

Mikrobielle Sukzession in geflutetem Reisfeldboden

Dissertation

Zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Matthias Noll

aus Kassel

Marburg / Lahn 2004

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden vom 15.06.2004 bis zum 30.06.2004 am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in Marburg / Lahn unter der Leitung von Priv.-Doz. Dr. Werner Liesack durchgeführt.

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

Erstgutachter: Priv.-Doz. Dr. L. Liesack

Zweitgutachter: Prof. Dr. W. Buckel

Tag der Disputation:

Ein Großteil der Ergebnisse dieser Dissertation ist in folgender Publikation veröffentlicht worden:

Matthias Noll, Diethart Matthies, Peter Frenzel, Manigee Derakshani, and Werner Liesack

Succession of bacterial community structure and diversity in a paddy soil oxygen gradient. *Env. Microb.*

(in Revision)

**„Jede Wissenschaft ist, unter anderem, ein Ordnen, ein Vereinfachen, ein
Verdaulichmachen des Unverständlichen für den Geist.“ Hermann Hesse**

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen.....	IV
1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. EINLEITUNG	3
2.1 Sukzession	3
2.2 Sauerstoffgradient	7
2.3 Mikrobiologie von gefluteten Reisfeldböden.....	8
2.4 Methoden zur Erfassung der mikrobiellen Diversität.....	9
2.5 Statistische Auswertung der Ergebnissen von „Fingerprint“-Techniken.....	11
2.6 Ziele der Arbeit.....	13
3. MATERIAL UND METHODEN.....	15
3.1 Chemikalien.....	15
3.2 Boden.....	15
3.3 Gravimetrischer Wassergehalt und pH-Wert des Bodens	16
3.4 Messung des Sauerstoffkonzentrationsprofils	17
3.4.1 Berechnung der Respirationsraten.....	18
3.5 Herstellung der Bodenkernschnitte	18
3.6 Molekularbiologische Untersuchungen.....	19
3.6.1 Extraktion von Nukleinsäuren aus Bodenkernen.....	19
3.6.2 Extraktion von Nukleinsäuren aus Isolaten.....	21
3.6.3 Agarose-Gelelektrophorese	21
3.6.4 Amplifikation von 16S rDNA.....	22
3.6.5 Amplifikation von 16S rRNA	23
3.6.6 Quantitative Amplifikation durch Real-Time PCR.....	24
3.6.7 T-RFLP Analyse.....	25

3.6.8 Erstellung von Klonbibliotheken.....	27
3.6.9 Sequenzanalyse.....	28
3.7 Isolierung von repräsentativen Bakterienstämmen aus den Bodenkernen	28
3.7.1 Lagerung von Isolaten und rekombinanten Klonen	29
3.8 Bestimmung der absoluten Zellzahl.....	30
3.9 Sequenzanalyse und phylogenetische Rekonstruktion.....	30
3.10 Statistische Methoden.....	32
3.10.1 Statistische Auswertung der T-RFLP-Ergebnisse.....	32
3.10.2 Diversität und Dominanzstruktur	34
4. ERGEBNISSE	35
4.1 Sauerstoffgradient	35
4.1.1 Respirationsrate	36
4.2 Sukzession der bakteriellen Lebensgemeinschaft.....	37
4.2.1 T-RFLP-Analyse der bakteriellen Lebensgemeinschaften.....	38
4.2.2 Zeitliche und räumliche Entwicklung einzelner bakterieller Gruppen.....	41
4.2.3 Phylogenetische Identifikation einzelner bakterieller Gruppen.....	44
4.2.4 Einteilung der Signatur -T-RFs in Phasen.....	44
4.2.5 Phylogenetische Gruppen der frühen Inkubationsphase (Phase I).....	45
4.2.6 Phylogenetische Gruppen der späten Inkubationsphase (Phase III).....	48
4.2.7 Diversität und Ähnlichkeit der bakteriellen Lebensgemeinschaft	50
4.3 Isolation und Identifikation von numerisch bedeutender Bakterien	51
4.3.1 Vergleich zwischen T-RFLP-Analyse und Kultivierungsansatz.....	55
4.4 Quantifizierung der bakteriellen Lebensgemeinschaft	60
4.5 Sukzession der archaealen Lebensgemeinschaft	62
5. DISKUSSION	65
5.1 Statistische Auswertung der T-RFLP-Ergebnisse.....	65
5.2 Die bakterielle Sukzession	66
5.2.1 Phase I - Dominanz von r-Strategen.....	67

5.2.2 Phase II - Der Übergang von r- zur K-Strategen.....	71
5.2.3 Phase III - Äquitabilität von K-Strategen.....	72
5.3 Mögliche Widersprüche zur Interpretation der bakteriellen Sukzession anhand des r/K-Konzeptes.....	76
5.4 Die archaeale Sukzession	77
5.5 Schlußfolgerungen und offene Fragen.....	78
6. LITERATURVERZEICHNIS	80
Danksagung.....	95
Lebenslauf.....	96
Beiträge zu Tagungen und Symposien	97

ABKÜRZUNGEN

bp	Basenpaare
CFU	Kolonienbildende Einheiten („colony forming units“)
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindoldhydrochlorid
dd H ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure („deoxyribonucleic acid“)
DNAse	Desoxyribonuklease
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
f	Vorwärts („forward“)
g	Erdbeschleunigung
KA	Korrespondenzanalyse
KKA	Kanonische Korrespondenzanalyse
kb	Kilobasen
PCR	Polymeraseketten-Reaktion („polymerase chain reaction“)
r	Rückwärts („reverse“)
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rRNA	ribosomale RNA
RT-PCR	Reverse Transkriptions – Polymeraseketten-Reaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat („sodium dodecyl sulphate“)
sigT-RF	charakteristisches Terminales Restriktionsfragment für eine definierte Phase der bakteriellen Sukzession („Signatur-terminales-Restriktionsfragment“)
sp.	Art („species“)
spp.	Arten
TG	Trockengewicht
T-RF	terminales Restriktionsfragment
T-RFLP	Terminaler RFLP („terminal restriction fragment length polymorphism“)
U	Einheit („unit“)
UpM	Umdrehung pro Minute
v/v	Volumen pro Volumen („volume per volume“)
w/v	Gewicht pro Volumen („weight per volume“)

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde eine bakterielle Sukzession in einem Reisfeldboden in Abhängigkeit zum Sauerstoffgradienten, wie er sich nach Überflutung des Bodens ausbildet, mit einem kombinierten Ansatz von molekularbiologischen Methoden und Kultivierungsexperimenten analysiert. Als Modellsystem wurde unbepflanzter Reisfeldboden in Mikrokosmen bei 30 °C in Dunkelheit inkubiert.

Mittels Mikrosensormessungen wurde gezeigt, dass sich bereits sechs Stunden nach dem Fluten ein steiler vertikaler Sauerstoffgradient entwickelt hatte und dieser über die weitere Inkubationsdauer stabil blieb. Die Struktur und Dynamik der bakteriellen Gemeinschaft in der oxischen Zone, der Übergangszone und der anoxischen Zone wurden mit der terminalen Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus (T-RFLP)-Analyse verfolgt. Als molekulare Marker wurden die 16S rRNA und ihr kodierendes Gen (16S rDNA) verwendet. Folgende Inkubationszeitpunkte wurden untersucht: ein und sechs Stunden sowie ein, zwei, sieben, 14, 21, 30, 42, 84 und 168 Tage. Zu den jeweiligen Inkubationszeitpunkten wurden aus Mikrokosmen Proben für die molekulare Analyse entnommen, die zu den oben genannten Sauerstoffzonen korrespondierten. Für jeden der Inkubationszeitpunkte wurde die Zusammensetzung der bakteriellen Lebensgemeinschaft in drei Mikrokosmen unabhängig voneinander analysiert.

Eine Korrespondenzanalyse der gesamten Fingerprintmuster auf 16S rRNA- bzw. auf 16S rDNA-Ebene zeigte, dass die Faktoren Inkubationszeit und Sauerstoffkonzentration und die Interaktion der beiden Faktoren einen Effekt auf die bakterielle Gemeinschaft hatten. Die zeitlichen Dynamiken wurden durch die Analyse der RNA besser aufgelöst als durch die Analyse der DNA. Die bessere Auflösung auf RNA-Ebene ist dadurch erklärbar, dass der detektierbare RNA-Gehalt einer Population durch den Faktor Populationsgröße und vor allem durch den Faktor Aktivität bestimmt wird. Die bakterielle Sukzession konnte in drei Phasen unterschiedlicher Dynamiken eingeteilt werden. Phase I (eine Stunde bis zwei Tage nach Überflutung) zeigte die stärksten Umbrüche in der Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft. Diese Dynamiken waren ebenfalls in Phase II (zwei Tage bis 21 Tage nach Überflutung) zu beobachten, allerdings im Vergleich zur Phase I in schwächerer Ausprägung. Die Phase III (21 Tage bis 168 Tage nach Überflutung) war durch eine zeitlich und räumlich stabile Gemeinschaft gekennzeichnet.

Mittels der vergleichenden Sequenzanalyse von 16S rRNA-Klonsequenzen wurden die mit den abundanten T-RFs korrespondierenden Organismen der Phase I in der oxischen Zone als *Betaproteobacteria* und in der anoxischen Zone als Clostridien identifiziert. Die Phase III

wurde durch *Nitrospira*, *Verrucomicrobia* und *Acidobacteria* (oxische Zone) und *Myxococcales* (hauptsächlich in der anoxischen Zone) charakterisiert. Sowohl in Phase I als auch in Phase III wurden Vertreter der *Betaproteobacteria* als abundante Population detektiert. Basierend auf der gemeinsamen Interpretation der T-RFLP-Daten und der Klonsequenzen konnte eine Veränderung über die Inkubationszeit in der phylogenetischen Zusammensetzung innerhalb dieser Gruppe festgestellt werden.

Aerobe Bakterien der Phase I und der Phase III wurden mittels Verdünnungsreihentechnik isoliert. Der Vergleich der Phylogenien der Isolate beider Phasen zeigte ebenfalls einen starken Umbruch in der kultivierbaren Fraktion über die Inkubationszeit. Während die kultivierbare Fraktion in der Phase I hauptsächlich durch Vertreter der *Betaproteobacteria* charakterisiert war, setzte sich die Phase III vor allem aus Mitgliedern des Phylums *Alphaproteobacteria* zusammen. Ferner wurden ausschließlich in der Phase III *Acidobacteria* spp. und *Verrucomicrobia* spp. isoliert. Isolate der *Actinomycetales* waren in beiden Phasen charakteristisch, wobei die Isolate der Phase I zu anderen Gattungen gehörten als die Isolate der Phase III.

Die abnehmende Dynamik der bakteriellen Sukzession hin zu einer Klimaxgemeinschaft konnte mit dem Konzept der r-/K-Selektion erklärt werden. Gleiches galt für die bakteriellen Populationen, die für die frühe bzw. späte Inkubationsphase als charakteristisch identifiziert worden waren. Der von taxonomisch beschriebenen Organismen abgeleitete Phänotyp der detektierten Bakterien der Phase I zeichnet sich durch hohe Wachstumsraten aus, während Bakterien der Phase III durch eine Anpassung an geringe Substratkonzentrationen gekennzeichnet sind.

2. Einleitung

In dem Ökosystem Boden sind neben Tieren und Pflanzen vor allem Mikroorganismen entscheidend an den biotischen Prozessen beteiligt, da alle biogeochemischen Stoffkreisläufe der Erde durch mikrobielle Prozesse im Boden beeinflusst werden. Die Ökologie dieser mikrobiellen Lebensgemeinschaften ist nicht annähernd so gut verstanden wie die von höheren Pflanzen oder Tieren. Das liegt vor allem daran, dass der Großteil der mikrobiellen Diversität nach wie vor unbekannt ist. Weniger als ein Prozent der mit molekularen Techniken detektierbaren Mikroorganismen ist bisher isoliert und taxonomisch beschrieben worden (Schleifer, 2004).

Schlüsselfragen der mikrobiellen Ökologie sind, wie Mikroorganismen auf komplexe biotische und abiotische Faktoren der Umwelt reagieren. Ein entscheidender Umweltfaktor, der die strukturelle Zusammensetzung einer mikrobiellen Lebensgemeinschaft beeinflusst, ist die Verfügbarkeit von Sauerstoff. In dieser Studie sollte die Frage geklärt werden, wie sich die Zusammensetzung der mikrobiellen Lebensgemeinschaft nach dem Fluten eines Reisfeldbodens entwickelt und welchen Einfluss in dieser Entwicklung die Sauerstoffkonzentration hat.

2.1 Sukzession

Die Sukzession wurde als zentraler Begriff schon im 19. Jahrhundert in der Vegetationskunde eingeführt und in verschiedener Weise im Hinblick auf die Betonung der relevanten Mechanismen definiert (Thoreau, 1860; Warming, 1896; Cowles 1899). Nach der Definition von Begon *et al.* (1996) ist der Prozess einer Sukzession eine nicht jahreszeitlich bedingte und kontinuierliche Veränderung der Lebensgemeinschaftsmuster eines Gebietes durch aufeinanderfolgende Populationen. Diese zeitlichen Veränderung der Gemeinschaftsmuster wird durch biotische und abiotische Faktoren bedingt. Unter dem Begriff „Muster“ fassen Begon *et al.* (1996) die Artenzusammensetzung und ihre jeweiligen Abundanzen zusammen.

In der Formulierung von Gesetzmäßigkeiten einer Sukzession ist besonders die abschließende Phase einer Sukzession kontrovers diskutiert worden. Clements (1916, 1936) etablierte das „organismische Konzept“, bei der die Mitglieder einer Gemeinschaft unter gleichen Ausgangsbedingungen und Umweltfaktoren eine vorhersagbare Sukzession zu einer stabilen Klimaxgesellschaft durchlaufen. Dieses Konzept ist von Transley (1939) durch das „Polyklimax-Konzept“ erweitert worden. Nach Transley

(1939) kann die Entwicklung innerhalb der Sukzession von zufälligen Einzelereignissen abhängen und dadurch in nicht determinierte Richtungen verlaufen. Whittaker (1953) schließlich geht davon aus, dass lokale Pflanzengemeinschaften untereinander interagieren und dadurch ein Mosaik verschiedener Klimax-Ausprägungen innerhalb einer Landschaftsfläche zu beobachten sind. In dieser „Klimax-Muster-Hypothese“ werden zyklische Veränderungen der Habitatbedingungen berücksichtigt, so dass ein Kontinuum ineinander übergehender Klimaxgesellschaften denkbar ist (Whittaker 1953, 1974). Zusammenfassend ist festzuhalten, dass alle genannten konzeptionellen Ansätze davon ausgehen, dass eine Sukzession durch innere Gesetzmäßigkeiten bestimmt ist und daher vorhersagbar ist.

In der Vegetationskunde werden neben einer zeitlichen Entwicklung der gesamten Lebensgemeinschaft auch die Prozesse innerhalb der Gemeinschaft als allogene oder als autogene Sukzession unterschieden. Zum einen ist die allogene Sukzession dadurch gekennzeichnet, dass die Lebensgemeinschaften ausschließlich durch äußere, geophysikochemische Kräfte beeinflusst werden und zum anderen die autogene Sukzession bei der die Entwicklung der Lebensgemeinschaften durch biologische Prozesse vorangetrieben wird (Begon *et al.*, 1996). Die autogene Sukzession wird wiederum, in Abhängigkeit von der biologischen Besiedlungsgeschichte des Habitates in eine Primär- und eine Sekundärsukzession untergliedert. Ist das Habitat noch nicht durch eine Lebensgemeinschaft beeinflusst, wie z. B. nach einem Vulkanausbruch oder dem Rückzug eines Gletschers, so wird eine Primärsukzession stattfinden. Im Gegensatz zur Primärsukzession werden in einer Sekundärsukzession etablierte mikrobielle Lebensgemeinschaften durch eine ökologische Katastrophe, wie z. B. durch einen Brand, dauerhafte Flutung oder durch Pflügen von Feldern, völlig neuartigen Habitatbedingungen ausgesetzt.

Die zeitliche Entwicklung von Populationen in Lebensgemeinschaften und die Beziehung zu ihrer Umwelt können in einem Konzept zusammengefasst werden, das sich bei der Beschreibung über Gesetzmäßigkeiten von Lebensstrategien als besonders überzeugend erwiesen hat. Dieses Konzept wurde anhand der Sukzession von Pflanzengesellschaften entwickelt (Margalef, 1963; MacArthur und Wilson, 1967; Odum, 1969) und teilt die Mitglieder einer Gemeinschaft in Abhängigkeit zu ihrem Verhalten in ihrer Umwelt in r- bzw. K-selektierte Organismen ein. Dabei bezieht sich das Konzept der r-/K-Selektion immer auf den Vergleich von einzelnen Spezies einer funktionellen Gruppe miteinander, so dass eine absolute Einordnung von einzelnen Spezies in dieses Konzept nicht möglich ist (Gadgil und Solbrig, 1972).

Die r-selektierten Spezies (r = rapid rates; schnelles Wachstum) zeichnen sich durch ihre Fähigkeit aus, sich schnell auf Habitatveränderungen einstellen zu können und verfügbare Substratressourcen durch schnelles Wachstum zu nutzen. Während der Sukzession werden diese r-Strategen von K-Strategen (K = carrying capacity; biologisch mögliche Kapazitätsgrenze) abgelöst, deren Vorteil eine optimalere Anpassung an eine stabile Umwelt ist. K-Strategen führen in der Regel einen effizienteren Stoffwechsel durch und vermehren sich langsamer.

Andrews and Harris (1986) adaptierte dieses Konzept der r-/K-Selektion für mikrobielle Lebensgemeinschaften. Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Eigenschaften der r- und K-Strategen nehmen Andrews and Harris (1986) zwei unterschiedliche Arten der Ressourcenakquisition an. Die r-Strategen werden in diesem Kontext als „Generalisten“ eingestuft, die die Fähigkeit besitzen ein breites Substratspektrum nutzen zu können, während die K-Strategen als „Spezialisten“ bezüglich spezifischer Substrate charakterisiert sind. Eine Spezialisierung der Mikroorganismen auf ein oder wenige Substrate, die aber schon bei sehr geringen Konzentrationen effektiv genutzt werden können, erhöhen das Potential sich in einer Konkurrenz um Substratressourcen und geringe Substratkonzentrationen durchsetzen zu können. In einer solchen Konkurrenz haben daher r-Strategen einen Nachteil, der sich zudem verstärkt, wenn die r-Strategen bei einer hohen Mikroorganismendichte mit vielen K-Strategen um die verfügbaren Substrate konkurrieren. Dafür können r-Strategen im Vergleich zu K-Strategen schneller auf einen Erhaltungsstoffwechsel übergehen und bilden eher Überdauerungsstadien (Andrews und Harris, 1986). Mit Überdauerungsstadien, wie Endosporen, Exosporen oder Cysten können r-Strategen mit einer hohen Anzahl von reproduktionsfähigen Zellen mit minimalem Energieaufwand persistieren bis höhere Substratkonzentrationen wieder verfügbar sind. Beispiele für derartige Konkurrenzen innerhalb einer definierten funktionellen Gilde sind bei aeroben und anaeroben Heterotrophen sowie bei chemolithotrophen Bakterien untersucht worden (Laanbroek *et al.*, 1984; Legan *et al.*, 1987; Legan und Owens, 1988; Robinson und Tiedje, 1984; Lovley *et al.*, 1982).

Leij *et al.* (1994) verwendeten das Konzept der r/K-Selektion für die Charakterisierung von unterschiedlichen bakteriellen Wachstumsgeschwindigkeiten auf festen Komplexmedien. In diesem Experiment wurden früh auftretende Kolonien als r-Strategen definiert, während später entstehende Kolonien auf den Medien als K-Strategen abgegrenzt wurden, so dass bis auf das Wachstum auf den selben Substratzusammensetzungen keine weitere Differenzierung der funktionellen Gilden durchgeführt wurde. In diesem Zusammenhang ist das Konzept der r/K-Selektion als ordnendes Prinzip für das Auftreten von Organismen über einen zeitlichen Verlauf zu verstehen. Auch Sigler und Zeyer (2002)

verwendeten das Konzept der r-/K-Selektion zur Beschreibung der Entwicklung der gesamten bakteriellen Lebensgemeinschaft und konnten in einem vom Gletscher freigelegtem Boden eine bakterielle Erstbesiedlung des Bodenhabitates in unterschiedliche Entwicklungsstadien einteilen. Diese Erweiterung des Konzeptes der r-/K-Selektion von einer funktionellen Gruppe zu einer relativen Einteilung der Mikroorganismen anhand ihres zeitlichen Erscheinens ermöglicht eine Strukturierung der bakteriellen Sukzession.

Allerdings ist ein eindeutiger Zusammenhang zwischen den metabolischen Eigenschaften der gesamten mikrobiellen Lebensgemeinschaft und den komplexen Habitatbedingungen eines Bodens unter natürlichen Umweltbedingungen nur schwer nachzuweisen. Diese Schwierigkeit betrifft gleichermaßen Studien von Primär- und Sekundärsukzessionen (Bardgett und Walker, 2004; Kowalchuk *et al.*, 2000).

Einen besonderen Fall von Sekundärsukzession stellt das „geschlossene“ Ökosystem dar, in das keine zusätzliche Energie eingebracht wird, so dass ausschließlich eine degradative, autogene Sukzession stattfinden kann. Diese Art von Sukzession findet ihr theoretisches Ende, wenn die Nährstoffe vollständig metabolisiert und mineralisiert sind (Begon *et al.*, 1996). Ein Beispiel für ein „geschlossenes“ Ökosystem sind ungestörte Tiefseesedimente, in denen außer einer geringfügigen Sedimentation keine Nährstoffe eingebracht werden. In diesen Habitaten wurde nur eine extrem geringe metabolische Aktivität der mikrobiellen Lebensgemeinschaft gemessen (D'Hondt *et al.*, 2002). Tiefseesedimente unterschiedlicher Standorte wiesen keine Unterschiede in der Zusammensetzung der bakteriellen Diversität auf und ebenso wurden entlang von Vertikalprofilen verschiedener Tiefseesedimente keine Änderungen der bakteriellen Diversität festgestellt (Kormas *et al.*, 2003). Im Zusammenhang mit dem Konzept der r-/K-Selektion könnte diese einheitliche bakterielle Zusammensetzung als stabile, endgültige Lebensgemeinschaft einer Sukzession, also als Klimaxgesellschaft angesehen werden.

2.2 Sauerstoffgradient

Molekularer Sauerstoff ist einer der wichtigsten Reaktanden in biogeochemischen Kreisläufen (Brune *et al.* 2000). Bedingt durch die geringe Löslichkeit in Wasser führt der biologische Verbrauch von Sauerstoff zur Entwicklung von oxisch-anoxischen Grenzschichten. Diese natürlichen Grenzschichten sind durch gekoppelte Oxidations- und Reduktionsprozesse charakterisiert und bilden somit komplexe Redoxsysteme. Redoxsysteme können in ihrer vertikalen Dimension in unterschiedlichen Skalierungen zwischen wenigen Millimetern, wie z. B. Biofilmen oder mikrobiellen Matten (Revsbech *et al.*, 1989; Dalsgaard und Revsbech, 1992; Fünd und Cohen, 1992; Ramsing *et al.*, 1993; Conrad *et al.*, 1995) und mehreren Metern, wie z. B. geschichteten Wassersäulen (Overbeck, 1972; Sorokin, 1970; Sorokin, 1972, Repeta *et al.*, 1989), ausgeprägt sein. Diese Habitats sind durch eine oxygenierte Oberflächenschicht und sauerstofffreie tiefere Schichten gekennzeichnet, in denen prinzipiell, der thermodynamischen Theorie folgend, eine Schichtung verschiedener Elektronenakzeptoren vorzufinden ist (Sørensen *et al.*, 1979; Kuivila *et al.*, 1989). In Reisfeldböden ist das Auftreten dieser Elektronenakzeptoren in unterschiedlichen räumlichen Skalierungen nachgewiesen worden. So ist Nitrat in einer Tiefe von 1 bis 2 mm (Arth und Frenzel, 2000), Fe^{3+} in einer Tiefe von 2 bis 4 mm (Ratering und Schnell, 2000) und Sulfat in einer Tiefe unterhalb von 1 bis 5 cm Tiefe (Wind und Conrad, 1995; Wind und Conrad, 1997) lokalisiert worden.

