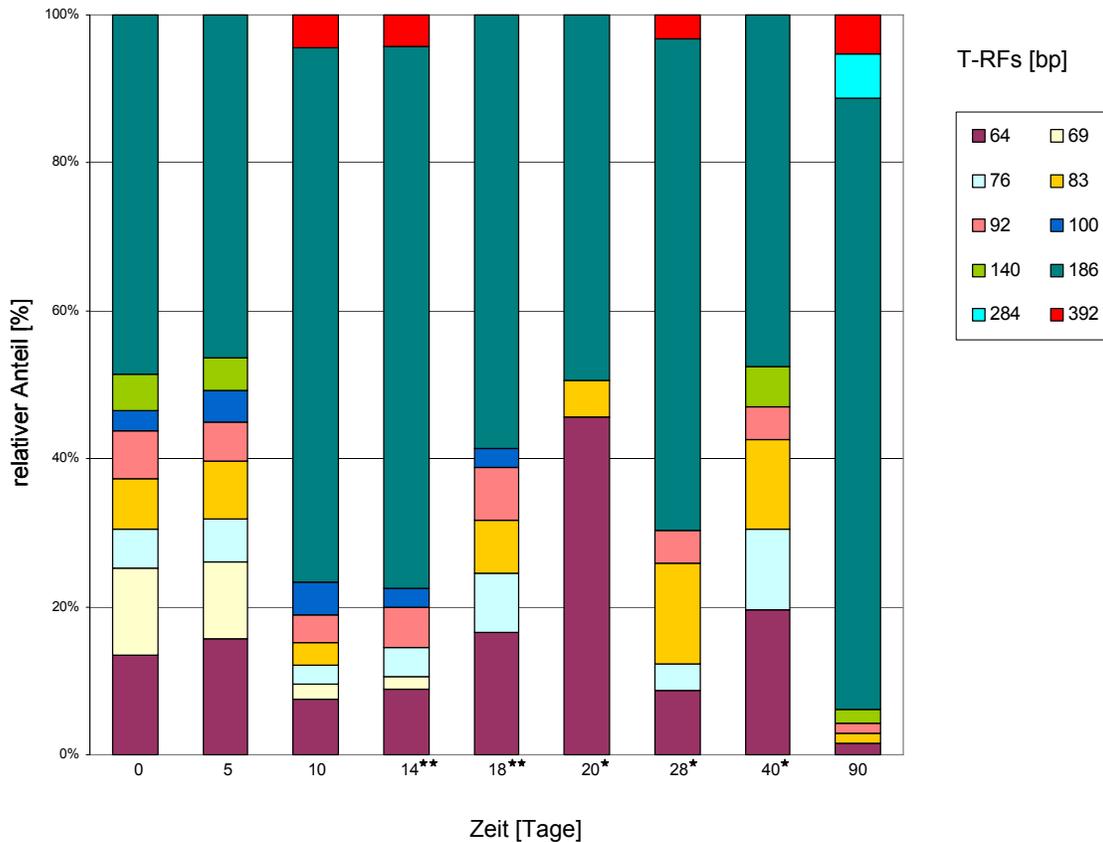
T-RF [bp]	Phylogenetische Gruppe	T-RF [bp]	Phylogenetische Gruppe	T-RF [bp]	Phylogenetische Gruppe
60	<i>Alphaproteobacteria</i> <i>Betaproteobacteria</i> <i>Deltaproteobacteria</i> <i>Verrucomicrobia</i>	212	<i>Gammaproteobacteria</i>	441	<i>Actinobacteria</i>
66	<i>Betaproteobacteria</i> <i>Gammaproteobacteria</i> <i>Bacteroidetes</i>	215	<i>Verrucomicrobia</i>	473	<i>Actinobacteria</i> <i>Bacillales</i>
72	<i>Bacillales</i>	220	<i>Gammaproteobacteria</i> <i>Actinobacteria</i> <i>Acidobacteria</i>	517	<i>Alphaproteobacteria</i>
81	<i>Alphaproteobacteria</i> <i>Gammaproteobacteria</i> <i>Deltaproteobacteria</i> <i>Planctomycetes</i>	226	<i>Alphaproteobacteria</i> <i>Bacillales</i>	530	n.d.
92	<i>Alphaproteobacteria</i> <i>Deltaproteobacteria</i> <i>Bacteroidetes</i> <i>Chlorobi</i>	233	<i>Bacillales</i> <i>Bacteroidetes</i>	538	n.d.
99	<i>Verrucomicrobia</i>	238	<i>Bacillales</i> <i>Actinobacteria</i>	547	<i>Bacillales</i>
108	<i>Alphaproteobacteria</i>	243	<i>Bacillales</i>	554	n.d.
127	n.d.	249	n.d.	567	<i>Betaproteobacteria</i>
143	<i>Actinobacteria</i>	331	<i>Alphaproteobacteria</i>	579	<i>Bacillales</i>
159	<i>Alphaproteobacteria</i>	340	<i>Alphaproteobacteria</i>	587	<i>Acidobacteria</i>
177	<i>Betaproteobacteria</i> <i>Gammaproteobacteria</i>	352	<i>Alphaproteobacteria</i> <i>Gemmatimonadetes</i>	640	n.d.
184	<i>Actinobacteria</i>	360	<i>Clostridiales</i> <i>Actinobacteria</i>	673	<i>Actinobacteria</i>
192	<i>Verrucomicrobia</i>	370	<i>Alphaproteobacteria</i> <i>Betaproteobacteria</i> <i>Gammaproteobacteria</i> <i>Deltaproteobacteria</i> <i>Actinobacteria</i> <i>Nitrospira</i>	730	n.d.
200	n.d.	376	<i>Actinobacteria</i>	740	unbekannte Zuordnung
206	<i>Betaproteobacteria</i> <i>Bacillales</i>	382	<i>Acidobacteria</i>	>928	<i>Actinobacteria</i> <i>Bacteroidetes</i>

n.d.: nicht in den Klonbibliotheken detektiert.

### 2.2.2. Struktur und phylogenetische Diversität der *Archaea*

Die Diversität der *Archaea* in den Bodenaufschlammungen und deren Dynamik während der anoxischen Inkubation wurde ebenfalls mittels T-RFLP-Analyse der 16S rDNA-Amplikons untersucht. Die Ergebnisse werden im Folgenden als Histogramme gezeigt. In der Regel stellt jede Säule die gemittelten Werte der relativen Abundanzen einzelner T-RFs aus drei Replikat-DNA-Extraktionen dar. In einigen Fällen war eine Amplifikation der 16S rRNA-Gene für die T-RFLP-Analyse jedoch nicht für alle DNA-Extrakte möglich, so dass sich die dargestellten Ergebnisse auf einen Einzelwert oder eine Doppelbestimmung beziehen. Dies ist in den jeweiligen Abbildungen vermerkt.

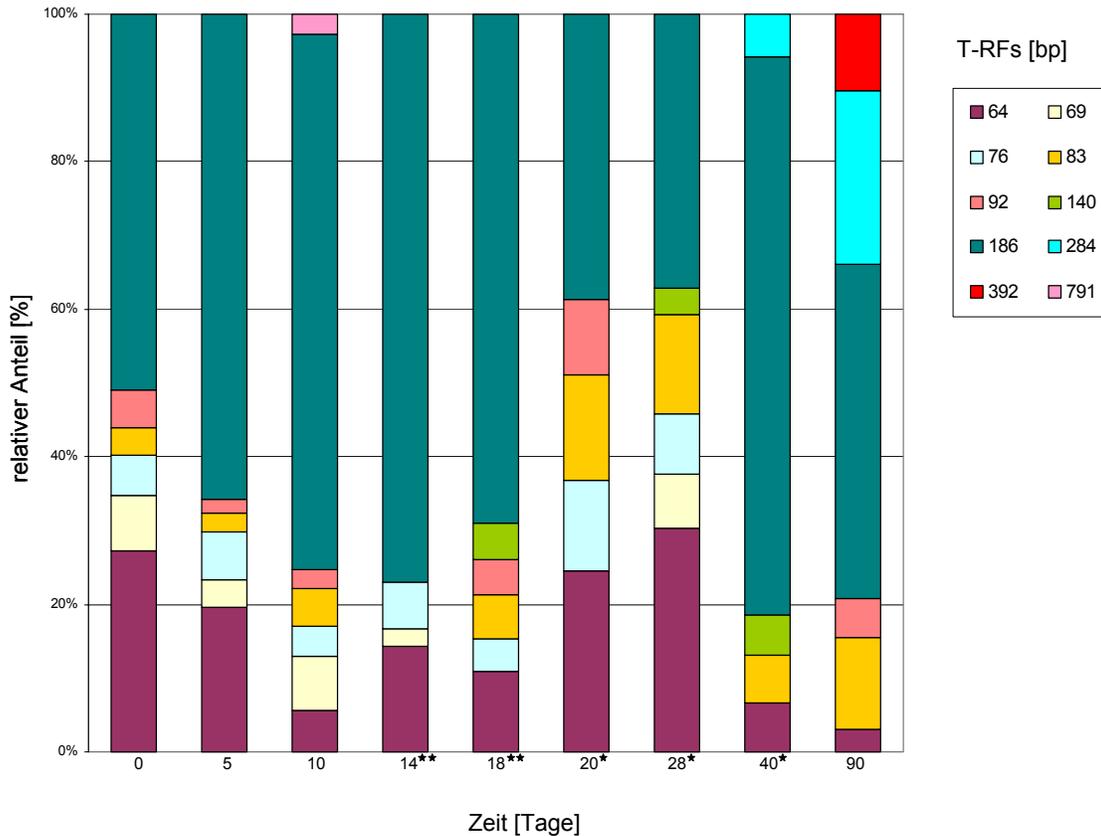
Der zeitliche Verlauf der relativen Abundanzen einzelner archaeeller T-RFs aus den Boden-Inkubationen der ungefluteten Pappelmikrokosmen ist in Abbildung 14 dargestellt. In den Inkubationsansätzen wurden insgesamt 10 verschiedene T-RFs von 64, 69, 76, 83, 92, 100, 140, 186, 284 und 392 bp Länge detektiert, davon jeweils zwischen drei bis acht verschiedene T-RFs in den einzelnen Ansätzen. Das T-RF von 186 bp Länge (46,3 - 82,7 %) dominierte über den gesamten untersuchten Inkubationszeitraum die Lebensgemeinschaft der *Archaea*. Nach einer Inkubation von 90 Tagen zeigte es die höchste relative Abundanz (82,7 %). Die relative Häufigkeit des T-RFs mit 64 bp Länge wurde ebenfalls in allen Ansätzen nachgewiesen und variierte zwischen 1,5 bis 45,7 %. Das T-RF von 284 bp Länge wurde erst nach einer Inkubationsdauer von 90 Tagen mit einem relativen Anteil von 5,9 % detektiert. Die T-RFs von 76 bp (2,6 - 10,8 %), 83 bp (1,5 - 13,6 %), 92 bp (1,4 - 7,1 %) und 392 bp (3,2 - 5,3 %) Länge variierten in ihrer relativen Abundanz und ihrem Vorkommen über den untersuchten Zeitraum. Das T-RF der Länge 69 bp (11,7 - 1,8 %) wurde bis zum Tag 14 mit abnehmender relativer Abundanz nachgewiesen.



**Abbildung 14:** Zeitlicher Verlauf der gemittelten relativen Abundanz von T-RFs amplifizierter 16S rRNA Gene innerhalb der *Archaea* von Bodenaufschlämmungen („bulk soil“, ungeflutet) aus Pappelmikrokosmen. Dargestellt ist das Ergebnis nach Restriktion mit *TaqI*. Die relativen Anteile geben die prozentuale Peakhöhe einzelner T-RFs bezogen auf die Gesamtppeakhöhe wieder. Die Standardfehler einzelner T-RFs waren in der Regel geringer als 10 % (n = 2 oder 3). \* = ein Replikat amplifizierbar; \*\* = zwei Replikate amplifizierbar. Die Fragmentlängen der T-RFs sind in Basenpaaren [bp] angegeben.

Der zeitliche Verlauf der relativen Abundanzen einzelner archaeeller T-RFs aus den Boden-Inkubationen der vorgefluteten Pappelmikrokosmen (eine Woche) ist in Abbildung 15 dargestellt. In den verschiedenen Inkubationsansätzen wurden auch hier 10 verschiedene T-RFs detektiert (64, 69, 76, 83, 92, 140, 186, 284, 392 und 791 bp Länge), davon vier bis sieben in den jeweiligen Proben. Die T-RFs der Längen 64 bp (3,1 - 30,3 %) und 186 bp (37,1 - 77,1 %) wurden über den gesamten Zeitraum nachgewiesen. Das Fragment von 186 bp war ebenfalls in allen Ansätzen dominant. Das Ende des Inkubationszeitraumes ist auch hier durch das Vorkommen eines T-RFs von 284 bp Länge

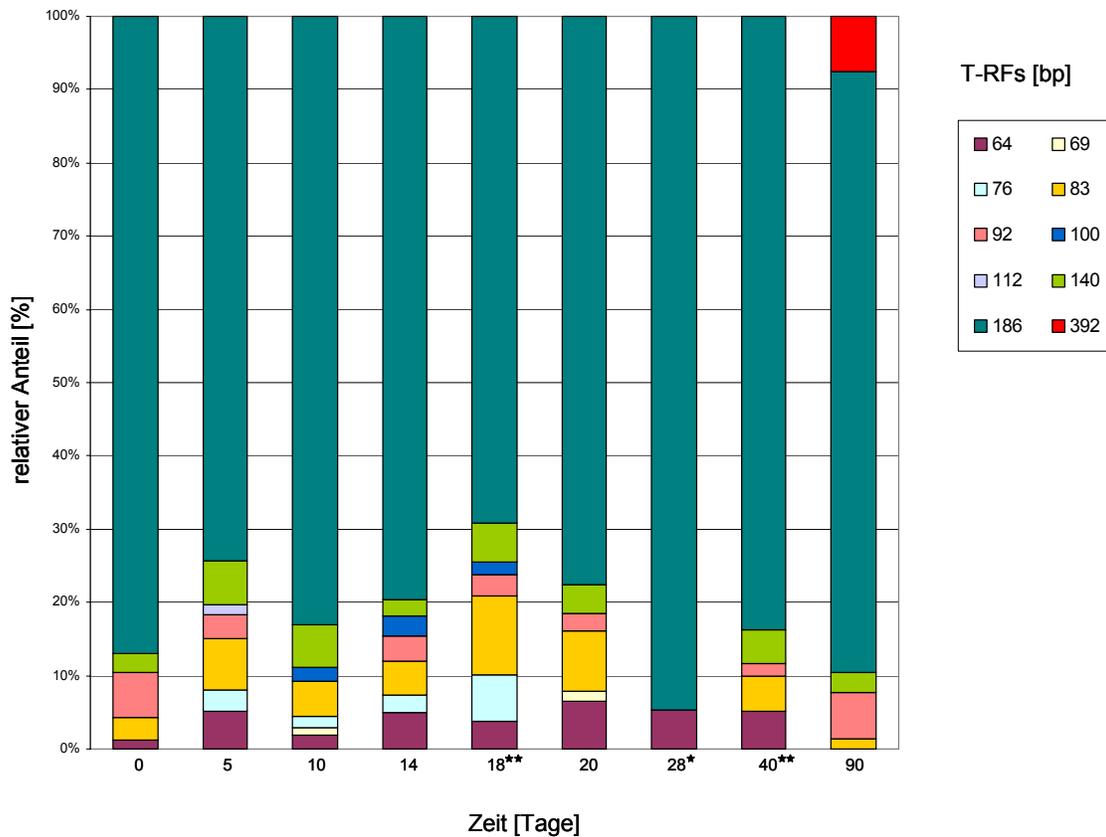
(5,7 - 23,6 %) charakterisiert, allerdings tritt dieser bereits ab Tag 40 der Inkubation auf. Das T-RF von 392 bp Länge (10,3 %) wurde während der Inkubation nur nach 90 Tagen und das T-RF von 791 bp Länge (2,7 %) nur am Tag 10 detektiert.



**Abbildung 15:** Zeitlicher Verlauf der gemittelten relativen Abundanz von T-RFs amplifizierter 16S rRNA Gene innerhalb der *Archaea* von Bodenaufschlammungen („bulk soil“, geflutet) aus Pappelmikrokosmen. Dargestellt ist das Ergebnis nach Restriktion mit *TaqI*. Die relativen Anteile geben die prozentuale Peakhöhe einzelner T-RFs bezogen auf die Gesamtppeakhöhe wieder. Die Standardfehler einzelner T-RFs waren in der Regel geringer als 10 % (n = 2 oder 3). \* = ein Replikat amplifizierbar; \*\* = zwei Replikate amplifizierbar. Die Fragmentlängen der T-RFs sind in Basenpaaren [bp] angegeben.

Ebenfalls wurde in feldfrischen Proben die archaeelle Lebensgemeinschaft und deren Entwicklung über einen Inkubationszeitraum von 90 Tagen mittels T-RFLP-Analyse untersucht (Abbildung 16). Zu allen neun untersuchten Zeitpunkten dominierte wie auch schon in den vorherigen Versuchsreihen jeweils das T-RF von 186 bp Länge (74,3 -

94,7 %) die Population der *Archaea* und zeigte hier höhere relative Abundanzen als in den Pappelmikrokosmosböden. Insgesamt wurden in den Ansätzen 10 verschiedene T-RFs (64, 69, 76, 83, 92, 100, 112, 140, 186, 392 bp) detektiert, deren Anzahl in den jeweiligen Umweltproben zwischen zwei bis sieben verschiedenen T-RFs schwankte. Die relativen Häufigkeiten der T-RFs mit 83 bp und 92 bp Länge variierten in den Ansätzen nur gering und betrug maximal 10,8 bzw. 6,2 %. Das T-RF von 392 bp Länge wurde nur nach einer Inkubationsdauer von 90 Tagen mit einem relativen Anteil von 7,5 % detektiert, während das T-RF von 64 bp zu diesem Zeitpunkt nicht mehr nachgewiesen werden konnte.



**Abbildung 16:** Zeitlicher Verlauf der gemittelten relativen Abundanz von T-RFs amplifizierter 16S rRNA Gene innerhalb der *Archaea* von Bodenaufschlammungen mit feldfrischen Bodenproben aus dem Jahr 2002. Dargestellt ist das Ergebnis nach Restriktion mit *TaqI*. Die relativen Anteile geben die prozentuale Peakhöhe einzelner T-RFs bezogen auf die Gesamtpeakhöhe wieder. Die Standardfehler einzelner T-RFs waren in der Regel geringer als 10 % (n = 2 oder 3). \* = ein Replikat amplifizierbar; \*\* = zwei Replikate amplifizierbar. Die Fragmentlängen der T-RFs sind in Basenpaaren [bp] angegeben.

Aus der DNA inkubierter Bodenaufschlammung („bulk soil“, geflutet) wurde nach einer Inkubationsdauer von 90 Tagen eine Klonbibliothek der 16S rDNA der *Archaea* erstellt. Mit Hilfe dieser Klonbibliothek erfolgte die Zuordnung der T-RFs zu phylogenetischen Gruppen. Diese Zuordnung ist in Tabelle 15 dargestellt. T-RFs mit terminalen Fragmentlängen  $\pm 2$  bp wurden zusammengefasst. In der Tabelle sind die in silico Schnittstellen der T-RFs angegeben. Die Zuordnung zu phylogenetischen Gruppen erfolgte mittels einer Wu-Blast2 Suche (NCBI-Datenbank). Dabei wurden vier T-RFs mehr als einer phylogenetischen Gruppe zugeordnet. Der  $S_{AB}$ -Wert (Ähnlichkeitswert) lag bei allen Sequenzen bei 87 – 100 %. Eine detaillierte Liste aller Klonsequenzen mit nächsten Verwandten, zugeordneten T-RFs und Referenzen ist in Anhang C zu finden.

Alle sechs T-RFs (64, 83, 92, 186, 284 und 392 bp Länge) in der zur Klonierung verwendeten Probe („bulk soil“, geflutet,  $t = 90$  d, s. Abbildung 15) konnten mit Hilfe der Klonbibliothek phylogenetisch korreliert werden (s. Tabelle 15). Zusätzlich wurden 11 T-RFs von Klonsequenzen aus dieser Umweltprobe nachgewiesen, welche jedoch nicht in dem T-RFLP-Profil der Umweltprobe detektiert wurden, da diese aufgrund ihrer geringen Abundanz vermutlich durch den Prozess der internen Normalisierung der T-RFLP-Daten nicht in Erscheinung treten.

**Tabelle 15:** Zuordnung der T-RFs von inkubiertem (t = 90d) Boden aus einem Pappelmikrokosmos (geflutet) zu phylogenetischen Gruppen der Domäne *Archaea*. Die Längen der T-RFs sind in Basenpaaren [bp] angegeben. n = Anzahl der 16S rRNA-Gen Klone. RC = Rice Cluster, DHVE = Deep-sea Hydrothermal Vent Euryarchaeotic.

T-RF [bp]	Phylogenetische Gruppe	Anzahl zugeordneter Sequenzen (n = 79)	S <sub>AB</sub> -Wert [%]
64	DHVE GroupII ( <i>Euryarchaeota</i> ) <sup>a</sup>	1	89
76	RC-V (unkultiviert)	2	89-95
83	<i>Methanomicrobiaceae</i>	3	98-99
92	DHVE GroupII ( <i>Euryarchaeota</i> ) <sup>a</sup>	2	90-93
	<i>Methanobacteriaceae</i>	2	93-94
173	GroupIII ( <i>Thermoplasma</i> und Verwandte) <sup>b</sup>	1	87
186	<i>Crenarchaeota</i> (unkultiviert)	17	89-100
	<i>Methanosarcinaceae</i>	7	94-99
201	<i>Crenarchaeota</i> (unkultiviert)	1	90
284	<i>Methanosaetaceae</i>	16	97-99
358	<i>Methanomicrobiaceae</i>	1	98
392	<i>Methanomicrobiaceae</i>	1	97
	<i>Methanosaetaceae</i>	1	99
478	DHVE GroupII ( <i>Euryarchaeota</i> ) <sup>a</sup>	1	89
689	<i>Methanosarcinaceae</i>	2	99
706	<i>Crenarchaeota</i> (unkultiviert)	1	94
741	<i>Crenarchaeota</i> (unkultiviert)	1	98
791	<i>Methanomicrobiaceae</i>	15	97-99
	DHVE GroupII ( <i>Euryarchaeota</i> ) <sup>a</sup>	1	89
	GroupIII ( <i>Thermoplasma</i> und Verwandte) <sup>b</sup>	1	97
	<i>Methanosarcinaceae</i>	1	99
810	RC-V (unkultiviert)	1	94

a: nach Definition von Takai und Horikoshi (1999).

b: nach Definition von Jurgens et al., (2000) und DeLong (1998).

In der Klonbibliothek wurden Umweltsequenzen innerhalb der *Eury-* und *Crenarchaeota* detektiert. Innerhalb der *Euryarchaeota* wurden folgende Methanogene nachgewiesen: *Methanomicrobiaceae* (T-RFs: 83, 358, 392, 791 bp); *Methanobacteriaceae* (T-RF:92), *Methanosarcinaceae* (T-RFs: 186, 689, 791 bp) und *Methanosaetaceae* (T-RFs: 284, 392 bp). Einige Klonsequenzen innerhalb der *Euryarchaeota* zählen zu bisher unkultivierten Linien. Diese sind mit einem als „Deep-sea Hydrothermal Vent Euryarchaeotic Group II“ bezeichneten Cluster verwandt (Takai und Horikoshi, 1999), welches auch als LDS-Cluster („Lake Dagow Sediment“) beschrieben wurde (Chan et al., 2005; Glissmann et al., 2004) (T-RFs: 64, 92, 478 und 791 bp). Weitere Sequenzen stehen in enger Verwandtschaft mit Klonsequenzen, die in dem von Jurgens und Mitarbeitern beschriebenen Cluster „Group III (*Thermoplasmatales* und Verwandte)“ (T-RFs: 173 und 791 bp) (Jurgens et al., 2000) gruppieren oder sind mit dem „Rice Cluster V“ (T-RF: 76, 810 bp) (Großkopf et al., 1998b) verwandt. Die nächsten kultivierten Verwandten dieser drei Cluster stellen Mitglieder der *Thermoplasmatales* dar.

25 % der Klonsequenzen gruppieren innerhalb der *Crenarchaeota* (T-RFs: 186, 201, 706, 741 bp). Dabei dominierten Klonsequenzen mit einem T-RF von 186 bp Länge (n = 17), welche alle in ein unkultiviertes Cluster fielen, welches von DeLong (DeLong, 1998) als „Group 1.1b“ bezeichnet wurde und auch als „Rice Cluster (RC)-VI“ beschrieben wurde (Chin et al., 1999a). Eine Klonsequenz innerhalb der *Crenarchaeota* (T-RF: 741 bp) fiel in die von DeLong beschriebene „Group 1.3“ (DeLong, 1998), welche auch als „Rice Cluster (RC)-IV“ bezeichnet wird (Großkopf et al., 1998b). Zwei weitere Klonsequenzen innerhalb der *Crenarchaeota* zeigten eine enge Verwandtschaft zu einer Klonsequenz aus der Tiefsee (Nercessian et al., 2005) (T-RF: 201 bp) bzw. einer Klonsequenz aus einer heißen Quelle (Barns et al., 1994). (T-RF: 706 bp).

Zusätzlich zu den *Archaea*-Klonsequenzen (n = 79) wurden mit dem verwendeten Primerpaar ebenfalls sechs Klonsequenzen bakteriellen Ursprungs detektiert (T-RFs: 92, 415 und 749 bp) (nicht dargestellt).

Die phylogenetische Zuordnung von einigen T-RFs (92, 186, 392 und 791 bp) war nicht auflösbar, da Klonsequenzen mit diesen T-RFs jeweils zwei bzw. vier Gruppen zugeordnet werden können (Tabelle 15).

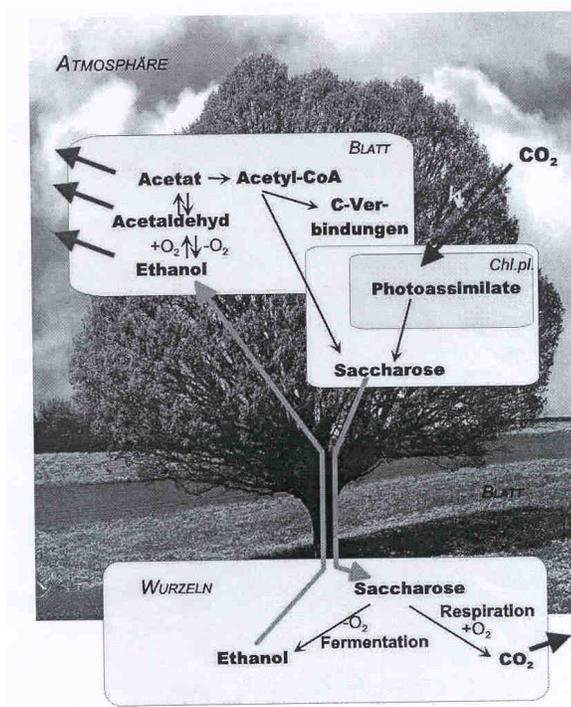
Die phylogenetische Zuordnung der T-RFs aus dem ersten Versuchsteil zu den *Crenarchaeota* (T-RF: 186 bp), dem *Euryarchaeota* RC-V (T-RF: 76 bp) und der „DHVE Group II“ (T-RF: 92 bp) wurde durch diese Klonbibliothek bestätigt.

## **IV. Diskussion**

### **1. Pappel und Boden als mikrobieller Lebensraum**

Zur Untersuchung von mikrobiellen Lebensgemeinschaften, welche mit Pappeln assoziiert sind, wurden als Modellsystem Pappelmikrokosmen verwendet. Da Pappeln flutungstolerant sind, wurden diese Gemeinschaften auch in Abhängigkeit von Flutungsexperimenten untersucht. Die Pappel wurde als Untersuchungsobjekt gewählt, da unter gefluteten Bedingungen ein pflanzeninterner Kreislauf in Gang gesetzt wird, der dazu führt, dass in den Wurzeln vermehrt Ethanol gebildet wird (s. Abbildung 17). Möglicherweise wird dieses zur Entgiftung der Wurzeln, neben dem Xylemtransport zu den Blättern, in geringem Masse auch über die Wurzeln abgegeben. Ob die Pappeln unter gefluteten oder ungefluteten Bedingungen über Wurzelexsudate einen Einfluss auf die mikrobiellen Populationen haben, sollte in dieser Arbeit untersucht werden. Es ist zu erwarten, dass Mikroorganismen, welche in der Lage sind sich an veränderte Flutungsbedingungen anzupassen, sich etablieren und eine Sukzession von Mikroorganismen unter diesen Bedingungen erfolgt.