Das zentrale Merkmal aller Redoxgradientensysteme besteht neben den physikalischen Gesetzmäßigkeiten in einer Sauerstoffzehrung bzw. Respiration in oberflächenentfernten Zonen durch Organismen, die auf diese Weise den vertikalen Verlauf des Sauerstoffgradienten bestimmen. (Frenzel *et al.*, 1992; Dalsgaard und Revsbech, 1992). Der Einfluss von den Organismen auf die Steilheit eines Sauerstoffgradienten ist vom verfügbaren organischen Kohlenstoff in der oxischen Zone abhängig (Revsbech *et al.*, 1980). Die anoxische Zone nimmt durch die mikrobiologische Produktion von reduzierten Verbindungen wie CH_4 , S^{2-} , Fe^{2+} oder NH_4^+ Einfluss auf die oberflächennahen Schichten des Redoxgradientens. An den oxisch-anoxischen Grenzschichten werden diese reduzierten Substanzen reoxidiert und führen so zu einer verstärkten Sauerstoffzehrung, die den vertikalen Abnahme des Sauerstoffgradientens verstärkt (Kuivila *et al.*, 1989; Frenzel *et al.*, 1990). In derartigen Sauerstoffgradientensystemen konnten vertikale Veränderungen der Zusammensetzung der mikrobiellen Lebensgemeinschaft in Süßwasser- und Ozeansedimenten (Braker *et al.*, 2001; Hines *et al.*, 1997; Rabouille *et al.*, 2003), in Biofilmen (Gieseke *et al.*, 2003), in mikrobiellen Matten (Grotzschel und de

Beer, 2002; Nubel *et al.*, 2002; Visscher *et al.*, 2003) und in terrestrischen gefluteten Böden (Lüdemann *et al.*, 2000) festgestellt werden.

2.3 Mikrobiologie von gefluteten Reisfeldböden

Reis ist mit ca. 155 Millionen ha die am häufigsten angebaute Kulturpflanze der Welt und 75 % der Anbauflächen befinden sich für die Dauer der Reiskultivierung in einem gefluteten Zustand (URL: <http://www.riceweb.org>). Reisfeldböden weisen durch das periodische Fluten und Trockenlegen wechselnde chemisch-physikalische Eigenschaften auf, die einen dominierenden Einfluss auf die drei unterschiedlichen Lebensräume (Boden-Wasser-Übergangszone, Rhizosphäre, nicht-durchwurzelter Boden) der mikrobiellen Lebensgemeinschaft hat.

Die Flutung bewirkt eine definierte räumliche und zeitliche Abfolge biogeochemischer Prozesse. Die mikrobielle Lebensgemeinschaft nutzt die Sauerstoffverfügbarkeit für den aeroben Abbau von organischem Material solange, bis der Sauerstoff weitestgehend verbraucht ist. Unter den entstehenden anoxischen Bedingungen findet eine sequentielle Reduktion der Elektronenakzeptoren entsprechend ihrer freien Energie statt (Ponnamperuma, 1972, Zehnder und Stumm, 1988). Demnach wird Nitrat als erster Elektronenakzeptor durch die mikrobielle Gemeinschaft reduziert, gefolgt von Mn^{4+} , Fe^{3+} , SO_4^{2-} und CO_2 . Aufgrund der unterschiedlichen Bedingungen entlang der entstehenden chemischen Gradienten finden funktionelle Gruppen von Mikroorganismen, wie z. B. Nitratreduzierer (Arth und Frenzel, 2000), Eisenreduzierer (Ratering und Schnell, 2000), Sulfatreduzierer (Wind und Conrad, 1997) und Methanotrophe (Gilbert und Frenzel, 1998; Henckel *et al.* 1999) ihre spezifische ökologische Nische im Reisfeldsystem.

Zeitgleich findet in dem anoxischen Teil des Bodens ein anaerober Abbauprozess von organischem Material statt. Dieser Prozess wird in die Hydrolyse, die Fermentation, der syntrophe Abbau, die Homoacetogenese sowie die Methanogenese untergliedert (Conrad und Frenzel, 2002).

In der Arbeit von Lüdemann *et al.* (2000) wurde die räumliche Verteilung der bakteriellen Lebensgemeinschaft entlang eines Sauerstoffgradientens im Reisfeldboden studiert. Dafür wurde der Reisfeldboden in unbepflanzten Bodenkernen für sieben Tage in Dunkelheit in drei Replikaten inkubiert und das Bodenprofil hochauflösend separiert. Aus jeder Schicht des Bodenprofils wurde mittels kultivierungsunabhängigen Methoden die Zusammensetzung der bakteriellen Lebensgemeinschaft analysiert. Als Ergebnis konnte sowohl für die oxische als auch für die anoxische Zone eine spezifisch

strukturierte Lebensgemeinschaft unterschieden werden. Die Populationen in der oxischen Zone wurden als *Betaproteobacteria* und *Alphaproteobacteria* und in der anoxischen Zone als Clostridien des Clusters I (sensu Collins *et al.*, 1994) identifiziert.

2.4 Methoden zur Erfassung der mikrobiellen Diversität

Es werden zwei generelle voneinander unabhängige methodische Ansätze für die Beantwortung von mikrobiell-ökologischen Fragestellungen eingesetzt. Der eine Ansatz basiert auf molekularbiologischen Techniken und der andere Ansatz auf der Kultivierung der zu untersuchenden Mikroorganismen. Letztere werden als „klassisch“ bezeichnet, da sie lange vor den molekularbiologischen Techniken entwickelt worden sind.

Die „klassischen“ Methoden umfassen Arbeiten zur Anreicherung, Isolation, Kultivierung, Identifizierung und Auszählung der Mikroorganismen aus den verschiedensten Habitaten (Janssen, 1991; Widdel, 1992; Schink, 1994). Durch das Animpfen von festen oder flüssigen Nährmedien mit Bodensuspensionsverdünnungen kann die mikrobielle Diversität eines komplexen Bodenhabitates bestimmt werden. Dabei findet allerdings durch die Auswahl der Kultivierungsbedingungen und der Nährmedien eine Selektion von solchen bakteriellen Gruppen statt, die unter den jeweiligen Bedingungen zu wachsen vermögen. Daher konnten durch diese Techniken nur ca. 1 % der mikroskopisch sichtbaren Mikroorganismen eines Habitates isoliert werden (Bakken und Olsen, 1987; Amann *et al.*, 1995, Schleifer, 2004). Die Kultivierungstechniken haben zudem selten einen Erfolg bei der Isolation von abundanten Mitgliedern mikrobieller Gemeinschaften und sind daher für eine Quantifizierung nur mit Einschränkung anwendbar. (Sørheim *et al.*, 1989; Chandler *et al.*, 1997; Liesack *et al.*, 1997). Zu den „klassischen“ Quantifizierungsmethoden gehören das Koloniezählverfahren bzw. „Colony-forming-units“ und die „Most-Probable-Number“-Technik (Taras *et al.*, 1976).

Allerdings haben trotz dieser Einschränkungen solche „klassischen“ Methoden einen wesentlichen Vorteil gegenüber den molekularbiologischen Techniken, denn die isolierten Reinkulturen können eingehend taxonomisch charakterisiert werden. Zur Zeit sind 5300 validierte prokaryotische Spezies publiziert (Stand Mai 2004: <http://www.dsmz.de> ; Euzéby, 1997).

Den Möglichkeiten der „klassischen“ Techniken steht das Potential der molekularbiologischen Techniken gegenüber. So konnten anhand von molekularbiologischen Techniken in einem charakteristischen Waldboden eine mikrobielle Diversität zwischen 13000 und 53000 Spezies berechnet

werden (Torsvik *et al.*, 1994; Sandaa *et al.*, 1999). Diese hohe Auflösung einer komplexen mikrobiellen Lebensgemeinschaft begründet sich darauf, dass die molekularbiologischen Techniken die Mitglieder einer Gemeinschaft auf Basis ihrer DNA bzw. RNA direkt nachweist. In den letzten 20 Jahren wurden eine Vielzahl von unterschiedlichen molekularbiologischen Techniken in der mikrobiellen Ökologie etabliert. Zu diesen molekularen Werkzeugen zählen Methoden aus der phylogenetischen Analyse, wie z. B. die vergleichende Sequenzanalyse der ribosomalen RNA-Gene (rRNA), durch die Hinweise über die mikrobielle Diversität, deren Entstehung und Sukzession erhalten worden sind. Die rRNA hat sich im Vergleich zu anderen molekularen Markern, wie z. B. Elongationsfaktoren (Ludwig *et al.*, 1990), Untereinheiten der ATPase (Amann *et al.*, 1988; Klugbauer *et al.*, 1992) oder RNA-Polymerasen (Pühler *et al.*, 1989) aus folgenden Gründen durchsetzen können. Die rRNA-Gene sind die strukturellen RNAs des prokaryontischen Ribosoms und kommen aus diesem Grund in allen Organismen vor. Als weiteren Vorteil hat sich herausgestellt, dass die Nukleotidpositionen der Basen hoch konserviert sind und es daher möglich war universelle Primer für nahezu alle bisher bekannten Mitgliedern der Domänen *Bacteria* (Lane, 1991; Weisburg *et al.*, 1991) oder *Archaea* (Barns *et al.*, 1994; Großkopf *et al.*, 1998) entwickeln zu können. Dabei erwiesen sich die 16S rRNA-Gene im Gegensatz zur 5S rRNA- und 23S rRNA-Gene als besonders vorteilhaft, da die 16S rRNA-Sequenzinformation von 1500 Basen einen ausreichenden Informationsgehalt aufweist, um aussagekräftige phylogenetische Zuordnung durchführen zu können (Woese, 1987; Ludwig und Schleifer, 1994).

Bei molekularökologischen Analysen ist die Amplifikation dieser Marker mittels PCR (Polymeraseketten-Reaktion) bzw. von der Transkription der entsprechenden Gene durch die reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) eine der zentralen Techniken geworden (von Wintzingerode *et al.*, 1997). Die Gesamtheit aller Biodiversitätstudien haben dazu geführt, dass 97000 16S rRNA Sequenzdaten in öffentlich zugänglich Datenbanken verfügbar sind. Die meisten dieser Sequenzen wurden bei kultivierungsunabhängigen Studien direkt aus Umweltproben erzielt. Bei diesen Biodiversitätstudien werden folgende Schritte durchgeführt: Extraktion der gesamten Nukleinsäuren aus einer Umweltprobe, Amplifikation der rDNA bzw. der rRNA, Generierung von 16S rRNA bzw. 16S rDNA-Klonbibliotheken und die Analyse der Klonbibliothek mittels vergleichender Sequenzanalyse.

Für eine detaillierte Diversitätsstudie von spezifischen Funktionen einer Lebensgemeinschaft können statt des phylogenetischen Markers der 16S rRNA-Gene auch funktionelle Gene untersucht werden. Idealerweise kodieren diese Gene für Enzyme, die zum einen universell in der zu untersuchenden Gruppe

vorhanden sind und zum anderen für die phänotypischen Eigenschaften einer funktionellen Gruppe spezifisch sind. Ein Beispiel für ein solches Enzym ist das *amoA*-Gen, das universell bei den autotrophen Ammoniak-Oxidierern vorkommt und der Nachweis von diesem Gen auf die Fähigkeit der Ammoniumoxidation hinweist (Rothauwe *et al.*, 1997; Purkhold *et al.*, 2000).

Für die Diversitätsstudien von komplexen Gemeinschaften ist eine sehr hohe Stichprobenzahl für repräsentative Aussagen nötig und aus diesem Grund gewinnen vor allem PCR-basierte „Fingerprinting“-Methoden seit Jahren an Bedeutung. Im Gegensatz zur Sequenzanalyse erlauben diese Methoden wie die denaturierende/thermische Gradientengelelektrophorese (DGGE/TGGE; Muyzer, 1999; Heuer und Smalla, 1997), die Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus-Analyse (SSCP; Lee *et al.*, 1996) und die terminale Restriktionsfragmentanalyse (T-RFLP; Liu *et al.*, 1997; Lukow *et al.*, 2000) die physikalische Separierung einzelner Sequenztypen der Lebensgemeinschaft.

Den explorativen Diversitätstudien stehen die Detektion und Quantifikation definierter und zuvor bekannter Sequenztypen bzw. Organismen gegenüber. Zur Quantifizierung der Abundanz von spezifischen Populationen werden die Real-Time-PCR (Raeymaekers, 1993; Kolb *et al.*, 2003), die „Northern-Blot“-Hybridisierungen (Roller *et al.*, 1994; Raskin *et al.*, 1994) und die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (Stahl *et al.*, 1988, Amann *et al.*, 1990, 1991) verwendet.

2.5 Statistische Auswertung der Ergebnissen von „Fingerprint“-Techniken

Die einfachste Auswertung von erhaltenen Fingerprintmustern aus Umweltproben ist der optische Vergleich, so dass das Vorhandensein bzw. die Abwesenheit unterschiedlicher Sequenztypen unter den einzelnen Mustern gegenübergestellt wird. Dies ist das primäre Ziel dieser Analysemethoden und ist generell für ein Vergleich von wenigen Proben ausreichend (Derakshani *et al.*, 2001; Kowalchuk *et al.*, 2000). Die Informationen vom Auftreten und Abwesenheit der Sequenztypen kann in Form einer binären Matrix zur Berechnung von Ähnlichkeitskoeffizienten, wie z. B. der Clusteranalyse, zwischen unterschiedlichen Fingerprintmustern verwendet werden (Legendre und Legendre, 1998).

Die „Fingerprint“-Techniken haben allerdings unter der Verwendung von weiteren statistischen Analysen das Potential für eine semi-quantitative Aussage. Zu diesem Zweck ist besonders die T-RFLP-Methode geeignet, da bei dieser Methode die Fluoreszenzsignale der einzelnen Sequenztypen (die sog. terminalen Restriktionsfragmente TRFs) als Maß für deren Abundanz innerhalb eines PCR-Produktes interpretiert werden können (Dunbar *et al.*, 2000). Derartige Vergleiche zwischen den T-RFLP-Profilen

wurden in vielen Studien durchgeführt (Lüdemann *et al.*, 2000; Lüders und Friedrich, 2000). Die Quantifikation von DGGE/TGGE-Daten hat den Nachteil, dass der Vergleich von den Intensitäten der Sequenztypen eines Fingerprintmusters indirekt durch eine Bildbearbeitungssoftware durchgeführt wird. Dabei müssen Hintergrundsignale zur Vermeidung von Fehlinterpretation ausgeschlossen werden (Ferrari und Hollibaugh, 1999; Zhang und Fang, 2000; Duineveld *et al.*, 2001). Der entscheidende Vorteil der DGGE/TGGE ist, dass die physikalisch separierten Sequenztypen direkt sequenziert und durch die vergleichende Sequenzanalyse phylogenetisch zugeordnet werden können.

Um Unterschiede eines komplexen „Fingerprint“-Datensatzes auf einzelne Behandlungen reduzieren zu können, ist eine Auswertung mittels Ordinationstechniken sinnvoll (Fromin *et al.*, 2002; Dollhopf *et al.*, 2002).

Die Anzahl an Sequenztypen von DGGE-Banden bzw. von T-RFs innerhalb eines T-RFLP-Profiles ist häufig verglichen worden (Derakshani *et al.*, 2001; Osborn *et al.*, 2000; Duarte *et al.*, 2001; Nakatsu *et al.*, 2000). Anhand der relativen Abundanz des jeweiligen Datensatzes können die klassischen ökologischen Indices, wie z. B. die Äquitabilität oder Simpsons-Index, berechnet werden. Da die Sequenztypen eines Fingerprintmusters nicht definierte phylogenetische Einheiten sind, können solche Berechnungen nur einen mittelbaren Einblick in die Struktur der Gemeinschaft ermöglichen (Eichner *et al.*, 1999; Hedrick *et al.*, 2000; Dunbar *et al.*, 2000).

2.6 Ziele der Arbeit

Die Bewirtschaftung von Reisfeldböden ist durch zyklische Flutung und Drainage charakterisiert, was eine Änderung der chemisch-physikalischen Bedingungen des Bodens zur Folge hat. Eine für die mikrobielle Gemeinschaft entscheidende Veränderung nach dem Fluten ist die Ausbildung eines steilen vertikalen Sauerstoffgradienten. Wie Lüdemann *et al.* (2000) zeigen konnten, etablierten sich bakterielle Lebensgemeinschaften verschiedener Zusammensetzung in Korrespondenz zum Sauerstoffgradienten. Diese Untersuchung wurde allerdings nur zu einem Zeitpunkt durchgeführt und war daher eine Momentaufnahme in einer voranschreitenden bakteriellen Sukzession.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht daher die Frage, wie sich die mikrobielle Dynamik nach dem Fluten des Reisfeldbodens entlang des Sauerstoffgradientens entwickelt. Für die Beantwortung dieser Fragen ist in Abbildung 1 das konzeptionelle Design der Experimente dargestellt, die in der vorliegenden Doktorarbeit angewendet wurden.

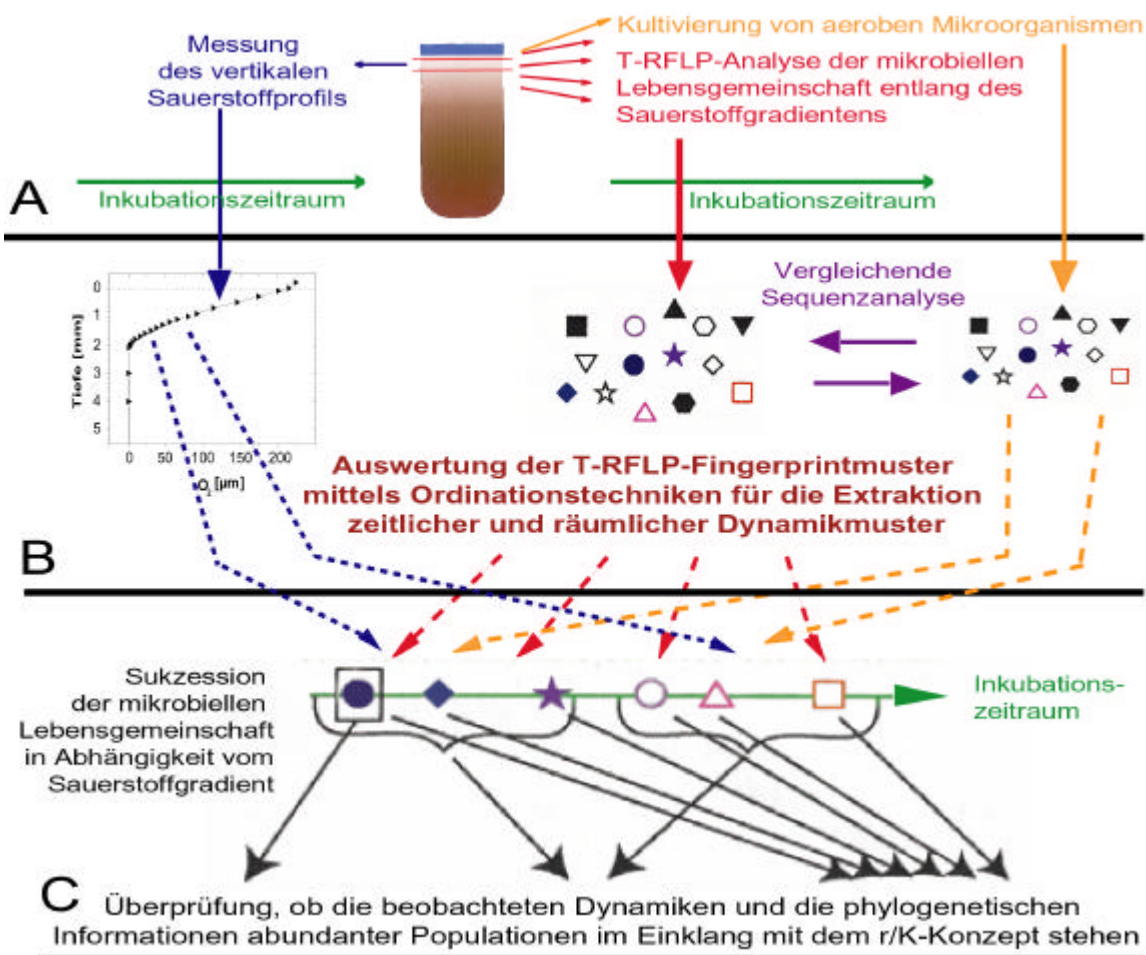


Abbildung 1: Das Konzeptionelle Design der experimentellen Datenerhebung und Interpretation der erzielten Ergebnisse. Die Symbole in Abschnitt B und C sind stellvertretend für abundante Populationen einer Inkubationsphase. Erklärung zu dem Konzept kann dem Text entnommen werden.

Die Experimente beinhalten folgende methodische Abschnitte:

A: Es sollte die zeitliche und räumliche Zusammensetzung der mikrobiellen Lebensgemeinschaft mittels der molekularen „Fingerprinting“-Technik T-RFLP untersucht werden. Als Marker sollte die 16S rRNA und die 16S rDNA verwendet werden. Während der Nachweis von Genen in DNA-Extrakten die genetische Präsenz der Populationen belegt, kann der Nachweis von Transkripten in RNA-Extrakten als ein Hinweis auf die metabolische Aktivität der entsprechenden Mikroorganismen betrachtet werden. Die zeitliche Entwicklung der mikrobiellen Gemeinschaft sollte in verschiedenen Tiefenzonen entlang des Sauerstoffgradienten (oxische Zone – Übergangszone - anoxische Zone) untersucht werden. Außerdem sollten durch aerobe Kultivierungstechniken numerisch bedeutenden Bakterien jeweils zu einem frühen und zu einem späten Inkubationszeitpunkt isoliert werden.

B: Um aus den komplexen Fingerprintmustern zu verschiedenen Zeitpunkten eine strukturierte zeitliche Entwicklung (Sukzession) extrahieren zu können, sollten die Datensätze der 16S rRNA und 16S rDNA mit statistischen Methoden, wie z. B. Ordinationstechniken, analysiert werden. Anhand dieser Analysen sollte die Sukzession in Phasen eingeteilt werden. Charakteristische TRFs einer Phase und einer Tiefenzone sollen durch repräsentative 16S rRNA-Klonbibliotheken phylogenetischen Gruppen zugeordnet werden. Die 16S rRNA-Sequenzen von den isolierten Bakterien sollte ebenfalls mit diesen Klonsequenzen verglichen werden. Dadurch sollte es ermöglicht werden, die Ergebnisse aus der molekularbiologischen Lebensgemeinschaftsanalyse mit denen der aeroben Kultivierung zu vergleichen.

C: Basierend auf den Ergebnissen der statistischen Auswertung der Fingerprintmuster und den phylogenetischen Informationen aus den Klonbibliotheken und Isolaten sollte überprüft werden, ob das von Andrews und Harris (1986) für Mikroorganismen adaptierte Konzept der r/K-Selektion auf die beobachtete mikrobielle Sukzession anwendbar ist.

3. Material und Methoden

3.1 Chemikalien

Soweit im Text nicht gesondert aufgeführt, wurden alle Chemikalien von folgenden Firmen bezogen:

Becton & Dickinson, Detroit, New Jersey, USA

Merck, Darmstadt

Promega, Mannheim

Roth, Karlsruhe

Serva, Heidelberg

Sigma-Aldrich, München

3.2 Boden

Der untersuchte Boden wurde von einem Reisfeld des „Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura“ bei Vercelli (Po-Ebene/Italien) entnommen. Charakteristika und Bewirtschaftung dieses Bodens wurden von Schütz *et al.* (1989) und Holzapfel-Pschorn *et al.* (1985) beschrieben. Der Boden wurde in einem trockenem Raum bei Außentemperatur gelagert, vor Versuchsbeginn mit Hilfe eines Backenbrechers (Typ BB1, Retsch, Haan) zerkleinert und auf eine Korngröße von ≤ 2 mm gesiebt. 190 g gesiebter Boden wurden mit 70 ml ddH₂O homogenisiert. Diese Bodensuspension wurde in einseitig verschlossene Plexiglasröhren mit einem Durchmesser von 6,2 cm gefüllt. Diese Bodenkerne wurden bei 30°C in Dunkelheit in einer Polyethylenwanne mit einer stehenden Wassersäule von 1 cm inkubiert (Abb. 2). Das Flutungswasser wurde durch eine Durchlüfterpumpe (Elite 802; Hagen Deutschland, Holm) mit Raumluft begast, um eine konstante Sauerstoffsättigung des Wassers zu gewährleisten. Es wurden je drei Bodenkerne hergestellt und in folgenden Zeitspannen geflutet inkubiert: ein, sechs Stunden und ein, zwei, sieben, 21, 30, 42, 84 und 168 Tage. Drei Bodenkerne wurden direkt nach Fluten (Null Stunden) analysiert, um diese als Ausgangssituation mit den folgenden Inkubationszeiten vergleichen zu können.

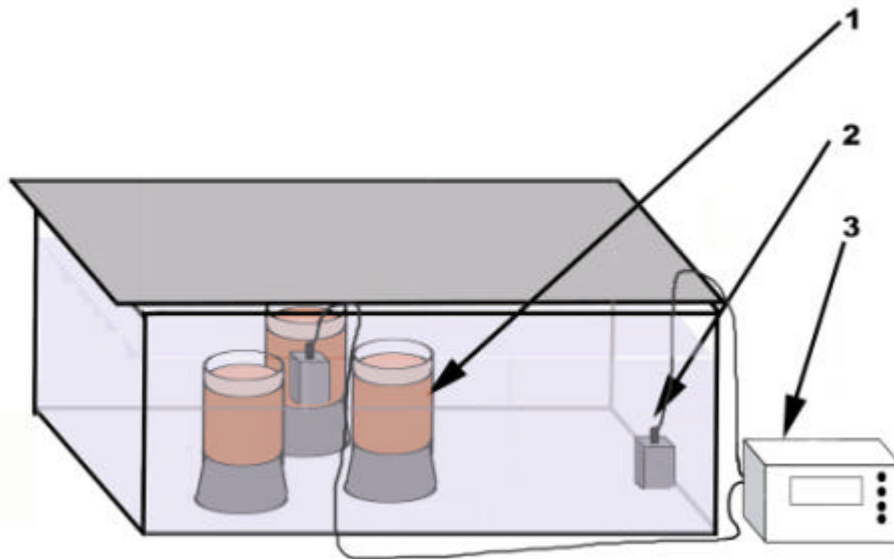


Abbildung 2: Versuchsaufbau für alle Inkubationsexperimente. Bodenkerne (1), Ausströmerstein (2), Durchlüfterpumpe (3)

3.3 Gravimetrischer Wassergehalt und pH-Wert des Bodens

Das Bodenwasser ist ein wichtiger, ökologischer Faktor im Standortkomplex Boden, da es den Austausch von löslichen Nährstoffen innerhalb der Bodentextur ermöglicht. In den Inkubationsexperimenten wurden die Bodenkerne permanent geflutet, so dass eine 100 %ige Wassersättigung erreicht wurde. Zur Bestimmung des gravimetrischen Wassergehaltes wurden das Feuchtgewicht (FG) und Trockengewicht (TG) ermittelt. Für die Ermittlung des TG wurde 1,5 g Boden in ein 50 ml Wäageglas eingewogen, bei 105 °C für zehn Stunden getrocknet und anschließend gewogen. Dies wurde wiederholt bis die Gewichtsabweichung unter 0,05 mg lag. Der prozentuale, gravimetrische Wassergehalt (WG) berechnet sich folgendermaßen:

$$WG = 100 - \left(\frac{TG \times 100\%}{FG} \right) \quad [1]$$

Wobei WG der Wasserghalt, TG das Trockengewicht und FG das Feuchtgewicht war.

Der pH-Wert des Bodens ist ein weiterer wichtiger Faktor, der einen starken Einfluss auf die Zusammensetzung der mikrobiellen Lebensgemeinschaft hat. Der pH-Wert wurde sechs Stunden und 84 Tage nach Flutung des Reisfeldbodens mit einer pH-Elektrode (SenTix 21, Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH (WTW), Weilheim) gemessen. Dabei wurden 1,5 g von der oberen Modellbodenschicht abgenommen, in einem Reagenzglas mit 10 ml ddH₂O aufgeschlämmt, und so lange gerührt bis sich ein konstanter pH-Wert eingestellt hatte.

3.4 Messung des Sauerstoffkonzentrationsprofils

Zur Messung von Sauerstoffprofilen wurden Sauerstoffmikroelektroden des Clark-Typs (Revsbech, 1989) (OX25; Unisense AS, Aarhus, Dänemark) und ein Picoammeter (PA2000; Unisense) verwendet. Für die Eichung der Sauerstoffelektrode wurde für eine vollständige Sauerstoffsättigung (100 % Sauerstoffkonzentrationseichung) mit Raumluft begastes Flutungswasser verwendet. Die Eichung des sauerstofffreien Bereichs (0 % Sauerstoffkonzentrationseichung) wurde mit einer Natriumascorbat-Natronlauge (0,1 M Natronlauge [w/v]; 0,1 M Natriumascorbat [w/v]) durchgeführt.

Zum Zeitpunkt der Sauerstoffmessung wurde eine Luftsättigung von 197 pA und ein Druck von 980 mbar bei 30°C gemessen. Mit diesen Werten konnten nach Forstner und Gnaiger (1983) bei vollständiger Sauerstoffsättigung eine Sauerstoffkonzentration von 228,1 μM berechnet werden. Die Mikroelektroden wurden auf einem Mikromanipulator (Bachofer, Reutlingen) befestigt, so dass die Mikroelektroden mit einer nominalen räumlichen Auflösung von 10 μm vertikal bewegt werden konnten. Die Grenzschicht zwischen Flutungswasser und Bodenoberfläche wurde mit einem Stereomikroskop (Leica MS 5, Leica Microsystems AG, Heidelberg) lokalisiert. Die Bodenoberfläche wurde als die räumliche Position definiert, an der durch laterale Bewegungen der Mikroelektroden spitze erste Partikel bewegt werden konnten. Die Profile wurden mit einer räumlichen Auflösung von 100 μm gemessen.

Das vertikale Sauerstoffprofil wurde nach einer Inkubationszeit von sechs Stunden und von 84 Tagen in jeweils drei Bodenkernen gemessen. Um Abweichungen der Sauerstoffprofile durch die variierende Entfernung zur Begasungsquelle innerhalb des Bodenkernes zu minimieren, wurde jeder Bodenkern dreimal über die Diagonale des Durchmessers gemessen. Für eine genauere, diagonale Auflösung innerhalb eines Bodenkernes nach 84 Tage Inkubation wurden fünf Sauerstoffprofile gemessen.

3.4.1 Berechnung der Respirationsraten

Der Diffusionskoeffizient D_S in Böden ist abhängig von der Bodentextur, die stark zwischen verschiedenen Böden variieren kann (Berner, 1980). In ähnlichen Bodenkernen mit dem gleichen Reisfeldboden, wurde von Rothfuss und Conrad (1998) der Diffusionskoeffizient für Methan empirisch als $D_{S;CH_4} = 5,09 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$ bestimmt. Der Diffusionskoeffizient $D_{S;O_2}$ wurde wie folgt berechnet:

$$D_{S;O_2} = \frac{D_{WasserO_2}}{D_{WasserCH_4}} \times D_{S;CH_4} \quad [2]$$

Wobei $D_{WasserO_2} = 2,2 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$ (Ferrell und Himmelblau, 1967), und $D_{WasserCH_4} = 2,2 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$ (Broecker und Peng, 1974) war.

Unter der Annahme eines Gleichgewichtszustandes mit $\frac{dC_{x,t}}{dt} = 0$ und $D_S(x) = \textit{konstant}$ konnten die Respirationsraten R innerhalb der gemessenen Sauerstoffprofile mit dem zweiten Fick'schen Gesetz berechnet werden (Berner, 1980; Crank, 1980):

$$\frac{dC_{x,t}}{dt} = D_S \cdot \frac{d^2 C_{x,t}}{dx^2} - R(x,t) \quad [3]$$

Wobei C die Sauerstoffkonzentration, x die Diffusionsstrecke, t die Zeit und R die Respirationsrate war.

Die Rate des Sauerstoffverbrauchs pro vertikaler Bodenschicht wurde mit dem Programm PROFIL (Version 1.0; Berg, 1998) nach Berg *et al.* (1998) berechnet.

3.5 Herstellung der Bodenkernschnitte

Beim Einfrieren von Bodenproben kommt es zu einer Verzerrung der *in situ* Bedingungen des Bodens. Da beim Tiefkühlen das Bodenwasser in Abhängigkeit vom Temperaturgradienten unterschiedlich schnell gefriert, werden vor allem wassergelöste Bestandteile bzw. durch die frierungsbedingten Scherkräfte freigesetzte Substanzen, in ihrer räumlichen Position verschoben. Diese Verzerrungen sind umso kleiner, je niedriger die Gefriertemperatur ist. Um Verzerrungen der vertikalen Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft innerhalb eines Bodenkernes beim Einfrieren so gering wie möglich zu halten, wurden die oberen Zentimeter der Bodenkerne nach ihrer Inkubation mit flüssigen Stickstoff ($-196 \text{ }^\circ\text{C}$) schockgefroren (Pachur *et al.*, 1984). Dabei wurde die überstehende Bodenlösung

von der Oberfläche des Bodenkerns abgenommen und auf diese Oberfläche wurde gleichmäßig flüssiges Stickstoff gegeben. Anschließend wurde der gesamte Bodenkern bei -80 °C gelagert.

Für die räumliche Separierung wurden die tiefgefrorenen Bodenkerne aus den Plexiglasröhren gelöst und mit einem Mikrotom (Modell HM 500 M, Microm Laborgeräte GmbH, Walldorf) bei -20 °C in vertikaler Richtung $200\text{ }\mu\text{m}$ dicke Schichten abgetragen. Jede Schicht wurde in -20 °C gekühlte 2 ml Reaktionsgefäße überführt und bis zur weiteren Bearbeitung bei -80 °C gelagert.

3.6 Molekularbiologische Untersuchungen

3.6.1 Extraktion von Nukleinsäuren aus Bodenkernen

Für den Aufschluß von Mikroorganismenzellen in Bodenkernen wurde ein Lyse-Verfahren angewandt. Die Mikroorganismen wurden in ihrem Habitat aufgeschlossen und anschließend wurden ihre Nukleinsäuren von Boden- und Zellbestandteilen gereinigt. Das verwendete Protokoll ist eine Modifikation des Protokolls von Lüdemann *et al.* (2000) und ermöglicht eine simultane Extraktion der DNA und RNA.

Die jeweilige geschnittene Bodenprobe wurde abgewogen (ca. $0,5\text{ g}$ FG), mit $0,5\text{ g}$ Glasperlen (Durchmesser $0,16\text{--}0,18\text{ mm}$) vermischt und auf Eis gelagert. Zu diesem Gemisch wurde $0,7\text{ ml}$ 4 °C kalter TPM-Puffer (50 mM Tris/HCl [pH $7,0$]; $1,7\%$ (w/v) Polyvinylpyrrolidon K25, 20 mM $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ [Felske *et al.* (1996)]) hinzugegeben und bei 2500 UpM mit einer Zelmühle (Fast Prep™ FP 120 Bio 101, Savant Instruments, Inc., Holbrook, NY, USA) für eine Minute geschüttelt. Die Bodensuspension wurde im nächsten Schritt bei $13000 \times g$, 4 °C für fünf Minuten zentrifugiert, und der Überstand zu $0,7\text{ ml}$ kaltem wassergesättigtem Phenol (PeqLab, Erlangen) gegeben. Für eine zweite Extraktion wurde auf das Pellet $0,7\text{ ml}$ 4 °C kalter, phenol-gesättigter Lysispuffer (5 mM Tris-HCl [pH $7,0$]; 5 mM Na_2EDTA ; $0,1\%$ [w/v] SDS; 6% [v/v] wassergesättigtes Phenol) gegeben und erneut bei 2500 UpM für eine Minute geschüttelt. Nach einer Zentrifugation bei $13000 \times g$, 4 °C für fünf Minuten wurde der Überstand mit dem ersten Überstand zusammengeführt. Die organische und anorganische Phase wurde durch eine Minute Schütteln emulgiert und anschließend für fünf Minuten bei $13000 \times g$, 4 °C zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde abgenommen und zu $0,7\text{ ml}$ Chloroform/Isoamylalkohol/Phenol ($24:25:1$ [v/v/v]) gegeben. Diese Emulsion wurde ebenfalls geschüttelt und wie oben beschrieben zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in $0,7\text{ ml}$

Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 [v/v]) transferiert und erneut zentrifugiert. Die verbliebene wässrige Phase wurde in ein weiteres Reaktionsgefäß überführt, mit 0,1 Volumen Natrium-Acetat-Lösung (3 M) und 2,5 Volumen Ethanol (98 % [v/v]) versetzt und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ für eine Stunde inkubiert.

Die präzipitierten Nukleinsäuren wurden durch eine Stunde Zentrifugieren bei $13000 \times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Pellet mit $400\text{ }\mu\text{l}$ Ethanol (70 % [v/v]) abermals bei $13000 \times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 15 Minuten zentrifugiert und unter Vakuum getrocknet. Das trockene Pellet wurde in $50\text{ }\mu\text{l}$ TE-Puffer (PeqLab) gelöst. Eine Hälfte der Extraktionslösung wurde bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ für die anschließende DNA-Analyse eingefroren und die andere Hälfte für die RNA-Analyse, wie im folgenden beschrieben, präpariert.

Vor der RNA-Präparation wurde DEPC-Wasser (DEPC Diethylpyrocarbonate) für eine RNase freie Extraktion angesetzt (Blumberg, 1987). Zu diesem Zweck wurden alle für die Extraktion verwendeten Glaswaren bei $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ für sieben Stunden mit einem Ofen (Heraus Instruments, Hanau) sterilisiert. In einer 1 L Flasche wurden 999 ml ddH₂O mit 1 ml DEPC gefüllt und die geschlossene Flasche bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ für vier Stunden geschüttelt. Anschließend wurde die Lösung bei $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 3 bar Überdruck für 30 Minuten in einem Autoklaven (CertoClav CV-EL 10 L, Traun, Österreich) unter dem Abzug autoklaviert.

Für die Präparation von RNA aus dem Nukleinsäureextrakt wurden zu $25\text{ }\mu\text{l}$ Extrakt $1 \times$ DNase Puffer (Promega), 5 U RQ1 RNase freie DNase (Promega), 200 U RNasin (Promega) hinzugefügt und mit DEPC-H₂O auf ein finales Volumen von $100\text{ }\mu\text{l}$ ergänzt. Das Reaktionsgemisch wurde bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 30 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von $60\text{ }\mu\text{l}$ Chloroform gestoppt und die RNA wie im vorangehenden Absatz beschrieben präzipitiert. Um Kontaminationen von koextrahierter DNA auszuschließen, wurden alle RNA-Extrakte mit einer PCR (siehe Kapitel 3.6.4) getestet und anschließend für die RT-PCR (siehe Kapitel 3.6.5) verwendet. Die Lagerung der Extrakte erfolgte bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.6.2 Extraktion von Nukleinsäuren aus Isolaten

Für die Extraktion der Nukleinsäuren aus den Isolaten (Details zur Isolation siehe in Kapitel 3.7) wurde ein kombiniertes Verfahren eines chemischen und physikalischen Zellaufschlusses durchgeführt.

Jedes Isolat wurde mit einer Impföse steril in ein Reaktionsgefäß mit 200 µl ¼ Ringerlösung (12 mM NaCl; 0,6 mM KCL; 0,2 mM CaCl × 6 H₂O; 0,2 mM NaHCO₃), 100 µl SDS-Lösung (10 % SDS [w/v]; 0,5 M Tris-HCl [pH 8,0]; 0,1 M NaCl) und 0,2 g Glasperlen (Durchmesser von 0,16-0,18 mm) überführt. Anschließend wurde das Gemisch bei 2500 UpM mit einer Zelmühle (Fast Prep™ FP) für eine Minute geschüttelt, in flüssigem Stickstoff gefroren und zehn Minuten bei 100 °C gekocht. Das Gemisch wurde ein weiteres Mal gefroren und gekocht, um im nächsten Schritt bei 13000 × g, 4 °C zentrifugiert zu werden. Mit dem Überstand wurde, wie im vorherigen Kapitel beschrieben, eine Präzipitation durchgeführt.

3.6.3 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Untersuchung der mittleren Molekülgröße sowie für eine Abschätzung der Menge extrahierter Nukleinsäuren wurde die Agarose-Gelelektrophorese angewendet. Da DNA- und RNA-Moleküle eine ähnliche Konformation und im Verhältnis zu ihrer Masse annähernd die gleiche Ladungsmenge besitzen, lassen sich unterschiedliche Molekülgrößen in einem elektrischen Feld auftrennen. Aliquots der Nukleinsäureextrakte, PCR-, RT-PCR und Real Time-PCR Produkte wurden mit 0,2 Volumen Auftragspuffer (40 % [v/v] Saccharose, 0,25 % [v/v] Bromphenolblau, 0,25 % [v/v] Xylencyanol FF) versetzt und auf ein 1 %iges TAE-Agarosegel (1 g Agarose in 100 ml [40 mM Tris-HCl [pH 8,0]; 8,3 mM Essigsäure; 1 mM EDTA]) aufgetragen. Als Größen- und Mengenstandard für DNA-Fragmente wurde parallel ein Größen-Marker (SmartLadder, Eurogentec, München) aufgetragen. Die extrahierte RNA-Menge wurde mit einem *E. coli* rRNA-Standard (Roche Diagnostics, Mannheim) abgeschätzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 120 V für eine Stunde in einer Elektrophoreseapparatur mit einem Gleichstromtransformator (Power Pac 300, Biorad Laboratories GmbH, München). Das Gel wurde danach für 15 Minuten in einer ethidiumbromidhaltigen Lösung inkubiert. Die gefärbten DNA- und RNA-Banden wurden unter UV-Licht fluoreszierend angeregt und mit einer digitalen Kamera (Gel Jet Imager, Infas, Göttingen) dokumentiert.

3.6.4 Amplifikation der 16S rDNA

Für die Analyse der mikrobiellen Gemeinschaft in den Bodenkernen wurden Abschnitte von ihren 16S rRNA-Genen durch die PCR-Technik (PCR = Polymerase chain reaction; Polymerase Kettenreaktion) amplifiziert. Für die Amplifikation der bakteriellen 16S rDNA wurde das Oligonukleotid-Primerpaar 27f* und 907r für die anschließende T-RFLP Analyse verwendet, während für die Erstellung von Klonbibliotheken das Primerpaar 27f und 1492r genutzt wurde. Die Amplifizierung von 16S rDNA der archaealen Gemeinschaft wurde mit dem Primerpaar A109f und A934r* durchgeführt (Tab. 1).

Die Amplifikation der 16S rDNA aus den Nukleinsäureextrakten erfolgte stets in einem Gesamtvolumen von 100 μ l. Die Reaktionsmischung enthielt 1 μ l der jeweiligen Matrizen-DNA, 1 \times PCR-Reaktionspuffer (Invitrogen, Karlsruhe), 4 mM $MgCl_2$ (Invitrogen), 50 μ M jedes Desoxynukleosidtriphosphates (PeqLab), 0,3 μ M jedes Primers (MWG-Biotech, Ebersberg) und 2,5 U *Taq*-Polymerase (Invitrogen). Als Negativkontrolle wurde in einem Reaktionsansatz statt Matrizen-DNA ddH₂O verwendet. Zur Minimierung von Inhibitionseffekten wurden die Nukleinsäureextrakte in einer 50 fachen Verdünnung in die PCR eingesetzt. Die Amplifikation der bakteriellen 16S rDNA erfolgte in einem Thermocycler (Primus 25; MWG) mit folgendem Temperaturprofil: Zwei Minuten initiale Denaturierung bei 94 °C, 28 Zyklen bestehend aus jeweils 30 Sekunden Denaturierung (94 °C) und 45 Sekunden Primer-Anlagerung (48 °C) sowie 90 Sekunden Extension (72 °C), und einer abschließenden Extension von sieben Minuten bei 72 °C. Die Amplifikation der archaealen 16S rDNA erfolgte in dem gleichen Thermocycler (Primus 25; MWG) mit folgendem Temperaturprofil: Zwei Minuten initiale Denaturierung bei 94 °C, 35 Zyklen bestehend aus jeweils 30 Sekunden Denaturierung (94 °C) und 45 s Primer-Anlagerung (48 °C) sowie 90 Sekunden Extension (72 °C), und einer abschließenden Extension von sieben Minuten bei 72 °C. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden mit QIAquick™-Säulen (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben gereinigt und bei 4 °C gelagert.

Tabelle 1: Verwendete Oligonukleotid-Primer zur Amplifikation der 16S rRNA-Genen von *Bacteria* und *Archaea*.

Primer	Sequenz (5' → 3')	Referenz
27f*	GAG TTT GAT C[C/A]T GGC TCA G	Edwards <i>et al.</i> (1989)
343f	TAC GGG A[G/C]G CAG CAG	Lane (1991)
519f	CAG C[A/C]G CCG CGG TAA [G/A/T/C][A/T]G	Stubner <i>et al.</i> (2002)
907r	CCG TCA ATT C[A/C]T TT[A/G] AGT TT	Muyzer <i>et al.</i> (1993)
1100r	AGG GTT GCG CTC GTT G	Lane (1991)
1492r	TAC GG[C/T] TAC ATT CTT TT[A/G] AGT TT	Lane (1991)
A109f	AC[G/T] GCT CAG TAA CAC GT	Großkopf <i>et al.</i> (1998)
A934r*	GTG CTC CCC CGC CAA TTC CTT TA	Lüders und Friedrich (2002)

* Dieser Primer wurde in der T-RFLP-Analyse mit einer 5' 6-carboxyfluorescein-Markierung (FAM) eingesetzt.

f: Vorwärtsprimer, r: Rückwärtsprimer

3.6.5 Amplifikation der 16S rRNA

Die Amplifikation der 16S rRNA wurde mit dem Promega Quick AccessTM RT-PCR system (Promega) in einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt. Mit diesem System wird in einem Reaktionszyklus die RNA zu cDNA (cDNA Kopie der RNA-Matrize als DNA) transkribiert und darauf im gleichen Ansatz amplifiziert. Für die Amplifikation wurde zuvor entweder das Oligonukleotid-Primerpaar 27f* und 907r für eine anschließende T-RFLP-Analyse (Tab. 1) oder das gleiche Primerpaar ohne FAM-Markierung für die Erstellung von Klonbibliotheken in der RT-PCR-Reaktion eingesetzt. Zur Minimierung von Inhibitionseffekten wurden die Nukleinsäureextrakte in zehnfacher Verdünnung in die RT-PCR verwendet.

Die Reaktionsmischung enthielt 1 µl der jeweiligen Matrizen-RNA, 25 µl PCR-Reaktionspuffer (Promega), und 1 µl M-MLV Reverse Transkriptase RNase H minus (Promega). Die Amplifikation erfolgte in einem Thermocycler (Primus 25; MWG) mit folgendem Temperaturprofil: 45 Minuten Transkription der RNA zu cDNA bei 48 °C, zwei Minuten initiale Denaturierung bei 94 °C, 18 Zyklen bestehend aus jeweils 30 Sekunden Denaturierung (94 °C) und 45 Sekunden Primer-Anlagerung (48 °C) sowie 90 Sekunden Extension (72 °C), und einer abschließenden Extension von sieben Minuten bei 72 °C. Die PCR-Amplifikate wurden mit QIAquickTM-Säulen (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

3.6.6 Quantitative Amplifikation durch Real-Time PCR

Für die Quantifizierung der 16S rDNA aus den Nukleinsäureextrakten wurde die Real-Time PCR-Methode verwendet. Das Messprinzip dieser kinetischen PCR beruht auf der Aufnahme der Amplikon-Kinetik mittels Fluoreszenzmessung (Raeymaekers, 2000). Für alle Messungen wurde das Oligonukleotid-Primerpaar 519f und 907r (Tab.1) verwendet.

Die Quantifizierung der 16S rDNA aus den Nukleinsäureextrakten erfolgte stets in 96-Well-Mikrotiterplatten (PeqLab) mit einem Gesamtvolumen von 40 µl. Die Reaktionsmischung enthielt 1 µl der jeweiligen Matrizen-DNA, 1 × PCR-Reaktionspuffer (Invitrogen), 4 mM MgCl₂ (Invitrogen), 50 µM jedes Desoxynukleosidtriphosphates (PeqLab), 0,3 µM jedes Primers (MWG-Biotech, Ebersberg), 0,4 µl Sybergreen I (500 fach verdünnt in ddH₂O) (Bio Whitakker Molecular Applications, USA) und 5 U Platinum *Taq*-Polymerase (Invitrogen). Jede Nukleinsäureextrakt Messung wurde dreimal jeweils in den Verdünnungen 1:10, 1:100 und 1:1000 gemessen, um Inhibierungs- und Verdünnungseffekte zu vermeiden. Für die Echung der Real-Time PCR-Messung wurde für jede Quantifizierung ein *E. coli* DNA-Standard (Roche Diagnostics) in einer dreifachen Verdünnungsreihe verwendet.