Generell sind mikrobielle Lebensgemeinschaften im Boden durch eine hohe Diversität gekennzeichnet, wie Studien an verschiedenen Ökosystemen gezeigt haben (Buckley und Schmidt, 2001; Dunbar et al., 1999; McCaig et al., 1999; Ovreas und Torsvik, 1998).



**Abbildung 17:** Pflanzeninterner Ethanolkreislauf nach Flutung des Wurzelsystems von Pappelpflanzen (von Jürgen Kreuzwieser).

Um neben dem Einfluss der Flutung auf die Bodenmikroflora auch den möglichen Einfluss der Pappelpflanze auf die mikrobiellen Gemeinschaften zu analysieren, wurden weiterhin die verschiedenen Kompartimente „bulk soil“ (undurchwurzelter Boden), Rhizosphäre und Rhizoplane unterschieden.

Molekularbiologische Methoden bieten die Möglichkeit ein großes Spektrum prokaryotischer Taxa ohne Kultivierung zu bestimmen (von Wintzingerode et al., 1997). Die gewählte T-RFLP-Methode als „fingerprint“-Methode hat sich zur Untersuchung dieses Habitats als geeignet gezeigt, obwohl sie wie jede andere Methode auch, möglichen Verzerrungen unterworfen ist (von Wintzingerode et al., 1997). Häufig können die ermittelten terminalen Restriktionsfragmente (T-RFs), wie auch in dieser Arbeit, mehr als einer phylogenetischen Gruppe zugeordnet werden, was eine Beurteilung des zu untersuchenden Habitats erschwert und die Erstellung einer Klonbibliothek sinnvoll macht. Die in verschiedenen Studien und in dieser Arbeit ermittelten terminalen Restriktionsfragmente weichen in ihren jeweiligen Längen zum Teil geringfügig voneinander ab. Es ist jedoch bekannt, dass T-RFs in ihrer Länge in einem Bereich von

$\pm 1 - 2$  bp zwischen verschiedenen Gelen und/oder Spuren desselben Gels variieren können. Ebenso ist ein Unterschied zwischen theoretisch und in vitro ermittelten T-RFs beschrieben worden (Kaplan und Kitts, 2003).

Als Boden für die Pappelmikrokosmen wurde Boden aus der Nähe des Rheinuferes in zwei Versuchsreihen verwendet. Die Proben stammen aus zwei verschiedenen Jahren (2000 und 2002). Da die verwendeten Böden aus dem gleichen Habitat stammen, die Standorte der Probenentnahme nur in relativ geringer Entfernung voneinander liegen und alle Untersuchungsgebiete durch das Flusswasser des Rhein beeinflusst sind, wurde davon ausgegangen, dass diese Proben sich in ihren Eigenschaften und der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften ähneln. Beide Standorte sind durch das Flutungswasser des Rheins beeinflusst. Zum einen wurden Bodenaufschlammungsexperimente und zum anderen Untersuchungen in verschiedenen Kompartimenten der Mikrokosmen durchgeführt.

## **2. Biogeochemische Prozesse in Bodenaufschlämmungen**

Um die biogeochemischen Prozesse im Pappelmikrokosmosboden zu klären und mit Prozessen in anderen Böden zu vergleichen, wurden Bodenaufschlämmungen („bulk soil“) aus ungefluteten und vorgefluteten (eine Woche) Pappelmikrokosmen untersucht. Zum Vergleich dieser Prozesse in einem natürlichen Habitat wurden diese Analysen ebenfalls in Bodenaufschlämmungen mit feldfrischen Bodenproben (Cores) durchgeführt. Parallel dazu wurden zu bestimmten Zeitpunkten der Inkubation mikrobielle Populationen (*Bacteria* und *Archaea*) analysiert. Mit Hilfe molekularbiologischer Methoden wie T-RFLP-Analyse und Klonierung wurde versucht, eine Verbindung zwischen den beobachteten biogeochemischen Prozessen und den bakteriellen und archaeellen Lebensgemeinschaften als Folge der Flutung in den untersuchten Böden herzustellen.

Im Vergleich der Böden aus ungefluteten und vorgefluteten Pappelmikrokosmen zeigten sich im Verlauf der ermittelten biogeochemischen Parameter während des untersuchten Inkubationszeitraumes kaum Unterschiede. Die ermittelten Daten bewegten sich jeweils in gleichen Größenordnungen. Allerdings setzten, wie zu erwarten, die sequentiellen Reduktionsprozesse in den vorgefluteten Proben aufgrund der länger

anhaltenden anoxischen Bedingungen infolge der Flutung der Mikrokosmen früher ein als in den Proben mit Boden aus zuvor ungefluteten Pappelmikrokosmen.

Nach Flutung des Bodens aus Pappelmikrokosmen (ungeflutet und eine Woche vorgeflutet) setzte in beiden Ansätzen die Methanproduktion nach der jeweiligen deutlich detektierbaren Sulfatreduktionsphase ein. Die Sulfatreduktion überlappte zeitlich mit der Reduktion von Fe(III), und Sulfat war bereits verbraucht bevor die Akkumulation von Fe(II) beendet war. Zum Zeitpunkt der Methanbildung war die Reduktion des Fe(III) jedoch fast vollständig abgeschlossen. Der Wasserstoffpartialdruck stellte sich gleich zu Beginn der Inkubation als Ergebnis von Produktion und Verbrauch (Yao und Conrad, 1999) auf einen relativ konstanten Wert ein. Ethanol wurde in diesen Proben nicht nachgewiesen, da eventuell vorhandenes Ethanol unter der Nachweisgrenze lag. Falls Ethanol in diesen Böden als Stoffwechselprodukt gebildet wurde, war es eventuell aufgrund der schnellen weiteren Umsetzung durch Mikroorganismen nicht mehr nachweisbar.

Der Verlauf der hier ermittelten biogeochemischen Parameter deckt sich mit Ergebnissen der sequentiellen Reduktionsprozesse und der Initiation der Methanproduktion nach Flutung, welche bereits in Bodensuspension-Inkubationen in Reisfeldanalysen (Lueders und Friedrich, 2002; Chidthaisong und Conrad, 2000; Lueders und Friedrich, 2000; Roy und Conrad, 1999; Yao und Conrad, 1999; Yao et al., 1999; Ratering und Conrad, 1998; Achtnich et al., 1995; Conrad, 1993;) und oxischen Habitaten (Acker-, Wald-, Savannen- und Wüstenböden) (Peters und Conrad, 1996) eingehend untersucht wurden. Die mikrobielle Oxidation organischer Verbindungen erfolgt in einer charakteristischen Sequenz von Reduktionsprozessen gemäß der thermodynamischen Theorie, wobei die Elektronenakzeptoren mit dem höchsten Redoxpotential zuerst reduziert werden (Zehnder und Stumm, 1988; Ponnampereuma, 1978). Dabei werden  $O_2$ ,  $NO_3^-$ , Mn(IV), Fe(III) und  $SO_4^{2-}$  nacheinander als Elektronenakzeptoren verwendet. Nach Verbrauch dieser alternativen Elektronenakzeptoren wird  $CO_2$  durch methanogene *Archaea* zu Methan reduziert (Conrad und Frenzel, 2002; Peters und Conrad, 1996; Achtnich et al., 1995). Es ist bereits bekannt, dass eine simultane Reduktion von Nitrat, Eisen(III) und Sulfat sowie die Produktion von Methan möglich ist, wenn die jeweiligen mikrobiellen Populationen aktiv und die Substratkonzentrationen nicht limitierend sind (Achtnich et al., 1995; Holmer und Kristensen, 1994; Mountfort und Asher, 1981). Dass Sulfat als Elektronenakzeptor bereits verbraucht wurde, bevor die Akkumulation von

Fe(II) beendet war, wurde bereits in einer Studie von Peters und Conrad nach Flutung von oxischen Böden gezeigt (Peters und Conrad, 1996).

Zum Vergleich biogeochemischer Prozesse von Pappelmikrokosmen mit einem natürlichen Habitat wurden ebenfalls feldfrische Bodenproben (Cores) in Bodenaufschlammungen eingesetzt. In diesen Ansätzen zeigten sich ähnliche Verläufe der ermittelten biogeochemischen Parameter wie in den Pappelmikrokosmen, allerdings in anderen Größenordnungen. Auch in diesen Ansätzen entsprach der Verlauf der biogeochemischen Parameter den Ergebnissen anderer Studien (s.o.).

Die Konkurrenz um Wasserstoff als Substrat zeigte sich in diesen Ansätzen jedoch wesentlich deutlicher. Wasserstoff wurde bis zum Tag 20 der Inkubation zur Reduktion von  $\text{NO}_3^-$ , Fe(III) und  $\text{SO}_4^{2-}$  genutzt und war während dieser Phase das kompetitive Substrat für Bakterien, welche an der Nitrat-, Eisen- oder Sulfatreduktion beteiligt sind (Acht nich et al., 1995). Sulfat- und Eisenreduzierer haben eine höhere Affinität zu  $\text{H}_2$  als Methanogene, so dass die  $\text{H}_2$ -Partialdrücke zu Beginn der Inkubation niedrig gehalten wurden und unter dem Schwellenwert der hydrogenotrophen Methanogenen von 6,5 Pa lagen (Lovley, 1985). Nachdem diese Reduktionsprozesse abgeschlossen waren, was sich in einer Erhöhung des Wasserstoffpartialdruckes darstellte, setzte die Bildung von  $\text{CH}_4$  ein. Die Methanbildung erfolgte in geringem Maße überlappend mit der Reduktion von Fe(III), wie bereits in den Ansätzen aus Mikrokosmen beschrieben. Zunächst wurde bei der Initiation der Methanogenese (Tag 26 – 30) nur wenig Methan gebildet, korrelierend mit der stetigen Abnahme der Wasserstoffpartialdrücke. Anschließend zeigte sich dann eine deutliche Zunahme der Methankonzentration korrelierend mit der Abnahme der Acetatkonzentration. Auch Acetat ist ein Substrat um das zunächst denitrifizierende, sulfat- und eisenreduzierende Bakterien im Boden konkurrieren. Die Acetat-Konzentrationen lagen ab Tag 18 der Inkubation in den Core-Proben deutlich über dem Schwellenwert für eine acetoclastische Methanogenese (Schwellenwerte von 0,2 – 1,2 mM; (Jetten et al., 1990)). Auch wenn die Reduktion von Fe(III) noch nicht vollständig abgeschlossen war, so akkumulierte Acetat jedoch zunächst bis zum Tag 28 der Inkubation. Die Wasserstoffpartialdrücke zeigten zu diesem Zeitpunkt bereits eine Abnahme, lagen jedoch bis zum Tag 30 über 6,5 Pa.

Dies stimmt gut mit Ergebnissen aus einem Experiment in anoxischem Reisfeldboden überein, in dem vermutet wurde, dass die Anfangsphase der Methanbildung zunächst durch die hydrogenotrophe Methanogenese dominiert wird. Nach drei Tagen weiterer Inkubation

erfolgte der Wechsel von der hydrogenotrophen zur acetoclastischen Methanogenese als dominierende Quelle des produzierten Methan (Roy et al., 1997). Außerdem zeigten Chidthaisong und Conrad, dass der Acetatverbrauch durch Methanogene im Reisfeldboden während der Reduktionsphase, im Besonderen bei Anwesenheit von Sulfat und Fe(III), sich langsamer vollzieht als die Acetatproduktion aus Glucose (Chidthaisong und Conrad, 2000).

Nitrat war in den Ansätzen der feldfrischen Bodenproben bereits nach einem Tag Inkubation vollständig reduziert und Sulfat wurde bereits zu Beginn der Inkubation nur in geringen Konzentrationen (ca. 0,1 mM) nachgewiesen. Es wird daher vermutet, dass hauptsächlich eisenreduzierende Bakterien in diesen Ansätzen mit den Methanogenen um Wasserstoff konkurrieren. Im Vergleich zu den Proben aus Mikrokosmen vollzog sich der Wechsel von der hydrogenotrophen zur acetoclastischen Methanogenese erst zu einem späteren Zeitpunkt der Inkubation (Tag 30), unter anderem bedingt durch die wesentlich höheren Wasserstoff-Partialdrücke in diesen Proben.

### **3. Bakterielle Diversität**

#### **3.1. Bodenaufschlammungen**

Die Untersuchungen der bakteriellen Diversität in anoxischen Inkubationen von „bulk soil“ aus Pappelmikrokosmen (ungeflutet und eine Woche vorgeflutet) zeigten auf Basis der T-RFLP-Analysen in beiden Ansätzen eine ähnliche komplexe mikrobielle Gemeinschaft. Während der Inkubation von 90 Tagen konnten keine starken Veränderungen der *Bacteria* detektiert werden. Im Folgenden werden jene phylogenetischen Gruppen hervorgehoben, die durch T-RFs mit einer relativen Abundanz >10 % in den T-RFLP-Profilen repräsentiert werden, da sie charakteristisch für das jeweilige Habitat sind. Es ist dabei jedoch zu beachten, dass ein Drittel der T-RFs dennoch von verschiedenen phylogenetischen Gruppen stammen kann (s. Tabelle 14) und die Zuordnung nicht immer eindeutig ist. Die phylogenetische Einordnung der *Bacteria* erfolgte aufgrund der Klonbibliothek aus nicht-inkubierten Pappelmikrokosmen. Es wurde angenommen, dass die T-RFs diesen beschriebenen phylogenetischen Gruppen zugeordnet werden können (s. III.1.2.: Phylogenetische Identifikation einzelner bakterieller Gruppen). Unter der Annahme, dass die ermittelten T-RFs den Klonsequenzen der jeweils

detektierten abundantesten phylogenetischen Gruppe in den Klonbibliotheken entsprechen zeigten sich folgende Resultate.

In den Aufschlammungen dominierten zum einen Mitglieder innerhalb der *Bacillales* (T-RFs: 72, 233 bp). Mitglieder dieser Gruppe, im Speziellen *Bacillus megaterium*, wurden mittels molekularer Methoden (DGGE) als Teil einer dominanten Population in „bulk soil“-Proben eines unbepflanzten Versuchsfeldes detektiert (Smalla et al., 2001). Im allgemeinen sind *Bacillus* spp. typisch für Böden, weisen einen aeroben, heterotrophen Metabolismus auf (Slepecky und Hemphill, 1992) und besitzen die Fähigkeit thermoresistente Sporen zu bilden. Die Heterogenität des Genus *Bacillus* in Physiologie, Ökologie und Genetik behindert jedoch eine Kategorisierung oder Generalisierung dieses Genus. Nahezu alle Substrate pflanzlichen oder tierischen Ursprungs können verwertet werden. Darunter fallen Cellulose, Stärke, Proteine, Agar und andere Kohlenwasserstoffe. Das Genus *Bacillus* umfasst unter anderem Antibiotikaproduzenten, heterotrophe Nitrifizierer, Denitrifizierer, Stickstoff-Fixierer und fakultativ Chemotrophe (Slepecky und Hemphill, 1992).

Als weitere dominante Gruppe waren in den Aufschlammungen *Acidobacteria* vertreten (T-RFs: 382, 587 bp). Es ist bereits bekannt, dass Mitglieder der *Acidobacteria*, wenn auch nur durch wenige kultivierte Organismen repräsentiert, zahlenmäßig dominant und aktive Mitglieder in den meisten Böden sind. Diese können bis zu 52 % der detektierten 16S rRNA-Gen Sequenzen in Klonbibliotheken ausmachen (Felske et al., 2000a; Felske et al., 2000b; Nogales et al., 1999; Kuske et al., 1997). Vertreter des Phylums *Acidobacteria* wurden auch bei der Entstehung von Biofilmen als abundante Organismen einer Gemeinschaft beschrieben (Martiny et al., 2003). Kultivierte Organismen innerhalb des Phylums der *Acidobacteria* sind *Acidobacterium capsulatum* (Hiraishi et al., 1995), *Holophaga foetida* (Liesack et al., 1994) und *Geothrix fermentans* (Lonergan et al., 1996). *Acidobacterium* ist ein moderat acidophiler, aerober Heterotropher; *Holophaga* und *Geothrix* sind strikt Anaerobe, die aromatische Komponenten bzw. Acetat fermentieren. Das Wissen über die physiologischen Fähigkeiten der *Acidobacteria* ist bisher sehr beschränkt. Aufgrund der hohen phylogenetischen Diversität innerhalb des Phylums der *Acidobacteria* (Hugenholtz et al., 1998b) wird vermutet, dass diese, ebenso wie die *Proteobacteria*, physiologisch und ökologisch sehr divers sind (Barns et al., 1999).

Die Bedeutung der *Alphaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Bacteroidetes* oder *Chlorobi* in diesen Ansätzen bleibt unklar, da jeweils nur eine Klonsequenz mit dem dominanten T-RF von 92 bp Länge innerhalb der genannten Gruppen detektiert wurde.

Die Bodenproben aus ungefluteten und vorgefluteten Pappelmikrokosmen zeigten eine ähnliche strukturelle Zusammensetzung der *Bacteria* mit geringen Unterschieden in der relativen Abundanz der *Acidobacteria*-spezifischen T-RFs (587 und 382 bp). In den Aufschlämmungen des vorgefluteten Bodens wurde eine geringere Anzahl an T-RFs pro Ansatz detektiert. Dies kann durch die interne Normalisierung innerhalb der jeweiligen Datenreihe verursacht sein, da hierbei T-RFs mit sehr geringen relativen Anteilen nicht berücksichtigt wurden. Weshalb kaum Veränderungen in der Zusammensetzung der *Bacteria* über den untersuchten Zeitraum detektiert wurden bleibt unklar. Vermutlich steht diese im Zusammenhang mit der Verfügbarkeit der Substrate in diesem Boden.

In den Ansätzen der feldfrischen Proben wurde anhand der T-RFLP-Profile, wie bereits in den Mikrokosmen, eine komplexe bakterielle Gemeinschaft detektiert, die sich in ihrer Zusammensetzung von den T-RFLP-Profilen der Mikrokosmosproben unterschied. Über den untersuchten Inkubationszeitraum von 90 Tagen zeigten sich, im Vergleich zu den Proben aus Pappelmikrokosmen, stärkere Veränderungen der *Bacteria*. Diese waren bis zum Tag 18 der Inkubation anhand der T-RFLP-Profile sichtbar. Anschließend zeigten die *Bacteria* bis zum Ende der Inkubation eine relativ konstante Zusammensetzung ihrer Struktur (s. Abbildung 13). Noll und Mitarbeiter untersuchten ebenfalls die Sukzession von bakteriellen Organismen als Folge von Flutung in Reisfeldboden-Inkubationen mit Hilfe der T-RFLP-Analyse von 16S rRNA-Genen. Die deutlichsten Veränderungen der strukturellen Zusammensetzung der *Bacteria* nach Flutung des Bodens zeigten sich in dieser Studie zu Beginn der Inkubation (nach einer Stunde bis zu zwei Tagen). Daraufhin wurden bis zum Tag 21 nur geringe Veränderungen und anschließend bis zum Tag 168 keine Veränderungen mehr detektiert (Noll et al., 2005).

In Bezug auf die T-RFs mit einer relativen Abundanz >10 % zeigte sich in den feldfrischen Proben, dass dieses Habitat von Vertretern der *Bacillales* (T-RF:72 bp); *Alphaproteobacteria* (T-RF: 60 bp), *Acidobacteria* (T-RF: 220 bp) und *Actinobacteria* (T-RF: 370 bp) dominiert wurde. Im Vergleich mit den „bulk soil“-Proben aus inkubierten Mikrokosmen wurden Vertreter der *Bacillales* jedoch nicht mit einem T-RF von 233 bp detektiert und *Acidobacteria* gehäuft mit dem T-RF von 220 bp Länge, welches in den

inkubierten Mikrokosmen nur eine untergeordnete Rolle spielte. Wie oben bereits erwähnt bestätigt dieses Ergebnis das ubiquitäre Vorkommen der *Bacillales* und *Acidobacteria* in Böden. Des Weiteren haben frühere vergleichende phylogenetische Analysen gezeigt, dass Mitglieder der Klasse *Alphaproteobacteria*, sowie die Phyla *Actinobacteria* und *Acidobacteria* ein ubiquitäres Vorkommen in fast allen Bodenarten zeigen: Diese Gruppen sind mit >75 % in 16S rDNA Klonbibliothek-Analysen von bakteriellen Lebensgemeinschaften des Bodens, vertreten (Hugenholtz et al., 1998b). Die zahlenmäßige und damit auch physiologische Bedeutung der *Alphaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Bacteroidetes* oder *Chlorobi* in diesen Ansätzen bleibt, wie auch schon in den Mikrokosmen, unklar, da jeweils nur eine Klonsequenz mit dem dominanten T-RF von 92 bp Länge innerhalb der genannten Gruppen detektiert wurde.

Im Vergleich zu den nicht-inkubierten „bulk soil“-Proben aus Pappelmikrokosmen (s. IV.3.2.) zeigte sich anhand der T-RFLP-Profile, dass sich die feldfrischen Inkubationsansätze ab Tag 18 und die nicht-inkubierten „bulk soil“-Proben aus drei Wochen gefluteten Mikrokosmen (Boden aus dem Jahr 2000) sich in ihrer strukturellen Zusammensetzung ähneln (s. Abbildung, 1, 13). Von den Bodenaufschlammungen aus Pappelmikrokosmen mit Boden aus dem Jahr 2002 unterschieden sie sich hingegen deutlich.

### **3.2. Pappelmikrokosmen**

Um neben der Flutung den Einfluss der Pappelpflanze auf die mikrobiellen Gemeinschaften zu untersuchen wurden die verschiedenen Kompartimente „bulk soil“ (undurchwurzelter Boden), Rhizosphäre und Rhizoplane in gefluteten und ungefluteten Pappelmikrokosmen mittels molekularbiologischer Methoden untersucht.

Die bakteriellen Lebensgemeinschaften unterschieden sich hinsichtlich ihrer Struktur in den drei oben genannten Kompartimenten und veränderten sich durch Flutung, was sich in der Zusammensetzung der Klonbibliotheken (Tabelle 11), den sichtbaren Unterschieden in den T-RFLP-Profilen (Abbildung 1) und der Korrespondenzanalyse (KA) (Abbildung 2) der T-RFLP-Profile zeigte.

Die Bodenproben des ungefluteten „bulk soil“ wurden durch *Arthrobacter* sp. (T-RF: 473 bp) und *Bacillus* sp. (T-RF: 579) dominiert (Tabelle 11, Abbildung 1, Abbildung 2). In einer Studie von Mahaffe und Kloepper dominierten Isolate dieser beiden Spezies

ebenfalls in Bodenproben, welche von einem Gurkenfeld entnommen wurden (Mahaffee und Kloepper, 1997). Neben *Bacillus megaterium* wurden auch *Arthrobacter* spp. mittels molekularer Methoden (DGGE) als dominante Populationen in „bulk soil“-Proben eines unbepflanzten Versuchsfeldes detektiert (Smalla et al., 2001). Mitglieder dieser beiden Spezies sind typisch für Böden und weisen einen aeroben, heterotrophen Metabolismus auf (Jones und Keddie, 1992; Slepecky und Hemphill, 1992).

Die Lebensgemeinschaften des ungefluteten Rhizosphäre-Habitats unterschieden sich von denen der „bulk soil“-Lebensgemeinschaften (Tabelle 11, Abbildung 1, Abbildung 2). Im Vergleich mit den „bulk soil“-Proben zeigte sich hier eine höhere relative Abundanz des T-RFs der Länge 238 bp. Dieses repräsentiert ebenfalls Mitglieder der *Bacillales* (*Bacillus* spp.), jedoch andere verschiedene Taxa als das in den „bulk soil“-Proben dominierende T-RF von 579 bp Länge (Abbildung 4). Dieses Ergebnis wurde durch die erhobenen Klonbibliothek-Daten bestätigt. Hier waren Klonsequenzen, jeweils repräsentiert durch verschiedene T-RFs, in phylogenetischer Verwandtschaft innerhalb der *Bacillales* die dominierende Gruppe (s. Tabelle 11 und Abbildung 4). Innerhalb dieser Gruppe waren neben *Bacillus* spp. auch *Paenibacillus* spp. charakteristisch für das Habitat der Rhizosphäre. Dieses Ergebnis deckt sich gut mit vorangegangenen Arbeiten. So konnte z.B. mittels DGGE-Technik gezeigt werden, dass *Bacillus* spp. ebenfalls dominant in der Rhizosphäre von Gerste (*Hordeum vulgare*) (Normander und Prosser, 2000) und Chrysanthemen (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) (Duineveld et al., 2001) waren. In kultivierungsabhängigen Studien dominierten *Bacillus* spp. in der Rhizosphäre von Palmfarngewächsen (Lobakova et al., 2003) und Daane und Mitarbeiter (Daane et al., 2001) beschrieben die Isolierung von sporenbildenden *Paenibacillus* spp. (Shida et al., 1997; Ash et al., 1993) aus der Rhizosphäre von Pflanzen einer Salz-Marsch. Des weiteren wurde *Paenibacillus brasilensis*, ein Bakterium welches zur Stickstoff-Fixierung befähigt ist, aus der Rhizosphäre von Mais isoliert (von der Weid et al., 2002). Als zweite dominante Gruppe, nach den *Bacillales*, wurden gehäuft *Alphaproteobacteria*, mittels T-RFLP-Analyse (T-RF: 81 bp) und Klonierung, in den Rhizosphäre-Proben, detektiert (s. Tabelle 11 und Abbildung 3). Eine Studie von McCaig und Mitarbeitern belegt, dass Klonsequenzen innerhalb der *Alphaproteobacteria* ebenfalls vermehrt in der Rhizosphäre von Gras detektiert wurden (McCaig et al., 1999).

Mit Hilfe von T-RFLP-Profilen, Klonbibliotheken und Korrespondenzanalyse (KA) wurde gezeigt, dass sich das Habitat der ungefluteten Rhizoplane von den Habitaten „bulk

soil“ und Rhizosphäre unterschied. Aus der KA wurde deutlich, dass das Habitat der ungefluteten Rhizoplane durch folgende T-RFs mit jeweils einer relativen Abundanz >10 % charakterisiert wird: 72, 99, 200 und 640 bp. In diesem Habitat war jedoch keine Zuordnung zu Klonsequenzen bakteriellen Ursprungs möglich, da die Co-Extraktion von Plastiden-DNA (T-RF: 777 bp, 50 %) in dieser Klonbibliothek quantitativ überwog. Mit einer größeren Anzahl an Umweltsequenzen aus dem Habitat der ungefluteten Rhizoplane wäre die Zuordnung dieser T-RFs eventuell möglich gewesen. Diese Co-Extraktion ist ein bekanntes Phänomen denn Chelius und Triplett beobachteten bei der Analyse von Pflanzenwurzeln von *Zea mays* ebenfalls die Amplifikation von Mitochondrien- und Chloroplasten-DNA (Chelius und Triplett, 2001). Jedoch erlaubt die räumliche Nähe der Kompartimente im Boden, die Umwelt-T-RFs der Rhizoplane anhand der Klonbibliotheken aus „bulk soil“ und Rhizosphäre phylogenetisch einzuordnen. Somit korreliert das T-RF von 72 bp wahrscheinlich phylogenetisch mit *Bacillus senegalensis* und das T-RF von 99 bp mit *Verrucomicrobium* (Tabelle 11). Die anderen zwei T-RFs (200 und 640 bp) wurden jedoch durch keine Klonsequenzen in den Klonbibliotheken repräsentiert und konnten somit nicht phylogenetisch korreliert werden

Die Flutung der Mikrokosmen führte in den „bulk soil“-Proben zu einer relativen Abnahme der T-RFs, welche Mitglieder der oben genannten Genera repräsentieren (*Arthrobacter* und einige *Bacillus* Spezies) und einem relativen Anstieg von Mitgliedern der *Alphaproteobacteria* (T-RFs: 81 und 92 bp), *Gammaproteobacteria* (T-RF: 212 bp) und *Deltaproteobacteria* (T-RF: 92 bp) (Tabelle 11, Abbildung 1, Abbildung 2). Mitglieder dieser taxonomischen Gruppen, mit Ausnahme der *Gammaproteobacteria*, wurden ebenfalls als dominante Population in einem landwirtschaftlichen Boden mittels BIOLOG Mikrotiterplatten zur Untersuchung metabolisch aktiver Mikroorganismen detektiert (Ovreas und Torsvik, 1998).

In dem Habitat der Rhizosphäre traten nach Flutung vermehrt Mitglieder der *Betaproteobacteria* in nächster Verwandtschaft zu *Aquaspirillum* spp. (T-RF: 206 bp) (Abbildung 1) auf. Diese waren ebenfalls charakteristisch für das Habitat der gefluteten Rhizoplane.

Die T-RFLP-Profile der Rhizoplane zeigten, im Gegensatz zu den anderen Kompartimenten, eine signifikante Abnahme ( $p < 0,01$ ) in der Anzahl der T-RFs als Folge der Flutung (Abbildung 1). Eine mögliche Fehleinschätzung der Auswirkung des Flutungs-

Effektes auf die anderen T-RFs aufgrund der Co-Extraktion von Plastiden-DNA (T-RF: 777 bp) ist unwahrscheinlich, da die relative Abundanz dieses T-RFs in der ungefluteten Rhizoplane höher war als in der gefluteten (nicht dargestellt). Das T-RF von 777 bp Länge stimmte mit keinem bakteriellen T-RF überein und war somit nicht relevant für die Darstellung der bakteriellen Lebensgemeinschaft.

In dieser Arbeit dominierten Mitglieder der *Betaproteobacteria* die Lebensgemeinschaft des gefluteten Rhizoplane-Habitats, welche durch die T-RFs der Längen 206 und 567 bp repräsentiert werden. Die Klonbibliothek zeigte, dass Umweltsequenzen mit einem T-RF von 206 bp Länge innerhalb der *Comamonadaceae* (Wen et al., 1999; Willems et al., 1991) gruppierten und sehr nahe verwandt mit *Aquaspirillum* spp. und einem aus Gartenerde isolierten denitrifizierenden Stamm (Probian et al., 2003) waren. Mitglieder des Genus *Aquaspirillum* sind aerob bis microaerophil und weisen einen respiratorischen Metabolismus mit Sauerstoff als terminalem Elektronenakzeptor auf. Einige Spezies sind in der Lage anaerob mit Nitrat zu wachsen oder besitzen die Fähigkeit zur Denitrifikation (Krieg, 1984). Spezies der Gattung *Aquaspirillum* wurden aus verschiedenen Süßwasser-Quellen isoliert, insbesondere aus stehenden Gewässern oder jenen mit einem hohen Anteil an organischem Material. Als Kohlenstoffquellen werden Aminosäuren oder Salze von organischen Säuren genutzt. Einige Spezies sind in der Lage Ethanol zu verstoffwechseln (Krieg, 1984). In jedem Fall ist das Genus *Aquaspirillum* sehr heterogen (Pot et al., 1992). Kürzlich wurde von Lobakova und Mitarbeitern (Lobakova et al., 2003) die Isolierung von Bakterien aus dem Wurzelbereich von Palmfarngewächsen beschrieben, welche in enger phylogenetischer Verwandtschaft zu *Aquaspirillum* spp. stehen. Des weiteren wurden in mit Nitrat zugesetzten Reisswurzeln-Inkubationen Klonsequenzen in phylogenetischer Verwandtschaft zu *Aquaspirillum* nachgewiesen (Scheid et al., 2004). Neben *Aquaspirillum* spp. wurden in dem Habitat der gefluteten Rhizoplane auch anderen Gattungen innerhalb der *Betaproteobacteria* wie *Dechloromonas* spp. und *Rhodocyclus* spp. mit einem T-RF von 206 bp Länge detektiert (s. Abbildung 3). Der Anteil der *Aquaspirillum*-verwandten Klonsequenzen in der Klonbibliothek war jedoch wesentlich höher (81 %). *Betaproteobacteria* sind physiologisch extrem heterogen (Kersters et al., 2001). Ikenaga und Mitarbeiter (Ikenaga et al., 2003) detektierten ebenfalls *Betaproteobacteria* mittels molekularer Methoden (DGGE) gehäuft an Reisswurzeln. Mittels kultivierungsabhängiger Analysen wurde in einer vorherigen Studie gezeigt, dass *Betaproteobacteria* auch an der

Wurzel von Tomatenpflanzen verbreitet sind (Shiomi et al., 1999). Neben den *Alphaproteobacteria* waren sie ebenfalls die abundanteste bakterielle Gruppe in Klonbibliotheken von der Mais-Rhizoplane (Chelius und Triplett, 2001).

Die Zusammensetzung der T-RFLP-Profile wurde durch das Auftreten von Pseudo-T-RFs beeinflusst. Es ist bereits bekannt, dass T-RFLP-Profile dadurch verzerrt werden können und es somit zu einer Überschätzung der Diversität kommen kann (Egert und Friedrich, 2003; Osborn et al., 2000). In den Habitaten der gefluteten Rhizoplane und Rhizosphäre ist das T-RF von 567 bp Länge vermutlich ein Pseudo-T-RF von *Aquaspirillum* spp.-verwandten Sequenzen (T-RF: 206 bp), da in den Klonbibliotheken dieser Habitate keine Sequenzen mit diesem T-RF nachgewiesen werden konnten (s. Tabelle 11, Abbildung 3). Das T-RF von 567 bp Länge entspricht in diesen Klonsequenzen der zweiten in silico Schnittstelle und wurde ebenfalls in der in vitro T-RFLP-Analyse dieser Klonsequenzen als Pseudo-T-RF nachgewiesen. Durch das Auftreten dieses Pseudo-T-RFs in der T-RFLP-Analyse scheint die Dominanz von *Aquaspirillum* spp. somit noch höher zu sein, als sie tatsächlich ist. Klonsequenzen mit dem T-RF von 567 bp Länge wurden hingegen nur in den Habitaten des gefluteten „bulk soil“ und der ungefluteten Rhizosphäre detektiert. Diese gruppieren ebenfalls innerhalb der *Betaproteobacteria* und zeigen hier eine nahe Verwandtschaft zu *Herbaspirillum* spp. (s. Abbildung 3). Eine weitere mögliche Verzerrung bei der Interpretation von T-RFs bestimmter phylogenetischer Gruppen entspringt der Tatsache, dass einige T-RFs durch verschiedene phylogenetische Gruppen repräsentiert werden. Je nach Habitat kann z.B. das T-RF von 206 bp Länge *Betaproteobacteria* (alle Kompartimente), *Gammaproteobacteria* („bulk soil“) oder *Bacillales* (ungeflutete Rhizosphäre) repräsentieren (s. Tabelle 11). Folglich ist die bevorzugte Zuordnung dieses T-RFs zu *Aquaspirillum*, oder generell zu den *Betaproteobacteria* nur durch genauen Abgleich mit Klonbibliotheken möglich.

In Folge der Flutung veränderten sich die T-RFLP-Profile in allen Kompartimenten da diese aufgrund des eingeschränkten Eintritts von atmosphärischem Sauerstoff in das System des Bodens beträchtliche physische, chemische und biologische Konsequenzen für die Bodenorganismen mit sich bringt. Arten, welche in der Lage sind, sich an die veränderten Flutungsbedingungen anzupassen, etablieren sich als Teil einer mikrobiellen Gemeinschaft. Die Flutung führt zu einer verminderten Verfügbarkeit von nutzbaren Elektronenakzeptoren und somit zu geringeren Raten zur Umsetzung von organischem

Material (Bossio und Scow, 1995). So wurde bereits von Bossio und Scow berichtet, dass die mit Hilfe von BIOLOG Mikrotiterplatten untersuchte Diversität metabolisch aktiver Mikroorganismen sich durch Flutung veränderte (Bossio und Scow, 1995). In ähnlicher Weise resultierte die Flutung von unbepflanzten Reisfeldboden-Mikrokosmen in einer Sukzession von bakteriellen Organismen, welche anhand sich verändernder T-RFLP-Profile von 16S rRNA-Genen untersucht wurde (Noll et al., 2005). Im Gegensatz dazu untersuchten Kowalchuk und Mitarbeiter bakterielle Lebensgemeinschaften eines Bodens von einem Versuchsfeld für Blumenzwiebel-Kultivierung mit Hilfe der DGGE-Technik und konnten nur geringe Auswirkungen aufgrund von Flutungen feststellen (Kowalchuk et al., 2003). In einer weiteren Arbeit von Zhou und Mitarbeitern, hatte der Wassergehalt eines Bodens reich an organischem Kohlenstoff (10 – 20 %) ebenfalls keinen Einfluss auf die mittels RFLP-Technik untersuchte mikrobielle Diversität dieses Bodens (Zhou et al., 2002). Im Gegensatz dazu konnten Griffiths und Mitarbeiter zeigen, dass in einem kultivierungsabhängigen Ansatz der Feuchtigkeitsgehalt für Veränderungen in den bakteriellen Populationen eines Grasland-Bodens verantwortlich war. Ein widersprüchliches Ergebnis wurde erzielt wenn molekulare Analysen (DGGE) durchgeführt wurden (Griffiths et al., 2003). Solche Widersprüche können eventuell durch Umweltfaktoren wie Bodentyp, Bodenpartikelgröße und Kohlenstoffverfügbarkeit (Zhou et al., 2002), welche in verschiedenen Ökosystemen variieren, erklärt werden.

Arten, welche in der Lage sind, sich an veränderte Flutungsbedingungen anzupassen, werden gehäuft auftreten bzw. nach Änderung der Bedingungen zunehmen. Unter diesen Bedingungen ist zu erwarten, dass fakultativ und obligat anaerobe Bakterien vermehrt auftreten. Unter gefluteten Bedingungen wurde jedoch nur eine einzige *Clostridium* sp.-verwandte Umweltsequenz aus dem Habitat der anoxischen Rhizosphäre detektiert. Eine Ursache dafür könnte sein, dass Gram-positive Bakterien aufgrund von Schwierigkeiten bei der Zellyse, sowohl in DNA- als auch in RNA-Extraktionen, unterrepräsentiert sind (Zhou et al., 1996).

Die T-RFLP-Profile waren geeignet die verschiedenen Habitate voneinander zu unterscheiden, auch wenn die meisten T-RFs gleichzeitig in den verschiedenen Kompartimenten und unter verschiedenen Bedingungen detektiert wurden. In einer kultivierungsabhängigen Studie bakterieller Lebensgemeinschaften assoziiert mit Gurkenpflanzen konnten Mahaffee und Kloepper (Mahaffee und Kloepper, 1997) ebenfalls zeigen, dass die Lebensgemeinschaften zwischen verschiedenen Habitaten variierten.

Marilley und Aragno zeigten in ihren molekularen Untersuchungen ebenfalls, dass die Struktur bakterieller Lebensgemeinschaften zwischen den untersuchten Habitaten variierte. Allerdings nahm die phylogenetische Diversität im Vergleich zu „bulk soil“ und Rhizosphäre in der Nähe von Pflanzenwurzeln ab (Marilley und Aragno, 1999). Diese Abnahme konnte in dieser Arbeit nicht festgestellt werden. Eine Verringerung der Diversität im Habitat der Rhizoplane wurde nur nach Flutung nachgewiesen.

Es sind mehrere Ursachen für die Unterschiede der bakteriellen Zusammensetzung der Lebensgemeinschaften in „bulk soil“, Rhizosphäre und Rhizoplane und für die Unterschiede unter gefluteten und ungefluteten Bedingungen denkbar. Bodenorganismen unterscheiden sich in ihrer Fähigkeit Kohlenstoff- und Elektronenquellen zu nutzen. Die Diversität der Mikroorganismen in der Rhizosphäre wird durch die Pflanzenwurzeln und durch die Art der Pflanze und der damit verbundenen Produktion verschiedener Wurzelexsudate, beeinflusst (Jäger et al., 1999; Waschütza et al., 1992). Folglich sind verschiedene Rhizosphären-Gemeinschaften mit verschiedenen Pflanzen assoziiert und es wird vermutet, dass Pflanzen auf das Vorhandensein spezieller Gemeinschaften an ihren Wurzeln selektieren aufgrund der Unterschiede an Exsudaten und des damit verbundenen stimulierenden Effekts der Rhizosphäre auf das mikrobielle Wachstum (Wieland et al., 2001; Grayston et al., 1998).

Pappeln akkumulieren in ihren Wurzeln unter sauerstofflimitierten Bedingungen Ethanol, welcher zur Entgiftung der Wurzeln mit dem Xylem-Saft (Kelsey, 1996; MacDonald und Kimmerer, 1991) in die Blätter transportiert wird und dort unter aeroben Bedingungen als Acetaldehyd emittiert wird (Kreuzwieser et al., 2000; Kreuzwieser et al., 1999a; Kreuzwieser et al., 1999b). Es ist denkbar, dass unter gefluteten Bedingungen Ethanol in gewissem Maße von der Pflanze abgesondert wird und die Entwicklung von bestimmten mikrobiellen Lebensgemeinschaften verursacht. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, dass Pappelpflanzen eine spezifische bakterielle Gemeinschaft unterstützen. Die große Anzahl von Klonsequenzen in enger Verwandtschaft zu *Aquaspirillum* spp. weist darauf hin, dass diese wichtige Mitglieder der bakteriellen Gemeinschaft der Pappelrhizoplane und –rhizosphäre unter gefluteten Bedingungen sind. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die mikrobielle Gemeinschaft in Pappelmikrokosmen komplex und dynamisch ist und in ihrer Zusammensetzung in verschiedenen Kompartimenten und unter Flutungsbedingungen variiert. Der Grund und die Konsequenzen dieser Veränderungen sind nur teilweise verstanden.

#### 4. Archaeelle Diversität in Bodenaufschlammungen und Pappelmikrokosmen

Eine Analyse der archaeellen Lebensgemeinschaft ist bisher noch nicht in dem Pappelmikrokosmosboden durchgeführt worden. In Korrespondenz zu den molekularen Untersuchungen der bakteriellen Lebensgemeinschaft wurde die Zusammensetzung der archaeellen Lebensgemeinschaft in Bodenaufschlammungen aus Pappelmikrokosmen und feldfrischen Proben mittels T-RFLP-Analyse untersucht. Aus einem DNA-Extrakt zu einem Zeitpunkt verstärkter Methanbildung wurde eine Klonbibliothek erstellt („bulk soil, vorgeflutet, Inkubationszeit: 90 Tage). Die Erfassung der methanogenen Populationen und eine Korrelation der T-RFs wurde somit ermöglicht.

In den Ansätzen aus Pappelmikrokosmen (ungeflutet und eine Woche vorgeflutet) wurde über den untersuchten Inkubationszeitraum von 90 Tagen eine einfach strukturierte archaeelle Population detektiert, deren Struktur in allen Ansätzen nur geringe Veränderungen mit der Zeit aufwies. Die detektierte Anzahl an T-RFs mit maximal acht verschiedenen T-RFs in den Ansätzen blieb relativ konstant. Über einen kürzeren Inkubationszeitraum von 17 Tagen wurde die stabile Zusammensetzung der *Archaea*-Lebensgemeinschaft ebenfalls bei anaeroben Reisfeldbodeninkubationen mittels T-RFLP-Analyse beobachtet (Lueders und Friedrich, 2000). Ebenso konnte auch Noll in einer weiteren Reisfeldbodenstudie mit dem gleichen Boden zeigen, dass bis zum Tag 21 der Inkubation keine Veränderungen in der archaeellen Struktur detektiert wurden. Erst in der Zeit von 30 bis 168 Tagen waren geringe Veränderungen detektierbar (Noll, 2004).

Es zeigte sich, dass in den Aufschlammungen die Mehrzahl der detektierten T-RFs (64, 76, 83, 92, 186, 284, 392 bp) und der damit verbundenen phylogenetischen Gruppen bereits in Reisfeldböden, Sedimenten des Dagow Sees und des Sees Genezareth und in Bodenproben aus dem Überschwemmungsgebiet des Flusses Waal detektiert wurde (Glissmann et al., 2004; Kemnitz et al., 2004; Nüsslein et al., 2001; Ramakrishnan et al., 2001; Ramakrishnan et al., 2000; Lueders und Friedrich, 2000; Chin et al., 1999a).

Innerhalb der *Euryarchaeota* wurden methanogene *Archaea* (*Methanomicrobiaceae*, *Methanobacteriaceae*, *Methanosarcinaceae* und *Methanosaetaceae*) detektiert. Vorhandene Methanogene traten in dem verwendeten Boden erst nach Flutung und somit längerer anaerober Inkubation abundant auf und zeigten dann ihre Aktivität. Anhand der Methanproduktion wurde dieses bestätigt. Diese setzte, wie oben erwähnt, in den vorgefluteten Proben, wie erwartet, früher ein als in den Ansätzen mit Boden aus

ungefluteten Mikrokosmen. Diese Ergebnisse bestätigen frühere Studien, die zeigten, dass methanogene *Archaea* zwar in jedem getesteten Boden detektiert wurden (Küsel et al., 1999; Peters und Conrad, 1995), das Wachstum der Methanogenen jedoch erst nach Flutung und anoxischer Inkubation von Bodenproben einsetzte (Peters und Conrad, 1996).

Weiterhin wurden in dieser Arbeit *Euryarchaeota*-Sequenzen bisher unkultivierter Linien nachgewiesen. Diese sind zum einen mit Umweltsequenzen des als „Deep-sea Hydrothermal Vent Euryarchaeotic Group II“ bezeichneten Cluster verwandt (Takai und Horikoshi, 1999), welches auch als LDS-Cluster („Lake Dagow Sediment“) beschrieben wurde (Chan et al., 2005; Glissmann et al., 2004). Klonsequenzen innerhalb des LDS-Clusters aus dem Sediment des Dagow Sees wiesen ein T-RF von 91 bp (hier: 92 bp) Länge und 63 bp (hier: 64 bp) Länge auf (Glissmann et al., 2004). Umweltsequenzen dieser Gruppe wurden bisher nur im Sediment des Dagow Sees (Chan et al., 2005; Glissmann et al., 2004) und hydrothermalen Schloten (Takai und Horikoshi, 1999) detektiert. Weitere Klonsequenzen sind mit dem „Rice Cluster V“ (RC-V) (Großkopf et al., 1998b) verwandt. Sequenzen dieser Gruppe mit einem T-RF in der Nähe von 76 bp Länge wurden ebenfalls im Reisfeldboden (Lueders und Friedrich, 2000) und im Sediment des Dagow Sees (Glissmann et al., 2004) detektiert. Weitere nachgewiesene *Euryarchaeota*-Sequenzen stehen in enger Verwandtschaft mit Klonsequenzen, die in dem von Jurgens und Mitarbeitern beschriebenen Cluster „Group III (*Thermoplasmales* und Verwandte)“ (Jurgens et al., 2000) gruppieren. Mitglieder dieses Clusters wurden ebenfalls im Sediment des Dagow Sees detektiert (Glissmann et al., 2004; Nüsslein et al., 2001).

Klonsequenzen innerhalb der *Crenarchaeota* aus den Bodenaufschlammungen fielen überwiegend in ein unkultiviertes Cluster, welches von DeLong (DeLong, 1998) als „Group 1.1b“ bezeichnet wurde, welche auch als „Terrestrial cluster“ (Buckley et al., 1998) oder „Rice Cluster VI“ (Chin et al., 1999a) bekannt ist. In Reisfeldböden (Ramakrishnan et al., 2001; Lueders und Friedrich, 2000; Ramakrishnan et al., 2000; Chin et al., 1999a) und in Bodenproben aus einem Überschwemmungsgebiet des Flusses Waal in den Niederlanden (Kemnitz et al., 2004) wurden bereits Umweltsequenzen, welche das RC-VI repräsentieren und ein T-RF in der Nähe von 186 bp Länge aufweisen, detektiert. Der Großteil der bekannten Umweltsequenzen der Linie 1.1b wurde in Böden detektiert, welche oxische sowie anoxische Bedingungen aufweisen (Kemnitz et al., 2004; Ochsenreiter et al., 2003; Chin et al., 1999a; Großkopf et al., 1998b; Bintrim et al., 1997). Sequenzen der Linie 1.1b wurden in allen von Ochsenreiter und Mitarbeitern untersuchten

oxischen Böden, welche zumeist nicht bewirtschaftet wurden, detektiert und häufig war es überhaupt die einzig detektierbare phylogenetische Linie innerhalb der *Archaea*, was auf deren Dominanz hinweist. Die untersuchten Böden stammten von verschiedenen Standorten aus Deutschland, England und Kamtschatka (Ochsenreiter et al., 2003). Weitere Sequenzen wurden in Termitendärmen (Friedrich et al., 2001), in mikrobiellen Matten (Ochsenreiter et al., 2003) und Gewässern (Ochsenreiter et al., 2003; Takai et al., 2001; Hershberger et al., 1996) gefunden.

Die unkultivierten *Crenarchaeota* beinhalten Umweltsequenzen verschiedener phylogenetischer Linien, die in verschiedensten Ökosystemen, z.B in mesophilen Böden (Bintrim et al., 1997; Jurgens et al., 1997; Ueda et al., 1995), Süßwassersedimenten (Schleper et al., 1997; Hershberger et al., 1996), und geflutetem Reisfeldboden (Großkopf et al., 1998b) detektiert wurden. Die signifikante Abundanz nicht-thermophiler *Crenarchaeota* in marinen (Massana et al., 1997; DeLong et al., 1994) und Süßwassersedimenten (MacGregor et al., 1997) wurde durch quantitative Untersuchungen gezeigt. In verschiedenen Böden jedoch führte die Quantifizierung der 16S rDNA der *Crenarchaeota* mit Hilfe einer Filterhybridisierungstechnik („slot blot“ Hybridisierung) und der Real-Time-PCR-Methode nur zu geringen relativen Anteilen von maximal 3 % (Ochsenreiter et al., 2003; Buckley et al., 1998). Die Untersuchungen zur Abundanz unkultivierter *Crenarchaeota* in Böden sind bisher noch lückenhaft. Die hohe Zahl detektierter *Crenarchaeota*-Umweltsequenzen in dieser Arbeit zeigt jedoch ihr ubiquitäres Vorkommen im Habitat der Pappelmikrokosmen. In der Analyse eines Waldbodens (Marburg) mittels T-RFLP-Analyse wurde ebenfalls ein hoher relativer Anteil unkultivierter *Crenarchaeota* mit durchschnittlich 88 % detektiert (Kemnitz, 2004).

Eine weitere Klonsequenz innerhalb der *Crenarchaeota* (T-RF: 741 bp) fiel in die von DeLong beschriebene „Group 1.3“ (DeLong, 1998), welche auch als „Rice Cluster (RC)-IV“ bezeichnet wird (Großkopf et al., 1998b). Sequenzen dieses Clusters wurden neben Reisfeldboden und Reiswurzeln (Lueders und Friedrich, 2000; Chin et al., 1999a; Großkopf et al., 1998b) auch in Bodenproben aus dem Überschwemmungsgebiet des Flusses Waal detektiert (Kemnitz et al., 2004). Zwei weitere Klonsequenzen innerhalb der *Crenarchaeota* zeigten eine enge Verwandtschaft zu einer Klonsequenz aus der Tiefsee (Nercessian et al., 2005) (T-RF: 201 bp) bzw. einer Klonsequenz aus einer heißen Quelle (Barns et al., 1994). (T-RF: 706 bp). Diese Klonsequenzen wurden bisher nur in „extremen“ Standorten und hier erstmals in Böden detektiert. Die drei letztgenannten T-

RFs wurden nicht in den Proben der Umwelt-T-RFLP-Profile detektiert, da ihre relativen Abundanzen scheinbar nur sehr gering sind.

Die Physiologie der unkultivierten *Eury-* und *Crenarchaeota* ist bisher meist unbekannt. Vermutlich besitzen diese Organismen eine Vielfalt metabolischer Aktivitäten, da vor allem die Linie 1.1b der *Crenarchaeota* sehr divers ist und eine interne Gruppierung der Sequenzen zu erkennen ist. Aufgrund von Metagenomstudien gibt es jedoch Vermutungen, dass nicht-thermophile *Crenarchaeota* in Böden chemolithoautotrophe Ammonium-Oxidierer (Nitrifizierer) sein könnten (Schleper et al., 2005). Es wurden zwei Gene detektiert, die für Proteine kodieren, welche den Untereinheiten der Ammonium Monooxygenasen (AmoAB), den zentralen Enzymen der Ammoniumoxidation in bakteriellen Nitrifizierern (Arp et al., 2002), ähneln. Des Weiteren wurde ein Homolog einer Kupfer-haltigen Nitrit-Reduktase (NirK), dem Schlüsselenzym der dissimilatorischen Nitratreduktion, in einem archaeellen Klon aus Boden identifiziert (Schleper et al., 2005). Aufgrund dieser Beobachtungen wird vermutet, dass der primäre Energiemetabolismus der mesophilen terrestrischen und marinen *Crenarchaeota* auf der Oxidation von Ammonium basiert (Schleper et al., 2005).

In den T-RFLP-Profilen dominierte das für *Crenarchaeota* der Linie 1.1b (RC-VI) und *Methanosarcinaceae* typische T-RF der Länge 186 bp. Diese beiden Gruppen und in geringem Umfang auch *Methanosaetaceae* bzw. *Methanomicrobiaceae* mit einem T-RF von 186 bp wurden bereits in Reisfeldböden und in Bodenproben aus einem Überschwemmungsgebiet des Flusses Waal in den Niederlanden detektiert (Kemnitz et al., 2004; Ramakrishnan et al., 2001; Lueders und Friedrich, 2000; Ramakrishnan et al., 2000; Chin et al., 1999a). Ob das T-RF von 186 bp Länge die methanogenen *Methanosarcinaceae* und das „Rice Cluster VI“, oder nur eine der beiden Gruppen repräsentiert, lässt sich aus den T-RFLP-Mustern der 16S rRNA-Gene nicht beurteilen. Lueders und Friedrich konnten jedoch in Reisfeldboden-Inkubationen zeigen, dass mit zunehmender Inkubationsdauer die *Methanosarcinaceae* zunahm (Lueders und Friedrich, 2000). Mitglieder des RC-VI sind vermutlich bevorzugt in der Phase direkt nach Flutung des Bodens aktiv wenn noch anorganische Elektronenakzeptoren wie Fe(III) und Sulfat verfügbar sind. Mit zunehmender Inkubationsdauer und der damit verbundenen einsetzenden Methanbildung nahm auch in dieser Arbeit der Anteil der *Methanosarcinaceae* gegenüber dem „Rice Cluster VI“ zu da in der Klonbibliothek neben *Crenarchaeota* der Linie 1.1b (RC-VI) auch *Methanosarcinaceae* detektiert wurden.