Vor einer Messung musste die Kalibrierung des optischen Systems der Real-Time-Gerätes vollzogen werden. Für diesen Zweck wurde eine 96-Well-Mikrotiterplatte (PeqLab) mit 40 µl Fluorescein-Lösung (0,5 µM Fluorescein [w/v]) (Calibrationdye, Biorad) je Reaktionsgefäß verwendet. Die Amplifikation erfolgte in einem Thermocycler (iCycler IQ; Biorad) mit folgendem Temperaturprofil: Zwei Minuten initiale Denaturierung bei 94 °C, 50 Zyklen bestehend aus jeweils 20 Sekunden Denaturierung (94 °C) und 20 Sekunden Primer-Anlagerung (50 °C) sowie zwei Minuten Extension (72 °C).

Während des Extensionsschrittes wurden die Amplifikationsdaten in Form von Sybergreen I gefärbter, doppelsträngiger DNA von dem optischen System aufgenommen. Diese Datenaufnahme und ihre Auswertung erfolgte über das Programm iCycler IQ Optical System Software (Version 3,0a; Biorad). Durch die Beziehung der gemessenen Fluoreszenz jeder Reaktion zur Zyklenzahl konnte der C_T-Wert (Threshold Cycle) nach Raeymarkers (1993) berechnet werden. Dieser Wert ist definiert als die Zyklenzahl, bei der die Fluoreszenz der Reaktion eine definierte Hintergrundfluoreszenz übersteigt. Die Daten wurden in das Programm Excel (Version 7,0; Microsoft, Berlin) exportiert und bearbeitet. Die Quantifizierungsergebnisse der 16S rDNA wurden in einer linearen Funktion zu den

Verdünnungsreihen des DNA-Standards gesetzt. Die Beziehung zwischen dem C_T -Wert einer Reaktion und der Menge an 16S rDNA konnte anhand einer lineare Regression berechnet werden:

$$\log C = m \times \log C_T + b \quad [4]$$

Wobei m die Steigung, C_T der Thresholdcycle; b der Achsenabschnitt; C die Menge an 16S rDNA pro Reaktion war.

Für einen Konzentrationswert der 16S rDNA in einem Nukleinsäureextrakt wurde drei Replikate einer Verdünnung gemittelt.

3.6.7 T-RFLP Analyse

Um die Gesamt-Komplexität mikrobieller Lebensgemeinschaften erfassen zu können, wurden molekulare Fingerprintmuster mittels der T-RFLP (Liu *et al.*, 1997) erstellt. Die TRFLP-Analyse basiert auf einer Restriktion von PCR-Produkten, die durch am 5'-Ende mit 6-carboxyfluorescein markierten Primer amplifiziert worden sind. Diese Markierung befand sich bei *Bacteria* spezifischen Primern an dem Vorwärts-Primer 27f*, während bei *Archaea* spezifischen Primern der Rückwärts-Primer A934r* markiert wurde (Tab. 1). Je nach Sequenztyp der amplifizierten 16S rDNA schneidet die Restriktionsendonuklease spezifisch in verschieden lange Fragmente, die jeweils für einen Genotyp bzw. einer Gruppe von Genotypen charakteristisch sind.

Der Restriktionsansatz enthielt ca. 100 ng gereinigtes *Bacteria*-PCR-Produkt, 1 µl Inkubationspuffer und 10 U des Restriktionsenzym *MspI* (Promega) mit der Erkennungssequenz $C\uparrow CGG$ in einem Reaktionsvolumen von 10 µl. Der Ansatz wurde für drei Stunden bei 37 °C in einem Heizblock inkubiert. Der Restriktionsansatz der *Archaea*-PCR-Produkte enthielt ca. 40 ng, 1 µl Inkubationspuffer und 10 U des Restriktionsenzym *TaqI* (Invitrogen) mit der Erkennungssequenz $T\uparrow CGA$ in einem Reaktionsvolumen von 10 µl. Dieser Ansatz wurde für drei Stunden bei 65 °C inkubiert. Von den Restriktionsansätzen wurde ein Aliquot von 2,5 µl (bei Umweltproben) bzw. 1 µl (bei Klonen oder Reinkulturen) mit 1,7 µl Formamide Loading Dye (Amersham Bioscience, Freiburg) und 0,8 µl des internen Längenstandards GeneScan™ - 2500 ROX™ Size Standard (Applied Biosystems, Weiterstadt) vermischt, für drei Minuten bei 95 °C im Heizblock denaturiert und bis zum Auftrag auf das 6 % Polyacrylamidgel (nach Angaben des Herstellers Applied Biosystems) auf Eis gekühlt. Als Laufpuffer wurde 1 × TBE (89 mM Tris-HCl; 89 mM Borsäure; 2 mM EDTA, [pH 8,5]) verwendet. Nachdem die Proben auf das Gel aufgetragen waren, wurde die Elektrophorese in dem ABI Prism 373

DNA Sequenzierer (Applied Biosystems) im GeneScan Modus mit 2500 V, 30 W, 40 mA und einer Laufzeit von acht Stunden durchgeführt. Während der Elektrophorese wurden die Fluoreszenzsignale des PCR-Produktes von dem Laser detektiert und an einen Rechner weitergeleitet. Die Daten wurden mit dem Programm GeneScan Analysis Software (Version 2.1; Applied Biosystems) ausgewertet. Anhand der Laufeigenschaft des Längenstandards konnten die fluoreszierenden PCR-Fragmente zu einer definierten T-RF Fragmentlänge verrechnet werden. Die Software ermöglicht neben der Fragmentgrößenbestimmung auch die Quantifizierung durch Integrierung des Fluoreszenzsignals eines Fragmentes (ausgedrückt in Höhe und Fläche der jeweiligen T-RFs). T-RFs mit einer Länge ≤ 50 bp wurden grundsätzlich von weiteren Analysen ausgeschlossen, da diese kurzen Fragmente von unspezifischen doppelsträngigen Nebenprodukten (Primerdimeren) überlagert werden konnten. Für die weitere statistische Auswertung wurde ausschließlich die Peakhöhe der T-RFs verwendet, da die Peakfläche bei vielen Peaks mit ähnlich großen T-RF Längen überlappten.

Das von Egert und Friedrich (2003) beschriebene Phänomen der PCR-abhängigen Artefakte („Pseudo-T-RFs“) wurde auf 16S rRNA- und 16S rDNA-Ebene für Nukleinsäureextrakte aller Tiefenzonen nach einer Inkubationszeit der Bodenkerne von sechs Stunden und von 42 Tagen getestet. Hierzu wurde die in Kapitel 3.6.4 beschriebene Amplifikation der 16S rDNA mit 25, 28, 45 Zyklen und die 16S rRNA-Amplifikation, die detailliert in Kapitel 3.6.5 beschrieben wurde, mit 14, 18, 32 Zyklen jeweils mit dem Primerpaar 27f* und 907r (Tab. 1) durchgeführt. Die gereinigten PCR-Produkte wurden mit 5 U Mung bean-Nuklease (New England Biolabs) bzw. 5 U S1-Nuklease (New England Biolabs) und jeweils 1 \times Reaktionspuffer behandelt, die Reaktion durch eine Chloroform-Extraktion gestoppt und die DNA, wie in Kapitel 3.6.1 beschrieben, präzipitiert. Das Spaltungsprodukt wurde mit QIAquick™-Säulen (Qiagen) aufgereinigt und wie bereits im oberen Abschnitt beschrieben für die T-RFLP Analyse weiter verwendet.

3.6.8 Erstellung von Klonbibliotheken

Um die Diversität der bakteriellen Lebensgemeinschaft zu analysieren, wurden 17 Klonbibliotheken erstellt. Die Klone der acht 16S rRNA-Bibliotheken sind durch das Präfix cD (= copy DNA) und die neun 16S rDNA-Bibliotheken durch das Präfix D (=DNA) gekennzeichnet. Die nachfolgende Nummerierung des Klons gibt die Probenentnahme innerhalb der zeitlichen Entwicklung und der räumlichen Zonierung wieder, aus dem die Umwelt-DNA des Klons extrahiert wurde (Tiefe in mm – Inkubationszeitpunkt in Stunden oder Tagen – Klonnummer).

Die Amplifikate (siehe Kapitel 3.6.4 und 3.6.5), die zuvor mit QIAquick™-Säulen (Qiagen) gereinigt worden waren, wurden nach Herstellerangaben mit dem TOPO TA Cloning kit™ (Invitrogen) ligiert und anschließend in hochkompetente *E. coli* JM109 Zellen (Invitrogen) transformiert. Der Ligationsansatz wurde auf selektiven LB-Nährmedien (40 µg Kanamycin, 10 mg [w/v] X-Gal, 1 mM IPTG) ausplattiert, und rekombinante Klone über das „Blau-Weiß-Verfahren“ selektiert. Die erfolgreich transformierten weißen Klone wurden für zehn Minuten bei 100 °C lysiert und 1 µl dieser Lösung in eine PCR mit Vektor spezifischen Primern (Tab. 2) eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte in einem Thermocycler (Primus 25; MWG) mit dem folgenden Temperaturprofil: Zwei Minuten initiale Denaturierung bei 94 °C, 25 Zyklen bestehend aus jeweils 45 Sekunden Denaturierung (94 °C) und eine Minute Primer-Anlagerung (55 °C) sowie zwei Minuten Extension (72 °C) und einer abschließenden Extension von sieben Minuten bei 72 °C. Das erhaltene PCR-Produkt wurde mit QIAquick™-Säulen (Qiagen) nach Herstellerangaben gereinigt und bei 4 °C gelagert.

Tabelle 2: Verwendete Oligonukleotid-Primer zur Amplifikation von DNA-Fragmenten im Vektor pcR 2.1 TOPO®.

Primer	Sequenz (5' → 3')	Referenz
T7f	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	Invitrogen
M13r	CAG GAA ACA GCT ATG AC	Invitrogen

f: Vorwärtsprimer, r: Rückwärtsprimer

3.6.9 Sequenzanalyse

Um T-RFs einer möglichen phylogenetischen Gruppe zuzuordnen zu können, wurde eine vergleichende Sequenzanalyse der klonierten Nukleinsäuren (siehe Kapitel 3.6.8) durchgeführt. Außerdem lässt diese Analyse die phylogenetische Einordnung der Isolate (siehe Kapitel 3.7) zu.

Der Reaktionsansatz bestand aus ca. 75 ng gereinigter amplifizierter Matrizen-DNA, 0,1 µM eines geeigneten Sequenzierprimers (Tab. 1) und 3 µl BigDye Reaction Mix (Applied Biosystems). Die zyklische Sequenzierung erfolgte in einem Thermocycler (Primus 25; MWG) mit folgendem Temperaturprofil: Zwei Minuten initiale Denaturierung bei 94 °C, 25 Zyklen bestehend aus jeweils zehn Sekunden Denaturierung (94 °C) und fünf Sekunden Primer-Anlagerung (48 °C) sowie vier Minuten Extension (72 °C) und einer abschließenden Extension von sieben Minuten bei 72 °C. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch über AutoSeq G50 (Amersham) gereinigt, im Vakuum getrocknet, in 2 µl Formamid Loading Dye (Amersham) resuspendiert, drei Minuten bei 95 °C denaturiert und auf einem 4,8 % PAGE-Plus Gel (nach Angaben des Herstellers Applied Biosystems) aufgetragen. Als Laufpuffer wurde 1 × TBE verwendet. Die elektrophoretische Sequenzanalyse erfolgte auf einem ABI Prism 377 DNA Sequenzierer (Applied Biosystems) im GeneScan Modus (3000 V, 40 W, 60 mA; Laufzeit: 18 Stunden).

3.7 Isolierung von repräsentativen Bakterienstämmen aus den Bodenkernen

Für die aerobe Isolation von repräsentativen Vertretern der bakteriellen Lebensgemeinschaft der frühen und späten Inkubationsphase wurden jeweils drei Bodenkerne für ein bzw. 70 Tage inkubiert. Von jedem Bodenkern wurde die obere, oxische Bodenschicht abgehoben und in 10 ml ¼ Ringerlösung suspendiert. Von der Suspension wurde eine Verdünnungsreihe bis 10^9 in ¼ Ringerlösung mit jeweils einem Gesamtvolumen von 10 ml angelegt. Auf zwei Komplexmedien NA (Nutrient Agar = Nähragar) (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA) und R2A (Difco), mit jeweils zwei Nährmedienkonzentrationen (unverdünnt und 1:100), wurden jeweils 100 µl von allen Stufen der Verdünnungsreihe in drei Replikaten ausplattiert. Die unverdünnten Nährmedien wurden nach Herstellerangaben verwendet, während bei den 1:100 verdünnten Nährmedien 15 g Agar-Agar (Difco) hinzugefügt wurden. Die Nährmedien wurden mit Salzsäure (2 M) auf einen pH-Wert von 6,0 eingestellt.

Das Wachstum auf allen Nährmedien wurde mit dem Koloniezählverfahren ein, zwei, drei, sieben, zehn, 15, 18, 21, 26, 32, 69 und 115 Tage nach dem Ausplattieren dokumentiert. Dazu wurden die Kolonien der verschiedenen Verdünnungsstufen ausgezählt und die kolonienbildenden Einheiten (CFU, „colony forming units“) bzw. Zellzahlen pro g Trockengewicht (TG) des Bodens mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{CFU}{TG} = \frac{C \times 10^{-a}}{(V \times B)} \quad [5]$$

Wobei TG das Trockengewicht, CFU die kolonienbildenden Einheiten, C die gezählten Bakterienkolonien, a die Verdünnungsstufe, V das ausplattierte Suspensionsvolumen und B die eingesetzte Bodenmenge war.

Für einen Zellzahlwert von einem Komplexmedium mit einer Medienkonzentration wurden die drei Replikate jedes Bodenkerns gemittelt. Diese Mittelwerte wurden mit den Mittelwerten der beiden weiteren Bodenkerne gemittelt, so dass das Ergebnis eines Zellzahlwertes aus neun Zählungen bestand.

3.7.1 Lagerung von Isolaten und rekombinanten Klonen

Für eine dauerhafte Lagerung der Isolate und der rekombinanten Klone wurden Stammkulturen angelegt. Es wurden in einem 2 ml Reaktionsgefäß 800 µl einer frischen LB-Flüssigmedium-Übernachtskultur (40 µg Kanamycin) bei Klonen bzw. das jeweilige, angewachsene Flüssigmedium des Isolates zu 800 µl Glycerinpuffer (56 % [v/v] Glycerin; 100 mM MgSO₄; 25 mM Tris-HCl, [pH 8,0]) gegeben, kurz geschüttelt und in Flüssigstickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei – 80 °C. Für ein erneutes Wachstum wurde mit einer sterilen Impföse ein Teil der gefrorenen Kultur abgenommen, und auf einer LB-Kanamycin-Agarplatte vereinzelt.

Da bei den Isolaten nur wenige Stamkulturen wieder wachsen konnten, wurden zu allen Isolaten Schrägagarkulturen angelegt. Hierzu wurde entweder das Nährmedium NA (Difco) oder R2A (Difco), je nachdem von welchem Medium das Isolat kultiviert worden war, in einer Konzentration von 1:100 verwendet. Diese wurden bei 4 °C gelagert und alle 2 Monate in frische Schrägagarkulturen überführt.

3.8 Bestimmung der absoluten Zellzahl

Um die absoluten Zellzahlen in den Bodenkernen, die für die Isolation von repräsentativen Mikroorganismen verwendet wurden (siehe Kapitel 3.7), zu bestimmen, wurden mikroskopische Zählungen durchgeführt. Für die Bestimmung der absoluten Zellzahlen ein und 70 Tagen nach Flutung der Bodenkern wurden die Zellen in der Bodenprobe nach einer Standardmethode von Perntaler *et al.* (2001) mit 3 % Paraformaldehyd in PBS (130 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄/ NaH₂PO₄ [pH 7,4]) fixiert. Die fixierten Zellen wurden durch eine Vakuumfiltrationseinheit (Schleicher & Schuell, Dassel) gleichmäßig auf einen 0,2 µm Filter (Nuclepore[®] Polycarbonate; Whatman, Kent, England) verteilt. Dieser Filter wurde mit jeweils 5 ml ddH₂O, 50 % Ethanol und 80 % Ethanol gereinigt und entwässert. Anschließend wurde die genomische DNA der auf dem Filter fixierten Zellen mit 100 µl DAPI-Lösung (48 µg 4',6-Diamidino-2-phenylindoldhydrochlorid [DAPI] [w/v]) gefärbt. Der getrocknete Filter wurde auf einen Objektträger transferiert, mit 20 µl Anti-Fading Agens (AF1, Citifluor, London) versetzt und mit einem Deckglas bedeckt. Die Zählungen wurden jeweils von drei Proben von drei parallelen Bodenkernen mittels Mikroskop (Leica DMR XE, Type TCS NT, Leica Microsystems AG, Heidelberg) bei 850-facher Vergrößerung durchgeführt. Während des Mikroskopierens wurden die DAPI-gefärbten Zellen unter ultraviolettem Licht zur Fluoreszenz angeregt und gezählt. Die Zählung erfolgte in 20 Rasterfeldern pro Messung durch ein gerastertes Okular. Die Längen des Rasters wurden durch einen Längenstandard (Wild, Heerburgg; Schweiz) bestimmt. Die drei Replikatzählungen von einem Bodenkern wurden gemittelt. Die angegebenen Zellzahlen beziehen sich auf 1 g Trockengewicht des inkubierten Bodenkernbodens.

3.9 Sequenzanalyse und phylogenetische Rekonstruktion

Die 16S rDNA Sequenzen wurden als Elektropherogramme in das Programm Seqman (DNASTAR, Madison, USA) importiert. Mit Seqman wurde die Qualität der Sequenzen überprüft, gegebenenfalls Vektorsequenzabschnitte und Primersequenzen entfernt, Teilsequenzen zusammengesetzt und fehlerhafte Bereiche editiert. Alle Sequenzen wurden auf chimäre Strukturen mit dem Onlinetool „Chimera-Check“ (RDP II; <http://rdp.cme.msu.edu/html>) überprüft. Die 16S rRNA- und 16S rDNA-Klonsequenzen wurden mit den „Accession“-Nummern von AJ617831 bis AJ617920 öffentlich hinterlegt, während die

16S rDNA-Sequenzen der Isolate für eine Veröffentlichung vorgesehen sind und zu dem Veröffentlichungszeitpunkt ebenfalls öffentlich hinterlegt werden.

Die erhaltenen Sequenzen wurden für eine erste phylogenetische Zuordnung mit öffentlich zugänglichen Sequenzen (z.B. NCBI [National Center for Biotechnology Information]; URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) verglichen. Die nächst verwandten Sequenzen wurden aus dem Internet gespeichert und in eine eigene 16S rRNA-Datenbank innerhalb des ARB Software Paketes (Version 2,5 b; erhältlich unter URL: <http://www.arb-home.de>; Strunk *et al.* [1998]) importiert. Für die phylogenetische Einordnung der Sequenzen und ihrer Verwaltung wurde das ARB Software Paket mit dem 16S rRNA-Datensatz von Juni 2002 (Last update Juni 2002 mit 24000 Sequenzen; ebenfalls erhältlich unter URL: <http://www.arb-home.de>) verwendet. Importierte Sequenzen wurden mit dem Fast Aligner (Version 1.03) in ein ARB spezifisches Alignment gebracht, d.h. homologe Nukleotide wurden untereinander in Spalten angeordnet. Das Alignment wurde manuell überprüft und gegebenenfalls korrigiert. Die Sequenzen wurden unter „Maximum Parsimony“-Kriterien in einen bestehenden Übersichtsbaum eingerechnet (Ludwig *et al.* 1998). Für diese Integration wurden die allgemeinen Basenfrequenzfilter (*gap_99_Bacteria_may02*) für *Bacteria* verwendet, die in der ARB-Software enthalten sind. Der Konsensusfilter ist für eine Gewichtung der unterschiedlichen 16S rRNA Bereiche notwendig, so dass hochkonservierte Bereiche der 16S rRNA Abschnitte für die Berechnung berücksichtigt werden, während variable Bereiche ausgeschlossen werden. Die Berechnung von Distanzmatrizen zwischen den Klonsequenzen bzw. den Sequenzen der isolierten Bakterien und charakterisierten und kultivierten Bakterien erfolgte innerhalb der „Neighbor joining“ Funktion. Als Korrekturfaktor wurde nach Felsenstein (1981) ein 50 %-Basenfrequenzfilter mit den wichtigsten bakteriellen Gruppen des zu berechnenden Baums erstellt und für die phylogenetische Rekonstruktion verwendet.

Um die phylogenetische Zuordnung in kleineren Übersichts bäumen darstellen zu können, wurden Dendrogramme mit ausgewählten Sequenzen mit der Software Tree-Puzzle (Version 5.0; erhältlich unter URL: <http://www.tree-puzzle.de>; Schmidt *et al.* [2002], Strimmer *et al.* [1996]) berechnet. Für die Berechnung wurde stets das Schöniger-von-Haesler-Modell von 1994 (Schöniger und von Haesler, 1994) mit einer phylogenetischen Außengruppe der 16S rDNA-Sequenz von *Aquifex pyrilus* verwendet. Tree-Puzzle basiert auf einem Maximumlikelihood-Verfahren. Dabei werden zuerst die optimalen Maximumlikelihood-Werte von Spezies-Quartetten berechnet. Im folgenden „puzzling“-Schritt werden einige tausend Dendrogramme rekonstruiert und die Übereinstimmungen der jeweiligen

Dendrogramme in einem Konsensusbaum zusammengefasst. Alle phylogenetischen Bäume wurden mit mindestens 10000 „puzzling“-Schritten berechnet. Die Häufigkeit der Knotenübereinstimmungen wurde in Tree-Puzzle-Unterstützungswerten angegeben, während Werte unter 50 als Mehrfachverzweigung dargestellt wurden. Die Topologien dieser Bäume wurden mit der Software FastDNA-ML (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/fastdnaml.html>; Olsen *et al.* [1994]) überprüft. Die endgültige grafische Darstellung und Formatierung der Dendrogramme wurde mit der Software Adobe Illustrator (Version 10; Adobe Systems Direct Ltd., Edinburgh, UK) durchgeführt.

3.10 Statistische Methoden

3.10.1 Statistische Auswertung der T-RFLP-Ergebnisse

Aus drei unabhängigen Bodenkernen wurden zu elf Inkubationszeitpunkten in jeweils vier räumlichen Zonen T-RFLP-Analysen durchgeführt, so dass mit 132 Profilen sowohl auf 16S rRNA und als auch auf 16S rDNA-Ebene zwei Datensätze generiert wurden. Vor der statistischen Auswertung wurden gering abundante TRFs (sog. Datenrauschen) mit der Formel [6] aus dem Gesamtprofil ausgeschlossen. Alle T-RFs unter 1 % der vorläufigen relative Abundanz wurden von den weiteren Analysen entfernt. Aus den verbliebenen TRFs wurden erneut die relative Abundanzen (rA) mit der Formel [6] eines jeden individuellen T-RFs berechnet.

$$rA = \frac{n_i}{N} \times 100 \quad [6]$$

Wobei rA die relative Abundanz, n_i die T-RF-Peakhöhe des einzelnen i -ten T-RFs und N die Summe aller T-RF-Peakhöhen war.

Zur statistischen Auswertung wurde das Programm SPSS (Version10) verwendet, und die Ordination wurde mit dem Programm CANOCO (Version 4; Microcomputer Power Inc., Ithaca, USA) durchgeführt (Ter Braak und Šmilauer, 1998). Die KA (Korrespondenzanalyse) wurde benutzt, um die Varianz des T-RFLP-Datensatzes auf die Streuung der jeweiligen Proben oder T-RFs auf zwei Achsen eines Ordinationssystemes zu reduzieren. Je näher zwei Punkte in dem Korrespondenz-Ordinationsdiagramm zueinander angeordnet werden, desto ähnlicher sind die Fingerprintmuster in ihrer T-RF-Zusammensetzung und ihrer relativen Abundanz.

Um die Signifikanz der Effekte von den Faktoren Inkubationszeit und Tiefe und die Interaktion der beiden Faktoren auf die T-RFLP-Struktur zu testen, wurde ein Monte-Carlo-Permutationstest mit 1500 Permutationen durchgeführt. Dabei wurden die Variablen als erklärende Faktoren eingesetzt. Um die Effekte der beiden Faktoren unabhängig voneinander zu testen, wurde in der Analyse der jeweils andere Faktor als Kovariable verwendet. Für die Berechnung des Effektes von dem Faktor Inkubationszeit wurde der Faktor Tiefe als Kovariable verwendet, für die Berechnung des Effektes von dem Faktor Tiefe wurde der Faktor Inkubationszeit als Kovariable verwendet und für den Effekt der Interaktion der Faktoren Inkubationszeit und Tiefe wurden beide Faktoren als Kovariablen verwendet (Ter Braak and Šmilauer, 1998). Nach dem gleichen Prinzip wurde der Effekt der Faktoren Zeit und Tiefe auf die archaealen Gemeinschaft untersucht. Allerdings wurde ein zwei-faktorielles Design ohne Wiederholungen verwendet. Deshalb war der Test des Effektes der Interaktion beider Faktoren nicht möglich.

Um die Signifikanz der Effekte von den beiden Faktoren Inkubationszeit und Tiefe auf die T-RFLP-Struktur zu testen, wurde ein Monte-Carlo-Permutationstest mit 9999 Permutationen durchgeführt. Die Visualisierung der Ergebnisse der KA von der *Bacteria*-Lebensgemeinschaft und der *Archaea*-Lebensgemeinschaft wurde mit dem Programm (Version 6.1; OriginLab Corp., Northampton, USA) durchgeführt.

Für die zeitliche Einteilung der T-RFs wurde eine KKA durchgeführt, bei der die log transformierte Inkubationszeit und die Tiefe als erklärende metrische Variable eingesetzt wurden. Die Signifikanz der Variablen wurde mit einem Monte-Carlo-Permutationstest mit 1500 Replikaten getestet. Da nicht alle T-RFs einen Zusammenhang zwischen relativer Häufigkeit und der Inkubationsdauer aufwiesen, wurde ein weiteres Auswahlkriterium verwendet. Bei diesem Auswahlkriterium wurden die relative Abundanz der drei Replikate eines TRFs gemittelt und in ihrer räumlichen Zone auf eine Zeitachse aufgetragen. Im folgenden Text wurde diese Funktion als *rA*-Verteilung bezeichnet. Durch die *rA*-Verteilung einzelner TRFs konnte überprüft werden zu welchen Inkubationszeitpunkten die höchsten relativen Abundanzwerte in der jeweiligen räumlichen Zone erreicht wurden und in wie weit diese mit der zeitlichen Einteilung in der KKA übereinstimmten.

3.10.2 Diversität und Dominanzstruktur

Die Entwicklung der T-RF-Anzahl (S) und der T-RF-Äquitabilität (E) der Fingerprintmuster wurde über die Inkubationsdauer und die vier räumlichen Zonen verglichen. Die T-RF-Anzahl gibt die Gesamtanzahl von T-RFs pro Fingerprintmuster an, während die T-RF-Äquitabilität die Dominanzstruktur der T-RFs anzeigt. Die T-RF-Äquitabilität wurde folgendermaßen berechnet:

$$E = \frac{-\sum rA_i \times \ln rA_i}{\ln S} \quad [7]$$

Wobei rA_i die relative Abundanz des einzelnen i -ten T-RFs und S die T-RF-Anzahl war.

4. Ergebnisse

4.1 Sauerstoffgradient

Das vertikale Sauerstoffprofil wurde in Bodenkernen gemessen, die sechs Stunden bzw. 84 Tage in einem gefluteten Zustand inkubiert worden waren. Die Mikrosensormessungen nach einer Inkubation von sowohl sechs Stunden als auch 84 Tagen ergaben, dass die Sauerstoffkonzentration von 228,2 μM an der Flutwasser-Boden-Grenzschicht bereits ab einer Tiefe von 2 mm bis auf nicht messbare Konzentrationen abnahm (Abb. 3).

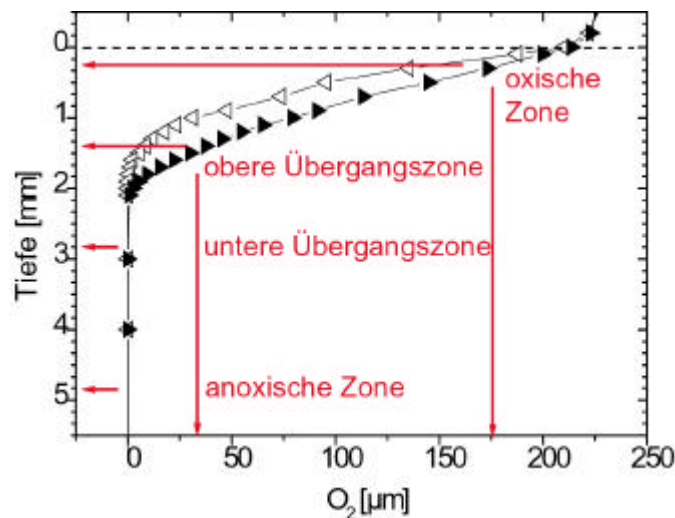


Abbildung 3: Vertikale Sauerstoffprofile von Bodenkernen, die sechs Stunden (-▶-) bzw. 84 Tage (-◁-) in einem gefluteten Zustand inkubiert wurden. Die Messungen wurden für drei unabhängige Bodenkern in drei Replikatmessungen und bei einem Bodenkern der 84 Tage-Inkubation in fünf Replikatmessungen durchgeführt. Die Datenpunkte geben die gemittelten Messwerte ($n = 9$, sechs Stunden; $n = 11$, 84 Tage) wieder. Die roten Pfeile markieren die für die molekularen Untersuchungen ausgewählten Schichten.

Anhand der Ergebnisse der Mikrosensormessungen konnten Sauerstoffzonen für eine weitere molekulare Untersuchung der Zusammensetzung der bakteriellen Lebensgemeinschaft definiert werden. Diese Sauerstoffzonen korrespondierten zu definierten Sauerstoffkonzentrationen und es wurden vier Zonen untersucht: die oxische Zone [0,2 - 0,4 mm]; die obere Übergangszone [1,4 - 1,6 mm]; die untere Übergangszone [2,8 - 3,0 mm] und die anoxische Zone [4,8 - 5,0 mm] (Abb. 3).

Die Sauerstoffkonzentration der oxischen Zone und der oberen Übergangszone unterschied sich zwischen den beiden Inkubationszeitpunkten signifikant (Abb. 4). Dagegen war die

Sauerstoffkonzentration der unteren Übergangszone und der anoxischen Zone zu beiden Inkubationszeitpunkten gleich. Die bakterielle Lebensgemeinschaft wies basierend auf den Ergebnissen der T-RFLP-Analyse zwischen der unteren Übergangszone und der anoxischen Zone in der frühen Inkubationsphase deutliche Unterschiede in ihrer Zusammensetzung auf. In der frühen Inkubationsphase wird die anoxische Zone von strikt anaeroben Mikroorganismen dominiert (siehe Kapitel 4.2.5), während die untere Übergangszone keine eindeutige Charakterisierung der physiologischen Eigenschaften der detektierten Mikroorganismen zuließ. Aus diesem Grund wurde angenommen, dass die Sauerstoffverfügbarkeit ein entscheidender Faktor für die Entwicklung der bakteriellen Gemeinschaft war. Daher werden die Begriffe „räumliches Kompartiment“ und „Sauerstoffzone“ im folgenden als Synonyme verwendet werden.

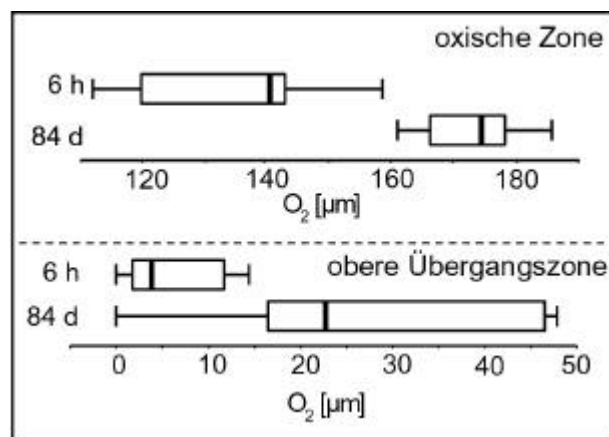


Abbildung 4: Boxdiagramme der Sauerstoffprofile der oxischen Zone und der oberen Übergangszone von Bodenkernen, die sechs Stunden bzw. 84 Tage in einem gefluteten Zustand inkubiert worden waren. Die Boxen umfassen das obere und untere Quartil und schließen den Median (schwarze Linie) ein. Die Linien vor und hinter der Box stellen die Spannweite der Messwertverteilung dar.

4.1.1 Respirationsrate

Der Sauerstoffgradient war über die Inkubationsdauer weitgehend stabil (Abb. 3). Allerdings war bei der sechs stündigen Inkubation eine stärkere vertikale Abnahme der Sauerstoffkonzentration zu verzeichnen als in der oxischen Zone und der oberen Übergangszone der 84 Tage-Inkubation (vergleiche Abb. 3 mit Abb. 4).

Die Grundlage für die Berechnung der Respirationsrate pro Bodenschicht war eine Sauerstoffkonzentration pro Zeit und ein konstanter Diffusionskoeffizient. Für die Berechnung der

Respirationsrate konnten die Sauerstoffprofile der sechs stündigen Inkubationen einem Berechnungsmodell in dem Programm PROFIL angepasst werden, bei dem die Respirationsraten als konstant zu den Bodenschichten angenommen worden waren. Die Respirationsrate betrug im Mittel $308,8 \pm 18,8 \text{ nmol O}_2 \times \text{cm}^3 \times \text{h}^{-1}$ (n=9).

Die Sauerstoffprofilmessungen nach 84 Tage Inkubation waren im Vergleich zu den Profilen nach sechs stündiger Inkubation heterogener. Vier Sauerstoffprofile wurden mit einem tiefenabhängigen Modell berechnet, während für die anderen sieben Sauerstoffprofile die Respirationsrate mit der oben angegebenen Annahme berechnet werden konnte. Für diese vier Profile wurden in der oberflächennahen Profilzone distinkt niedrigere Respirationsraten (oxische Zone; $21,7 \pm 20 \text{ nmol O}_2 \times \text{cm}^3 \times \text{h}^{-1}$) berechnet als in der tieferen Profilzone (obere Übergangszone; $141,8 \pm 31,6 \text{ nmol O}_2 \times \text{cm}^3 \times \text{h}^{-1}$). Die gemittelte Respirationsrate der 84 Tage inkubierten Bodenkerne betrug für alle elf Messungen in der oxische Zone $132,3 \pm 23,8 \text{ nmol O}_2 \times \text{cm}^3 \times \text{h}^{-1}$ und in der obere Übergangszone $181,0 \pm 16,4 \text{ nmol O}_2 \times \text{cm}^3 \times \text{h}^{-1}$.

Der Sauerstoffverbrauch des Reisfeldbodens wurde von den einzelnen Sauerstoffprofilen für beide Inkubationszeitpunkte berechnet und betrug nach sechs stündiger Inkubation $50,4 \pm 1,7 \text{ nmol O}_2 \times \text{cm}^2 \times \text{h}^{-1}$ (n=9) und war nach 84 Tagen Inkubation mit $35,9 \pm 2,1 \text{ nmol O}_2 \times \text{cm}^2 \times \text{h}^{-1}$ (n=11) geringer. Dieses Ergebnis zeigt an, dass die respiratorischen Prozesse über die Inkubationsdauer abnahmen.

4.2 Sukzession der bakteriellen Lebensgemeinschaft

In diesem Teil wird die Entwicklung der bakteriellen Gemeinschaft in den vorliegenden Sauerstoffzonen dargestellt. Aufgrund der sehr engen Korrelation zwischen den T-RFLP Datensätzen und den Daten des Kultivierungsansatzes werden bereits in diesem Teil Ergebnisse aus der Kultivierung vorverlegt und im Zusammenhang mit der T-RFLP-Analyse präsentiert. Die Überschneidung der beiden unabhängigen Datensätze betrifft die phylogenetische Zuordnung der erhaltenen 16S rRNA-Gensequenzen und der Sequenzen der Isolate. Die Beziehung zwischen den Isolaten und den Fingerprintmustern wird in den jeweiligen Abbildungen in Form der *rA*-Verteilung der korrespondierenden TRFs dargestellt. Die Isolate sowie die unterschiedlichen Kultivierungsansätze werden in Kapitel 4.3 ausführlich beschrieben.

4.2.1 T-RFLP-Analyse der bakteriellen Lebensgemeinschaften

Für die Untersuchung der bakteriellen Sukzession wurden in vier Sauerstoffzonen zu elf Inkubationszeitpunkten Nukleinsäuren aus 200 µm dicken Bodenkernschichten isoliert. Zu jedem Zeitpunkt und aus jeder Sauerstoffzone wurden aus drei unter den gleichen Bedingungen inkubierten Bodenkernen jeweils ein Nukleinsäureextrakt gewonnen.

Die Analyse der Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft in den einzelnen Extrakten wurde mittels T-RFLP-Methode durchgeführt. Die TRFLP-Analyse kann durch PCR-abhängige Artefakte, die einen Einfluß auf die T-RF-Verteilung und T-RF-Abundanz innerhalb des Gesamtprofils haben, verzerrt werden (Egert und Friedrich, 2003). Da diese Artefakte ein zyklenabhängiges Phänomen der PCR sind, kann der Effekt von solchen Artefakten durch einen Gradienten von unterschiedlich vielen Zyklen bei der PCR-Amplifikation überprüft werden. Es zeigte sich bei beiden untersuchten Inkubationszeitpunkten auf 16S rDNA-Ebene, dass die Artefakte bei einer PCR mit 45 Zyklen einen Effekt auf das Ergebnis der T-RFLP-Analyse hatte. Eine PCR mit 28 Zyklen führte zu gleichen T-RFLP-Ergebnissen wie eine PCR mit 24 Zyklen, so dass der Nachweis von Artefakten stark minimiert war. Um für alle weiteren Analysen ausreichende PCR-Produktmengen zu generieren, wurde in allen weiteren Versuchen eine PCR mit 28 Zyklen durchgeführt. Analog wurden mögliche Artefaktbildungen für die 16S rRNA-Analyse überprüft, wobei bei einer RT-PCR mit 18 Zyklen keine Artefakte nachzuweisen waren und ausreichende PCR-Produktmengen generiert wurden. Nach diesen Tests wurden für die T-RFLP-Analyse die optimierten PCR- bzw. RT-PCR-Protokolle verwendet.

Um den Einfluss der Inkubationszeit sowie der Sauerstoffkonzentration auf die Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft zu bestimmen, die sich in den Fingerprintmustern widerspiegelt, wurden zwei Verfahren angewendet. Zum einen wurden Ordinationstechniken und zum anderen die Analyse der relativen Abundanzen der einzelnen T-RFs nach ihrer zeitlichen Entwicklung (*rA*-Verteilung) verwendet. Als Ordinationstechnik wurde die KA (Korrespondenzanalyse) genutzt, da sie eine Auswertung und Visualisierung von mehrdimensionalen Kontingenztabellen ermöglicht und geringe Anforderungen an die Ausgangsdaten stellt. Mit der KA konnten die Unterschiede zwischen den einzelnen Profilen der T-RFLP-Analyse aufgedeckt und interpretiert werden. Als weitere Ordinationstechnik wurde die kanonische Korrespondenzanalyse (KKA) eingesetzt, die zusätzlich zu den Eigenschaften der KA die T-RFLP-Datensätze durch multiple Regression entlang definierter Umweltgradienten anordnet. Diese

Funktion wurde für die Zuordnung der T-RFs zu definierten Phasen der bakteriellen Sukzession verwendet.

Der Anteil in der Varianz des T-RFLP-Datensatzes, der durch die Ordinationsachsen erklärt werden kann, wird in den Eigenwerten angegeben. Die Signifikanz der Faktoren wurde mit Monte-Carlo-Permutationstests getestet. Dabei wurden die Faktoren Inkubationszeit und Sauerstoffzone als erklärende Faktoren („explanatory factors“) verwendet. Die Fingerprintmuster auf 16S rRNA- und 16S rDNA-Ebene wurden signifikant durch Inkubationszeit (16S rRNA: trace = 0,85; $p < 0,001$; 16S rDNA: trace = 0,65; $p < 0,001$) und Sauerstoffzone (16S rRNA: trace = 0,06; $p < 0,001$; 16S rDNA: trace = 0,07; $p < 0,001$) beeinflusst und zwischen den Faktoren Inkubationszeit und Sauerstoffzone bestand eine signifikante Interaktion (16S rRNA: trace = 0,22; $p < 0,001$; 16S rDNA: trace = 0,19; $p < 0,001$). Die trace-Werte deuten darauf, dass der Effekt der Inkubationsdauer auf die Fingerprintmuster der 16S rRNA-Ebene einen größeren Einfluss hatten als auf die Fingerprintmuster der 16S rDNA-Ebene, während der Effekt der Sauerstoffzone sich nicht zwischen der rRNA- und der rDNA-Ebene unterschied.

Um die Reproduzierbarkeit der TRFLP-Analysen zu testen, wurde die Variation der Eigenwerte zwischen KKA und KA verglichen. Die Eigenwerte der ersten beiden Achsen der KKA waren kaum geringer als die der KA. (16S rDNA-Ebene, erste Achse 0,32 vs. 0,35, zweite Achse 0,11 vs. 0,14; 16S rRNA-Ebene, erste Achse 0,33 vs. 0,38, zweite Achse 0,21 vs. 0,23). Die geringe Reduktion der Eigenwerte der KKA im Vergleich zu den Werten der KA deutet auf eine geringe Variation zwischen den Extrakten der drei individuellen Bodenkernen hin.

Bei der KA werden die einzelnen Fingerprintmuster als farbige Symbole in einem zwei-dimensionalen Ordinationsdiagramm anhand ihrer Ähnlichkeiten angeordnet (Abb. 5). Je kürzer die Distanz zwischen zwei farbigen Symbolen im zwei-dimensionalen Ordinationsdiagramm ist, um so ähnlicher sind die beiden zu vergleichenden bakteriellen Lebensgemeinschaften in ihrer T-RF-Verteilung und T-RF-Abundanz. Die zeitliche Entwicklung der bakteriellen Gemeinschaft wurde, wie unten beschrieben, in vier Phasen gegliedert, um die bakterielle Sukzession und deren Zuordnung zu charakteristischen bakteriellen Taxa gezielt ansprechen zu können.

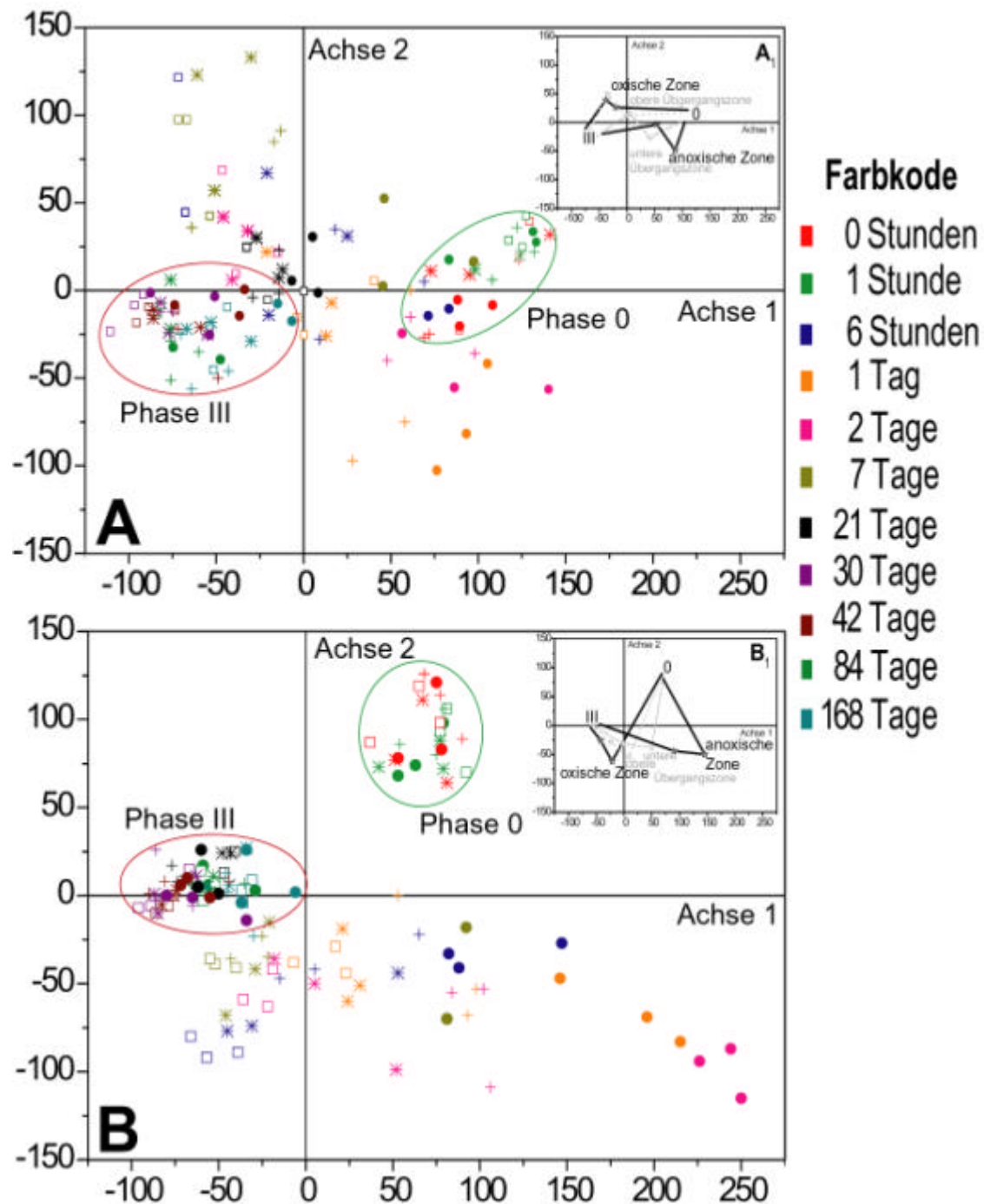


Abbildung 5: Korrespondenzanalyse (KA) der bakteriellen Fingerprintmuster auf 16S rDNA- (A) und 16S rRNA-Ebene (B). Die Ordinationsdiagramme basieren auf der ersten und zweiten Achse der KA mit den Eigenwerten $\lambda_1 = 0.35$, $\lambda_2 = 0.14$ auf 16S rDNA-Ebene und $\lambda_1 = 0.38$, $\lambda_2 = 0.23$ auf 16S rRNA-Ebene. Die Sauerstoffzonierung wird durch (•) für die oxische Zone, (*) für die obere Übergangszone, (+) für die untere Übergangszone und (●) für die anoxische Zone kodiert. Der Farbkode gibt die Inkubationszeitpunkte wieder. Datenpunkte der Phase 0 sind durch einen grünen und Datenpunkte der Phase III durch einen roten Kreis umschlossen. A₁-B₁: Der Verlauf zeigt in der jeweiligen Sauerstoffzone die Sukzession auf 16S rRNA-Gen- (A) und 16S rRNA-Ebene (B). Die Eckpunkte (★) des Verlaufs sind die Mittelpunkte der Phasen I und II in dem Ordinationsdiagramm.

Die Fingerprintmuster, die direkt nach dem Fluten (Phase 0) aufgenommen worden waren, gruppieren in der KA eng beieinander, was auf eine ähnliche Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft in allen Sauerstoffzonen hindeutet (Abb. 5). Nach der Phase 0 wiesen die Fingerprintmuster sowohl auf 16S rRNA- als auch auf 16S rDNA-Ebene eine hohe Gesamtvarianz auf, die mit der Inkubationsdauer stetig abnahm. Die Gesamtvarianz basiert auf der Dynamik der Zusammensetzung der bakteriellen Lebensgemeinschaft. Diese Dynamik war auf 16S rRNA-Ebene deutlicher ausgeprägt als auf 16S rDNA-Ebene (vergleiche Abb. 5A₁ mit Abb. 5B₁). Aus diesem Grund wurde die zeitliche Einteilung der drei Phasen anhand der 16S rRNA-Ebene definiert. So wurde Phase I in einem Inkubationszeitspanne von einer Stunde bis 2 Tage nach Fluten definiert, gefolgt von Phase II mit zwei bis 21 Tage und Phase III ab einem Inkubationszeitspanne von 21 Tagen. Die Fingerprintmuster von 21 bis 168 Tagen gruppieren im Ordinationsdiagramm eng beieinander, so dass weder eine räumliche Zonierung noch eine zeitliche Entwicklung der bakteriellen Gemeinschaft differenziert werden konnte. Diese enge Gruppierung der Fingerprintmuster in Phase III und die differenziertere Auflösung der zeitlichen und räumlichen Entwicklung der bakteriellen Sukzession war auf 16S rRNA-Ebene deutlicher als auf 16S rDNA-Ebene (vergleiche Abb. 5A mit Abb. 5B).