Zum Ende der Inkubation wurde eine Zunahme der relativen Abundanz von T-RFs, welche *Methanosaetaceae* (T-RFs: 284 und 392 bp) repräsentieren festgestellt. Ihr Erscheinen setzt offenbar eine längere Inkubationsdauer unter anhaltenden anoxischen Bedingungen voraus. Erst nachdem die Acetatkonzentrationen  $< 0,1$  mM waren, wurden in dieser Arbeit T-RFs der *Methanosaetaceae* nachgewiesen. In den vorgefluteten Ansätzen wurden diese niedrigen Konzentrationen früher erreicht als in den Ansätzen aus ungefluteten Mikrokosmen und somit erklärt sich auch das Auftreten von *Methanosaetaceae* in den vorgefluteten Ansätzen ab Tag 40 und in den anderen Ansätzen ab Tag 90 der Inkubation. Die *Methanosaetaceae* sind potentiell in dem untersuchten Boden vorhanden, werden jedoch zunächst durch die schneller wachsenden *Methanosarcinaceae* überlagert. Sowie niedrige Acetatkonzentrationen erreicht sind haben die *Methanosaetaceae* dann gegenüber den *Methanosarcinaceae* einen Selektionsvorteil, da ihre Wachstumsrate gegenüber den *Methanosarcinaceae* zwar geringer, jedoch ihr Schwellenwert nutzbarer Acetatkonzentrationen ( $< 0,1$  mM) gegenüber den *Methanosarcinaceae* (Schwellenwert:  $< 1$ mM) niedriger ist (Jetten et al., 1992; Jetten et al., 1990). In Reisfeldboden-Inkubationen konnten *Methanosaeta* spp. aufgrund einer langsamen Wachstumsrate auch erst ab dem Tag 20 nachgewiesen werden (Chin et al., 1999a). Des weiteren konnte bei Untersuchungen von Reisfeldböden und Boden aus dem Überschwemmungsgebiet des Flusses Waal gezeigt werden, dass bei niedrigen Acetatkonzentrationen die relative Häufigkeit der *Methanosarcinaceae* abnahm (Kemnitz et al., 2004; Fey und Conrad, 2000; Lueders und Friedrich, 2000; Großkopf et al., 1998b). Mitglieder der *Methanosaetaceae* nutzen als Substrat für die Methanogenese nur Acetat. Im Gegensatz dazu sind *Methanosarcinaceae* spp. in der Lage neben Acetat auch  $H_2$  zu nutzen. Aufgrund der schon zu Beginn der Inkubation niedrigen Wasserstoffpartialdrücke wird die Methanproduktion der anfänglich hydrogenotrophen Methanogenese ab dem Zeitpunkt der Abnahme der Acetatkonzentrationen in den jeweiligen Ansätzen vermutlich durch die acetoclastische Methanogenese dominiert. In den Ansätzen des vorgefluteten Bodens war der Wechsel von der hydrogenotrophen zur acetoclastischen Methanogenese aufgrund der verlängerten anoxischen Bedingungen bereits vollzogen. Klonsequenzen mit einem T-RF von 392 bp Länge wurden in dieser Arbeit neben den *Methanosaetaceae* auch den *Methanomicrobiaceae* zugeordnet. Diese Zuordnung wurde bereits in Analysen des Reisfeldbodens, der Sedimente des Dagow Sees und des Sees Genezareth und dem Überschwemmungsgebiet des Flusses Waal beschrieben (Glissmann et al., 2004; Kemnitz

et al., 2004; Nüsslein et al., 2001). Das T-RF von 284 bp Länge wurde in Analysen des Reisfeldbodens nicht nur wie in dieser Arbeit den *Methanosaetaceae* sondern auch dem vermutlich nicht methanogenen „Rice-Cluster V“ zugeordnet (Ramakrishnan et al, 2001; Lueders und Friedrich, 2000; Ramakrishnan et al., 2000; Chin et al., 1999a).

Des weiteren wurden in der Klonbibliothek in überwiegender Mehrzahl Klonsequenzen der *Methanomicrobiaceae* mit einem T-RF von 791 bp Länge detektiert, obwohl dieses T-RF nicht in dem Umwelt-TRFLP-Profil der zur Klonierung verwendeten Probe detektiert wurde. Vermutlich ist dieses T-RF, wie auch noch weitere, durch den Prozess der internen Normalisierung der erhobenen Daten nicht in Erscheinung getreten, da es in den T-RFLP-Profilen der Umweltproben eine zu geringe Abundanz zeigte. Je länger ein T-RF ist, desto schlechter ist die Auftrennung auf dem Sequenziergel und die T-RFs erscheinen dann bei der Visualisierung der Ergebnisse eher als breite „Peaks“ im T-RFLP-Profil. Da die erhobenen Daten auf der Ermittlung der „Peakhöhen“ der individuellen „Peaks“ basieren, ist denkbar, dass dadurch einige T-RFs in ihrer Abundanz unterschätzt werden. Lueders und Friedrich zeigten bereits in Reisfeldboden-Analysen eine mögliche Diskrepanz zwischen den beiden methodischen Ansätzen wie T-RFLP-Analyse und Klonierung. Mit Hilfe der T-RFLP-Analyse wurde eine relativ konstante Struktur der archaeellen Lebensgemeinschaft detektiert, während mit Hilfe der Klonbibliothek hingegen deutliche Veränderungen während der Inkubation detektiert wurden (Lueders und Friedrich, 2000). Eine Klonbibliothek zur umfassenden Beschreibung des zu untersuchenden Habitats ist somit unerlässlich.

Zum Vergleich archaeeller Lebensgemeinschaften von Pappelmikrokosmen mit einem natürlichen Habitat wurden ebenfalls feldfrische Bodenproben (Cores) in Bodenaufschlammungen eingesetzt. Auch hier zeigte sich anhand der T-RFLP-Analyse eine einfach strukturierte archaeelle Lebensgemeinschaft, die in ihrer Struktur der in Mikrokosmen ähnelte und über den untersuchten Zeitraum ebenfalls nur geringen Veränderungen unterworfen war. Die Mehrzahl der detektierten T-RFs (64, 76, 83, 92, 186, 392 bp) aus diesen Aufschlämmungen und die damit verbundenen phylogenetischen Gruppen wurde bereits in „bulk soil“ Proben aus Mikrokosmen und anderen Studien detektiert. Die archaeelle Population wurde ebenfalls über den gesamten Inkubationszeitraum von *Methanosarcinaceae* und/oder *Crenarchaeota* der Linie 1.1b (RC-VI) mit einem T-RF von 186 bp Länge dominiert, welches im Vergleich zu den

Proben aus Pappelmikrokosmen hier eine noch höhere relative Abundanz zeigte. Es ist anzunehmen, dass auch in diesen Proben der Anteil der *Methanosarcinaceae* während des Inkubationsverlaufes mit steigender Methankonzentration, einhergehend mit einer Abnahme der Acetatkonzentration, gegenüber den *Crenarchaeota* zunahm. Nach 90 Tagen Inkubation wurden bei niedrigen Acetatkonzentrationen in diesen Proben *Methanosaetaceae* nur mit dem T-RF von 392 bp Länge und nicht mit dem *Methanosaetaceae*-typischen T-RF von 284 bp Länge, wie in den Ansätzen aus den Mikrokosmen, nachgewiesen. Die relative Abundanz der *Methanosaetaceae* war somit in diesen Proben geringer.

Es wurde gezeigt, dass die Populationsverteilung der *Archaea* innerhalb der untersuchten Standorte relativ konstant ist und eine Veränderung der strukturellen Zusammensetzung bei anhaltenden anoxischen Bedingungen über einen längeren Zeitraum abläuft.

Um räumliche Unterschiede und einen möglichen Einfluss der Pappelpflanze auf die archaeelle Lebensgemeinschaft in Pappelmikrokosmen zu detektieren, wurde mittels eines kombinierten Ansatzes von T-RFLP-Analyse und Sequenzierung ein Einblick in die Zusammensetzung der archaeellen Lebensgemeinschaft in den Kompartimenten „bulk soil“, Rhizosphäre und Rhizoplane von Pappelmikrokosmen unter gefluteten und ungefluteten Bedingungen erhalten.

Anhand der Unterschiede in den T-RFLP-Profilen zeigten „bulk soil“ und Rhizosphäre eine ähnliche strukturelle Zusammensetzung der archaeellen Lebensgemeinschaft, sowohl ungeflutet als auch geflutet (s. Abbildung 5). Sliwinski und Goodman hingegen konnten an verschiedenen Pflanzen zeigen, dass Unterschiede in der Zusammensetzung von Konsortien von *Crenarchaeota* zwischen Rhizosphäre und „bulk soil“ bestehen (Sliwinski und Goodman, 2004a).

Die T-RFLP-Profile der Rhizoplane waren diverser und zeigten eine höhere Anzahl an T-RFs, sowohl im ungefluteten als auch im gefluteten Zustand. Anhand der Klonbibliotheken aus allen drei Kompartimenten konnten jedoch nur drei T-RFs (76, 92 und 186 bp) phylogenetisch zugeordnet werden. Es wurden unkultivierte Linien der *Crenarchaeota* (T-RFs: 92 und 186 bp) und *Euryarchaeota* (T-RFs: 76 und 92 bp) nachgewiesen. Die phylogenetische Zuordnung dieser T-RFs zu den *Crenarchaeota* (T-RF: 186 bp), dem *Euryarchaeota* RC-V (T-RF: 76 bp) und der „DHVE Group II“ („Deep-

sea Hydrothermal Vent Euryarchaeotic Group II“) (T-RF: 92 bp) (Abbildung 6 und Abbildung 7) bestätigte die Ergebnisse der Klonbibliothek aus den Bodenaufschlammungen.

Insgesamt wurden 99 % (n=155) der detektierten Klonsequenzen aus allen drei Kompartimenten, sowohl ungeflutet als auch geflutet, phylogenetisch den *Crenarchaeota* (T-RFs: 92 und 186 bp) zugeordnet. Diese Klonsequenzen gruppieren alle in der von DeLong beschriebenen Linie „Group 1.1b“ (DeLong, 1998) und *Crenarchaeota*-Sequenzen dieser Linie mit dem T-RF von 186 bp Länge dominierten, wie bereits in den Bodenaufschlammungen, die archaelle Population in allen Kompartimenten. Anhand des Vergleichs und der Überprüfung von theoretischen Schnittstellen der Umweltsequenzen mit dem T-RF von 92 bp Länge in dieser Arbeit mit Umweltsequenzen aus Reisfeldboden zeigte sich, dass das T-RF von 92 bp Länge dem T-RF von 88 bp Länge entspricht, das in Reisfeldböden ebenfalls das *Crenarchaeota*-RC-VI („Group 1.1b“) repräsentiert (Ramakrishnan et al., 2001; Lueders und Friedrich, 2000). Das ubiquitäre Vorkommen von *Crenarchaeota*-Sequenzen dieser Gruppe in Böden wurde zuvor bereits erwähnt.

Die *Crenarchaeota*-Klonsequenzen in dieser Arbeit wurden nicht nur im undurchwurzelten Boden, sondern auch im Rhizosphärenboden und an der Rhizoplane von Pappeln, sowohl unter ungefluteten als auch gefluteten Bedingungen detektiert. An Reiswurzeln aus gefluteten Reisfeldbodenmikrokosmen konnten Großkopf und Mitarbeiter ebenfalls *Crenarchaeota*-Sequenzen detektieren. Diese wurden allerdings dem „Rice Cluster IV“ zugeordnet (Großkopf et al., 1998b). Simon und Mitarbeiter (Simon et al., 2000) zeigten mit Hilfe der FISH-(Fluoreszenz in situ Hybridisierung) Methode und *Crenarchaeota*-spezifischen Sonden, dass *Crenarchaeota* die Wurzeln von Tomatenpflanzen in einem Wachstumskammer-Versuch und in einem Feldversuch in Wisconsin (USA) kolonisierten. Die relative Abundanz der *Crenarchaeota* an Wurzeln von Tomatenpflanzen betrug bis zu 16 %. Die Klonierung der 16S rRNA-Gensequenzen führte ebenfalls nur zu Klonsequenzen der Gruppe 1.1b (Simon et al., 2000). Auch in dieser Arbeit wurden an Pappelwurzeln nur *Crenarchaeota*-Umweltsequenzen dieser Gruppe detektiert, was auf deren Abundanz, nicht nur in Böden, hinweist. In einer weiteren in Wisconsin durchgeführten Studie detektierten Chelius und Triplett mittels Klonierung ebenfalls *Crenarchaeota* Sequenzen der Gruppe 1 an gewaschenen Maiswurzeln (*Zea mays*) (Chelius und Triplett, 2001).

Außer den drei beschriebenen T-RFs konnten alle weiteren archaeellen T-RFs aus den verschiedenen Kompartimenten der nicht-inkubierten Mikrokosmen keiner phylogenetischen Gruppe zugeordnet werden, da keine Klone mit diesen T-RFs nachgewiesen wurden. Ein Teil der detektierten T-RFs (64, 83, 92, 169, 186, 810 bp) wurde jedoch in vorherigen Analysen detektiert und erlaubte somit deren phylogenetische Einordnung. In Analogie zu dem bereits bekannten T-RF der Länge 63 bp (hier 64 bp) könnte es sich um Sequenzen des LDS-Clusters innerhalb der *Euryarchaeota* handeln (Glissmann et al., 2004), das in dieser Arbeit gehäuft im Habitat der Rhizoplane, sowohl unter ungefluteten als auch gefluteten Bedingungen, detektiert wurde. Die Bedeutung im Habitat der Rhizoplane bleibt allerdings unklar. Das T-RF der Länge 80 bp bzw. 82 bp (hier 83 bp), welches *Methanomicrobiaceae* repräsentiert ist bereits aus Reisfeldbodenstudien und Analysen des See Genezareth bekannt (Kemnitz et al., 2004; Nüsslein et al., 2001; Lueders und Friedrich, 2000; Ramakrishnan et al., 2000; Chin et al., 1999a) und wurde auch in den Bodenaufschlammungen aus Pappelmikrokosmen detektiert. Dieses T-RF (83 bp) wurde in dieser Arbeit in allen Kompartimenten der Pappelmikrokosmen detektiert. Das T-RF von 88 bp bzw. 91 bp (hier 92 bp) Länge wird neben den bereits zuvor genannten Gruppen (DHVE II/ RC-VI) in Analysen des Reisfeldbodens und des Sediments des See Genezareths (Kemnitz et al., 2004; Ramakrishnan et al., 2001; Nüsslein et al., 2001; Lueders und Friedrich, 2000; Ramakrishnan et al., 2000; Chin et al., 1999a) wie auch in den inkubierten Bodenaufschlammungen den *Methanobacteriaceae* zugeordnet. In dieser Arbeit wurde das T-RF von 92 bp Länge in allen drei Kompartimenten, sowohl unter ungefluteten als auch gefluteten Bedingungen nachgewiesen. Das T-RF von 169 bp Länge wurde im Reisfeldboden von Chin und Mitarbeitern bereits beschrieben und repräsentiert Umweltsequenzen des „Rice-Cluster II“ (RC-II) (Chin et al., 1999a). Das dominante T-RF der Länge 186 bp, welches in den nicht-inkubierten Proben der verschiedenen Kompartimente ausschließlich *Crenarchaeota* der Linie 1.1b (RC-VI) repräsentiert, wurde in vorherigen Arbeiten und aus Bodenaufschlammungen dieser Arbeit auch Klonsequenzen innerhalb der *Methanosarcinaceae* zugeordnet (Kemnitz et al., 2004; Ramakrishnan et al., 2001; Lueders und Friedrich, 2000; Ramakrishnan et al., 2000; Chin et al., 1999a). Das T-RF von 810 bp Länge wurde von Kemnitz und Mitarbeitern (Kemnitz et al., 2004) bei Bodenanalysen aus dem Überschwemmungsgebiet des Flusses Waal detektiert und repräsentiert dort *Crenarchaeota*-Sequenzen des RC-IV, welches auch als

„Group 1.3“ bezeichnet wird (Jurgens et al., 2000; DeLong, 1998). Diese Zuordnung ergab sich ebenfalls in Analysen des Reisfeldbodens, allerdings wird das T-RF hier mit einer Länge von 820 bp beschrieben und repräsentiert zusätzlich Klonsequenzen innerhalb der *Methanosarcinaceae* und *Methanobacteriaceae* (Lueders und Friedrich, 2000; Ramakrishnan et al., 2000).

Anhand dieser Vergleiche ist es möglich, dass auch methanogene *Archaea* in geringen relativen Abundanzen in den nicht-inkubierten Pappelmikrokosmen vorkommen. Da die beschriebenen T-RFs jedoch oft einer weiteren nicht methanogenen Gruppe von *Archaea* zugeordnet werden können, ist eine eindeutige Aussage darüber hier nicht möglich. Aufgrund der dominanten relativen Abundanz der *Crenarchaeota*-Sequenzen in allen drei Kompartimenten wurden keine weiteren T-RFs der Umwelt-T-RFLP-Profile anhand von Klonsequenzen nachgewiesen.

Die archaeelle Lebensgemeinschaft der Rhizoplane erscheint diverser als in den anderen Habitaten. Die Analyse der archaeellen, wurzellosoziierten Population und die Aufklärung der unbekannt T-RFs wurde jedoch durch Probleme bei der PCR-Amplifikation und der Klonierung erschwert. Da in geringem Umfang auch eine unspezifische Amplifikation von *Bacteria*-Sequenzen aus dem Habitat der Rhizoplane wie auch zuvor aus den Bodenaufschlammungen mit dem verwendeten Primersystem erfolgte, ist unklar ob es sich bei den unbekannt „Peaks“ um weitere *Bacteria* spezifische T-RFs oder potentiell unbekannt *Archaea*-T-RFs handelt und die Diversität der detektierten *Archaea* eventuell überschätzt wird. Eine mögliche unspezifische Amplifikation bakterieller 16S rRNA-Gene mit dem verwendeten Primerpaar bei der Analyse archaeeller Lebensgemeinschaften wurde bereits beschrieben (Kemnitz et al., 2004; Scheid et al., 2003). Mit einer größeren Anzahl an Umweltsequenzen aus dem Habitat der Rhizoplane wäre die Zuordnung weiterer unbekannter T-RFs eventuell möglich gewesen. Des weiteren zeigten sich in einer Studie an Mais-Wurzeln ebenfalls Probleme bei der Amplifikation von *Archaea*-DNA und verschiedene Versuche waren nötig um diese zu ermöglichen (Chelius und Triplett, 2001).

An den Wurzeln von Pappeln wurden in dieser Arbeit mit überwiegender Mehrzahl *Crenarchaeota*-Sequenzen detektiert. Dies macht die Pappelwurzeln zu einem interessanten Wurzelsystem und zeigt das ubiquitäre Vorkommen dieser Gruppe, nicht nur in Böden.

## 5. Vergleich der Böden

Die Unterschiede in der Methanproduktion und weiteren biogeochemischen Prozessen der beiden untersuchten Böden (Mikrokosmen und feldfrische Proben) können ihre Ursache zum einen in den unterschiedlichen biogeochemischen Parametern der Böden haben (Yao et al., 1999) und zum anderen spielt die Vorbehandlung (Trocknung) des Bodens, welcher für die Mikrokosmen verwendet wurde, eine Rolle. Achtnich und Mitarbeiter untersuchten bereits in Reisfeldboden-Inkubationen den Unterschied der sequentiellen Reduktionsprozesse in Bodenaufschlammungen mit frischen Bodenproben und zuvor getrocknetem Boden. Die verschiedenen Redoxprozesse zeigten in beiden Ansätzen eine ähnliche Abfolge. Der deutlichste Unterschied bestand darin, dass in den Ansätzen mit getrocknetem Boden zu Beginn der Inkubation kein Nitrat nachgewiesen werden konnte und dass die Methanproduktion geringer ausfiel (Achtnich et al., 1995). Dies wurde auch in den Bodenproben aus Pappelmikrokosmen, für welche zuvor getrockneter Standortboden verwendet wurde, gezeigt. Konzentrationsunterschiede wurden in dieser Arbeit auch für andere Substrate wie Sulfat, CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> detektiert. Hinsichtlich der Eisenkonzentrationen unterschieden sich die Böden kaum. Reisfeldboden-Inkubationen, welche zeitlich limitiert mit Sauerstoff in Kontakt kamen oder getrocknet wurden zeigten so lange eine Unterdrückung der Methanproduktion bis alles während dieser Behandlung gebildete Sulfat und Fe(III) wieder reduziert war (Ratering und Conrad, 1998).

Es ist bereits bekannt, dass sequentielle Reduktionsprozesse in Böden in geringem Maße überlappend vorkommen können. Dies scheint hauptsächlich von der Verfügbarkeit an organischen Substraten und nicht nur von der vorhandenen Menge an reduzierbarem Fe(III) oder Sulfat abzuhängen (Yao und Conrad, 1999; Yao et al., 1999; Roy et al., 1997). Die Untersuchung von Bodenkernen verschiedener Feuchtgebiete der „Allgäu-Region“ zeigte, dass die Methanproduktionsrate und die Anzahl vorhandener methanogener *Archaea* umso größer war, je mehr organisches Material zur Verfügung stand (Wachinger et al., 2000). Der Anteil organischen Kohlenstoffs in den für die Inkubationsexperimente verwendeten Böden lag in dem Pappelmikrokosmosboden bei 4 % und in den feldfrischen Core-Proben bei 7 %. Die Methanproduktion wird durch weitere Faktoren wie z.B. die Aggregatgröße der Bodenpartikel beeinflusst (Ramakrishnan et al., 2000; Mayer und Conrad, 1990). Des weiteren spielen Parameter wie Luftfeuchtigkeit und Feuchtigkeit des

Bodens eine Rolle, welche während der Lagerung des Bodens einen Einfluss auf die Methanbildung bei Flutung des Bodens haben können (Mayer und Conrad, 1990).

Die genannten Faktoren haben mit Sicherheit auch Auswirkungen auf die mikrobiellen Populationen. Die Unterschiede in der strukturellen Zusammensetzung der *Bacteria* im Vergleich der Aufschlammungen aus Mikrokosmen mit zuvor getrocknetem Boden und den feldfrischen Proben lassen sich so zum Teil mit den oben genannten Tatsachen begründen.

Im Vergleich der bakteriellen Gemeinschaften in den „bulk soil“ Proben der nicht-inkubierten Mikrokosmen (Boden aus dem Jahr 2000) mit dem „bulk soil“ Boden der Aufschlammungen aus Mikrokosmen (Boden aus dem Jahr 2002) zeigte sich ein deutlicher Unterschied in der Abundanz der *Acidobacteria*, die in den Aufschlammungen eine deutlich höhere Abundanz zeigten und in den verschiedenen Böden durch unterschiedliche T-RFs repräsentiert wurden. Dies trifft auch für Mitglieder der *Bacillales* in den verschiedenen Böden zu. Es bleibt festzuhalten, dass in den verschiedenen Böden die gleichen abundanten phylogenetischen Gruppen, jedoch jeweils mit verschiedenen T-RFs detektiert wurden, sichtbar an den voneinander unterscheidbaren T-RFLP-Profilen (vgl. Abbildung 1, 11, 12). Die Unterschiede in der Struktur der bakteriellen Gemeinschaften beruhen vermutlich auf einem unterschiedlichen Eintrag an organischem Material und allgemein auf der Heterogenität von Böden, da die Böden zur Herstellung der Mikrokosmen zuvor beide getrocknet und unter gleichen Bedingungen gelagert wurden. Ein Unterschied besteht in der Textur der beiden Böden (2000: Lehm; 2002: sandiger Lehm) obwohl die Standorte der Probenentnahme in unmittelbarer Nähe zueinander liegen. Bei den untersuchten Böden handelt es sich um Oberflächenböden mit einer hoch diversen mikrobiellen Lebensgemeinschaft. Diese Tatsache deckt sich mit den Beobachtungen aus zahlreichen Studien (Dunbar et al., 2002; Felske et al., 1998; Hugenholz et al., 1998b; Borneman und Triplett, 1997; Borneman et al., 1996). Zhou und Mitarbeiter stellten die Hypothese auf, dass räumliche Isolation und die Heterogenität der Kohlenstoff-Ressourcen Schlüsselmechanismen sind, welche die Diversität und Struktur mikrobieller Gemeinschaften kontrollieren (Zhou et al., 2003; Zhou et al., 2002). Das unterschiedliche Ausmaß an Eintrag von Kohlenstoff über einen Zeitraum von zwei Jahren in den Boden und die Arten von Kohlenstoff, der zur Verfügung steht, führt als Folge vermutlich zu einer Ausbildung unterschiedlicher bakterieller Gemeinschaften. Die mikrobielle

Heterogenität in den Böden zeigt sich, obwohl die Proben aus einer Umgebung entnommen wurden, die als geochemisch und physikalisch einheitlich betrachtet wird.

Es ist jedoch interessant, dass die untersuchten Böden eine sehr ähnliche Zusammensetzung der archaeellen Lebensgemeinschaft zeigen, obwohl der verwendete Boden zwar aus demselben Habitat jedoch in verschiedenen Jahren beprobt wurde. In Reisfeldbodenanalysen wurde diese Beobachtung anhand des Vergleichs von Umweltsequenzen ebenfalls von Lueders und Friedrich gemacht (Lueders und Friedrich, 2000). Diese Stabilität ist schon bemerkenswert, denn sie steht im Gegensatz zu den Veränderungen biogeochemischer Parameter, wie die Verfügbarkeit von Elektronenakzeptoren (Nitrat, Sulfat, Fe(III)) und Elektronendonatoren wie Acetat und Wasserstoff.

## **6. Abschließende Betrachtung und Ausblick**

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die T-RFLP-Methode ein geeignetes Werkzeug zur Untersuchung mikrobieller Gemeinschaften (*Bacteria* und *Archaea*) in dem Habitat der Pappelmikrokosmen darstellt. Es konnten damit zeitliche oder räumliche Veränderungen der einzelnen Gruppen unter dem Einfluss von Flutungen dargestellt und die jeweils abundanten Organismen in diesem System erfasst werden.

Die Beobachtungen dieser Arbeit verdeutlichen, dass weitere Untersuchungen, wie z.B. kultivierungsabhängige Analysen zur Anreicherung von Mikroorganismen unter gezielter Benutzung spezifischer Substrate, unter anderem auch Ethanol, sinnvoll sind um das metabolische Potential der mit Pappeln assoziierten mikrobiellen Lebensgemeinschaften und ihre Bedeutung für das Pappelboden-Ökosystem zu untersuchen.

## V. Literatur

**Abd El-Rahman, H. A., D. Fritze, C. Sproer und D. Claus.** 2002. Two novel psychrotolerant species, *Bacillus psychrotolerans* sp. nov. and *Bacillus psychrodurans* sp. nov., which contain ornithine in their cell walls. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**:2127-2133.

**Abraham, W. R., C. Strompl, H. Meyer, S. Lindholst, E. R. B. Moore, R. Christ, M. Vancanneyt, B. J. Tindall, A. Bennasar, J. Smit und M. Tesar.** 1999. Phylogeny and polyphasic taxonomy of *Caulobacter* species. Proposal of *Maricaulis* gen. nov with *Maricaulis maris* (Poindexter) comb. nov. as the type species, and emended description of the genera *Brevundimonas* and *Caulobacter*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**:1053-1073.

**Achtnich, C., F. Bak und R. Conrad.** 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.

**Alfreider, A., C. Vogt und W. Babel.** 2002. Microbial diversity in an in situ reactor system treating monochlorobenzene contaminated groundwater as revealed by 16S ribosomal DNA analysis. *System. Appl. Microbiol.* **25**:232-240.

**Amann, R. I., W. Ludwig und K.-H. Schleifer.** 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microb. Reviews* **59**:143-169.

**Arp, D. J., L. A. Sayavedra-Soto und N. G. Hommes.** 2002. Molecular biology and biochemistry of ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea*. *Arch. Microbiol.* **178**:250-255.

**Ash, C., F. G. Priest und M. D. Collins.** 1993. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **64**:253-260.

**Bak, F., G. Scheff und K.-H. Jansen.** 1991. A rapid and sensitive ion chromatographic technique for the determination of sulfate and sulfate reduction rates in freshwater lake sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.* **85**:23-30.

**Baker, W., A. v. d. Broek, E. Camon, P. Hingamp, P. Sterk, G. Stoesser und M. A. Tuli.** 2000. The EMBL nucleotide sequence database. *Nucleic Acids Res.* **28**:19-23.

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

**Barns, S. M., R. E. Fundyga, M. W. Jeffries und N. R. Pace.** 1994. Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **91**:1609-1613.

**Barns, S. M., S. L. Takala und C. R. Kuske.** 1999. Wide distribution and diversity of members of the bacterial kingdom *Acidobacterium* in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:1731-1737.

**Basiliko, N. und J. B. Yavitt.** 2003. Methane Biogeochemistry and Methanogen Communities in Two Northern Peatland Ecosystems, New York State. *Geomicrobiol. J.* **20**:563-577.

**Begon, M. E., J. L. Harper und C. R. Townsend.** 1998. *Ökologie*. Sauer, K. P. (Hrsg.). Spektrum, Heidelberg.

**Berthelet, M., L. G. Whyte und C. W. Greer.** 1996. Rapid, direct extraction of DNA from soils for PCR analysis using polyvinylpolypyrrolidone spin columns. *FEMS Microbiol. Letters* **138**:17-22.

**Bintrim, S. B., T. J. Donohue, J. Handelsman, G. P. Roberts und R. M. Goodman.** 1997. Molecular phylogeny of *Archaea* from soil. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **94**:277-282.

**Blackwood, C. B. und E. A. Paul.** 2003. Eubacterial community structure and population size within the soil light fraction, rhizosphere, and heavy fraction of several agricultural systems. Soil Biol. Biochem. **35**:1245-1255.