4.2.2 Zeitliche und räumliche Entwicklung einzelner bakterieller Gruppen

In Kapitel 4.2.1 wurde die Entwicklung der gesamten bakteriellen Lebensgemeinschaft über die Inkubationsdauer und in definierten Sauerstoffzonen mittels statistischer Verfahren beschrieben. Die folgenden Analysen extrahieren aus den Fingerprintmustern jene T-RFs heraus, die charakteristisch für eine zeitliche Phase und für eine Sauerstoffzone waren. Aufgrund ihrer Bedeutung für den Sukzessionsverlauf werden diese im folgenden Text als sigT-RF (Signatur-T-RFs) bezeichnet. Diese sigT-RFs wurden anhand folgender Kriterien definiert: (i) die gemittelte relative Abundanz zu den elf Inkubationszeitpunkten war größer als 4,5 %, (ii) im zeitlichen Verlauf erfolgte eine Änderung um mindestens 3 Prozentpunkte, und (iii) TRFs wurden ausgeschlossen, deren mittlere relative Abundanz einen Standardfehler größer als 2 Prozentpunkten aufwies. Diese Kriterien wurden gewählt, um den Anteil nicht-dominanter T-RFs (sogenanntes „Datenrauschen“) zu reduzieren. Insgesamt wurden 59 T-RFs sowohl auf rRNA- als auch auf rDNA-Ebene für eine statistische Auswertung der Fingerprintmuster ausgewählt (siehe Kapitel 3.10.1), von denen insgesamt 27 die Kriterien eines sigT-

RFs erfüllten (Tab. 3). Davon wurden 22 sigT-RFs auf beiden Ebenen und 3 bzw. 2 ausschließlich auf 16S rRNA- bzw. 16S rDNA-Ebene detektiert (Abb. 6).

Tabelle 3: Zuordnung der Signatur T-RFs (sigT-RFs) zu taxonomischen Gruppen und Zeitphasen

T-RF ¹	Taxonomische Zuordnung ²	Phase ³	T-RF ¹	Taxonomische Zuordnung ²	Phase ³
66	<i>Syntrophobacter</i>	I	439	<i>Mesorhizobium</i> / <i>Hyphomicrobium</i>	II
76	<i>Methylocaldum</i> / <i>Polyangium</i>	III			
120	<i>Chloroflexi</i>	(II)	445	<i>Methylobacter</i>	II (III)
128	<i>Bacillus</i> / <i>Geobacter</i>	(I)	451	<i>Comamonadaceae</i>	(I/III)
141	<i>Nocardiodes</i> / <i>Rubrivivax</i>	I (0)	454	<i>Aquabacterium</i>	I
145	<i>Bacillus</i>	I	469	<i>Actinobacteria</i>	(0, III)
148	<i>Sphingomonas</i>	I (II)	484	<i>Comamonadaceae</i>	I (II)
160	<i>Cystobacter</i> (<i>Myxococcales</i>)	II	489	<i>Telluria</i> / <i>Herbaspirillum</i> / <i>Janthinobacterium</i>	(I/II/III)
162	<i>Mycobacteriaceae</i>	I			
166	<i>Bacillus</i> / <i>Clostridium</i>	0	502	<i>Polyangium</i> (<i>Myxococcales</i>)	III
170	<i>Verrucomicrobia</i>	III	510	<i>Clostridium</i> (cluster I)	I
270	<i>Clostridium</i> (Cluster I, III und IV sensu Collins <i>et al.</i> , 1994)	I	515	<i>Clostridiaceae</i>	I
			519	<i>Clostridium</i> (cluster I)	I
290	<i>Acidobacteria</i>	III	527	<i>Dehalococcoides</i>	0 (I)
430	<i>Dechloromonas</i>	II (III)	600	<i>Nitrospira</i>	III

1 : T-RF-Länge in Basenpaaren

2 : Zuordnung der sigT-RFs zu definierten Taxa erfolgte nach der Nomenklatur der zweiten Edition von „Bergey's Manual of Determinative Microbiology“ (Garrity *et al.*, 2001). Die phylogenetische Zuordnung basierte auf Klonsequenzen beider Nukleinsäureebenen, die aus den Sauerstoffzonen und Zeitphasen erhalten worden waren, für die das jeweilige sigT-RF charakteristisch war. Bei einer prozentualen Ähnlichkeit ≥ 95 % zu taxonomisch beschriebenen Mitgliedern wurde das Gattungsniveau angegeben und ≤ 95 % wurde höheren taxonomischen Einheiten zugeordnet.

3 : Zuordnung der sigT-RFs zu einer der vier Phasen (0, I, II und III) der bakteriellen Sukzession. SigT-RFs wurden in eine Phase eingeteilt, wenn die Zuordnung dieser sigT-RFs sowohl bei der KKA als auch bei der *rA*-Verteilung über die Inkubationszeit eindeutig war. Zuordnungen von sigT-RFs, die auf der *rA*-Verteilung aber nicht auf der KKA beruhen, werden in Klammern angegeben.

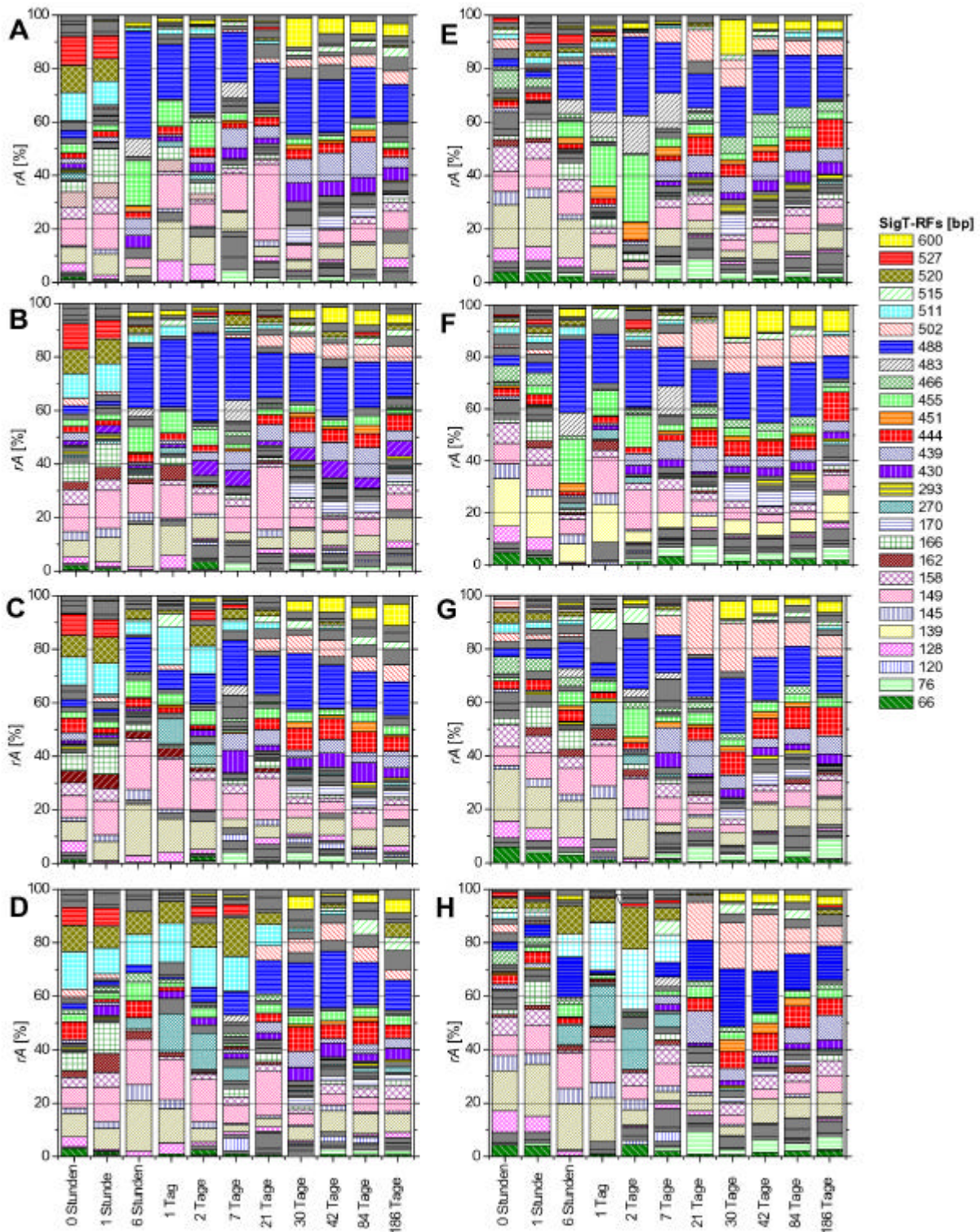


Abbildung 6: Verteilung der gemittelten relativen Abundanz von sigT-RFs in der oxischen Zone (A, E), der oberen Übergangszone (B, F), der unteren Übergangszone (C, G) und der anoxischen Zone (D, H) auf 16S rDNA- (A, B, C, D) und 16S rRNA-Ebene (E, F, G, H). Die jeweiligen sigT-RFs sind in dem Farbekode dargestellt, während die anderen TRFs in grau gezeigt werden. Fragmentlänge der sigT-RFs ist in Basenpaaren angegeben.

4.2.3 Phylogenetische Identifikation einzelner bakterieller Gruppen

Um sigT-RFs phylogenetische Informationen zuordnen zu können, wurden 16S rRNA- und 16S rDNA-Klonbibliotheken aus den Extrakten der T-RFLP-Analyse erstellt. Mit den erhaltenen Klonsequenzen und ihrer abgeleiteten T-RF-Länge konnte durch die vergleichende Sequenzanalyse die Diversität der den sigT-RF zugrunde liegenden Organismen abgeschätzt werden. Für eine zeitliche und räumliche Differenzierung der Klonsequenzen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten aus den jeweiligen Sauerstoffzonen 17 Klonbibliotheken erstellt, neun 16S rRNA- und acht 16S rDNA-Bibliotheken. Mindestens zehn zufällig ausgewählte Klone jeder Bibliothek wurden sequenziert. Die Sequenzen wurden einem „Chimera-Check“ (siehe Kapitel 3.9) unterzogen, um Sequenzartefakte ausschließen zu können. Von den 190 analysierten Klonsequenzen wurden fünf aus den weiteren Analysen ausgeschlossen. Die anderen Klonsequenzen wurden mit Sequenzen einer öffentlich zugänglichen Datenbank in dem Programmpaket ARB unter „Maximum Parsimony“-Kriterien verrechnet (siehe Kapitel 3.9) und phylogenetischen Gruppen zugeordnet (Tab. 3).

4.2.4 Einteilung der Signatur-T-RFs in Phasen

Für die Einteilung der sigT-RFs zu einer spezifischen Phase wurde auf rRNA- und rDNA-Ebene eine KKA mit den Faktoren Inkubationszeit ([in logarithmischer Transformation] 16S rDNA: trace = 0.25, $p < 0,001$; 16S rRNA: trace = 0.24, $p < 0,001$) und Sauerstoffzone (16S rDNA: trace = 0.07, $p < 0,001$; 16S rRNA: trace = 0.06, $p < 0,001$) als erklärende Variablen durchgeführt. Bei dieser KKA wurden alle T-RFs entlang des zeitlichen Gradientens platziert und nach ihrer Anordnung im Ordinationsdiagramm der jeweiligen Phase zugeordnet. Bei der Zuordnung der sigT-RFs zu den jeweiligen Phasen konnten allerdings einige sigT-RFs aufgrund ihrer multimodalen *rA*-Verteilung nicht eindeutig zugeordnet werden. Diese sigT-RFs wurden ausschließlich anhand ihrer *rA*-Verteilung in die Phasen eingeteilt. Ein Beispiel war das 469-bp sigT-RF, das auf der Grundlage der KKA in Phase II eingeteilt wurde allerdings die höchste relative Abundanz in den Phasen 0 und III hatte. Aus diesem Grund wurde das 469-bp sigT-RF ausschließlich den Phasen 0 und III zugeordnet (Tab. 3). Die unterschiedlichen Modalitäten der Zuordnung der einzelnen sigT-RFs sind in Tabelle 3 angegeben.

4.2.5 Phylogenetische Gruppen der frühen Inkubationsphase (Phase I)

In der Entwicklung von Phase 0 zur Phase I konnte zusätzlich zur zeitlichen Entwicklung eine räumliche Zonierung der bakteriellen Gemeinschaft unterschieden werden. Dabei zeigte sich, dass sich in der oxischen Zone eine andere bakterielle Gemeinschaft entwickelt hatte als in der anoxischen Zone.

Oxische Zone Die Fingerprintmuster in der oxischen Zone wurde durch die 454-bp, 484-bp und 489-bp sigT-RFs dominiert, die sechs Stunden nach dem Fluten eine gemeinsame relative Abundanz von 69 % auf 16S rRNA-Ebene erreichten. Diese drei sigT-RFs korrespondierten alle zu Populationen des Phylums *Betaproteobacteria* (Abb. 7).

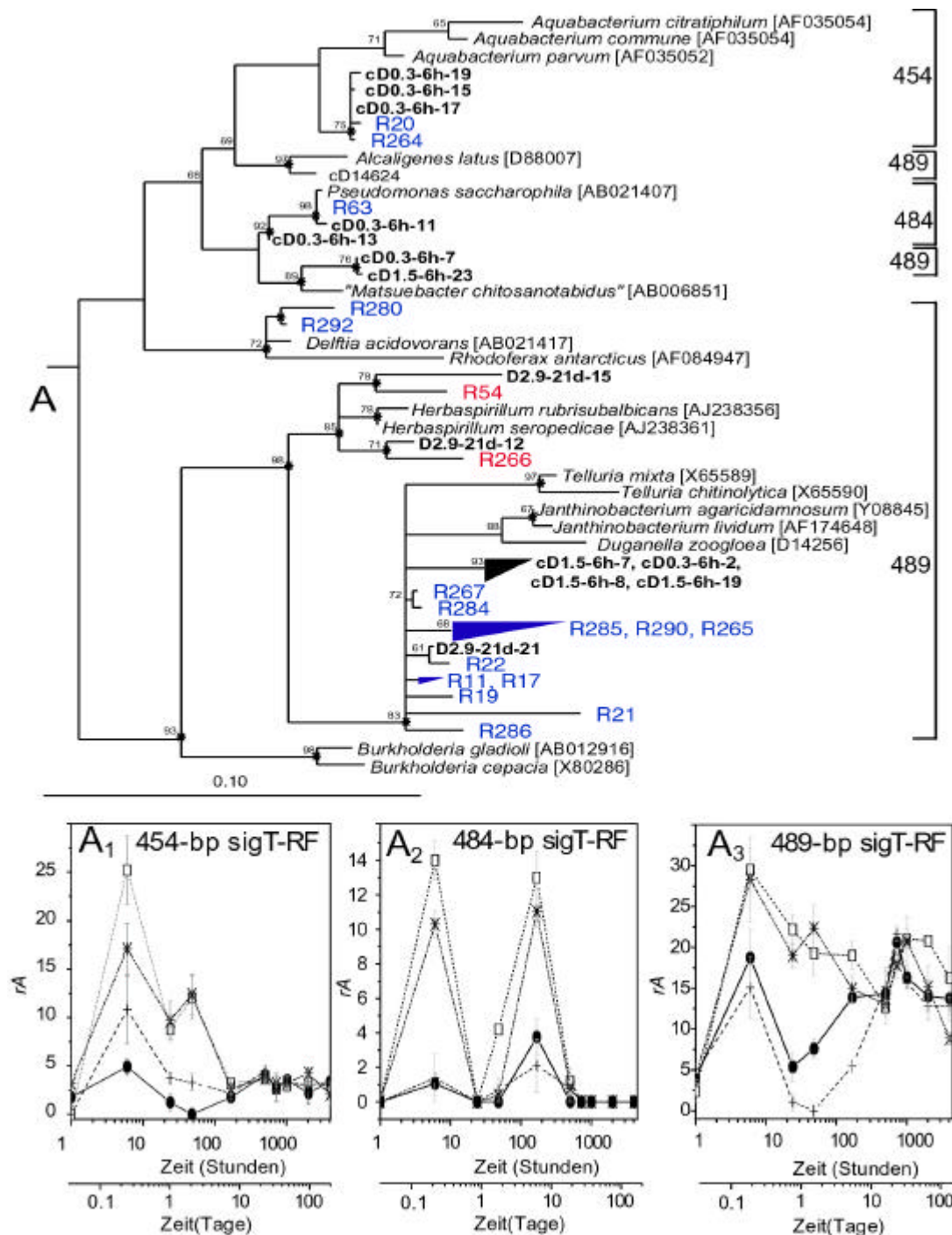


Abbildung 7: Phylogenetisches Dendrogramm zur Charakterisierung der frühen Inkubationsphase (Phase I) in der oxischen Zone. Die Klonsequenzen mit den abgeleiteten Schnittstellen 454-bp, 484-bp und 489-bp bzw. die Isolate der ein Tag- (blau) und 70 Tage-Inokula (rot) wurden verwandten Bakterien innerhalb der *Betaproteobacteria* zugeordnet. Die Korrespondenz zu den sigT-RFs ist in vertikalen Klammern angegeben. Die Informationen der Klonsequenzen wurden folgendermaßen zusammengefasst: Präfix D (= DNA = Sequenz basiert auf rDNA-Ebene bzw. Präfix cD (= copy DNA = Sequenz basiert auf rRNA-Ebene); räumliche Zonierung in mm – Inkubationszeitpunkt in h (Stunden) oder d (Tagen) – Klonnummer. Die Nummern an den Verzweigungen geben die Tree-Puzzle-Unterstützungswerte an, die > 60 angeben werden. Die Topologie des Dendrogrammes ist mit FastDNA-ML validiert worden und übereinstimmende Verzweigungen mit * markiert. Der Maßstab gibt 10 % Sequenzunterschied an. A₁-A₃: Die rA-Verteilung der sigT-RFs mittels 16S rRNA basierter

T-RFLP-Analyse in der jeweiligen Sauerstoffzone. Für jeden relativen Abundanzwert wird die Standardabweichung der drei Replikaten durch einen vertikalen Balken angegeben. Die Sauerstoffzonierung ist durch (□) für die oxische Zone, (*) für die obere Übergangszone, (+) für die untere Übergangszone und (●) für die anoxische Zone gekennzeichnet. Die Isolate sowie die unterschiedlichen Kultivierungsansätze werden in Kapitel 4.3 ausführlich beschrieben.

Anoxische Zone Die Fingerprintmuster in der anoxischen Zone wurde durch die 270-bp, 510-bp und 519-bp sigT-RFs dominiert, die zwei Tage nach Fluten eine gemeinsame relative Abundanz von 54 % auf 16S rRNA-Ebene erreichten. Diese sigT-RFs korrespondierten alle mit Mitgliedern der Gattung *Clostridium*, in dem Cluster I. Das 270-bp sigT-RF wurde zusätzlich in Clustern III und IV der selben Gattung detektiert (Abb. 8). Die Einteilung in die jeweiligen Cluster erfolgte nach Collins *et al.* (1994).

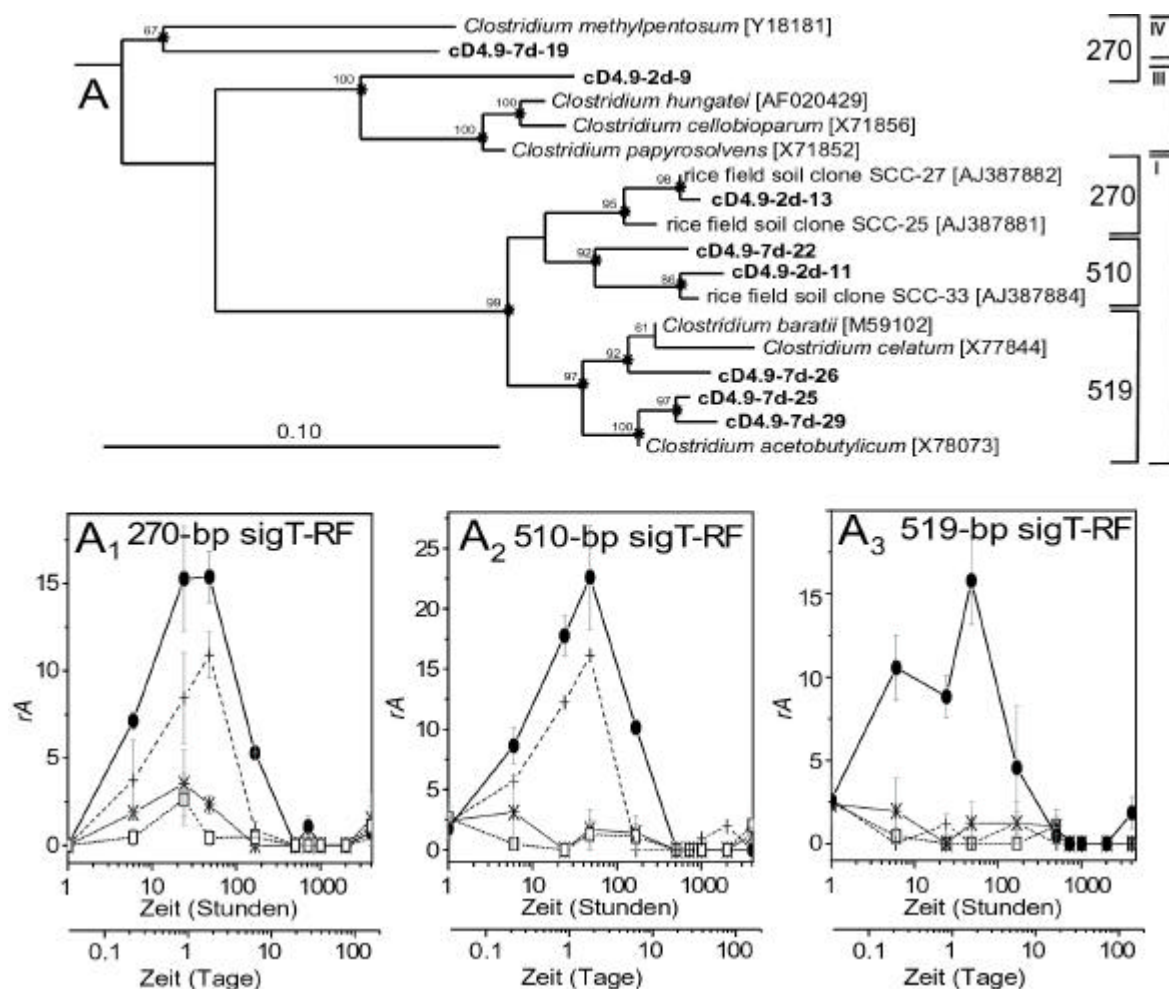


Abbildung 8: Phylogenetisches Dendrogramm zur Charakterisierung der frühen Inkubationsphase (Phase I) in der anoxischen Zone. Die 270-bp, 510-bp und 519-bp sigT-RFs wurden zu verwandten Bakterien und Klonsequenzen anderer Studien innerhalb der Gattung *Clostridium* in den Clustern I, III und IV sensu Collins *et al.* (1994) zugeordnet. A₁-A₃: Die rA-Verteilung der sigT-RFs mittels 16S rRNA basierter T-RFLP-Analyse in der jeweiligen Sauerstoffzone. Weitere Details können der Legende der Abb. 7 entnommen werden.

4.2.6 Phylogenetische Gruppen der späten Inkubationsphase (Phase III)

Die Fingerprintmuster in der späten Inkubationsphase (Phase III) waren sich sehr ähnlich, so dass davon auszugehen ist, dass die Zusammensetzung der bakteriellen Lebensgemeinschaft nach einer Inkubationsdauer von 21 Tagen in allen Sauerstoffzonen ähnlich war. Jedoch zeigten einige sigT-RFs in dieser Phase III eine deutliche Präferenz für eine spezifische Sauerstoffzone.

Die 170-bp und 600-bp sigT-RFs wurden ausschließlich in der oxischen Zone und der oberen Übergangszone detektiert. Durch die vergleichende Sequenzanalyse wurde das 170-bp sigT-RF Vertretern des Phylums *Verrucomicrobia* zugeordnet, während das 600-bp sigT-RF mit Sequenzen aus dem Phylum *Nitrospira* korrespondierte (Abb. 9).

In der unteren Übergangszone und der anoxischen Zone konnte im zeitlichen Verlauf der Phase III ein Anstieg des 502-bp sigT-RFs festgestellt werden, dass allerdings zusätzlich in schwächerer Ausprägung in der oxischen Zone und in der oberen Übergangszone nachgewiesen wurde. Dieses sigT-RF konnte durch die vergleichende Sequenzanalyse mit Vertretern der *Myxococcales* zugeordnet werden (Abb. 9). Ein weiteres sigT-RF, das bevorzugt in der unteren Übergangszone während Phase II und III detektiert wurde, war das 445-bp sigT-RF. Dieses sigT-RF konnte durch die vergleichende Sequenzanalyse Mitgliedern der Gattung *Methylobacter* zugeordnet werden.

Ein charakteristisches sigT-RF für die unabhängige Verteilung innerhalb des Sauerstoffgradientens in der Phase III war das 489-bp sigT-RF. Die relative Abundanz dieses sigT-RFs betrug in allen Sauerstoffzonen ca. 20 % (Abb. 7).

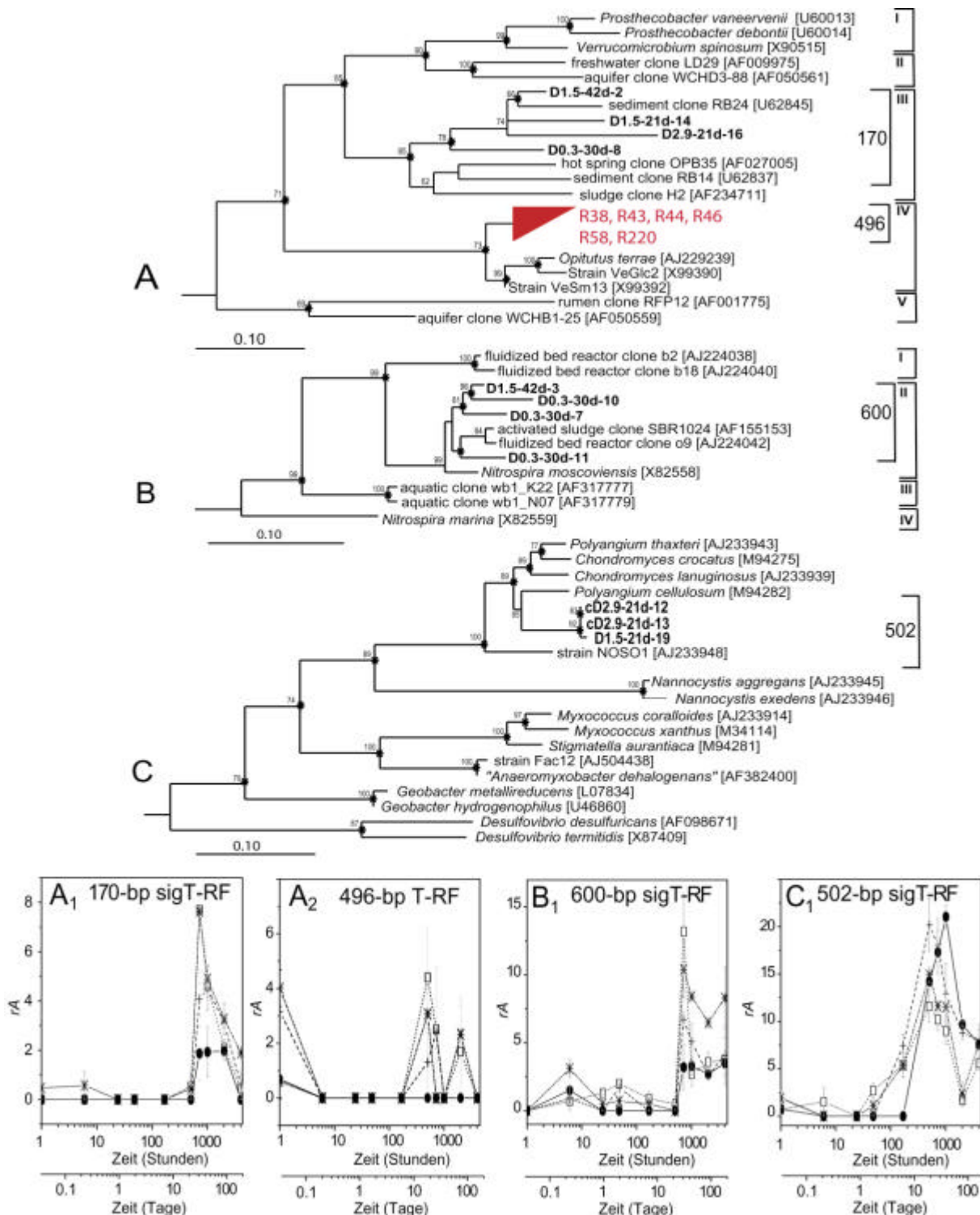


Abbildung 9: Phylogenetisches Dendrogramm zur Charakterisierung der späten Inkubationsphase (Phase III). Die 170-bp, 600-bp und 502-bp sigT-RFs und das 496-bp T-RF bzw. die Isolate der 70 Tag-Inokula (rot) wurden verwandten Bakterien und Klonsequenzen anderer Studien innerhalb der *Verrucomicrobia* sensu Hugenholtz *et al.*, 1998 (A); der *Nitrospira* sensu Daims *et al.*, 2001 (B) und der *Myxococcales* (C) zugeordnet. A₁-C₁: Die *rA*-Verteilung der T-RFs mittels 16S rRNA basierter T-RFLP-Analyse in der jeweiligen Sauerstoffzone. Die Details für die phylogenetische Rekonstruktion, der Beziehung zwischen sigT-RFs und Phylogenie und der *rA*-Verteilung können der Legende der Abb. 7 und die Details der Isolate und der Kultivierungsansätze dem Kapitel 4.3 entnommen werden.

4.2.7 Diversität und Ähnlichkeit der bakteriellen Lebensgemeinschaft

In der KA wurden für die TRFLP-Datensätze sowohl auf rRNA- als auch auf rDNA-Ebene eine bakterielle Sukzession in den jeweiligen Sauerstoffzonen aufgedeckt (Abb. 5). Um die Verteilungsstruktur innerhalb der gesamten Fingerprintmuster in ihrer T-RF-Diversität und ihrer relativen Abundanz-Struktur auflösen zu können, wurden die T-RF-Anzahl (S) und die T-RF-Äquitabilität (E) für beide Nukleinsäureniveaus berechnet (Abb. 10).

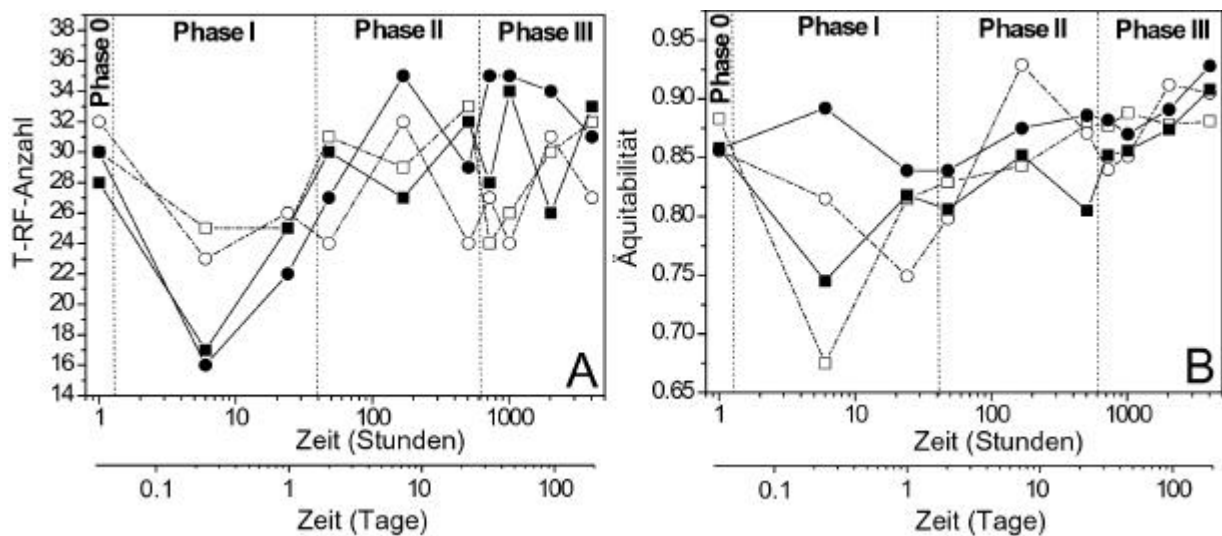


Abbildung 10: Entwicklung der T-RF-Anzahl (A) und T-RF-Äquitabilität (B) über die Inkubationszeit. Die rDNA-Ebene ist mit (■) für die oxische und mit (●) für die anoxische Zone gekennzeichnet, während die rRNA-Ebene mit (□) für die oxische und mit (○) für die anoxische Zone dargestellt wird.

Während die Inkubationszeit einen hohen Effekt auf die T-RF-Anzahl und T-RF-Äquitabilität hatte (ANOVA: $F_{10,87} [S] = 8,7$, $p < 0,001$; $F_{10,87} [E] = 21,1$, $p < 0,001$) hatte die Sauerstoffzone keinen Effekt (ANOVA: $F_{3,87} [S] = 2,0$, $p < 0,12$; $F_{3,87} [E] = 1,3$, $p < 0,39$). Ferner war der Effekt der Interaktion zwischen den Faktoren Inkubationszeit und Sauerstoffzone (ANOVA: $F_{30,87} [S] = 1,6$, $p < 0,05$; $F_{30,87} [E] = 3,3$, $p < 0,05$) signifikant, was auf eine unterschiedliche Dynamik der bakteriellen Gemeinschaft in den einzelnen Sauerstoffzonen hindeutet.

Änderungen innerhalb der T-RF-Anzahl und T-RF-Äquitabilität traten vor allem in Phase I auf (Abb. 10). Die T-RF-Anzahl nahm eine Stunde nach Inkubation auf beiden Nukleinsäureebenen ab, wobei diese besonders auf 16S rDNA-Ebene abnahm (Abb. 10A). Die T-RF-Äquitabilität nahm in Phase I auf beiden Nukleinsäureniveaus sowohl in der oxischen Zone als auch in der anoxischen Zone ab (Abb. 10B). Die Phasen II und III waren, mit zwei Ausnahmen (siehe Abb. 10B), durch einen Anstieg der T-RF-Äquitabilität auf beiden Nukleinsäureniveaus gekennzeichnet. Dieser Anstieg der Gleichverteilung

steht im Einklang mit den Ergebnissen der KA, die in den Phasen II und III eine zeitliche und räumliche Stabilisierung der Zusammensetzung der bakteriellen Lebensgemeinschaft wiedergeben hatte. Die T-RF-Anzahl in Phase II und III nahm im Vergleich zu der T-RF-Anzahl der Phase I zuerst zu und fluktuierte auf beiden Nukleinsäureebenen im weiteren Sukzessionsverlauf (Abb. 10A). Diese Fluktuation wurden durch TRFs verursacht, die durch ihre geringe Abundanz nahe an der Nachweisgrenze (siehe Kapitel 3.10.1) lagen.

4.3 Isolation und Identifikation von numerisch bedeutender Bakterien

Um die bakterielle Sukzession zu charakteristischen Inkubationszeitpunkten zu untersuchen, wurden für den Kultivierungsansatz die Ergebnisse der TRFLP-Analyse berücksichtigt. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden für eine aerobe kultivierungsabhängige Analyse jeweils ein Inkubationszeitpunkt aus der Phase I und aus der Phase III ausgewählt, da zu diesen Zeitpunkten zum einen hoch variable (Phase I) und zum anderen relativ stabile Fingerprintmuster (Phase III) über Zeit und Sauerstoffzone detektiert worden waren (siehe Kapitel 4.2.1). Bei dem Kultivierungsansatz wurde die Phase I durch einen Tag lang inkubierte und die Phase III durch 70 Tage lang inkubierte Bodenkerne repräsentiert. Es wurde jeweils ein Inokulum von einem der drei unabhängigen Bodenkernen zu beiden Inkubationszeitpunkten angefertigt, so dass ein Inkubationszeitpunkt sich aus drei Inokula zusammensetzt. Die Inokula werden als ein Tag-Inokula bzw. 70 Tage-Inokula im folgenden Text abgekürzt.

Als Medien wurden die Komplexmedien R2A und NA in jeweils zwei Konzentrationen verwendet, da sie ein breites Spektrum an Substraten bieten und aus diesem Grund als Universalmedium in der Praxis für die Kultivierung von Bodenbakterien eingesetzt werden. Die Konzentration der beiden Medien wurde in zwei Variationen (unverdünnt / 1:100) angesetzt, um den Mikroorganismen sowohl oligo- als auch copiotrophe Substratbedingungen anzubieten. Dadurch sollte gewährleistet werden, dass ein umfangreiches Spektrum physiologisch unterschiedlicher aerober Bakterien isoliert werden kann. Als copiotrophe Substratquelle wurden unverdünnte Medien verwendet, während oligotrophe Bedingungen durch eine 1:100 verdünnte Nährmedienkonzentration erzielt wurden. Der pH-Wert der Medien wurde auf 6,0 eingestellt, entsprechend dem pH-Wert des Bodens.

Ausgehend von den ausplattierten Verdünnungsreihen wurden Isolate aus endpositiven Verdünnungsstufen (10^9 – 10^7) ausgewählt und über mindestens drei aufeinander folgende Verdünnungsausstriche vereinzelt. Die Reinheit der Bakterienkulturen wurde anhand der Einheitlichkeit

der Koloniemorphologie und anhand der Zellmorphologie überprüft. Bei reinen Isolaten wurde die 16S rDNA amplifiziert und anschließend sequenziert. Die erhaltenen Klonsequenzen wurden einem „Chimera-Check“ (siehe Kapitel 3.9) unterzogen, um evtl. Fehler bei der Extraktion, PCR und Sequenzierung bzw. bei der Reinheit der Isolate auszuschließen. Es wurden von 63 Sequenzen vier mit Sequenzartefakten ermittelt. Die Isolate dieser vier Sequenzen wurden von den weiteren Analysen ausgeschlossen. Die anderen 16S rRNA-Gensequenzen der Isolate wurden für eine vergleichende Sequenzanalyse verwendet.

Auf Basis der Sequenzähnlichkeit wurden, die Isolate taxonomisch beschriebenen Spezies zugeordnet. Die Sequenzähnlichkeit zu den nächsten Verwandten variierte zwischen 85,6 % (R61 – *Acidobacterium capsulatum*) und 99,9 % (z. B. R47 - *Hyphomicrobium facile*). Es wurden keine Sequenzähnlichkeiten über 97 % zwischen den Isolaten der ein Tag-Inokula und den Isolaten der 70 Tage-Inokula festgestellt. Die phylogenetische Zusammensetzung unterschied sich auf höherem taxonomischem Niveau ebenfalls zwischen den Isolaten der ein Tag- und der 70 Tage-Inokula (Abb. 11, Tab. 4).

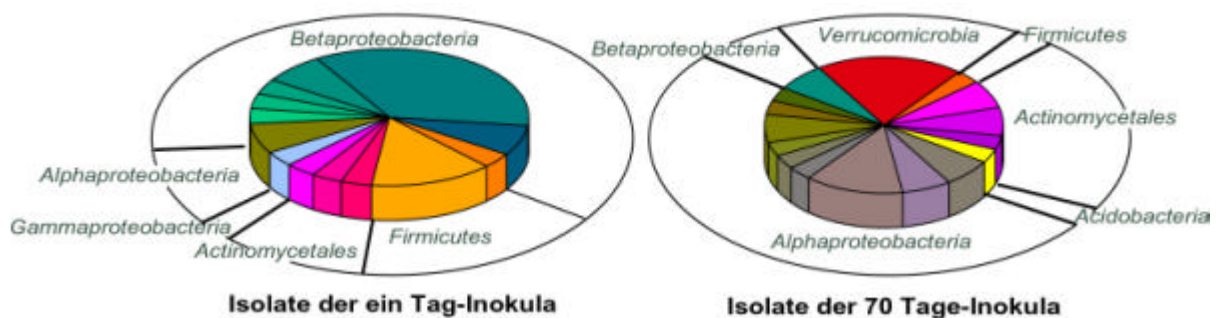


Abbildung 11: Vergleich zwischen der phylogenetischen Zusammensetzung der Isolate der ein Tag- bzw. der 70 Tage-Inokula. Die Einteilung erfolgte unabhängig von den jeweiligen Medien und deren Konzentrationen und fasst die Isolate oberhalb von 97 % Sequenzähnlichkeit in einen Diagrammabschnitt zusammen. Einzelheiten zu den Isolaten können der Tabelle 4 entnommen werden.

Die Sequenzähnlichkeit einiger Bakterien in den beiden Medienkonzentrationen war zu beiden Kultivierungszeitpunkten über 97 %. Bei den Isolaten der ein Tag-Inokula wurden mit *Janthinobacterium agaricidamnorum* verwandte Bakterien in beiden Medienkonzentrationen kultiviert, während bei den Isolaten der 70 Tage-Inokula mit *Optitus terrae* und *Hyphomicrobium facilis* verwandte Bakterien in beiden Medienkonzentrationen kultiviert worden waren. Diese Isolate konnten unabhängig von der Medienkonzentration wachsen, während die anderen Isolate ausschließlich in einer Medienkonzentration isoliert worden waren.

Tabelle 4: Taxonomische Zuordnung der 16S rDNA-Sequenzen der Isolate erzielt aus den ein Tag-Inokula bzw. 70 Tage-Inokula.

Isolate der ein Tag-Inokula					Isolate der 70 Tage-Inokula				
Isolat ¹	Phylogenetische Zuordnung ²	Medium ³	VD ⁴	T-RF ⁵	Isolat ¹	Phylogenetische Zuordnung ²	Medium ³	VD ⁴	T-RF ⁵
R17, R22, R265, R267, R284, R285	<i>Janthinobacterium agaricidamnorum</i> (97,0 / 96,1 / 96,1 / 97,2 / 95,3 / 97,1 %)	NA (1:100) R2A (1:100)	10 ⁻⁸ 10 ⁻⁷	489	R38, R43, R44, R46	<i>Optinus terrae</i> (92,7 / 93,3 / 91,9 / 89,3 %)	R2A (1:100), NA (1:100)	10 ⁻⁸	496
R260	<i>Mycobacterium obuense</i> (98,5 %)	NA (1:100)	10 ⁻⁷	158	R39, R56	<i>Hyphomicrobium facile</i> (99,9, 99,9 %)	R2A (1:100)	10 ⁻⁷	400
R270	<i>Arthrobacter chlorophenolicus</i> (99,1 %)	NA (1:100)	10 ⁻⁷	162	R32, R64	<i>Mycobacterium austroafricanum</i> (98,2 / 98,4 %)	NA (1:100), R2A (1:100)	10 ⁻⁷	275
R280, R292	<i>Delftia acidovorans</i> (97,6 / 99,1 %)	NA (1:100)	10 ⁻⁸	489	R23, R57	<i>Nocardia beijingensis</i> (99,0 / 99,0 %)	NA (1:100)	10 ⁻⁷	162
R293	<i>Zoogloea ramigera</i> (96,6 %)	R2A (1:100)	10 ⁻⁷	400	R24, R243	<i>Phenyllobacterium immobile</i> (97,7 / 97,5 %)	NA (1:100)	10 ⁻⁷	148, 400
R295	<i>Microbacterium testaceum</i> (98,6 %)	NA (1:100)	10 ⁻⁷	284	R204	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (99,4 %)	NA (1:100)	10 ⁻⁸	148
R290	<i>Duganella zoogloecoides</i> (96,0 %)	NA (1:100)	10 ⁻⁷	489	R42	<i>Sphingomonas aquatilis</i> (96,3 %)	NA (1:100)	10 ⁻⁷	148
					R60	<i>Micromonospora matsumotoense</i> (98,0 %)	NA (1:100)	10 ⁻⁷	141
					R61	<i>Acidobacterium capsulatum</i> (85,6 %)	NA (1:100)	10 ⁻⁷	148
					R62	<i>Methylocella palustris</i> (96,9 %)	NA (1:100)	10 ⁻⁷	62
					R26	<i>Afipta broomeae</i> (96,5 %)	NA (1:100)	10 ⁻⁸	148

Fortsetzung der Tabelle 4 auf der nächsten Seite

Fortsetzung von Tabelle 4

Isolate der 1 Tag-Inokula					Isolate der 70 Tag-Inokula				
Isolat ¹	Phylogenetische Zuordnung ²	Medium ³	VD ⁴	T-RF ⁵	Isolat ¹	Phylogenetische Zuordnung ²	Medium ³	VD ⁴	T-RF ⁵
R1, R8	<i>Paracaroococcus ruber</i> (95,6 / 95,6 %)	R2A	10 ⁻⁸	128	R51	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> (98,7 %)	R2A	10 ⁻⁸	148
R2, R7,	<i>Bacillus subtilis</i>	R2A	10 ⁻⁹	145	R47,	<i>Hyphomicrobium facile</i>	NA	10 ⁻⁸	400
R12, R14	(99,7 / 99,7 / 99,8 / 99,9 %)	NA	10 ⁻⁸	298	R221	(99,9 / 99,9 %)	R2A	10 ⁻⁸	489
R9	<i>Moraxella osloensis</i> (99,1 %)	R2A	10 ⁻⁸	455	R54,	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	R2A	10 ⁻⁸	439
R20,	<i>Aquabacterium parvum</i>	R2A	10 ⁻⁸	25	R266	(96,4 / 96,7 %)	R2A	10 ⁻⁷	439
R264	(96,8 / 96,8 %)	NA	10 ⁻⁸	484	R55	<i>Acidosphaera rubrifaciens</i> (95,3 %)	R2A	10 ⁻⁷	439
R5, R6	<i>Paenibacillus compinasensis</i> (94,6 / 93,4 %)	R2A	10 ⁻⁸	489	R40	<i>Roseococcus thiosulfatophilus</i> (95,1 %)	NA	10 ⁻⁷	439
R63	<i>Roseateles depolymerans</i> (99,3 %)	R2A	10 ⁻⁸	489	R187	<i>Azospirillum lipoferum</i> (97,1 %)	NA	10 ⁻⁷	148
R11,	<i>Janthinobacterium</i>	NA	10 ⁻⁸	489	R58,	<i>Opitius terrae</i>	NA	10 ⁻⁸	496
R19, R21	<i>agaricidamnosum</i> (96,7 / 97,0 / 93,9 %)	R2A	10 ⁻⁸	489	R220	(92,1 / 91,5 %)	NA	10 ⁻⁷	153
					R36	<i>Bacillus macroides</i> (99,4 %)	NA	10 ⁻⁷	148
					R213	<i>Afipia broomeae</i> (99,3 %)	NA	10 ⁻⁸	148

1: Die Sequenzinformation bestand bei ein- und zweistelligen Isolatnummern aus der gesamten 16S rRNA-Gensequenz, während die Sequenzen der dreistelligen Isolatnummern sich von partiellen 16S rRNA-Gensequenzen von mind. 900 bp zusammensetzten.

2: Die Zuordnung der Isolate zum nächst charakterisierten Verwandten erfolgte mit der Distanzmatrix-Funktion in dem Programmpaket ARB. Sequenzähnlichkeiten zwischen Isolat und dem nächstem Verwandten sind in Klammern angegeben.

3: Die Nährmedium-Konzentration der verdünnten Medien ist in Klammern angegeben.

4: Verdünnungsstufe (VD) des Inokulums, aus dem das jeweilige Isolat erzielt wurde.

5: Die T-RF-Länge in Basenpaaren wurde anhand der abgeleiteten *MspI*-Schnittstelle der Sequenz des jeweiligen Isolates berechnet.

4.3.1. Vergleich zwischen T-RFLP-Analyse und Kultivierungsansatz

Um die Sequenzinformationen der Klonbibliotheken mit denen der Isolate vergleichen zu können, wurden phylogenetische Dendrogramme erstellt (Abb. 7, 9, 12, 13, 14, 15). In diesen Dendrogrammen werden die relevanten T-RFLP-Ergebnisse in Form von *rA*-Verteilungen der jeweiligen T-RFs eingefügt, um die Bedeutung der Sequenzen innerhalb der bakteriellen Sukzession zu verdeutlichen. Bei den Ergebnissen der T-RFLP-Analysen sind vor allem die Ergebnisse der oxischen Zone interessant, da diese voraussichtlich die *in situ* Bedingungen der aeroben Isolate wiedergeben. Im folgenden werden die einzelnen Isolate mit ihren abgeleiteten TRF-Schnittstellen nach ihrer taxonomischen Zuordnung beschrieben.