**Bodour, A. A., J. M. Wang, M. L. Brusseau und R. M. Maier.** 2003. Temporal change in culturable phenanthrene degraders in response to long-term exposure to phenanthrene in a soil column system. Environ. Microbiol. **5**:888-895.

**Borneman, J. und E. W. Triplett.** 1997. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: Evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. Appl. Environ. Microbiol. **63**:2647-2653.

**Borneman, J., P. W. Skroch, K. M. O'Sullivan, J. A. Palus, N. G. Rumjanek, J. L. Jansen, J. Nienhuis und E. W. Triplett.** 1996. Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. Appl. Environ. Microbiol. **62**:1935-1943.

**Bossio, D. A. und K. M. Scow.** 1995. Impact of carbon and flooding on the metabolic diversity of microbial communities in soils. Appl. Environ. Microbiol. **61**:4043-4050.

**Brosius, J., M. L. Palmer, P. J. Kennedy und H. F. Noller.** 1978. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **75**:4801-4805.

**Bruns, M. A., J. R. Hanson, J. Mefford und K. M. Scow.** 2001. Isolate PM1 populations are dominant and novel methyl *tert*-butyl ether-degrading bacterial in compost biofilter enrichments. Environ. Microbiol. **3**:220-225.

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

**Buckley, D. H. und T. M. Schmidt.** 2001. The structure of microbial communities in soil and the lasting impact of cultivation. *Microb. Ecol.* **42**:11-21.

**Burkert, U., F. Warnecke, D. Babenzien, E. Zwirnmann und J. Pernthaler.** 2003. Members of a readily enriched beta-proteobacterial clade are common in surface waters of a humic lake. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:6550-6559.

**Casamayor, E. O., G. Muyzer und C. Pedros-Alio.** 2001. Composition and temporal dynamics of planktonic archaeal assemblages from anaerobic sulfurous environments studied by 16S rDNA denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing. *Aquatic Microb. Ecol.* **25**:237-246.

**Chan, O. C., P. Claus, P. Casper, A. Ulrich, T. Lueders und R. Conrad.** 2005. Vertical distribution of structure and function of the methanogenic archaeal community in Lake Dagow sediment. *Environ. Microbiol.* **7**:1139-1149.

**Chan, O. C., M. Wolf, D. Hepperle und P. Casper.** 2002. Methanogenic archaeal community in the sediment of an artificially partitioned acidic bog lake. *FEMS Microbiol. Ecol.* **42**:119-129.

**Chao, A.** 1987. Estimating the population size for capture-recapture data with unequal catchability. *Biometrics* **43**:783-791.

**Chao, A.** 1984. Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scand. J. Stat.* **11**:265-270.

**Chelius, M. K. und E. W. Triplett.** 2001. The diversity of Archaea and Bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. *Microb. Ecol.* **41**:252-263.

**Chidthaisong, A. und R. Conrad.** 2000. Turnover of glucose and acetate coupled to reduction of nitrate, ferric iron and sulfate and to methanogenesis in anoxic rice field soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **31**:73-86.

**Chin, K. J., T. Lueders, M. W. Friedrich, M. Klose und R. Conrad.** 2004. Archaeal community structure and pathway of methane formation on rice roots. *Microb. Ecol.* **47**:59-67.

**Chin, K.-J., T. Lukow und R. Conrad.** 1999a. Effect of temperature on structure and function of the methanogenic archaeal community in an anoxic rice field soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:2341-2349.

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

**Chin, K. J., F. A. Rainey, P. H. Janssen und R. Conrad.** 1998. Methanogenic degradation of polysaccharides and the characterization of polysaccharolytic clostridia from anoxic rice field soil. *System. Appl. Microbiol.* **21**:185-200.

**Clement, B. G., L. E. Kehl, K. L. De Bord und C. L. Kitts.** 1998. Terminal restriction fragment patterns (TRFPs), a rapid, PCR-based method for the comparison of complex bacterial communities. *J. Microbiol. Methods* **31**:135-142.

**Coleman, N. V., T. E. Mattes, J. M. Gossett und J. C. Spain.** 2002. Phylogenetic and kinetic diversity of aerobic vinyl chloride-assimilating bacteria from contaminated sites. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:6162-6171.

**Conrad, R. und P. Frenzel.** 2002. Flooded soils, S. 1316-1333. *In* G. Britton (Hrsg.), *Encyclopedia of Environmental Microbiology*. John Wiley and Sons.

**Conrad, R.** 1993. Mechanisms Controlling Methane Emission from Wetland Rice Fields, S. 266-284. *In* R. G. Prinn (Hrsg.), The Biogeochemistry of Global Change. Radiativ Trace Gases. Chapman & Hall, New York.

**Crocetti, G. R., P. Hugenholtz, P. L. Bond, A. Schuler, J. Keller, D. Jenkins und L. L. Blackall.** 2000. Identification of polyphosphate-accumulating organisms and design of 16S rRNA-directed probes for their detection and quantitation. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:1175-1182.

**Daane, L. L., I. Harjono, G. J. Zylstra und M. M. Häggblom.** 2001. Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria associated with the rhizosphere of salt marsh plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:2683-2691.

**Dandurand, L.-M. C. und G. R. Knudsen.** 1997. Sampling microbes from the rhizosphere and phyllosphere, S. 391-399. *In* C. J. Hurst, G. R. Knudsen, M. J. McInerney, L. D. Stetzenbach und M. V. Walter (Hrsg.), Manual of environmental microbiology. ASM.

**Dasman, S. Kajiyama, H. Kawasaki, M. Yagi, T. Seki, E. Fukusaki und A. Kobayashi.** 2002. *Paenibacillus glycanilyticus* sp. nov., a novel species that degrades heteropolysaccharide produced by the cyanobacterium *Nostoc commune*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**:1669-1674.

**De la Torre, J. R., B. M. Goebel, E. I. Friedmann und N. R. Pace.** 2003. Microbial diversity of cryptoendolithic communities from the McMurdo Dry Valleys, Antarctica. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:3858-3867.

**DeLong, E. F.** 1998. Everything in moderation: Archaea as 'non-extremophiles'. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**:649-654.

**DeLong, E. F., K. Y. Wu, B. B. Prezelin und R. V. M. Jovine.** 1994. High abundance of *Archaea* in Antarctic marine picoplankton. *Nature* **371**:695-697.

**Dojka, M. A., P. Hugenholtz, S. K. Haack und N. R. Pace.** 1998. Microbial diversity in a hydrocarbon- and chlorinated-solvent-contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:3869-3877.

**Donovan, S. E., K. J. Purdy, M. D. Kane und P. Eggleton.** 2004. Comparison of *Euryarchaea* strains in the guts and food-soil of the soil-feeding termite *Cubitermes fungifaber* across different soil types. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:3884-3892.

**Drancourt, M., C. Bollet, A. Carlouz, R. Martelin, J. P. Gayral und D. Raoult.** 2000. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *J. Clin. Microbiol.* **38**:3623-3630.

**Duineveld, B. M., G. A. Kowalchuk, A. Keijzer, J. D. van Elsas und J. A. van Veen.** 2001. Analysis of bacterial communities in the rhizosphere of chrysanthemum via denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rRNA as well as DNA fragments coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:172-178.

**Dunbar, J., S. M. Barns, L. O. Ticknor und C. R. Kuske.** 2002. Empirical and theoretical bacterial diversity in four Arizona soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:3035-3045.

**Dunbar, J., L. O. Ticknor und C. R. Kuske.** 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.

**Dunbar, J., S. Takala, S. M. Barns, J. A. Davis und C. R. Kuske.** 1999. Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:1662-1669.

**Egert, M. und M. W. Friedrich.** 2003. Formation of Pseudo-Terminal Restriction Fragments, a PCR-Related Bias Affecting Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Microbial Community Structure. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:2555-62.

**Ehrich, S., D. Behrens, E. Lebedeva, W. Ludwig und E. Bock.** 1995. A new obligately chemolithoautotrophic, nitrite-oxidizing bacterium, *Nitrospira moscoviensis* sp. nov. and its phylogenetic relationship. *Arch. Microbiol.* **164**:16-23.

**Elomari, M., L. Coroler, B. Hoste, M. Gillis, D. Izard und H. Leclerc.** 1996. DNA relatedness among *Pseudomonas* strains isolated from natural mineral waters and proposal of *Pseudomonas veronii* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**:1138-1144.

**Evtushenko, L. I., L. V. Dorofeeva, S. A. Subbotin, J. R. Cole und J. M. Tiedje.** 2000. *Leifsonia poae* gen. nov., sp. nov., isolated from nematode galls on *Poa annua*, and reclassification of '*Corynebacterium aquaticum*' Leifson 1962 as *Leifsonia aquatica* (ex Leifson 1962) gen. nov., nom. rev., comb. nov. and *Clavibacter xyli* Davis et al. 1984 with two subspecies as *Leifsonia xyli* (Davis et al. 1984) gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50 Pt 1**:371-380.

**Feigel, B. J. und H. J. Knackmuss.** 1993. Syntrophic interactions during degradation of 4-aminobenzenesulfonic acid by a two species bacterial culture. *Arch. Microbiol.* **159**:124-130.

**Felsenstein, J.** 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* **17**:368-376.

**Felske, A. und R. Weller.** 2001. Cloning 16S rRNA genes and utilization to type bacterial communities, S. 1-16. In A. D. L. Akkermans, J. D. Van Elsas und F. J. De Bruijn (Hrsg.), *Mol. Microb. Ecol. Manual*, vol. 3.3.3. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/ Boston/ London.

**Felske, A., W. M. de Vos und A. D. Akkermans.** 2000a. Spatial distribution of 16S rRNA levels from uncultured acidobacteria in soil. *Lett. Appl. Microbiol.* **31**:118-122.

**Felske, A., A. Wolterink, R. Van Lis, W. M. De Vos und A. D. L. Akkermans.** 2000b. Response of a soil bacterial community to grassland succession as monitored by 16S rRNA levels of the predominant ribotypes. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:3998-4003.

**Felske, A., A. Wolterink, R. Van Lis und A. D. Akkermans.** 1998. Phylogeny of the main bacterial 16S rRNA sequences in Drentse A grassland soils (The Netherlands). *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:871-879.

**Fey, A. und R. Conrad.** 2000. Effect of temperature on carbon and electron flow and on the archaeal community in methanogenic rice field soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:4790-4797.

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

**Friedrich, M. W., D. Schmitt-Wagner, T. Lueders und A. Brune.** 2001. Axial differences in community structure of Crenarchaeota and Euryarchaeota in the highly compartmentalized gut of the soil-feeding termite *Cubitermes orthognathus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:4880-4890.

**Friedrich, U., K. Prior, K. Altendorf und A. Lipski.** 2002. High bacterial diversity of a waste gas-degrading community in an industrial biofilter as shown by a 16S rDNA clone library. *Environ. Microbiol.* **4**:721-734.

**Germaine, K., E. Keogh, G. Garcia-Cabellos, B. Borremans, D. van der Lelie, T. Barac, L. Oeyen, J. Vangronsveld, F. Porteous Moore, E. R. B. Moore, C. D. Campbell, D. Ryan und D. N. Dowling.** 2004. Colonisation of poplar trees by *gfp* expressing bacterial endophytes. *FEMS Microbiol. Ecol.* **48**:109-118.

**Gewässerdirektion südlicher Oberrhein/Hochrhein.** 2000. Auswirkungen der ökologischen Flutungen der Polder Altenheim. Gewässerdirektion Südlicher Oberrhein/Hochrhein (Hrsg.), Lahr, Germany.

**Glissmann, K., K. J. Chin, P. Casper und R. Conrad.** 2004. Methanogenic pathway and archaeal community structure in the sediment of eutrophic Lake Dagow: effect of temperature. *Microb. Ecol.* **48**:389-399.

**Goto, K., T. Omura, Y. Hara und Y. Sadaie.** 2000. Application of the partial 16S rDNA sequence as an index for rapid identification of species in the genus *Bacillus*. *J. of General and Appl. Microbiol.* **46**:1-8.

**Grayston, S. J., S. Wang, C. D. Campbell und A. C. Edwards.** 1998. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* **30**:369-378.

**Grayston, S. J. und C. D. Campbell.** 1996. Functional biodiversity of microbial communities in the rhizospheres of hybrid larch (*Larix eurolepis*) and Sitka spruce (*Picea sitchensis*). *Tree Physiology* **16**:1031-1038.

**Griffiths, B. S., K. Ritz und L. A. Glover.** 1996. Broad-scale approaches to the determination of soil microbial community structure: Application of the community DNA hybridization technique. *Microb. Ecol.* **31**:269-280.

**Griffiths, R. I., A. S. Whiteley, A. G. O'Donnell und M. J. Bailey.** 2003. Physiological and community responses of established grassland bacterial populations to water stress. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:6961-6968.

**Großkopf, R., P. H. Janssen und W. Liesack.** 1998a. Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:960-969.

**Großkopf, R., S. Stubner und W. Liesack.** 1998b. Novel euryarchaeotal lineages detected on rice roots and in the anoxic bulk soil of flooded rice microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:4983-4989.

**Gutell, R. R., N. Larsen und C. R. Woese.** 1994. Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective. *Microb. Rev.* **58**:10-26.

**Henckel, T., U. Jäckel, S. Schnell und R. Conrad.** 2000. Molecular analyses of novel methanotrophic communities in forest soil that oxidize atmospheric methane. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:1801-1808.

**Henckel, T., M. Friedrich und R. Conrad.** 1999. Molecular analyses of the methane-oxidizing microbial community in rice field soil by targeting the genes of the 16S rRNA, particulate methane monooxygenase, and methanol dehydrogenase. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:1980-1990.

**Hengstmann, U., K. J. Chin, P. H. Janssen und W. Liesack.** 1999. Comparative phylogenetic assignment of environmental sequences of genes encoding 16S rRNA and numerically abundant culturable bacteria from an anoxic rice paddy soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:5050-5058.

**Hershberger, K. L., S. M. Barns, A. L. Reysenbach, S. C. Dawson und N. R. Pace.** 1996. Wide diversity of Crenarchaeota. *Nature* **384**:420-420.

**Heuer, H. und K. Smalla.** 1997. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) for studying soil microbial communities, S. 353-373. *In* J. D. van Elsas, J. T. Trevors und E. M. H. Wellington (Hrsg.), *Modern Soil Microbiology*. Marcel Dekker, New York.

**Heyrman, J. und J. Swings.** 2001. 16S rDNA sequence analysis of bacterial isolates from biodeteriorated mural paintings in the Servilia tomb (Necropolis of Carmona, Seville, Spain). *System. Appl. Microbiol.* **24**:417-422.

**Heyrman, J., B. Vanparys, N. A. Logan, A. Balcaen, M. Rodriguez-Diaz, A. Felske und P. De Vos.** 2004. *Bacillus novalis* sp. nov., *Bacillus vireti* sp. nov., *Bacillus soli* sp. nov., *Bacillus bataviensis* sp. nov. and *Bacillus drentensis* sp. nov., from the Drentse A grasslands. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**:47-57.

**Hiraishi, A., N. Kishimoto, Y. Kosako, N. Wakao und T. Tano.** 1995. Phylogenetic position of the menaquinone-containing acidophilic chemo-organotroph *Acidobacterium capsulatum*. *FEMS Microbiol. Letters* **132**:91-94.

**Hiraishi, A. und Y. Ueda.** 1994. *Rhodoplanes* gen-nov., a new genus of phototrophic bacteria including *Rhodopseudomonas rosea* as *Rhodoplanes roseus* comb. nov. and *Rhodoplanes elegans* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**:665-673.

**Holben, W. E., J. K. Jansson, B. K. Chelm und J. M. Tiedje.** 1988. DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:703-711.

**Holmer, M. und E. Kristensen.** 1994. Coexistence of Sulfate Reduction and Methane Production in an Organic-Rich Sediment. *Marine Ecology-Progress Series* **107**:177-184.

**Holmes, A. J., N. A. Tujula, M. Holley, A. Contos, J. M. James, P. Rogers und M. R. Gillings.** 2001. Phylogenetic structure of unusual aquatic microbial formations in Nullarbor caves, Australia. *Environ. Microbiol.* **3**:256-64.

**Holmes, A. J., J. Bowyer, M. P. Holley, M. O'Donoghue, M. Montgomery und M. R. Gillings.** 2000. Diverse, yet-to-be-cultured members of the *Rubrobacter* subdivision of the Actinobacteria are widespread in Australian arid soils. *FEMS Microbiol. Ecol.* **33**:111-120.

**Huber, H., M. J. Hohn, R. Rachel, T. Fuchs, V. C. Wimmer und K. O. Stetter.** 2002. A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* **417**:63-67.

**Hugenholtz, P., C. Pitulle, K. L. Hershberger und N. R. Pace.** 1998a. Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. *J. Bacteriol.* **180**:366-376.

**Hugenholtz, P., B. M. Goebel und N. R. Pace.** 1998b. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.* **180**:4765-4774.

**Hughes, J. B., J. J. Hellmann, T. H. Ricketts und B. J. Bohannan.** 2001. Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:4399-4406.

**Ihssen, J., M. A. Horn, C. Matthies, A. Gossner, A. Schramm und H. L. Drake.** 2003. N<sub>2</sub>O-producing microorganisms in the gut of the earthworm *Aporrectodea caliginosa* are indicative of ingested soil bacteria. *Appl Environ Microbiol* **69**:1655-1661.

**Ikenaga, M., S. Asakawa, Y. Muraoka und M. Kimura.** 2003. Bacterial communities associated with nodal roots of rice plants along with the growth stages: Estimation by PCR-DGGE and sequence analyses. *Soil Sci Plant Nutr* **49**:591-602.

**Itoh, T.** 2003. Taxonomy of nonmethanogenic hyperthermophilic and related thermophilic archaea. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **96**:203-212.

**Iwabuchi, T., Y. Inomata-Yamauchi, A. Katsuta und S. Harayama.** 1998. Isolation and characterization of marine *Nocardioides* capable of growing and degrading phenanthrene at 42 degrees C. *Journal of Marine Biotechnology* **6**:86-90.

**Jäger, C. H., 3rd, S. E. Lindow, W. Miller, E. Clark und M. K. Firestone.** 1999. Mapping of sugar and amino acid availability in soil around roots with bacterial sensors of sucrose and tryptophan. *Appl Environ Microbiol* **65**:2685-2690.

**Jetten, M. S. M., A. J. M. Stams und A. J. B. Zehnder.** 1992. Methanogenesis from acetate - a comparison of the acetate metabolism in *Methanotheroxobacter* and *Methanosarcina* spp. FEMS Microbiol. Rev. **88**:181-197.

**Jetten, M. S. M., A. J. M. Stams und A. J. B. Zehnder.** 1990. Acetate threshold values and acetate activating enzymes in methanogenic bacteria. FEMS Microbiol. Ecol. **73**:339-344.

**Jones, D. und R. M. Keddie.** 1992. The genus *Arthrobacter*, S. 1283-1299. In A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder und K.-H. Schleifer (Hrsg.), The Prokaryotes. Springer, New York.

**Joseph, S. J., P. Hugenholtz, P. Sangwan, C. A. Osborne und P. H. Janssen.** 2003. Laboratory cultivation of widespread and previously uncultured soil bacteria. Appl. Environ. Microbiol. **69**:7210-7215.

**Juretschko, S., A. Loy, A. Lehner und M. Wagner.** 2002. The microbial community composition of a nitrifying-denitrifying activated sludge from an industrial sewage treatment plant analyzed by the full-cycle rRNA approach. System. Appl. Microbiol. **25**:84-99.

**Jurgens, G., F. Glockner, R. Amann, A. Saano, L. Montonen, M. Likolammi und U. Munster.** 2000. Identification of novel Archaea in bacterioplankton of a boreal forest lake by phylogenetic analysis and fluorescent in situ hybridization (1). FEMS Microbiol. Ecol. **34**:45-56.

**Jurgens, G., K. Lindstrom und A. Saano.** 1997. Novel group within the kingdom *Crenarchaeota* from boreal forest soil. Appl. Environ. Microbiol. **63**:803-805.

**Kanaly, R. A., S. Harayama und K. Watanabe.** 2002. *Rhodanobacter* sp. strain BPC1 in a benzo[a]pyrene-mineralizing bacterial consortium. Appl. Environ. Microbiol. **68**:5826-5833.

**Kaplan, C. W. und C. L. Kitts.** 2003. Variation between observed and true Terminal Restriction Fragment length is dependent on true T-RF length and purine content. *J. Microbiol. Methods* **54**:121-125.

**Kasai, Y., Y. Takahata, T. Hoaki und K. Watanabe.** 2005. Physiological and molecular characterization of a microbial community established in unsaturated, petroleum-contaminated soil. *Environ. Microbiol.* **7**:806-818.

**Kelsey, R. G.** 1996. Anaerobic induced ethanol synthesis in the stems of greenhouse-grown conifer seedlings. *Trees* **10**:183-188.

**Kemnitz, D.** 2004. Charakterisierung unkultivierter *Archaea* aus Böden. Dissertation, Philipps-Universität Marburg.

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

**Kerstens, K., P. De Vos, M. Gillis, J. Swings, P. Vandamme und E. Stackebrandt.** 2001. Introduction to the Proteobacteria. *In* K. Kersters et al. (Hrsg.), *The Prokaryotes: an Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*, 3. Ausgabe Springer, New York. (URL: <http://link.springer-ny.com/link/service/books/10125/>).

**Kitts, C. L.** 2001. Terminal restriction fragment patterns: a tool for comparing microbial communities and assessing community dynamics. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* **2**:17-25.

**Kowalchuk, G. A., G. J. Os, J. Aartrijk und J. A. Veen.** 2003. Microbial community responses to disease management soil treatments used in flower bulb cultivation. *Biol. Fertil. Soils* **37**:55-63.

**Kreuzwieser, J., F. Kühnemann, A. Martis, H. Rennenberg und W. Urban.** 2000. Diurnal pattern of acetaldehyde emission by flooded poplar trees. *Physiologia Plantarum* **108**:79-86.

**Kreuzwieser, J., U. Scheerer und H. Rennenberg.** 1999a. Metabolic origin of acetaldehyde emitted by poplar (*Populus tremula* \**P. alba*) trees. J. Exp. Botany **50**:757-765.

**Kreuzwieser, J., J.-P. Schnitzler und R. Steinbrecher.** 1999b. Biosynthesis of organic compounds emitted by plants. Plant Biol. **1**:149-159.

**Krieg, N. R.** 1984. Genus *Aquaspirillum* Hylemon, Wells, Krieg and Jannasch 1973, S. 72-90. In N. R. Krieg und J. G. Holt (Hrsg.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams & Wilkins, Baltimore.

**Krumböck, M. und R. Conrad.** 1991. Metabolism of position-labelled glucose in anoxic methanogenic paddy soil and lake sediment. FEMS Microbiol. Ecol. **85**:247-256.

**Küsel, K., C. Wagner und H. L. Drake.** 1999. Enumeration and metabolic product profiles of the anaerobic microflora in the mineral soil and litter of a beech forest. FEMS Microbiol. Ecol. **29**:91-103.

**Kuske, C. R., S. M. Barns und J. D. Busch.** 1997. Diverse uncultivated bacterial groups from soils of the arid southwestern United States that are present in many geographic regions. Appl. Environ. Microbiol. **63**:3614-3621.

**La Scola, B., L. Barrassi und D. Raoult.** 2000. Isolation of a new fastidious  $\alpha$  Proteobacteria and *Afipia felis* from hospital water supplies by direct plating and amoebal co-culture procedures. FEMS Microbiol. Ecol. **34**:129-137.

**Lane, D. J.** 1991. 16S/23S rRNA sequencing, S. 115-147. In E. Stackebrandt und M. Goodfellow (Hrsg.), Nucleic acid techniques in bacterial systematics. John Wiley & Sons, Chichester.

**Laramee, L., J. R. Lawrence und C. W. Greer.** 2000. Molecular analysis and development of 16S rRNA oligonucleotide probes to characterize a diclofop-methyl-degrading biofilm consortium. *Canadian J. Microbiol.* **46**:133-142.

**Latour, X., L. Philippot, T. Corberand und P. Lemanceau.** 1999. The establishment of an introduced community of fluorescent pseudomonads in the soil and in the rhizosphere is affected by the soil type. *FEMS Microbiol. Ecol.* **30**:163-170.

**Lee, J. S., Y. K. Shin, J. H. Yoon, M. Takeuchi, Y. R. Pyun und Y. H. Park.** 2001. *Sphingomonas aquatilis* sp. nov., *Sphingomonas koreensis* sp. nov., and *Sphingomonas taejonensis* sp. nov., yellow-pigmented bacteria isolated from natural mineral water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**:1491-1498.

**Lee, S. Y., J. Bollinger, D. Bezdicek und A. Ogram.** 1996. Estimation of the abundance of an uncultured soil bacterial strain by a competitive quantitative PCR method. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:3787-3793.

**Liesack, W., P. H. Janssen, F. A. Rainey, N. L. Ward-Rainey und E. Stackebrandt.** 1997. Microbial diversity in soil: the need for a combined approach using molecular and cultivation techniques. *In* J. D. Van Elsas, J. T. Trevors und E. M. H. Wellington (Hrsg.), *Modern soil microbiology*. Marcel Dekker, Inc., New York.

**Liesack, W., F. Bak, J. U. Kreft und E. Stackebrandt.** 1994. *Holophaga foetida* gen. nov., sp. nov., a new, homoacetogenic bacterium degrading methoxylated aromatic compounds. *Arch. Microbiol.* **162**:85-90.

**Liesack, W. und E. Stackebrandt.** 1992. Occurrence of novel groups of the domain Bacteria as revealed by analysis of genetic material isolated from an Australian terrestrial environment. *J. Bacteriol.* **174**:5072-5078.

**Lincoln, S. P., T. R. Fermor und B. J. Tindall.** 1999. *Janthinobacterium agaricidamnosum* sp. nov., a soft rot pathogen of *Agaricus bisporus*. Int. J. Syst. Bacteriol. **49 Pt 4**:1577-1589.

**Liu, W.-T., T. L. Marsh, H. Cheng und L. J. Forney.** 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. **63**:4516-4522.

**Lo Presti, F., S. Riffard, H. Meugnier, M. Reyrolle, Y. Lasne, P. A. Grimont, F. Grimont, R. F. Benson, D. J. Brenner, A. G. Steigerwalt, J. Etienne und J. Freney.** 2001. *Legionella gresilensis* sp. nov. and *Legionella beliardensis* sp. nov., isolated from water in France. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **51**:1949-1957.

**Lobakova, E. S., M. K. Orazova und T. G. Dobrovol'skaya.** 2003. Microbial complexes occurring on the apogeotropic roots and in the rhizosphere of cycad plants. Microbiol. **72**:628-633.

**Lonergan, D. J., H. L. Jenter, J. D. Coates, E. J. Phillips, T. M. Schmidt und D. R. Lovley.** 1996. Phylogenetic analysis of dissimilatory Fe(III)-reducing bacteria. J. Bacteriol. **178**:2402-2408.

**Lovley, D. R.** 1985. Minimum Threshold for Hydrogen Metabolism in Methanogenic Bacteria. Appl. Environ. Microbiol. **49**:1530-1531.

**Lüdemann, H., I. Arth und W. Liesack.** 2000. Spatial changes in the bacterial community structure along a vertical oxygen gradient in flooded paddy soil cores. Appl. Environ. Microbiol. **66**:754-762.

**Lüders, T. J.** 2001. Molekularbiologische Untersuchung der Diversität und Funktion methanogener Mikroorganismen im Reisfeldboden. Dissertation, Philipps-Universität Marburg.

**Ludwig, W., O. Strunk, R. Westram, L. Richter, H. Meier, Yadhukumar, A. Buchner, T. Lai, S. Steppi, G. Jobb, W. Förster, I. Brettske, S. Gerber, A. W. Ginhart, O. Gross, S. Grumann, S. Hermann, R. Jost, A. König, T. Liss, R. Lüßmann, M. May, B. Nonhoff, B. Reichel, R. Strehlow, A. Stamatakis, N. Stuckmann, A. Vilbig, M. Lenke, T. Ludwig, A. Bode und K.-H. Schleifer.** 2004. ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res* **32**:1363-1371.

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

**Ludwig, W., S. H. Bauer, M. Bauer, I. Held, G. Kirchhof, R. Schulze, I. Huber, S. Spring, A. Hartmann und K. H. Schleifer.** 1997. Detection and in situ identification of representatives of a widely distributed new bacterial phylum. *FEMS Microbiol. Letters* **153**:181-190.

**Ludwig, W. und K.-H. Schleifer.** 1994. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* **15**:155-173.

**Lueders, T., B. Pommerenke und M. W. Friedrich.** 2004. Stable-isotope probing of microorganisms thriving at thermodynamic limits: Syntrophic propionate oxidation in flooded soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:5778-5786.

**Lueders, T. und M. W. Friedrich.** 2002. Effects of amendment with ferrihydrite and gypsum on the structure and activity of methanogenic populations in rice field soil. *Appl Environ Microbiol* **68**:2484-2494.

**Lueders, T. und M. Friedrich.** 2000. Archaeal population dynamics during sequential reduction processes in rice field soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:2732-2742.

**Lukow, T., P. F. Dunfield und W. Liesack.** 2000. Use of the T-RFLP technique to assess spatial and temporal changes in the bacterial community structure within an agricultural soil planted with transgenic and non-transgenic potato plants. *FEMS Microbiol. Ecol.* **32**:241-247.

**Lynch, J. M.** 1990. Introduction: Some consequences of microbial rhizosphere competence for plant and soil, S. 1-10. *In* J. M. Lynch (Hrsg.), *The rhizosphere*. John Wiley & Sons, Chichester, England.

**MacDonald, R. C. und T. W. Kimmerer.** 1991. Ethanol in the stems of trees. *Physiologia Plantarum* **82**:582-588.

**MacGregor, B. J., D. P. Moser, E. W. Alm, K. H. Neelson und D. A. Stahl.** 1997. Crenarchaeota in Lake Michigan sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:1178-1181.

**Mahaffee, W. F. und J. W. Kloepper.** 1997. Temporal Changes in the Bacterial Communities of Soil, Rhizosphere, and Endorhiza Associated with Field-Grown Cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Microb. Ecol.* **34**:210-223.

**Marilley, L. und M. Aragno.** 1999. Phylogenetic diversity of bacterial communities differing in degree of proximity of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* roots. *Appl. Soil Ecol.* **13**:127-136.

**Martiny, A. C., T. M. Jorgensen, H. J. Albrechtsen, E. Arvin und S. Molin.** 2003. Long-term succession of structure and diversity of a biofilm formed in a model drinking water distribution system. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:6899-6907.

**Massana, R., A. E. Murray, C. M. Preston und E. F. DeLong.** 1997. Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic Archaea in the Santa Barbara Channel. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:50-56.

**Mayer, H. P. und R. Conrad.** 1990. Factors influencing the population of methanogenic bacteria and the initiation of methane production upon flooding of paddy soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **73**:103-112.

**McCaig, A. E., L. A. Glover und J. I. Prosser.** 1999. Molecular analysis of bacterial community structure and diversity in unimproved and improved upland grass pastures. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:1721-1730.

**McMahon, K. D., M. A. Dojka, N. R. Pace, D. Jenkins und J. D. Keasling.** 2002. Polyphosphate kinase from activated sludge performing enhanced biological phosphorus removal. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:4971-4978.

**Miller, L. G., K. L. Warner, S. M. Baesman, R. S. Oremland, I. R. McDonald, S. Radajewski und J. C. Murrell.** 2004. Degradation of methyl bromide and methyl chloride in soil microcosms: Use of stable C isotope fractionation and stable isotope probing to identify reactions and the responsible microorganisms. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* **68**:3271-3283.

**Moré, M. I., J. B. Herrick, M. C. Silva, W. C. Ghiorse und E. L. Madsen.** 1994. Quantitative cell lysis of indigenous microorganisms and rapid extraction of microbial DNA from sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:1572-1580.

**Morris, S. A., S. Radajewski, T. W. Willison und J. C. Murrell.** 2002. Identification of the functionally active methanotroph population in a peat soil microcosm by stable-isotope probing. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:1446-1453.

**Mountfort, D. O. und R. A. Asher.** 1981. Role of Sulfate Reduction Versus Methanogenesis in Terminal Carbon Flow in Polluted Inter-Tidal Sediment of Waimea Inlet, Nelson, New-Zealand. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**:252-258.

**Muyzer, G.** 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion Microbiol.* **2**:317-322.

**Nercessian, O., Y. Fouquet, C. Pierre, D. Prieur und C. Jeanthon.** 2005. Diversity of *Bacteria* and *Archaea* associated with a carbonate-rich metalliferous sediment sample from the Rainbow vent field on the Mid-Atlantic Ridge. *Environ. Microbiol.* **7**:698-714.

**Nogales, B., E. R. Moore, W. R. Abraham und K. N. Timmis.** 1999. Identification of the metabolically active members of a bacterial community in a polychlorinated biphenyl-polluted moorland soil. *Environ. Microbiol.* **1**:199-212.

**Noll, M., D. Matthies, P. Frenzel, M. Derakshani und W. Liesack.** 2005. Succession of bacterial community structure and diversity in a paddy soil oxygen gradient. *Environ. Microbiol.* **7**:382-395.

**Noll, M.** 2004. Mikrobielle Sukzession in geflutetem Reisfeldboden. Dissertation, Philipps-Universität Marburg.

**Normander, B. und J. I. Prosser.** 2000. Bacterial origin and community composition in the barley phytosphere as a function of habitat and presowing conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:4372-4377.

**Norris, T. B., J. M. Wraith, R. W. Castenholz und T. R. McDermott.** 2002. Soil microbial community structure across a thermal gradient following a geothermal heating event. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:6300-6309.

**Northup, D. E., S. M. Barns, L. E. Yu, M. N. Spilde, R. T. Schelble, K. E. Dano, L. J. Crossey, C. A. Connolly, P. J. Boston, D. O. Natvig und C. N. Dahm.** 2003. Diverse microbial communities inhabiting ferromanganese deposits in Lechuguilla and Spider Caves. *Environ. Microbiol.* **5**:1071-1086.

**Nüsslein, B., K. J. Chin, W. Eckert und R. Conrad.** 2001. Evidence for anaerobic syntrophic acetate oxidation during methane production in the profundal sediment of subtropical Lake Kinneret (Israel). *Environ. Microbiol.* **3**:460-470.

- Ochsenreiter, T., D. Selezi, A. Quaiser, L. Bonch-Osmolovskaya und C. Schleper.** 2003. Diversity and abundance of Crenarchaeota in terrestrial habitats studied by 16S RNA surveys and real time PCR. *Environ. Microbiol.* **5**:787-797.
- Olsen, G. J.** 1994. Microbial Ecology - Archaea, Archaea, everywhere. *Nature* **371**:657-658.
- Olsen, G. J. und C. R. Woese.** 1993. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *FASEB J.* **7**:113-23.
- Osborn, A. M., E. R. B. Moore und K. N. Timmis.** 2000. An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environ. Microbiol.* **2**:39-50.
- Ovreas, L. und V. Torsvik.** 1998. Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. *Microb. Ecol.* **36**:303-315.
- Peters, V. und R. Conrad.** 1995. Methanogenic and Other Strictly Anaerobic-Bacteria in Desert Soil and Other Oxidic Soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:1673-1676.
- Peters, V. und R. Conrad.** 1996. Sequential reduction processes and initiation of CH<sub>4</sub> production upon flooding of oxidic upland soils. *Soil Biol. Biochem.* **28**:371-382.
- Ponnamperuma, F. N.** 1978. Electrochemical changes in submerged soils and the growth of rice, S. 421-441. *In* I. R. R. Institute (Hrsg.), *Soils and Rice*, Los Banos, Philippines.
- Pot, B., A. Willems, M. Gillis und J. De Ley.** 1992. Intra- and intergeneric relationships of the genus *Aquaspirillum*: *Prolinoborus*, a new genus for *Aquaspirillum fasciculus*, with the species *Prolinoborus fasciculus* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**:44-57.

**Priha, O., S. J. Grayston, R. Hiukka, T. Pennanen und A. Smolander.** 2001. Microbial community structure and characteristics of the organic matter in soils under *Pinus sylvestris*, *Picea abies* and *Betula pendula* at two forest sites. *Biol. Fertil. Soils* **33**:17-24.

**Probian, C., A. Wülfing und J. Harder.** 2003. Anaerobic mineralization of quaternary carbon atoms: isolation of denitrifying bacteria on pivalic acid (2,2-dimethylpropionic acid). *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:1866-70.

**Purdy, K. J., D. B. Nedwell und T. M. Embley.** 2003. Analysis of the sulfate-reducing bacterial and methanogenic archaeal populations in contrasting Antarctic sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:3181-3191.

**Rabus, R. und F. Widdel.** 1995. Anaerobic degradation of ethylbenzene and other aromatic hydrocarbons by new denitrifying bacteria. *Arch. Microbiol.* **163**:96-103.

**Rainey, F. A., N. Ward-Rainey, C. G. Gliesche und E. Stackebrandt.** 1998. Phylogenetic analysis and intrageneric structure of the genus *Hyphomicrobium* and the related genus *Filomicrobium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48 Pt 3**:635-639.

**Rainey, F., N. Weiss, H. Prauser und E. Stackebrandt.** 1994. Further evidence for the phylogenetic coherence of actinomycetes with Group B-Peptidoglycan and evidence for the phylogenetic intermixing of the genera *Microbacterium* and *Aureobacterium* as determined by 16s rDNA analysis. *FEMS Microbiol. Letters* **118**:135-139.

**Ramakrishnan, B., T. Lueders, P. F. Dunfield, R. Conrad, and M. W. Friedrich.** 2001. Archaeal community structures in rice soils from different geographical regions before and after initiation of methane production. *FEMS Microbiol. Ecol.* **37**:175-186.

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

**Ranjard, L., F. Poly, J. Combrisson, A. Richaume, F. Gourbiere, J. Thioulouse und S. Nazaret.** 2000. Heterogeneous cell density and genetic structure of bacterial pools associated with various soil microenvironments as determined by enumeration and DNA fingerprinting approach (RISA). *Microb. Ecol.* **39**:263-272.

**Rappé, M. S. und S. J. Giovannoni.** 2003. The uncultured microbial majority. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**:369-394.

**Ratering, S. und R. Conrad.** 1998. Effects of short-term drainage and aeration on the production of methane in submerged rice soil. *Global Change Biology* **4**:397-407.

**Reed, D. W., Y. Fujita, M. E. Delwiche, D. B. Blackwelder, P. P. Sheridan, T. Uchida und F. S. Colwell.** 2002. Microbial communities from methane hydrate-bearing deep marine sediments in a forearc basin. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:3759-3770.

**Rossello-Mora, R. A., W. Ludwig und K. H. Schleifer.** 1993. *Zoogloea ramigera*: A phylogenetically diverse species. *FEMS Microbiol. Letters* **114**:129-134.

**Roy, R. und R. Conrad.** 1999. Effect of methanogenic precursors (acetate, hydrogen, propionate) on the suppression of methane production by nitrate in anoxic rice field soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **28**:49-61.

**Roy, R., H. D. Klüber und R. Conrad.** 1997. Early initiation of methane production in anoxic rice soil despite the presence of oxidants. *FEMS Microbiol. Ecol.* **24**:311-320.

**Rudolph, C., C. Moissl, R. Henneberger und R. Huber.** 2004. Ecology and microbial structures of archaeal/bacterial strings-of-pearls communities and archaeal relatives thriving in cold sulfidic springs. *FEMS Microbiol. Ecol.* **50**:1-11.

**Rutz, B. A. und T. L. Kieft.** 2004. Phylogenetic characterization of dwarf archaea and bacteria from a semiarid soil. *Soil Biol. Biochem.* **36**:825-833.

**Saitou, N. und M. Nei.** 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**:406-425.

**Sambrook, J., E. F. Fritsch und T. Maniatis.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor, N.Y., USA.

**Sanger, F., S. Nicklen und A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS* **74**:5463-5367.

**Scheffer und Schachtschabel.** 2002. *Lehrbuch der Bodenkunde*, 15. Auflage. Spektrum Verlag, Heidelberg.

**Scheid, D., S. Stubner und R. Conrad.** 2004. Identification of rice root associated nitrate, sulfate, and ferric iron reducing bacteria during root decomposition. *FEMS Microbiol. Ecol.* **50**:101-110.

**Scheid, D., S. Stubner und R. Conrad.** 2003. Effects of nitrate- and sulfate-amendment on the methanogenic populations in rice root incubations. *FEMS Microbiol. Ecol.* **43**:309-315.

**Scheid, D. und S. Stubner.** 2001. Structure and diversity of Gram-negative sulfate-reducing bacteria on rice roots. *FEMS Microbiol. Ecol.* **36**:175-183.

**Schinner, F., R. Öhlinger und E. Kandeler.** 1991. *Bodenbiologische Arbeitsmethoden.* Springer-Verlag, Berlin.

**Schleper, C., G. Jurgens und M. Jonuscheit.** 2005. Genomic studies of uncultivated archaea. *Nature Reviews Microbiology* **3**:479-488.

**Schleper, C., W. Holben und H. P. Klenk.** 1997. Recovery of Crenarchaeotal ribosomal DNA sequences from freshwater-lake sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:321-323.

**Schlichting, E., H.-P. Blume und K. Stahr.** 1995. *Bodenkundliches Praktikum*, 2. Auflage. Blackwell, Berlin.

**Schmidt, H. A., K. Strimmer, M. Vingron und A. von Haeseler.** 2002. TREE-PUZZLE: maximum likelihood phylogenetic analysis using quartets and parallel computing. *Bioinformatics* **18**:502-504.

**Scott, E. S.** 1984. Populations of bacteria in poplar stems. *European J. For. Path.* **14**:103-112.

**Shida, O., H. Takagi, K. Kadowaki, L. K. Nakamura und K. Komagata.** 1997. Transfer of *Bacillus alginolyticus*, *Bacillus chondroitinus*, *Bacillus curdlanolyticus*, *Bacillus glucanolyticus*, *Bacillus kobensis*, and *Bacillus thiaminolyticus* to the genus *Paenibacillus* and emended description of the genus *Paenibacillus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**:289-298.

**Shiomi, Y., M. Nishiyama, T. Onizuka und T. Marumoto.** 1999. Comparison of bacterial community structures in the rhizoplane of tomato plants grown in soils suppressive and conducive towards bacterial wilt. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:3996-4001.

**Simankova, M. V., O. R. Kotsyurbenko, T. Lueders, A. N. Nozhevnikova, B. Wagner, R. Conrad und M. W. Friedrich.** 2003. Isolation and characterization of new strains of methanogens from cold terrestrial habitats. *System. Appl. Microbiol.* **26**:312-318.

**Simon, H. M., J. A. Dodsworth und R. M. Goodman.** 2000. Crenarchaeota colonize terrestrial plant roots. *Environ. Microbiol.* **2**:495-505.

**Simpson, J. M., J. W. Santo Domingo und D. J. Reasoner.** 2004. Assessment of equine fecal contamination: the search for alternative bacterial source-tracking targets. *FEMS Microbiol. Ecol.* **47**:65-75.

**Singleton, D. R., P. F. Hendrix, D. C. Coleman und W. B. Whitman.** 2003. Identification of uncultured bacteria tightly associated with the intestine of the earthworm *Lumbricus rubellus* (Lumbricidae; Oligochaeta). *Soil Biol. Biochem.* **35**:1547-1555.

**Slepecky, R. A. und H. E. Hemphill.** 1992. The genus *Bacillus*-nonmedical, S. 1663-1696. In A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder und K.-H. Schleifer (Hrsg.), *The Prokaryotes*, 2. Auflage. Springer, New York.

**Sliwinski, M. K. und R. M. Goodman.** 2004a. Comparison of Crenarchaeal Consortia Inhabiting the Rhizosphere of Diverse Terrestrial Plants with Those in Bulk Soil in Native Environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:1821-1826.

**Sliwinski, M. K. und R. M. Goodman.** 2004b. Spatial Heterogeneity of Crenarchaeal Assemblages within Mesophilic Soil Ecosystems as Revealed by PCR-Single-Stranded Conformation Polymorphism Profiling. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:1811-1820.

**Smalla, K., G. Wieland, A. Buchner, A. Zock, J. Parzy, S. Kaiser, N. Roskot, H. Heuer und G. Berg.** 2001. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:4742-4751.

**Smalla, K., U. Wachtendorf, H. Heuer, W.-T. Liu, and L. Forney.** 1998. Analysis of BIOLOG SN substrate utilization patterns by microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:1220-1225.

**Söderberg, K. H., P. A. Olsson und E. Baath.** 2002. Structure and activity of the bacterial community in the rhizosphere of different plant species and the effect of arbuscular mycorrhizal colonisation. *FEMS Microbiol. Ecol.* **40**:223-231.

**Söderberg, K. H. und E. Baath.** 1998. Bacterial activity along a young barley root measured by the thymidine and leucine incorporation techniques. *Soil Biol. Biochem.* **30**:1259-1268.

**Stackebrandt, E. und B. M. Goebel.** 1994. Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**:846-849.

**Stackebrandt, E., W. Liesack und B. M. Goebel.** 1993. Bacterial diversity in a soil sample from a subtropical Australian environment as determined by 16S rDNA analysis. *FASEB J.* **7**:232-236.

**Staley, J. T. und A. Konopka.** 1985. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu. Rev. Microbiol.* **39**:321-346.

**Stein, L. Y., G. Jones, B. Alexander, K. Elmund, C. Wright-Jones und K. H. Neelson.** 2002. Intriguing microbial diversity associated with metal-rich particles from a freshwater reservoir. *FEMS Microbiol. Ecol.* **42**:431-440.

**Stein, L. Y., M. T. La Duc, T. J. Grundl und K. H. Neelson.** 2001. Bacterial and archaeal populations associated with freshwater ferromanganous micronodules and sediments. *Environ. Microbiol.* **3**:10-8.

**Strohm, M., L. Jouanin, K. J. Kunert, C. Pruvost, A. Polle, C. H. Foyer und H. Rennenberg.** 1995. Regulation of glutathione synthesis in leaves of transgenic poplar (*Populus tremula* x *P. alba*) overexpressing glutathione synthetase. *The Plant Journal* **7**:141-145.

**Takai, K., D. P. Moser, M. DeFlaun, T. C. Onstott und J. K. Fredrickson.** 2001. Archaeal diversity in waters from deep South African gold mines. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:5750-5760.

**Takai, K. und K. Horikoshi.** 1999. Genetic diversity of archaea in deep-sea hydrothermal vent environments. *Genetics* **152**:1285-1297.

**Tamura, K. und M. Nei.** 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* **10**:512-26.

**Ter Braak, C. J. F. und P. Smilauer.** 1998. Canoco Reference Manual and User's Guide to Canoco for Windows: Software for Canonical Community Ordination (Version 4). Ithaca, N.Y.

**Thauer, R. K.** 1998. Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. *Microbiol.* **144**:2377-2406.

**Topp, E., W. M. Mulbry, H. Zhu, S. M. Nour und D. Cuppels.** 2000. Characterization of S-triazine herbicide metabolism by a *Nocardioides* sp. isolated from agricultural soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:3134-3141.

**Ueda, T., Y. Suga und T. Matsuguchi.** 1995. Molecular Phylogenetic Analysis of a Soil Microbial Community in a Soybean Field. *European J. Soil Science* **46**:415-421.

**Uetanabaro, A. P., C. Wahrenburg, W. Hunger, R. Pukall, C. Sproer, E. Stackebrandt, V. P. de Canhos, D. Claus und D. Fritze.** 2003. *Paenibacillus agarixedens* sp. nov., nom. rev., and *Paenibacillus agaridevorans* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**:1051-1057.

**Valinsky, L., G. Della Vedova, A. J. Scupham, S. Alvey, A. Figueroa, B. Yin, R. J. Hartin, M. Chrobak, D. E. Crowley, T. Jiang und J. Borneman.** 2002. Analysis of bacterial community composition by oligonucleotide fingerprinting of rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:3243-3250.

**Van Aken, B., C. M. Peres, S. L. Doty, J. M. Yoon und J. L. Schnoor.** 2004. *Methylobacterium populi* sp. nov., a novel aerobic, pink-pigmented, facultatively methylotrophic, methane-utilizing bacterium isolated from poplar trees (*Populus deltoides* x *nigra* DN34). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**:1191-1196.

**van Berkum, P., D. Beyene, G. Bao, T. A. Campbell und B. D. Eardly.** 1998. *Rhizobium mongolense* sp. nov. is one of three rhizobial genotypes identified which nodulate and form nitrogen-fixing symbioses with *Medicago ruthenica* [(L.) Ledebour]. Int. J. Syst. Bacteriol. **48 Pt 1**:13-22.

**Vartapetian, B. B. und M. B. Jackson.** 1997. Plant adaptations to anaerobic stress. Annals of Botany **79**:3-20.

**von der Weid, I., G. F. Duarte, J. D. van Elsas und L. Seldin.** 2002. *Paenibacillus brasilensis* sp. nov., a novel nitrogen-fixing species isolated from the maize rhizosphere in Brazil. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **52**:2147-2153.

**von Wintzingerode, F., U. B. Göbel und E. Stackebrandt.** 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. FEMS Microbiol. Rev. **21**:213-229.

**Wachinger, G., S. Fiedler, K. Zepp, A. Gattinger, M. Sommer und K. Roth.** 2000. Variability of soil methane production on the micro-scale: spatial association with hot spots of organic material and Archaeal populations. Soil Biol Biochem. **32**:1121-1130.

**Wang, J., C. Jenkins, R. I. Webb und J. A. Fuerst.** 2002. Isolation of *Gemmata*-like and *Isosphaera*-like planctomycete bacteria from soil and freshwater. Appl. Environ. Microbiol. **68**:417-22.

**Ward, D. M., R. Weller und M. Bateson.** 1990. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. Nature **345**:63-65.

**Waschütza, S., N. Hofmann, E.-G. Niemann und I. Fendrik.** 1992. Investigations on Root Exudates of Korean Rice. Symbiosis **13**:181-189.

**Watanabe, K., M. Teramoto und S. Harayama.** 1999. An outbreak of nonflocculating catabolic populations caused the breakdown of a phenol-digesting activated-sludge process. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:2813-2819.

**Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier und D. J. Lane.** 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* **173**:697-703.

**Wen, A., M. Fegan, C. Hayward, S. Chakraborty und L. I. Sly.** 1999. Phylogenetic relationships among members of the *Comamonadaceae*, and description of *Delftia acidovorans* (den Dooren de Jong 1926 and Tamaoka *et al.* 1987) gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**:567-576.

**Whipps, J. M.** 1990. Carbon Economy, S. 59-98. *In* J. M. Lynch (Hrsg.), *The Rhizosphere*. Wiley & Sons Ltd., Chicester, England.

**Wieland, G., R. Neumann und H. Backhaus.** 2001. Variation of microbial communities in soil, rhizosphere, and rhizoplane in response to crop species, soil type, and crop development. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:5849-5854.

**Willems, A., J. De Ley, M. Gillis und K. Kersters.** 1991. *Comamonadaceae*, a new family encompassing the Acidovorans rRNA complex, including *Variovorax paradoxus* gen. nov., comb. nov., for *Alcaligenes paradoxus* (Davis 1969). *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**:445-450.

**Williams, M. M., J. W. Domingo, M. C. Meckes, C. A. Kelty und H. S. Rochon.** 2004. Phylogenetic diversity of drinking water bacteria in a distribution system simulator. *J. Appl. Microbiol.* **96**:954-964.

**Woese, C. R., O. Kandler und M. L. Wheelis.** 1990a. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:4576-4579.

**Woese, C. R., D. Yang, L. Mandelco und K. O. Stetter.** 1990b. The *Flexibacter-Flavobacter* Connection. *Syst Appl Microbiol* **13**:161-165.

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

**Yao, H. und R. Conrad.** 1999. Thermodynamics of methane production in different rice paddy soils from China, the Philippines and Italy. *Soil Biol. Biochem.* **31**:463-473.

**Yao, H., R. Conrad, R. Wassmann und H. U. Neue.** 1999. Effect of soil characteristics on sequential reduction and methane production in sixteen rice paddy soils from China, the Philippines, and Italy. *Biogeochem.* **47**:269-295.

**Yoon, J. H., K. C. Lee, N. Weiss, Y. H. Kho, K. H. Kang und Y. H. Park.** 2001. *Sporosarcina aquimarina* sp. nov., a bacterium isolated from seawater in Korea, and transfer of *Bacillus globisporus* (Larkin and Stokes 1967), *Bacillus psychrophilus* (Nakamura 1984) and *Bacillus pasteurii* (Chester 1898) to the genus *Sporosarcina* as *Sporosarcina globispora* comb. nov., *Sporosarcina psychrophila* comb. nov. and *Sporosarcina pasteurii* comb. nov., and emended description of the genus *Sporosarcina*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**:1079-86.

**Zehnder, A. J. B. und W. Stumm.** 1988. Geochemistry and biogeochemistry of anaerobic habitats. In A. J. B. Zehnder (Hrsg.), *Biology of anaerobic microorganisms*. Wiley, New York, U.S.A.

**Zengler, K., G. Toledo, M. Rappe, J. Elkins, E. J. Mathur, J. M. Short und M. Keller.** 2002. Cultivating the uncultured. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **99**:15681-15686.

**Zhang, H., Y. Sekiguchi, S. Hanada, P. Hugenholtz, H. Kim, Y. Kamagata und K. Nakamura.** 2003a. *Gemmatimonas aurantiaca* gen. nov., sp. nov., a gram-negative, aerobic, polyphosphate-accumulating micro-organism, the first cultured representative of the new bacterial phylum *Gemmatimonadetes* phyl. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**:1155-63.

**Zhang, Q., W. J. Li, X. L. Cui, M. G. Li, L. H. Xu und C. L. Jiang.** 2003b. *Streptomyces yunnanensis* sp. nov., a mesophile from soils in Yunnan, China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**:217-21.

**Zhou, J. Z., B. C. Xia, H. S. Huang, D. S. Treves, L. J. Hauser, R. J. Mural, A. V. Palumbo und J. M. Tiedje.** 2003. Bacterial phylogenetic diversity and a novel candidate division of two humid region, sandy surface soils. *Soil Biol. Biochem.* **35**:915-924.

**Zhou, J., B. Xia, D. S. Treves, L.-Y. Wu, T. L. Marsh, R. V. O'Neill, A. V. Palumbo und J. M. Tiedje.** 2002. Spatial and Resource Factors Influencing High Microbial Diversity in Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:326-334.

**Zhou, J. Z., M. A. Bruns und J. M. Tiedje.** 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:316-322.

**Zwart, G., B. C. Crump, M. P. K. V. Agterveld, F. Hagen und S. K. Han.** 2002. Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers. *Aquatic Microb. Ecol.* **28**:141-155.

**Anhang A**

**Tabelle Anhang A:** Zuordnung terminaler Restriktionsfragmente (T-RFs) nach Restriktion mit *HhaI* zu 16S rRNA-Klonsequenzen von Pappelmikrokosmen und deren phylogenetische Einordnung innerhalb der *Bacteria* mittels „Blast Search“. BS („bulk soil“), RH (Rhizosphäre), RP (Rhizoplane), U (ungeflutet), F (geflutet). T-RFs mit Abweichungen von  $\pm 1-2$  bp wurden jeweils als ein T-RF zusammengefasst.

Klon-bezeichnung	ACC	T-RF	nächster Verwandter	EMBL-Bez. <sup>a</sup>	Ähnlichkeit	Referenz
25 BSU 20 28 RHF 15	AJ863208 AJ863368	36	uncultured soil bacterium clone S085, <i>Chloroflexi</i>	AF507693	0,85	(Dunbar et al., 2002)
20 BSU 5 20 BSU 24 25 BSU 46 21 BSF 48	AJ863183 AJ863184 AJ863185 AJ863234	36	uncultured bacterium # 0649-1G9, <i>Actinobacteria</i> , Klon aus Boden	AF234119	0,92 0,94 0,93 0,93	(Holmes et al., 2000)
21 BSF 62	AJ863251	36	<i>Nitrospira marina</i> 16S rRNA gene	NMA16RRNA	0,97	(Ehrich et al., 1995)
26 BSF 9	AJ863235	36	Agricultural soil bacterium clone SC-I- 92, <i>Actinobacteria</i>	ASO252667	0,92	
26 BSF 20	AJ863286	60	uncultured bacterium clone G13, <i>Deltaproteobacteria</i>	AF407700	0,89	
26 BSF 37	AJ863287	60	Agricultural soil bacterium clone SC-I- 17, <i>Deltaproteobacteria</i> , Kartoffelpflanze	ASO252620	0,88	
25 BSU 43	AJ863218	60	uncultured bacterium clone 8F541, <i>Alphaproteobacteria</i>	AY387351	0,97	
25 BSU 51	AJ863219	60	<i>Rhodoplanes elegans</i> 16S rRNA gene, <i>Alphaproteobacteria</i>	RE16SRD1	0,96	(Hiraishi und Ueda, 1994)
21 BSF 21 21 BSF 23	AJ863241 AJ863242	60	uncultured soil bacterium clone 546-2, <i>Verrucomicrobia</i>	AY326525	0,93	
21 BSF 45	AJ863265	60	uncultured Green Bay ferromanganous micronodule bacterium MNF4, <i>Alphaproteobacteria</i>	AF292996	0,95	(Stein et al., 2001)
26 BSF 1 26 BSF 24	AJ863266 AJ863267	60	uncultured gold mine bacterium D35, <i>Alphaproteobacteria</i>	AF337888	0,97	
26 BSF 46	AJ863288	60	<i>Corallococcus</i> <i>coralloides</i> , strain Cc9736, <i>Deltaproteobacteria</i>	AY072739	0,93	

Anhang A

Klon-bezeichnung	ACC	T-RF	nächster Verwandter	EMBL-Bez. <sup>a</sup>	Ähnlichkeit	Referenz
4 RHU 40	AJ863320	60	<i>Afipia felis</i> , partial sequence, <i>Alphaproteobacteria</i>	AF288310	0,99	(La Scola et al., 2000)
27 RHU 19	AJ863321	60	uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone SHA-91, <i>Alphaproteobacteria</i>	UBA306769	0,99	
17 RHF 28	AJ863369	60	uncultured bacterium clone GIF7, <i>Alphaproteobacteria</i>	AF407198	0,96	(Alfreider et al., 2002)
25 BSU 19	AJ863223	60	Bacterium Ellin6095, <i>Betaproteobacteria</i>	AY234747	0,95	(Joseph et al., 2003)
17 RHF 29	AJ863378	66	<i>Herbaspirillum</i> sp. PIV-34-1, <i>Betaproteobacteria</i>	HSP505863	0,96	(Probian et al., 2003)
25 BSU 13	AJ863224	66	uncultured beta proteobacterium clone i51, <i>Betaproteobacteria</i>	AF529336	0,96	
21 BSF 2	AJ863278	66	uncultured bacterium clone EACUL1A4, <i>Gammaproteobacteria</i>	AY186075	0,96	(Northup et al., 2003)
21 BSF 12	AJ863279					
26 BSF 48	AJ863253	66	uncultured bacterium clone HP1B19, <i>Bacteroidetes</i>	AF502210	0,96	(McMahon et al., 2002)
16 RHU 6	AJ863337	66	uncultured bacterium clone KD8-97, <i>Gammaproteobacteria</i>	AY218698	0,92	
28 RHF 41	AJ863379	66	uncultured proteobacterium OCS7, <i>Betaproteobacteria</i>	AF001645	0,99	
23 RPF 5	AJ863419	66	Phenanthrene-degrading bacterium 70-2, <i>Betaproteobacteria</i>	AY177375	0,97	(Bodour et al., 2003)
28 RHF 50	AJ863341	72	<i>Bacillus senegalensis</i>	AF519468	0,98	
28 RHF 51	AJ863342		strain RS8			
28 RHF 26	AJ863380	78	<i>Hydrogenophaga intermedia</i> , <i>Betaproteobacteria</i>	AF019037	0,99	(Feigel und Knackmuss, 1993)
26 BSF 36	AJ863250	81	<i>Isosphaera</i> -like strain C2-3, <i>Planctomycetes</i>	AF239692	0,95	(Wang et al., 2002)
20 BSU 34	AJ863220	81	uncultured bacterium clone MeCl62, <i>Alphaproteobacteria</i>	AY439192	0,98	(Miller et al., 2004)
21 BSF 10	AJ863268					
21 BSF 28	AJ863280	81	<i>Pseudomonas</i> sp. DSM12877, <i>Gammaproteobacteria</i>	AF184918	0,98	

Anhang A

Klon- bezeichnung	ACC	T-RF	nächster Verwandter	EMBL-Bez. <sup>a</sup>	Ähnlichkeit	Referenz
26 BSF 7	AJ863269	81	Rhizosphere soil bacterium clone RSI- 21, <i>Alphaproteobacteria</i>	RSO252588	0,97	
4 RHU 25	AJ863322	81	<i>Sphingomonas</i> sp. JSS- 54, <i>Alphaproteobacteria</i>	AF131297	0,99	(Lee et al., 2001)
27 RHU 17	AJ863323	81	<i>Sphingobium</i> <i>yanoikuyae</i> , <i>Alphaproteobacteria</i>	AY047219	0,99	
27 RHU 41	AJ863324	81	uncultured bacterium clone 255ds10, <i>Alphaproteobacteria</i>	AY212704	0,98	(Simpson et al., 2004)
17 RHF 10	AJ863370	81	<i>Alphaproteobacterium</i> F0812	AF235995	0,96	
28 RHF 43	AJ863371	81	uncultured bacterium HOCiCi68, <i>Alphaproteobacteria</i>	AY328617	1,00	(Williams et al., 2004)
25 BSU 47	AJ863227	81	uncultured earthworm intestine bacterium clone lw62, <i>Deltaproteobacteria</i>	AY154557	0,99	(Singleton et al., 2003)
26 BSF 39	AJ863270	92	Alpha proteobacterium Shinshu-th1	AB121772	0,98	
26 BSF 21	AJ863289	92	Agricultural soil bacterium clone SC-I- 17, <i>Deltaproteobacteria</i> , Kartoffelpflanze	ASO252620	0,98	
25 BSU 36	AJ863207	92	uncultured <i>Cytophagales</i> bacterium, clone FBP292	AY250875	0,93	(De la Torre et al., 2003)
20 BSU 33	AJ863209	92	uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, isolate P2CN14, <i>Chlorobi</i>	UBA504563	0,95	
25 BSU 38	AJ863204	99	Agricultural soil	ASO252611	0,97	
21 BSF 13	AJ863243		bacterium clone SC-I-7,		0,98	
26 BSF 30	AJ863247		<i>Verrucomicrobia</i> ,		0,92	
26 BSF 34	AJ863248		Kartoffelpflanze		0,98	
21 BSF 33	AJ863244	99	uncultured	UVE575731	0,89	(Burkert et al., 2003)
21 BSF 50	AJ863245		<i>Verrucomicrobia</i> bacterium, clone NE06			
26 BSF 6	AJ863246	99	uncultured <i>Verrucomicrobia</i> bacterium YNPRH34A	AF465651	0,92	(Norris et al., 2002)

Anhang A

Klon-bezeichnung	ACC	T-RF	nächster Verwandter	EMBL-Bez. <sup>a</sup>	Ähnlichkeit	Referenz
21 BSF 46	AJ863271	108	uncultured soil bacterium clone 128-1, <i>Alphaproteobacteria</i>	AY326603	0,97	
23 RPF 33	AJ863420	118	<i>Comamonadaceae</i> bacterium PIV-16-1, <i>Betaproteobacteria</i>	CSP505860	0,99	(Probian et al., 2003)
27 RHU 39	AJ863313	144	uncultured hydrocarbon seep bacterium BPC090, <i>Actinobacteria</i>	AF154098	0,99	
27 RHU 11	AJ863312	144	<i>Microbacterium</i> sp. AS-44, <i>Actinobacteria</i>	MSP391205	0,99	
5 RHF 39	AJ863358	144	<i>Microbacterium</i> sp. S10, <i>Actinobacteria</i>	AF260714	0,99	
21 BSF 7	AJ863257	154	Bacterial species 16S rRNA gene, clone RB24, <i>Acidobacteria</i>	BSPZ95717	0,94	(Ludwig et al., 1997)
21 BSF 36	AJ863258	154	uncultured soil bacterium clone 576-2, <i>Acidobacteria</i>	AF423279	0,97	(Valinsky et al., 2002)
27 RHU 33	AJ863325	159	<i>Afipia</i> genosp. 6, <i>Alphaproteobacteria</i>	U87772	0,98	
20 BSU 14	AJ863186	173	uncultured soil bacterium clone 480-2, <i>Actinobacteria</i>	AF423269	0,92	(Valinsky et al., 2002)
28 RHF 11	AJ863417	177	<i>Thermomonas haemolytica</i> isolate S5, <i>Gammaproteobacteria</i>	AF508108	0,99	
4 RHU 28	AJ863338	177	unidentified bacterium	AB021333	0,98	(Watanabe et al., 1999)
5 RHF 38	AJ863415		DNA for 16S rRNA, strain rJ15,		0,98	
17 RHF 39	AJ863416		<i>Gammaproteobacteria</i>		0,97	
28 RHF 46	AJ863418				0,97	
23 RPF 42	AJ863421	177	<i>Dechloromonas</i> sp. SIUL, strain ED1, <i>Betaproteobacteria</i>	DSP318917	0,94	(Ihssen et al., 2003)
25 BSU 29	AJ863187	184	uncultured bacterium clone MB-A2-108, <i>Actinobacteria</i>	AY093463	0,89	(Reed et al., 2002)
25 BSU 50	AJ863188				0,89	
26 BSF 29	AJ863236				0,88	
20 BSU 56	AJ863205	192	uncultured sludge bacterium A21, <i>Verrucomicrobia</i>	AF234742	0,95	(Juretschko et al., 2002)
4 RHU 38	AJ863291	206	<i>Paenibacillus agarexedens</i> , strain DSM 1327	PAG345020	0,94	(Uetanabaro et al., 2003)
27 RHU 34	AJ863292	206	<i>Paenibacillus</i> sp. DSM 1481	PSP345024	0,92	(Uetanabaro et al., 2003)

## Anhang A

Klon- bezeichnung	ACC	T-RF	nächster Verwandter	EMBL-Bez. <sup>a</sup>	Ähnlichkeit	Referenz
5 RHF 31	AJ863381	206	<i>Comamonadaceae</i>	CSP505860	0,97	(Probian et al., 2003)
5 RHF 32	AJ863382		bacterium PIV-16-1,		0,99	
5 RHF 41	AJ863384		<i>Betaproteobacteria</i>		0,99	
5 RHF 42	AJ863385				0,99	
17 RHF 3	AJ863387				0,99	
17 RHF 4	AJ863388				0,99	
17 RHF 6	AJ863389				0,99	
17 RHF 11	AJ863390				0,99	
17 RHF 12	AJ863391				0,99	
17 RHF 18	AJ863392				0,99	
17 RHF 25	AJ863393				0,99	
17 RHF 27	AJ863394				0,99	
17 RHF 32	AJ863395				0,99	
17 RHF 33	AJ863396				0,99	
17 RHF 37	AJ863397				1,00	
17 RHF 40	AJ863398				0,99	
17 RHF 41	AJ863399				0,99	
23 RPF 1	AJ863422				0,98	
23 RPF 6	AJ863423				0,99	
23 RPF 7	AJ863424				0,99	
23 RPF 8	AJ863425				0,99	
23 RPF 11	AJ863426				0,99	
23 RPF 13	AJ863427				0,99	
23 RPF 18	AJ863428				0,99	
23 RPF 19	AJ863429				0,98	
23 RPF 68	AJ863451				0,99	

Anhang A

Klon- bezeichnung	ACC	T-RF	nächster Verwandter	EMBL-Bez. <sup>a</sup>	Ähnlichkeit	Referenz
28 RHF 7	AJ863400	206	<i>Comamonadaceae</i>	CSP505862	0,99	(Probian et al., 2003)
28 RHF 10	AJ863401		bacterium PIV-20-1,		0,99	
28 RHF 14	AJ863402		<i>Betaproteobacteria</i>		0,99	
28 RHF 20	AJ863403				0,99	
28 RHF 27	AJ863404				1,00	
28 RHF 30	AJ863405				0,95	
28 RHF 35	AJ863406				0,99	
28 RHF 36	AJ863407				0,99	
28 RHF 37	AJ863408				0,99	
28 RHF 38	AJ863409				0,99	
28 RHF 40	AJ863410				0,99	
28 RHF 42	AJ863411				0,99	
28 RHF 47	AJ863412				0,99	
28 RHF 52	AJ863413				0,99	
23 RPF 20	AJ863430				1,00	
23 RPF 21	AJ863431				0,99	
23 RPF 23	AJ863433				0,99	
23 RPF 25	AJ863434				1,00	
23 RPF 29	AJ863435				0,99	
23 RPF 32	AJ863437				0,99	
23 RPF 34	AJ863438				0,99	
23 RPF 43	AJ863441				0,99	
23 RPF 54	AJ863442				0,99	
23 RPF 55	AJ863443				0,99	
23 RPF 56	AJ863444				0,99	
23 RPF 57	AJ863445				0,99	
23 RPF 59	AJ863446				0,99	
23 RPF 60	AJ863447				0,99	
23 RPF 61	AJ863448				0,99	
23 RPF 70	AJ863452				0,99	
23 RPF 72	AJ863453				0,99	
23 RPF 64	AJ863449	206	Perchlorate-reducing bacterium CR, <i>Betaproteobacteria</i>	AY530552	0,94	
20 BSU 42	AJ863226	206	<i>Pseudomonas veronii</i>	AF064460	0,99	(Elomari et al., 1996)
21 BSF 1	AJ863281		16S rRNA gene,			
21 BSF 22	AJ863282		<i>Gammaproteobacteria</i>			
5 RHF 34	AJ863383	206	MTBE-degrading bacterium PM1, <i>Betaproteobacteria</i>	AF176594	0,99	(Bruns et al., 2001)
5 RHF 43	AJ863386	206	<i>Azoarcus</i> sp., strain PbN1, <i>Betaproteobacteria</i>	PBPBN116S	0,99	(Rabus und Widdel, 1995)
23 RPF 22	AJ863432	206	uncultured <i>Betaproteobacterium</i> SBRH147	AF204246	0,96	(Crocetti et al., 2000)
23 RPF 30	AJ863436	206	Perchlorate-reducing bacterium CR,	AY530552	0,97	
23 RPF 66	AJ863450		<i>Betaproteobacteria</i>			

Anhang A

Klon- bezeichnung	ACC	T-RF	nächster Verwandter	EMBL-Bez. <sup>a</sup>	Ähnlichkeit	Referenz
23 RPF 37	AJ863439	206	uncultured bacterium clone 120ds10, <i>Betaproteobacteria</i>	AY212571	0,98	(Simpson et al., 2004)
23 RPF 39	AJ863440	206	<i>Dechloromonas</i> sp. PC1, <i>Betaproteobacteria</i>	AY126452	0,96	
25 BSU 23 26 BSF 32	AJ863225 AJ863276	206	Agricultural soil bacterium clone SC-I-45, <i>Betaproteobacteria</i> , Kartoffelpflanze	ASO252636	0,93	
26 BSF 12	AJ863283	206	uncultured clone PLTA13, <i>Gammaproteobacteria</i>	AY193176	0,96	
27 RHU 21	AJ863333	206	<i>Burkholderia unamae</i> strain SCCu-23, <i>Betaproteobacteria</i>	AY221957	0,99	
26 BSF 49	AJ863284	212	unidentified bacterium, strain rJ15, <i>Gammaproteobacteria</i>	AB021333	0,94	(Watanabe et al., 1999)
27 RHU 14	AJ863339	212	<i>Rhodanobacter</i> sp. BPC1, <i>Gammaproteobacteria</i>	AF494542	0,97	(Kanaly et al., 2002)
25 BSU 8 26 BSF 33	AJ863206 AJ863249	215	Agricultural soil bacterium clone SC-I-7, <i>Verrucomicrobia</i> , Kartoffelpflanze	ASO252611	0,97 0,96	
27 RHU 15	AJ863340	220	<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pascullei</i> , <i>Gammaproteobacteria</i>	AF122885	0,91	(Lo Presti et al., 2001)
20 BSU 25 25 BSU 22 25 BSU 40	AJ863211 AJ863214 AJ863215	220	Bacterial species 16S rRNA gene (clone kb2426), <i>Acidobacteria</i>	BSPZ95732	0,94	(Ludwig et al., 1997)
20 BSU 45	AJ863212	220	uncultured soil bacterium clone 21, <i>Acidobacteria</i>	AY493930	0,96	
21 BSF 32	AJ863259	220	uncultured soil bacterium clone 529, <i>Acidobacteria</i>	AY493931	0,96	
20 BSU 7	AJ863210	220	Bacterial species 16S rRNA gene, clone ii3-12, <i>Acidobacteria</i>	BSPZ95724	0,95	(Ludwig et al., 1997)
26 BSF 5 26 BSF 25	AJ863260 AJ863261	220	Bacterial species 16S rRNA gene, clone ii3-15, <i>Acidobacteria</i>	BSPZ95725	0,96 0,98	(Ludwig et al., 1997)
26 BSF 52	AJ863263	220	Bacterial species 16S rRNA gene, clone ii3-7, <i>Acidobacteria</i>	BSPZ95727	0,94	(Ludwig et al., 1997)

Anhang A

Klon- bezeichnung	ACC	T-RF	nächster Verwandter	EMBL-Bez. <sup>a</sup>	Ähnlichkeit	Referenz
25 BSU 5	AJ863213	220	uncultured soil bacterium clone 284, <i>Acidobacteria</i>	AY493929	0,93	
26 BSF 28	AJ863262	220	uncultured <i>Holophaga</i> sp., clone JG37-AG- 145, <i>Acidobacteria</i>	UBA519392	0,97	
27 RHU 37	AJ863319	220	uncultured bacterium clone 137ds10, <i>Acidobacteria</i>	AY212587	0,96	(Simpson et al., 2004)
28 RHF 5	AJ863359	220	Bacterium Ellin6048, <i>Actinobacteria</i>	AY234700	0,90	(Joseph et al., 2003)
16 RHU 14 27 RHU 24	AJ863326 AJ863327	226	<i>Alphaproteobacterium</i> LMG 20591	AY040361	0,94	
27 RHU 1	AJ863293	226	<i>Paenibacillus</i> <i>chondroitinus</i>	PCD064	0,97	(Shida et al., 1997)
27 RHU 38	AJ863317	233	uncultured <i>Bacteroidetes</i> bacterium, clone MTAG12	AJ619071	0,92	
21 BSF 63	AJ863229	233	<i>Paenibacillus</i> <i>alginolyticus</i>	AB073362	0,97	
13 RHU 2 27 RHU 25 28 RHF 16	AJ863294 AJ863295	233	<i>Paenibacillus</i> sp. DSM 1482	PSP345019	0,96 0,97 0,97	(Uetanabaro et al., 2003)
5 RHF 36 17 RHF 17	AJ863343	233	<i>Paenibacillus</i> sp. DS-1	AB042938	0,94 0,93	(Dasman et al., 2002)
27 RHU 45	AJ863296	233	<i>Paenibacillus validus</i> strain PR-P9	AF353697	0,89	(Daane et al., 2001)
20 BSU 39	AJ863189	238	unidentified bacterium clone W4-B35, <i>Actinobacteria</i>	AY345497	0,90	
27 RHU 26 27 RHU 28 27 RHU 35 27 RHU 43	AJ863299 AJ863300 AJ863302 AJ863304	238	<i>Bacillus circulans</i>	AY043084	0,98 0,97 0,97 0,98	
21 BSF 51	AJ863231	238	uncultured bacterium DA032, <i>Bacillales</i>	BSY07574	0,97	(Felske et al., 1998)
20 BSU 58	AJ863174	238	Bacterium str. 47083 16S rRNA gene, partial sequence, <i>Bacillus</i> sp.	AF227837	0,98	(Drancourt et al., 2000)
25 BSU 10 26 BSF 26	AJ863175 AJ863232	238	<i>Bacillus</i> sp. 19498	BSP315066	0,99	(Heyrman und Swings, 2001)
21 BSF 31	AJ863230	238	<i>Bacillus</i> sp. 19489	BSP315057	0,99	(Heyrman und Swings, 2001)

Anhang A

Klon- bezeichnung	ACC	T-RF	nächster Verwandter	EMBL-Bez. <sup>a</sup>	Ähnlichkeit	Referenz
26 BSF 35	AJ863233	238	unidentified eubacterium from anoxic bulk soil, clone BSV06, <i>Bacillales</i>	UEA229180	0,98	(Hengstmann et al., 1999)
27 RHU 16 28 RHF 23	AJ863297 AJ863351	238	<i>Bacillus senegalensis</i> strain RS6	AF519466	0,98	
27 RHU 23 28 RHF 33	AJ863298 AJ863352	238	<i>Bacillus soli</i> , strain LMG 21838	BSO542513	0,98	(Heyrman et al., 2004)
27 RHU 30	AJ863301	238	<i>Bacillus niacini</i>	AB021194	0,98	(Goto et al., 2000)
27 RHU 40 5 RHF 45 17 RHF 1 17 RHF 22	AJ863303 AJ863346 AJ863347 AJ863348	238	<i>Bacillus senegalensis</i> strain RS8	AF519468	0,98	
17 RHF 34	AJ863349	238	<i>Bacillus</i> sp. LMG 20241	BSP316313	0,97	
17 RHF 44	AJ863350	238	<i>Bacillus benzoovorans</i>	AY043085	0,97	
25 BSU 30	AJ863176	243	uncultured firmicute partial 16S rRNA gene, clone Gitt-GS-134	UFI582201	0,98	
28 RHF 6	AJ863353	243	<i>Paenibacillus kobensis</i>	PKD471	0,97	(Shida et al., 1997)
17 RHF 23	AJ863366	294	<i>Flexibacter</i> cf. <i>sancti</i> , <i>Bacteroidetes</i>	AF181568	0,91	(Laramée et al., 2000)
26 BSF 41	AJ863272	331	<i>Brevundimonas subvibrioides</i> , strain CB81, <i>Alphaproteobacteria</i>	BSJ227784	0,94	(Abraham et al., 1999)
16 RHU 21	AJ863328	331	<i>Caulobacter fusiformis</i> , strain ATCC 15257(T), <i>Alphaproteobacteria</i>	CFJ227759	0,94	(Abraham et al., 1999)
27 RHU 52	AJ863329	331	<i>Afipia</i> genosp. 14, <i>Alphaproteobacteria</i>	U87785	0,99	
27 RHU 47	AJ863330	340	<i>Hirschia baltica</i> , strain DSM 5838T, <i>Alphaproteobacteria</i>	HBA421782	0,90	
27 RHU 48	AJ863331	340	<i>Rhizobium mongolense</i> , <i>Alphaproteobacteria</i>	RMU89822	0,96	(van Berkum et al., 1998)
17 RHF 20	AJ863372	340	<i>Zoogloea ramigera</i> , (ATCC 19623), <i>Alphaproteobacteria</i>	ZR16SRRNC	0,99	(Rossello-Mora et al., 1993)
17 RHF 35	AJ863373	340	<i>Rhizobium</i> sp. CA8561, <i>Alphaproteobacteria</i>	AY056831	0,96	
28 RHF 13	AJ863374	340	Alpha proteobacterium PI_GH2.1.D7	AY162048	0,96	(Zengler et al., 2002)

Anhang A

Klon- bezeichnung	ACC	T-RF	nächster Verwandter	EMBL-Bez. <sup>a</sup>	Ähnlichkeit	Referenz
28 RHF 24 28 RHF 39	AJ863375 AJ863376	340	<i>Rhizobium etli</i> , <i>Alphaproteobacteria</i>	AY460185	0,99	
26 BSF 22	AJ863273	340	<i>Hyphomicrobium zavarzinii</i> , strain ZV-622, <i>Alphaproteobacteria</i>	HZRNA16S	0,98	(Rainey et al., 1998)
26 BSF 18	AJ863274	352	uncultured bacterium clone LO13.3, <i>Alphaproteobacteria</i>	AF358017	0,99	(Morris et al., 2002)
27 RHU 5	AJ863318	352	<i>Gemmatimonas aurantiaca</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, <i>Gemmatimonadetes</i>	AB072735	0,90	(Zhang et al., 2003a)
17 RHF 8	AJ863357	360	unidentified eubacterium from anoxic bulk soil, clone BSV72, <i>Firmicutes</i>	UEA229216	0,96	(Hengstmann et al., 1999)
20 BSU 18	AJ863190	360	<i>Streptomyces yunnanensis</i> , 16S rRNA gene, partial sequence, Boden, <i>Actinobacteria</i>	AF346818	0,86	(Zhang et al., 2003b)
20 BSU 41	AJ863193	370	Bacterium Ellin5201, <i>Actinobacteria</i>	AY234552	0,93	
25 BSU 24 28 RHF 17	AJ863195 AJ863360	370	uncultured bacterium clone C-F-15, <i>Actinobacteria</i>	AF443586	0,94 0,93	(Rutz und Kieft, 2004)
26 BSF 23	AJ863275	370	uncultured bacterium clone LO13.3, <i>Alphaproteobacteria</i>	AF358017	0,92	(Morris et al., 2002)
5 RHF 33	AJ863414	366	<i>Janthinobacterium agaricidamnorum</i> , <i>Betaproteobacteria</i>	JA16SRRNA	0,98	(Lincoln et al., 1999)
20 BSU 31	AJ863192	370	unidentified bacterium wb1_G04, <i>Actinobacteria</i>	AF317765	0,90	(Holmes et al., 2001)
21 BSF 59	AJ863237	370	uncultured bacterium clone MB-A2-100, <i>Actinobacteria</i>	AY093455	0,93	(Reed et al., 2002)
27 RHU 3	AJ863314	370	<i>Arthrobacter</i> sp., strain:19B, <i>Actinobacteria</i>	AB017649	1,00	
20 BSU 50	AJ863194	370	<i>Agromyces ramosus</i> (DSM 43045), <i>Actinobacteria</i>	AR16SR	0,99	(Rainey et al., 1994)
20 BSU 30	AJ863191	370	<i>Agromyces cerinus</i> (DSM 8595), <i>Actinobacteria</i>	AC16SR	0,99	(Rainey et al., 1994)

## Anhang A

Klon- bezeichnung	ACC	T-RF	nächster Verwandter	EMBL-Bez. <sup>a</sup>	Ähnlichkeit	Referenz
21 BSF 19	AJ863285	370	uncultured <i>Xanthomonas</i> sp. Clone CI-9-TB8-II, <i>Gammaproteobacteria</i>	AY599707	0,97	
21 BSF 20	AJ863290	370	uncultured soil bacterium clone 293-1, <i>Deltaproteobacteria</i>	AY326617	0,94	
21 BSF 5	AJ863252	370	<i>Nitrospira marina</i> 16S rRNA gene	NMA16RRNA	0,88	(Ehrich et al., 1995)
20 BSU 6	AJ863196	376	uncultured bacterium clone HTG5, environmental samples, <i>Actinobacteria</i>	AF418962	0,91	(Stein et al., 2002)
21 BSF 61	AJ863264	382	uncultured soil bacterium clone 529, <i>Acidobacteria</i>	AY493931	0,97	
20 BSU 60	AJ863216	382	uncultured soil bacterium clone 21, <i>Acidobacteria</i>	AY493930	0,96	
28 RHF 49	AJ863362	441	<i>Nocardioides</i> sp. C157, <i>Actinobacteria</i>	AF253509	0,97	(Topp et al., 2000)
28 RHF 32	AJ863361	441	<i>Nocardioides</i> sp. JS614, <i>Actinobacteria</i>	AF498652	0,96	(Coleman et al., 2002)
21 BSF 55	AJ863238	441	<i>Nocardioides</i> sp., <i>Actinobacteria</i>	NSD974	0,97	(Iwabuchi et al., 1998)
16 RHU 11	AJ863305	466	<i>Paenibacillus</i>	PAG345020	0,94	(Uetanabaro et al., 2003)
16 RHU 12	AJ863306		<i>agarexedens</i> , strain			
16 RHU 15	AJ863307		DSM 1327			
27 RHU 2	AJ863308	466	<i>Paenibacillus</i> sp. DSM	PSP345024	0,94	(Uetanabaro et al., 2003)
27 RHU 7	AJ863309		1481			
28 RHF 1	AJ863354					
28 RHF 28	AJ863355					
25 BSU 4	AJ863197	473	<i>Arthrobacter</i> sp. CAB1, <i>Actinobacteria</i>	AB039736	0,99	
25 BSU 17	AJ863198				0,97	
25 BSU 28	AJ863199				0,99	
25 BSU 34	AJ863200				0,99	
27 RHU 20	AJ863310	473	uncultured bacterium clone Y27, <i>Bacillales</i>	AF407677	0,92	
17 RHF 5	AJ863377	510	uncultured alpha proteobacterium , clone BIci23	UAL318111	0,96	(Friedrich et al., 2002)
25 BSU 12	AJ863221	510	<i>Pedomicrobium</i> <i>fusiforme</i> , strain DSM 5304, <i>Alphaproteobacteria</i>	PFRNA16S	0,92	(Rainey et al., 1998)

Anhang A

Klon-bezeichnung	ACC	T-RF	nächster Verwandter	EMBL-Bez. <sup>a</sup>	Ähnlichkeit	Referenz
25 BSU 14	AJ863222	517	<i>Bosea thiooxidans</i> isolate TJ1, <i>Alphaproteobacteria</i>	AF508112	0,93	
20 BSU 17	AJ863177	547	<i>Bacillus aquamarinus</i> , partial sequence	AF202056	0,96	(Yoon et al., 2001)
21 BSF 26	AJ863277	567	uncultured beta proteobacterium clone FTL205, <i>Betaproteobacteria</i>	AF529095	0,98	
4 RHU 31	AJ863334	567	uncultured beta proteobacterium clone	AF529336	0,99	
4 RHU 33	AJ863335		CLi51, <i>Betaproteobacteria</i>			
27 RHU 42	AJ863336					
27 RHU 9	AJ863311	574	<i>Bacillus</i> sp. LMG	BSP316313	0,97	
17 RHF 21	AJ863356		20241		0,98	
20 BSU 19	AJ863178	579	<i>Bacillus psychrodurans</i> , strain DSM 11713	BPS277984	0,96	(Abd El- Rahman et al., 2002)
20 BSU 23	AJ863179				0,96	
20 BSU 27	AJ863180				0,96	
20 BSU 44	AJ863181				0,95	
25 BSU 3	AJ863182				0,95	
20 BSU 10	AJ863217	587	uncultured soil bacterium clone S035, <i>Acidobacteria</i>	AF507710	0,89	(Dunbar et al., 2002)
27 RHU 36	AJ863316	673	<i>Leifsonia poae</i> , <i>Actinobacteria</i>	AF116342	0,98	(Evtushenko et al., 2000)
26 BSF 47	AJ863239	673	uncultured bacterium clone MB-A2-100, <i>Actinobacteria</i>	AY093455	0,93	(Reed et al., 2002)
25 BSU 2	AJ863201	673	unidentified bacterium clone K2-30-12, <i>Actinobacteria</i>	AY344421	0,94	
27 RHU 22	AJ863315	673	<i>Nocardioides</i> sp. C190, <i>Actinobacteria</i>	AF253510	0,95	(Topp et al., 2000)
28 RHF 3	AJ863363					
28 RHF 25	AJ863364					
28 RHF 29	AJ863365					
25 BSU 41	AJ863202	673	uncultured bacterium clone A20, <i>Actinobacteria</i>	AY373407	0,93	
25 BSU 25	AJ863203	681	<i>Nocardioides</i> sp. JS614, <i>Actinobacteria</i>	AF498652	0,94	(Coleman et al., 2002)
20 BSU 2	AJ863173	740	uncultured bacterium, clone SHA-71	UBA306763	0,96	
21 BSF 64	AJ863228					
4 RHU 22	AJ863332	794	<i>Rhodopseudomonas</i> <i>palustris</i> T, <i>Alphaproteobacteria</i>	AF123087	0,98	

## Anhang A

Klon-bezeichnung	ACC	T-RF	nächster Verwandter	EMBL-Bez. <sup>a</sup>	Ähnlichkeit	Referenz
21 BSF 11	AJ863254	851	uncultured soil	AF497759	0,93	
21 BSF 16	AJ863255		bacterium clone 1506-2, <i>Bacteroidetes</i>			
26 BSF 3	AJ863240	1079	uncultured soil bacterium clone S017, <i>Actinobacteria</i>	AF507698	0,88	(Dunbar et al., 2002)
28 RHF 48	AJ863367	1094	<i>Flavobacterium ferrugineum</i> , <i>Bacteroidetes</i>	FFRRDD	0,93	(Woese et al., 1990b)
21 BSF 3	AJ863256	1097	uncultured soil bacterium clone 1417, <i>Bacteroidetes</i>	AY493956	0,94	

<sup>a</sup>EMBL-Bezeichnung (EMBL Entry Name)

ACC: „accession number“

**Anhang B**

## Anhang B

**Tabelle Anhang B:** Zuordnung terminaler Restriktionsfragmente (T-RFs) nach Restriktion mit *TaqI* zu 16S rRNA-Klonsequenzen von Pappelmikrokosmen und deren phylogenetische Einordnung innerhalb der *Archaea* mittels „Blast Search“. BS („bulk soil“), RH (Rhizosphäre), RP (Rhizoplane), U (ungeflutet), F (geflutet). T-RFs mit Abweichungen von  $\pm 1-2$  bp wurden jeweils als ein T-RF zusammengefasst.

Klon-bezeichnung	T-RF	nächster Verwandter	EMBL-Bez. <sup>a</sup>	Ähnlichkeit	Referenz
37 RPU 35	76	uncultured archaeon S15-4, <i>Euryarchaeota</i>	UAR236485	0,90	(Chin et al., 1999a)
38 RPF 33	92	unidentified archaeon clone pMC2A35, <i>Euryarchaeota</i>	AB019753	0,85	(Takai und Horikoshi, 1999)
32 RHF 27	92	uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone HL19, <i>Crenarchaeota</i>	AJ608205	0,97	(Kemnitz et al., 2004)
29 BSU 40 30 BSF 8	92	uncultured archaeon clone 660mArA8, <i>Crenarchaeota</i>	AY367312	0,99	
30 BSF 3	186	uncultured crenarchaeote clone TRC23-31, <i>Crenarchaeota</i>	AF227643	0,98	
29 BSU 12 29 BSU 34 29 BSU 39 31 RHU 23 31 RHU 34	186	uncultured archaeon clone HTA- B6, <i>Crenarchaeota</i>	AF418928	0,99 0,98 0,99 1,00 0,99	(Stein et al., 2002)
29 BSU 10 37 RPU 25	186	uncultured archaeon clone HTA- G6, <i>Crenarchaeota</i>	AF418938	0,99	(Stein et al., 2002)
29 BSU 14 29 BSU 35 29 BSU 38 30 BSF 9 30 BSF 27 31 RHU 9 37 RPU 21	186	uncultured archaeon clone HTA- H8, <i>Crenarchaeota</i>	AF418939	0,99 0,98 0,99 0,99 0,99 0,99 0,99	(Stein et al., 2002)
29 BSU 6 29 BSU 9 29 BSU 26 29 BSU 37 30 BSF 4 30 BSF 36 31 RHU 40 32 RHF 21 35 RPU 7	186	uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone PM4, <i>Crenarchaeota</i>	AJ6081621	0,98 0,98 0,99 0,99 0,99 0,99 0,99 0,98 0,99	(Kemnitz et al., 2004)
30 BSF 14	186	uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone PM34, <i>Crenarchaeota</i>	AJ608180	0,99	(Kemnitz et al., 2004)

Anhang B

Klon- bezeichnung	T-RF	nächster Verwandter	EMBL-Bez. <sup>a</sup>	Ähnlichkeit	Referenz
29 BSU 7	186	uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone HL2, <i>Crenarchaeota</i>	AJ608192	0,99	(Kemnitz et al., 2004)
29 BSU 8					
29 BSU 13					
29 BSU 28					
29 BSU 33					
29 BSU 41					
29 BSU 46					
30 BSF 1					
30 BSF 2					
30 BSF 3					
30 BSF 5					
30 BSF 6					
30 BSF 10					
30 BSF 13					
30 BSF 20					
30 BSF 22					
30 BSF 24					
30 BSF 25					
30 BSF 39					
31 RHU 3					
31 RHU 4					
31 RHU 5					
31 RHU 10					
31 RHU 12					
31 RHU 13					
31 RHU 14					
31 RHU 38					
31 RHU 42					
31 RHU 44					
32 RHF 1					
32 RHF 6					
32 RHF 22					
32 RHF 30					
32 RHF 31					
32 RHF 36					
32 RHF 39					
32 RHF 44					
32 RHF 46					
37 RPU 34					
36 RPF 2					
36 RPF 24					
38 RPF 25					
31 RHU 31	186	uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone HL3, <i>Crenarchaeota</i>	AJ608193	0,98	(Kemnitz et al., 2004)
32 RHF 12					
32 RHF 28					
38 RPF 2					
31 RHU 39	186	uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone HL4, <i>Crenarchaeota</i>	AJ608194	0,98	(Kemnitz et al., 2004)
31 RHU 45					

Anhang B

Klon- bezeichnung	T-RF	nächster Verwandter	EMBL-Bez. <sup>a</sup>	Ähnlichkeit	Referenz
29 BSU 16	186	uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone HL6, <i>Crenarchaeota</i>	AJ608196	0,99	(Kemnitz et al., 2004)
29 BSU 29				0,98	
30 BSF 18				0,98	
30 BSF 37				0,99	
31 RHU 11				0,99	
32 RHF 11				0,99	
38 RPF 3				0,99	
29 BSU 2	186	uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone HL7, <i>Crenarchaeota</i>	AJ608197	1,00	(Kemnitz et al., 2004)
29 BSU 45				0,99	
32 RHF 14				0,99	
32 RHF 19				0,99	
37 RPU 11				0,99	
38 RPF 39				0,96	
29 BSU 19	186	uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone HL8, <i>Crenarchaeota</i>	AJ608198	0,96	(Kemnitz et al., 2004)
29 BSU 21				0,98	
32 RHF 7				0,99	
29 BSU 23	186	uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone HL9, <i>Crenarchaeota</i>	AJ608199	0,99	(Kemnitz et al., 2004)
30 BSF 12				0,99	
30 BSF 41				0,99	
32 RHF 26				1,00	
29 BSU 31	186	uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone HL16, <i>Crenarchaeota</i>	AJ608202	0,99	(Kemnitz et al., 2004)
29 BSU 32				0,99	
29 BSU 43				0,99	
30 BSF 40				0,99	
31 RHU 24				0,99	
31 RHU 35				1,00	
32 RHF 42				0,98	
37 RPU 3				0,99	
29 BSU 15	186	uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone HL17, <i>Crenarchaeota</i>	AJ608203	1,00	(Kemnitz et al., 2004)
30 BSF 28				0,99	
31 RHU 21				0,98	
32 RHF 4				1,00	
32 RHF 34				0,99	
32 RHF 40				0,99	
37 RPU 2				0,98	
37 RPU 7				0,99	
37 RPU 14				0,99	
38 RPF 30				186	
32 RHF 45	186	uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone PILK21, <i>Crenarchaeota</i>	AJ704371		0,98

Anhang B

Klon-bezeichnung	T-RF	nächster Verwandter	EMBL-Bez. <sup>a</sup>	Ähnlichkeit	Referenz
29 BSU 3	186	uncultured crenarchaeote clone 54D9, <i>Crenarchaeota</i>	AY278106	0,99	
29 BSU 24				0,98	
29 BSU 27				0,99	
29 BSU 30				0,99	
29 BSU 44				0,99	
30 BSF 16				0,98	
30 BSF 17				0,99	
30 BSF 32				0,99	
31 RHU 36				0,99	
32 RHF 3				0,99	
29 BSU 1	186	uncultured archaeon clone 660mArC10, <i>Crenarchaeota</i>	AY367315	0,97	
29 BSU 4				0,99	
29 BSU 25				0,99	
29 BSU 42				0,99	
30 BSF 7				0,99	
30 BSF 29				0,99	
32 RHF 5				0,99	
32 RHF 15				0,98	
30 BSF 31	186	uncultured crenarchaeote clone MBS8, <i>Crenarchaeota</i>	AY522890	0,99	(Sliwinski und Goodman, 2004b)
30 BSF 42				0,99	
30 BSF 45				1,00	
32 RHF 43				0,96	
30 BSF 23	186	uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone HLI-42, <i>Crenarchaeota</i>	UAR556371	0,99	
29 BSU 11	186	uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone PMI-20, <i>Crenarchaeota</i>	UAR556393	0,99	
29 BSU 22					
30 BSF 38					
31 RHU 1					
32 RHF 13					
32 RHF 29					
32 RHF 38					
30 BSF 19	186	unidentified archaeon SCA1145, <i>Crenarchaeota</i>	UAU62811	1,00	(Bintrim et al., 1997)
30 BSF 26				0,99	
30 BSF 34	186	unidentified archaeon SCA1154, <i>Crenarchaeota</i>	UAU62814	0,99	(Bintrim et al., 1997)
38 RPF 37				0,98	
30 BSF 21	186	unidentified archaeon SCA1175, <i>Crenarchaeota</i>	UAU62819	0,99	(Bintrim et al., 1997)
31 RHU 25				0,99	
32 RHF 17				0,98	
32 RHF 23				0,99	
38 RPF 29				0,99	
29 BSU 20	186	uncultured crenarchaeote one Gitt-GR-31, <i>Crenarchaeota</i>	UCR535119	0,98	

<sup>a</sup>EMBL-Bezeichnung (EMBL Entry Name)

**Anhang C**

**Tabelle Anhang C:** Zuordnung terminaler Restriktionsfragmente (T-RFs) nach Restriktion mit *TaqI* zu 16S rRNA-Klonsequenzen einer Bodenaufschlammung aus Pappelmikrokosmen („bulk soil“, geflutet, t=90 Tage) und deren phylogenetische Einordnung innerhalb der *Archaea* mittels „Blast Search“. BS („bulk soil“), F (gef lutet). T-RFs mit Abweichungen von  $\pm 1-2$  bp wurden jeweils als ein T-RF zusammengefasst.

Klon-bezeichnung	T-RF	nächster Verwandter	NCBI-Bez. <sup>a</sup>	Ähnlichkeit	Referenz
BSFIII_92	64	Uncultured archaeon clone Dg2003_D_128 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, <i>Euryarchaeota</i> LDS Cluster	AY531712	0,89	(Chan et al., 2005)
BSFIII_53	76	Uncultured archaeon clone Dg2003_D_63 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, <i>Euryarchaeota</i> Rice Cluster V	AY531716	0,89	(Chan et al., 2005)
BSFIII_54	76	uncultured archaeon S15-4 16S ribosomal RNA, <i>Euryarchaeota</i> Rice Cluster V	AJ236485	0,95	(Chin et al., 1999a)
BSFIII_45	83	Uncultured <i>Methanomicrobiales</i> archaeon 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	AY187063	0,98	(Purdy et al., 2003)
BSFIII_52				0,99	
BSFIII_61				0,98	
BSFIII_60	92	Uncultured euryarchaeote clone LDS27 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	AY133915	0,90	(Glissmann et al., 2004)
BSFIII_81	92	Uncultured archaeon WCHD3-30 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, <i>Euryarchaeota</i> LDS Cluster	AF050612	0,93	(Dojka et al., 1998)
BSFIII_76	92	Uncultured euryarchaeote clone P4b-Ar-23 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, <i>Methanobacteriaceae</i>	AF293493	0,94	(Friedrich et al., 2001)
BSFIII_78				0,93	
BSFIII_33	173	Uncultured <i>Thermoplasmatales</i> CRARC-4 16S rRNA gene, DGGE band CRARC-4	AJ306412	0,87	(Casamayor et al., 2001)
BSFIII_1	186	Unidentified archaeon SCA1145 16S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, <i>Crenarchaeota</i>	U62811	1,00	(Bintrim et al., 1997)
BSFIII_3	186	<i>Methanosarcina lacustris</i> strain MS 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	AY260431	0,98	(Simankova et al., 2003)
BSFIII_5	186	Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone HL19, <i>Crenarchaeota</i>	AJ608205	0,99	(Kemnitz et al., 2004)
BSFIII_9	186	Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone HL16, <i>Crenarchaeota</i>	AJ608202	0,99	(Kemnitz et al., 2004)
BSFIII_31					
BSFIII_58					

Anhang C

Klon- bezeichnung	T-RF	nächster Verwandter	NCBI-Bez. <sup>a</sup>	Ähnlichkeit	Referenz
BSFIII_10	186	Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone HL7, <i>Crenarchaeota</i>	AJ608197	0,98	(Kemnitz et al., 2004)
BSFIII_14 BSFIII_68	186	Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone PM4, <i>Crenarchaeota</i>	AJ608162	0,98	(Kemnitz et al., 2004)
BSFIII_21	186	Uncultured <i>Methanobolus</i> sp. clone SB05 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	AY177812	0,94	(Purdy et al., 2003)
BSFIII_34	186	Uncultured <i>Methanosarcina</i> sp. clone X4Ar38 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	AY607263	0,99	(Lueders et al., 2004)
BSFIII_40 BSFIII_57	186	Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone HL2, <i>Crenarchaeota</i>	AJ608192	0,99	(Kemnitz et al., 2004)
BSFIII_47	186	Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone HL4, <i>Crenarchaeota</i>	AJ608194	0,97	(Kemnitz et al., 2004)
BSFIII_48	186	Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone HL17, <i>Crenarchaeota</i>	AJ608203	0,98	(Kemnitz et al., 2004)
BSFIII_55	186	uncultured <i>Methanosarcina</i> sp. clone Soil113B_13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	AY487183	0,98	(Donovan et al., 2004)
BSFIII_56	186	Uncultured <i>Methanosarcina</i> sp. clone X4Ar22 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	AY607247	0,98	(Lueders et al., 2004)
BSFIII_64	186	Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone HL9, <i>Crenarchaeota</i>	AJ608199	0,99	(Kemnitz et al., 2004)
BSFIII_75	186	Uncultured <i>Methanobolus</i> sp. clone SB05 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	AY177812	0,95	(Purdy et al., 2003)
BSFIII_85	186	Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone PM32, <i>Crenarchaeota</i>	AJ608178	0,99	(Kemnitz et al., 2004)
BSFIII_86	186	Uncultured archaeon clone HTA-G6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, <i>Crenarchaeota</i>	AF418938	0,89	(Stein et al., 2002)
BSFIII_90	186	Uncultured archaeon clone HTA-B6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, <i>Crenarchaeota</i>	AF418928	0,99	(Stein et al., 2002)
BSFIII_91	186	Uncultured archaeon clone HTA-B3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, <i>Methanosarcinaceae</i>	AF418927	0,99	(Stein et al., 2002)

Anhang C

Klon-bezeichnung	T-RF	nächster Verwandter	NCBI-Bez. <sup>a</sup>	Ähnlichkeit	Referenz
BSFIII_18	186	Uncultured archaeon SCA11 16S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, <i>Crenarchaeota</i>	U62820	0,98	(Bintrim et al., 1997)
BSFIII_26	201	Uncultured archaeon clone pIR3AB04 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, <i>Crenarchaeota</i>	AY354118	0,90	(Nercessian et al., 2005)
BSFIII_2	284	Uncultured <i>Methanosaeta</i> sp. clone KB-1 2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	AY780569	0,97	
BSFIII_6	284	Uncultured <i>Methanosaeta</i> sp. clone LH25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	AY177808	0,97	(Purdy et al., 2003)
BSFIII_13 BSFIII_16	284	Uncultured <i>Methanosaeta</i> sp. clone LH11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	AY177805	0,98	(Purdy et al., 2003)
BSFIII_32 BSFIII_35 BSFIII_38 BSFIII_51 BSFIII_63 BSFIII_65	284	Uncultured archaeon clone Fuku03 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, <i>Methanosaetaceae</i>	AF481338	0,99 0,99 0,98 0,98 0,98 0,98	(Chan et al., 2002)
BSFIII_39 BSFIII_41 BSFIII_43 BSFIII_62 BSFIII_87	284	Uncultured archaeon clone HTA-D5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, <i>Methanosaetaceae</i>	AF418933	0,99 0,98 0,99 0,98 0,99	(Stein et al., 2002)
BSFIII_71	284	Uncultured archaeon gene for 16S rRNA, partial sequence, clone:ASC34, <i>Methanosaetaceae</i>	AB161335	0,97	(Kasai et al., 2005)
BSFIII_67	358	Uncultured <i>Methanomicrobiaceae</i> archaeon MRR45 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	AY125720	0,98	(Chin et al., 2004)
BSFIII_17	392	Uncultured <i>Methanomicrobiaceae</i> archaeon MRR45 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	AY125720	0,97	(Chin et al., 2004)
BSFIII_24	392	anaerobic methanogenic archaeon E15-4 16S rRNA gene, partial, <i>Methanosaetaceae</i>	AJ244290	0,99	(Chin et al., 1999b)
BSFIII_83	478	Uncultured archaeon clone Dg2003_D_128 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, <i>Euryarchaeota</i> LDS Cluster	AY531712	0,89	(Chan et al., 2005)

Anhang C

Klon-bezeichnung	T-RF	nächster Verwandter	NCBI-Bez. <sup>a</sup>	Ähnlichkeit	Referenz
BSFIII_84	689	Uncultured archaeon gene for 16S rRNA, partial sequence, clone:ASC22, <i>Methanosarcinaceae</i>	AB161327	0,99	(Kasai et al., 2005)
BSFIII_12	689	<i>Methanomethylovorans hollandica</i> strain ZB 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	AY260433	0,99	(Simankova et al., 2003)
BSFIII_59	706	Crenarchaeotal sp. clone pJP 41 16S ribosomal RNA gene fragment, <i>Crenarchaeota</i>	L25301	0,94	(Barns et al., 1994)
BSFIII_96	741	Uncultured archaeon clone AS01-06 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, <i>Crenarchaeota</i>	AF225608	0,98	(Lueders und Friedrich, 2000)
BSFIII_8	791	Uncultured <i>Methanomicrobiales</i> archaeon 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	AY187063	0,99	(Purdy et al., 2003)
BSFIII_15				0,99	
BSFIII_49				0,99	
BSFIII_66				0,99	
BSFIII_69				0,98	
BSFIII_73				0,99	
BSFIII_74				0,99	
BSFIII_80				0,99	
BSFIII_97	0,99				
BSFIII_11	791	uncultured archaeon partial 16S rDNA gene partial 16S rRNA gene, clone LKS3, <i>Methanomicrobiaceae</i>	AJ310852	0,98	(Nüsslein et al., 2001)
BSFIII_23	791	Uncultured <i>Methanomicrobiaceae</i> archaeon MRR45 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	AY125720	0,98	(Chin et al., 2004)
BSFIII_25					
BSFIII_27					
BSFIII_77	791	uncultured euryarchaeote VAL47 16S rRNA gene, partial, clone VAL47, <i>Methanomicrobiales</i>	AJ131268	0,97	(Jurgens et al., 2000)
BSFIII_89	791	Uncultured archaeon clone MB-10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, <i>Methanomicrobiaceae</i>	AY175398	0,98	(Basiliko und Yavitt, 2003)
BSFIII_19	791	uncultured archaeon partial 16S rDNA gene partial 16S rRNA gene, clone LKS8, <i>Euryarchaeota</i> GroupIII	AJ310857	0,97	(Nüsslein et al., 2001)
BSFIII_44	791	Uncultured archaeon gene for 16S rRNA, partial sequence, clone:ASC22, <i>Methanosarcinaceae</i>	AB161327	0,99	(Kasai et al., 2005)
BSFIII_72	791	Uncultured archaeon clone Dg2003_D_41 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, <i>Euryarchaeota</i> LDS Cluster	AY531709	0,89	(Chan et al., 2005)

## Anhang C

---

Klon- bezeichnung	T-RF	nächster Verwandter	NCBI-Bez. <sup>a</sup>	Ähnlichkeit	Referenz
BSFIII_82	810	Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone PILK13	AJ631256	0,94	(Rudolph et al., 2004)

<sup>a</sup>NCBI-Bezeichnung (NCBI Entry Name)

## Lebenslauf

Andrea Graff, geboren am 18.12.1970 in Stade

### Schulausbildung

1977 – 1981	Grundschule, Stade
1981 – 1983	Orientierungsstufe, Stade
1983 – 1990	Vincent-Lübeck-Gymnasium, Stade Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
1990 – 1991	Sprachschulen in Großbritannien und Frankreich

### Berufsausbildung

1991 – 1993	Staatlich anerkannte Lehranstalt für technische Assistenten in der Medizin am Krankenhaus Stade Abschluss: Examen 09.1993
-------------	--

### Berufserfahrung

06.1994 – 08.1995	Medizinische Laboratoriumsassistentin, Laborarztpraxis Mohr, Kiel
-------------------	--

### Studium

WS 1995/96	Biologie (Diplom), Philipps-Universität, Marburg
SS 1997	Vordiplom
WS 1997/98	Beginn des Hauptstudiums, Fächerkombination: Mikrobiologie, Genetik, Biochemie und Virologie
WS 1999//2000	Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg, unter Anleitung von Prof. Dr. R. Conrad. Thema: „Isolierung und molekulare Charakterisierung von schwefeloxidierenden Bakterien aus einem italienischen Reisfeldboden“
08.2000	Diplom

### **Dissertation**

seit 11.2000

Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg, unter Anleitung von Prof. Dr. R. Conrad. Thema: „Molekularbiologische Untersuchung der Diversität von Mikroorganismen in gefluteten und ungefluteten Pappelmikrokosmen“

### **Publikationen**

**Graff, A. und R. Conrad.** 2005. Impact of flooding on soil bacterial communities associated with poplar (*Populus* sp.) trees. FEMS Microbiol. Ecol. **53**:401-415.

**Graff, A. und S. Stubner.** 2003. Isolation and molecular characterization of thiosulfate-oxidizing bacteria from an Italian rice field soil. System. Appl. Microbiol. **26**:445-452.

### **Beiträge zu wissenschaftlichen Tagungen**

**Graff, A. und S. Stubner.** Isolation and molecular characterization of sulfur-oxidizing bacteria from an Italian rice field soil. VAAM-Jahrestagung 2001, Oldenburg (Poster)

**Graff, A., J. Kreuzwieser und R. Conrad.** Analysis of the microbial communities of flooded and unflooded microcosms of poplar trees. VAAM-Jahrestagung 2002, Göttingen (Poster)

**Graff, A., J. Kreuzwieser und R. Conrad.** Analysis of the microbial communities of flooded and unflooded microcosms of poplar trees. Internationales Symposium „Structure and function of soil microbiota“ 2003, Marburg (Poster)

---

## **Dank**

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Ralf Conrad für die Bereitstellung des Themas und die Anleitung meiner Doktorarbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. Erhard Bremer danke ich für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Bei Herrn Prof. Dr. P. Galland und Herrn Prof. Dr. M. Bölker möchte ich mich für die Bereitstellung als Prüfer meiner Disputation bedanken.

Für die Bereitstellung des Pflanzen- und Bodenmaterials danke ich Dr. Jürgen Kreuzwieser von der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg.

Danken möchte ich allen Mitgliedern der Abteilung Biogeochemie, die mir mit Ratschlägen und Hilfe zur Seite gestanden haben. Katja Meuser, Bianca Pommerenke und Melanie Klose danke ich für so manche Einweisung und Hilfe im Umgang mit der Mikrobiologie.

Meinen Laborkollegen Steffen Kolb, Matthias Noll, Julia Schwarz, Christina Bremer und meinem langjährigen Ex-Boxnachbarn Daniel Scheid danke ich für die gute Zusammenarbeit, die angenehme Arbeitsatmosphäre, so manchen Motivationsschub und für viele „geistreiche“ gemeinsame Stunden. Vielen Dank auch an Claudia Knief und Markus Egert für ihre Hilfe bei der Anfertigung dieser Arbeit. Mein besonderer Dank gilt Dana Kemnitz, Gesche Braker und Holger Penning für ihre Hilfsbereitschaft, besonders auf den letzten Metern und Gesche Braker auch dafür, dass sie mir so lange „Asyl“ gewährt hat.

Großer Dank geht auch an meine Freunde, hier in Marburg und anderswo - für alles!!

Ganz besonders herzlich danke ich Irma und Maren, auf deren volle Unterstützung ich während des gesamten Studiums bauen konnte. Posthum danke ich Harald, der mir dieses Studium ermöglicht hat. Es wäre schön gewesen, wenn er das Ende dieser Arbeit erlebt hätte.

## **Erklärung**

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Molekularbiologische Untersuchung der Diversität  
von Mikroorganismen in gefluteten  
und ungefluteten Pappelmikrokosmen“

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

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

Marburg, 8. 11. 2005