Acidobacteria. Das Isolat R61 wurde aus den 70 Tage-Inokula isoliert und korrespondierte mit den Klonsequenzen dieser Studie und anderer Studien des Clusters III der *Acidobacteria* sensu Hugenholtz *et al.* (1998) (Abb. 12). Der nächstkultivierte Verwandte war *Acidobacterium capsulatum* des Clusters I, der eine 16S rDNA-Sequenzähnlichkeit von 85,6 % mit dem Isolat aufwies. Das Isolat R61 korrespondierte zu dem 148-bp sigT-RF. Dieses sigT-RF wurde in der vergleichenden Analyse von Klonsequenzen und den Sequenzen weiterer Isolate zusätzlich von Vertretern des Phylums *Alphaproteobacteria* repräsentiert und erreichte in der Phase III eine relative Abundanz von 4,5 %.

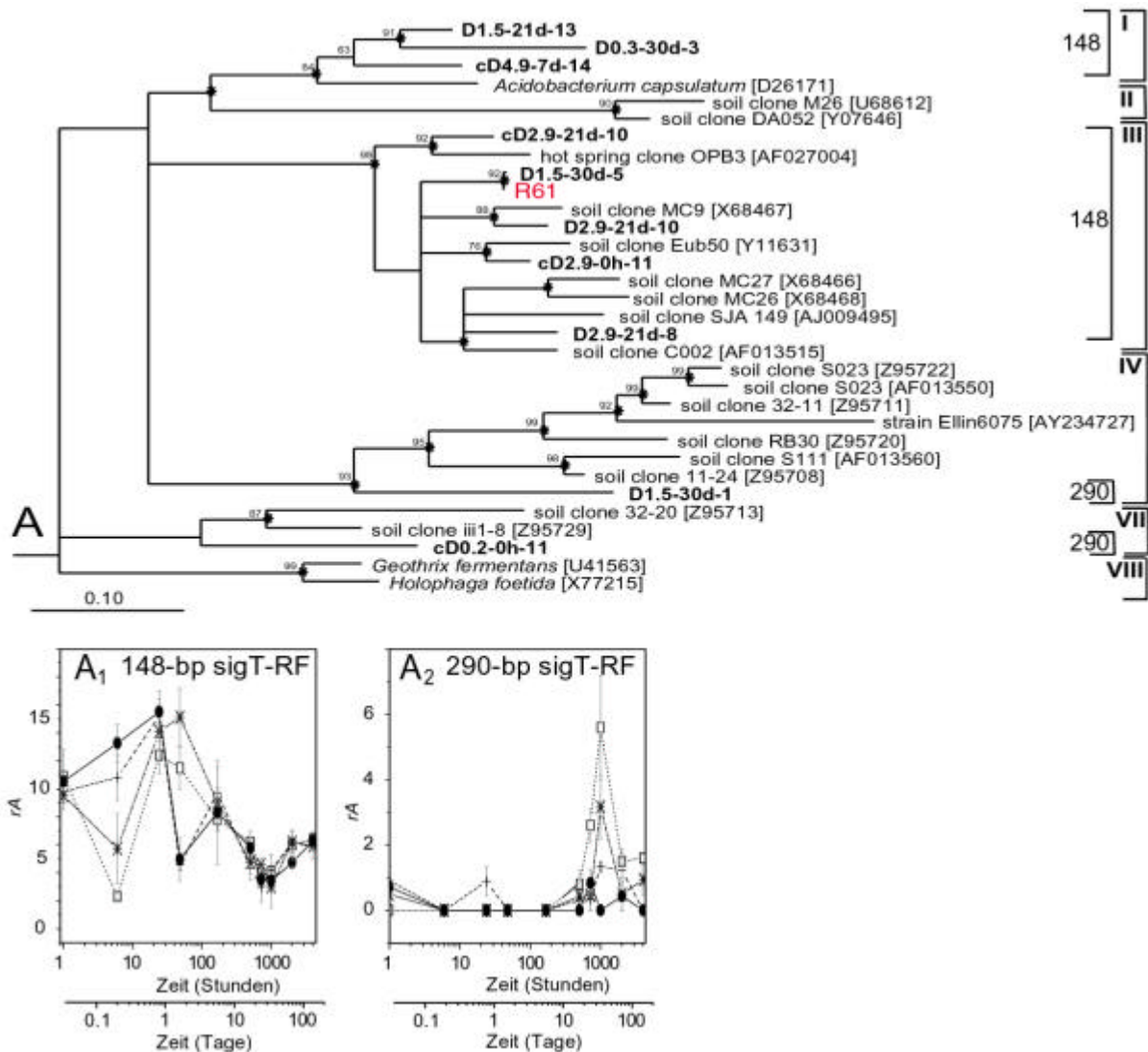


Abbildung 12: Phylogenetisches Dendrogramm zur Charakterisierung des Isolates R61 von den 70 Tage-Inokula innerhalb des Phylums *Acidobacteria*. Zuordnung der Klonsequenzen und des Isolates mit den 148-bp und 290-bp sigT-RFs und verwandten Bakterien und Klonsequenzen anderer Studien innerhalb des Phylums *Acidobacteria* nach der Einteilung von Hugenholtz *et al.* (1998). A₁-A₂: Die rA-Verteilung der sigT-RFs erfolgte mittels 16S rRNA basierter T-RFLP-Analyse in der jeweiligen Sauerstoffzone. Weitere Details können der Legende der Abb. 7 entnommen werden.

Actinomycetales. Die Isolate von beiden Kultivierungszeitpunkten dieser Ordnung waren mit den ermittelten Klonsequenzen nur entfernt verwandt (Abb. 13). Alle zu den Isolaten korrespondierenden T-RFs bzw. sigT-RFs in der jeweiligen Phase hatten eine relative Abundanz von mindestens 1 %. Ausnahme war das 275-bp T-RF, das den Isolaten R32 und R64 entsprach.

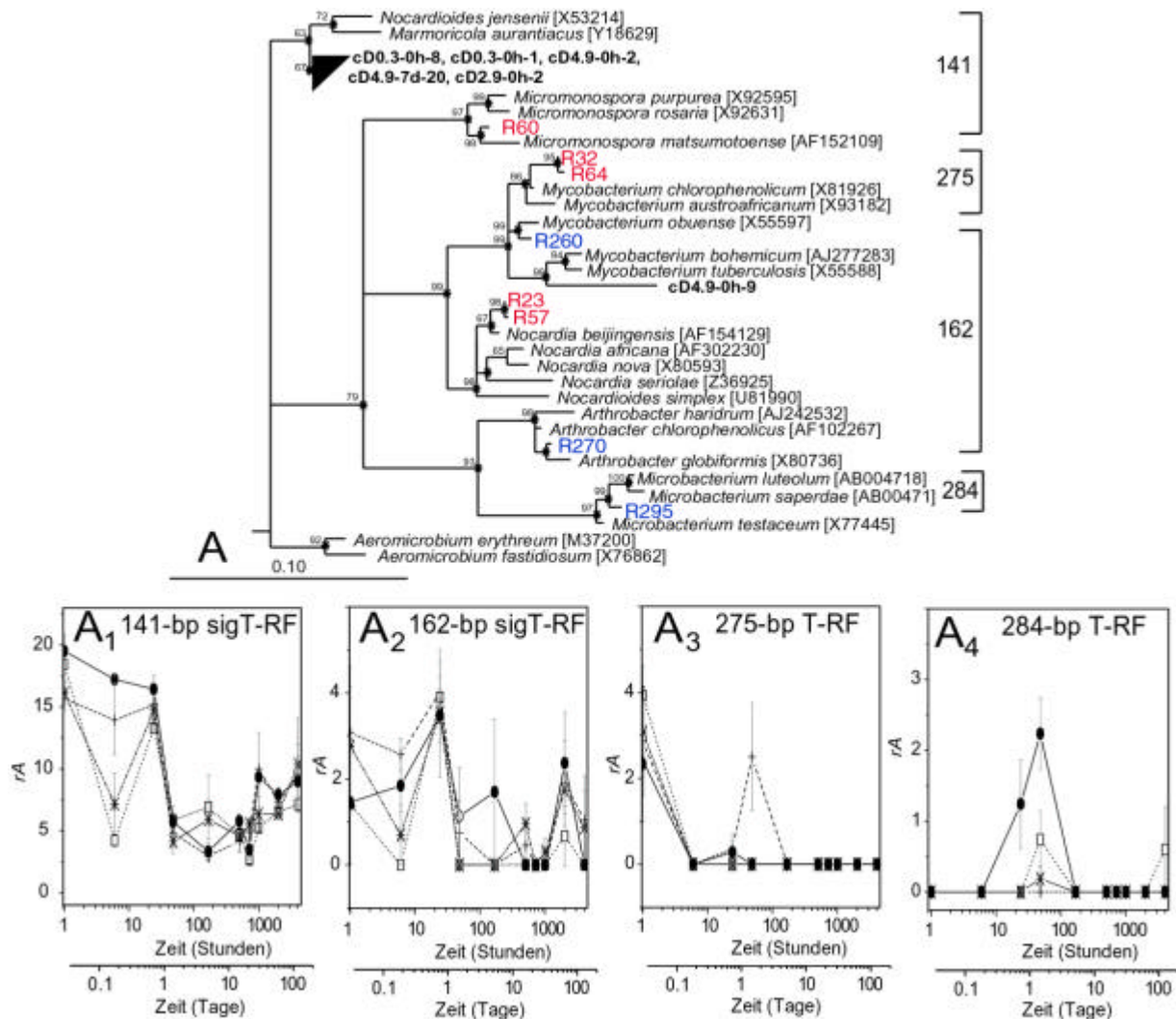


Abbildung 13: Phylogenetisches Dendrogramm zur Charakterisierung der Isolate innerhalb der Ordnung *Actinomycetales*. Zuordnung der Klonsequenzen und der Isolate der ein-Tage (blau) und der 70-Tage-Inokula (rot) mit den 141-bp und 162-bp sigT-RFs und den 275-bp und 284-bp T-RF und mit verwandten Bakterien der Gattungen *Nocardia*, *Mycobacterium* und *Micromonospora*. A₁-A₄: Die rA-Verteilung der T-RFs erfolgte mittels 16S rRNA basierter T-RFLP-Analyse in der jeweiligen Sauerstoffzone. Weitere Details können der Legende der Abb. 7 entnommen werden.

Alphaproteobacteria. In diesem Phylum wurden mehr Isolate aus den 70 Tage-Inokula gewonnen als aus den ein Tag-Inokula (Abb. 14). Mit Ausnahme der Isolate R39, R47, R56 und R221 korrespondierten die Isolate von beiden Kultivierungszeitpunkten nicht mit den ermittelten Klonsequenzen. Alle zu den Isolaten korrespondierenden T-RFs bzw. sigT-RFs wiesen in der jeweiligen Phase eine relative Abundanz von mindestens 1 % auf.

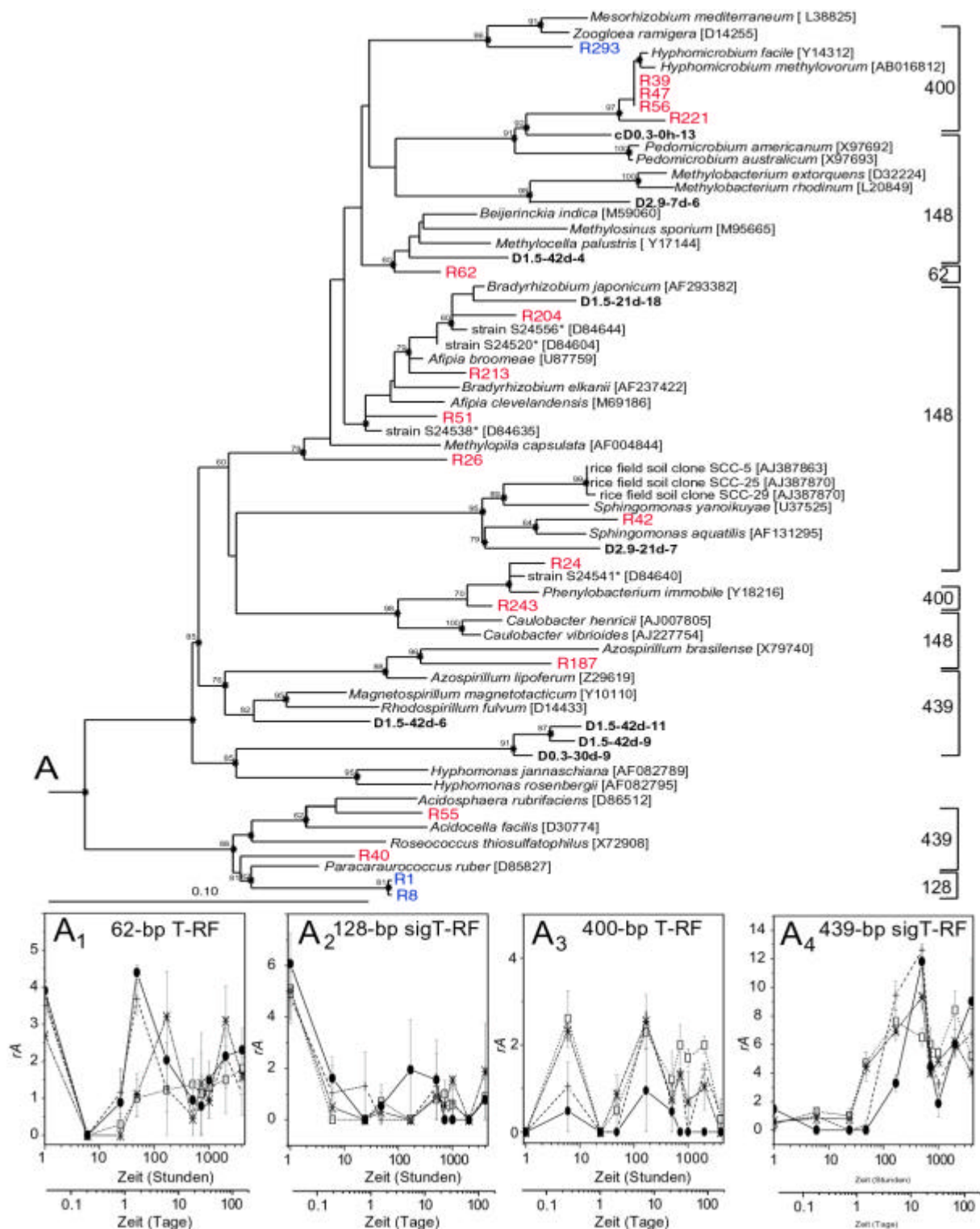


Abbildung 14: Phylogenetisches Dendrogramm zur Charakterisierung der Isolate innerhalb des Phylums *Alphaproteobacteria*. Zuordnung der Klonsequenzen und der Isolate der ein-Tage (blau) und der 70-Tage-Inokula (rot) mit den 128-bp und 439-bp sigT-RFs und den 62-bp und 400-bp T-RF und mit verwandten Bakterien und Klonsequenzen anderer Studien innerhalb des Phylums *Alphaproteobacteria*. A₁-A₄: Die rA-Verteilung der T-RFs erfolgte mittels 16S rRNA basierter T-RFLP-Analyse in der jeweiligen Sauerstoffzone. Die rA-Verteilung von 148-bp sigT-RF ist in Abb. 12 dargestellt. Weitere Details können der Legende der Abb. 7 entnommen werden.

Bacillales. Zu beiden Kultivierungszeitpunkten wurden Vertreter der Gattungen *Bacillus* und *Paenibacillus* isoliert (Abb. 15). Während die Isolate der Gattung *Bacillus* aus den ein Tag-Inokula und Klonsequenzen der frühen Inkubationsphase mit dem 145-bp sigT-RF korrespondierten, konnte das T-RF, das dem Isolat R36 aus den 70 Tage-Inokula zugeordnet wurde, nicht in der T-RFLP-Analyse nachgewiesen werden. Mit den Isolaten der Gattung *Paenibacillus* konnte kein Zusammenhang zu den Fingerprintmustern hergestellt werden, da diese Sequenz dieser Isolate ein abgeleitetes T-RF von 25 Basenpaaren hatte. T-RFs unterhalb einer Fragmentlänge von 50 Basenpaaren mußten durch das gleichzeitige Erscheinen von markierten Primerdimeren aus den T-RFLP-Analysen ausgeschlossen werden.

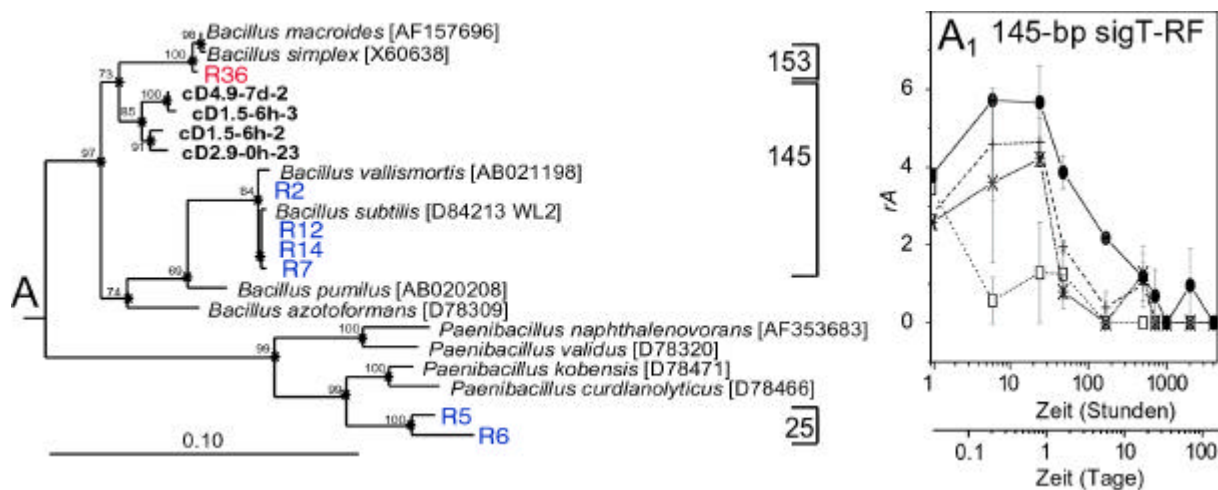


Abbildung 15: Phylogenetisches Dendrogramm zur Charakterisierung der Isolate innerhalb der Ordnung *Bacillales*. Zuordnung der Klonsequenzen und der Isolate der ein-Tag (blau) und der 70-Tage-Inokula (rot) mit den 145-bp sigT-RF und mit verwandten Bakterien innerhalb der Gattungen *Bacillus* und *Paenibacillus*. Das 25-bp und 153-bp wurden in der T-RFLP-Analyse nicht detektiert. A₁: Die rA-Verteilung des sigT-RFs erfolgte mittels 16S rRNA basierter T-RFLP-Analyse in der jeweiligen Sauerstoffzone. Weitere Details können der Legende der Abb. 7 entnommen werden.

Betaproteobacteria. Die Isolate aus den ein Tag-Inokula gruppierten eng mit den erhaltenen 16S rRNA-Gensequenzen und wiesen die gleichen T-RF-Schnittstellen auf (Abb. 7). Die Isolate aus den 70 Tage-Inokula gruppierten ebenfalls eng mit Klonsequenzen, die aus Extrakten der unteren Übergangszone 21 Tage nach Fluten generiert worden waren. Diese Sequenzen der frühen Inkubationsphase waren somit entfernt mit den Klonsequenzen und den Sequenzen der Isolate aus der späten Inkubationsphase verwandt.

Gammaproteobacteria. Das Isolat R9 gruppierte nicht mit Klonsequenzen. Das zu dem Isolat R9 gehörende 298-bp T-RF wurde allerdings in der frühen Kultivierungsphase mit einer relativen Abundanz von 1,5 % detektiert.

Verrucomicrobia. Isolate aus dem Phylum Verrucomicrobia wurden ausschließlich aus den 70 Tage-Inokula kultiviert und gruppierten miteinander in einer phylogenetisch kohärenten Gruppe. Die Sequenzen der Isolate hatten Ähnlichkeitswerte von 89,3 – 93,3 % mit den nächsten Verwandten *Optitus* sp. VeSm13 (Abb. 9). Das zu den Isolaten korrespondierende 496-bp T-RF wurde in der T-RFLP-Analyse der Phase III mit einer relativen Abundanz von 2 % detektiert. Jedoch konnten keine Klonsequenzen generiert werden, die mit diesem T-RF korrespondierten.

4.4 Quantifizierung der bakteriellen Lebensgemeinschaft

Für die Quantifizierung der bakteriellen Lebensgemeinschaft wurde Real-Time-PCR, DAPI-Zellzählungen und das Koloniezählverfahren angewendet. Bei der Real-Time-PCR wird anhand der Reaktionskinetik die ursprüngliche 16S rDNA-Anzahl eines Nukleinsäureextraktes im Verhältnis zu Eichreaktionen quantifiziert. Die verwendeten Nukleinsäureextrakte wurden ebenfalls für die T-RFLP-Analyse verwendet. Die DAPI-Zählungen basieren auf einer direkten mikroskopischen Quantifizierung von Zellen, bei denen die genomische DNA durch DAPI gefärbt wird. Die Zahl der lebenden Zellen in einer Bodensuspension wurde mit dem Koloniezählverfahren ermittelt. Bei diesem Verfahren wird die Bodensuspension logarithmisch verdünnt und auf geeignete Medien ausplattiert. Die Zellzahl berechnet sich aus der Summe der entstandenen Kolonien multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor. Die DAPI-Zählungen und das Koloniezählverfahren war an den selben Bodenkernen durchgeführt worden, die für den Kultivierungsansatz (siehe Kapitel 4.3) Verwendung fanden.

Bei der Real-Time-PCR-Messungen wurden die bakterielle 16S rDNA von den Nukleinsäureextrakte aller vier Sauerstoffzonen der Inkubationszeitpunkte sechs Stunden und ein, zwei, sieben, 42, 168 Tage und direkt nach dem Fluten (null Stunden) in drei Replikaten gemessen. Die 16S rDNA-Anzahl lag mit einer Ausnahme in der oxischen Zone nach einer Inkubationszeit von sieben Tagen über den gesamten Zeitraum in einem Größenbereich von 5×10^7 bis 8×10^8 16S rRNA-Gene g^{-1} TG Boden (Abb. 16). Die Änderungen in der Zusammensetzung der bakteriellen Lebensgemeinschaft, die durch die T-RFLP-Analyse nachgewiesen worden war, beziehen sich auf eine nahezu konstante Menge an 16S rRNA-Genen.

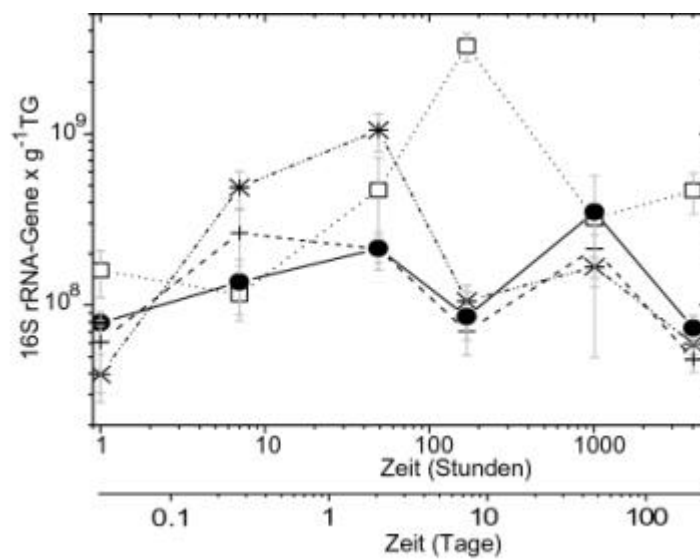


Abbildung 16: Quantifizierung der bakteriellen 16S rRNA-Gene über die Inkubationszeit und die Sauerstoffzone. Für jeden Messwert wird die Standardabweichung von den drei Replikatmessungen durch einen vertikalen Balken angegeben. Die Sauerstoffzonierung ist durch (□) für die oxische Zone, (*) für die obere Übergangzone, (+) für die untere Übergangzone und (•) für die anoxische Zone gekennzeichnet.

In einem weiteren Ansatz wurden die durch DAPI-färbbaren Zellen der Inkubationszeitpunkte ein Tag bzw. 70 Tage nach Flutung gezählt. Es wurden die DAPI-gefärbten Zellen aus drei Bodensuspensionen von jeweils drei unabhängigen Bodenkernen eines Inkubationszeitpunktes gezählt. Die Ergebnisse der drei Replikatzählungen eines Bodenkernes wurden gemittelt, d. h. die Standardabweichung bezieht sich auf drei verschiedene Bodenkernkerne. Die DAPI-Zellzahlen betragen für die einen Tag inkubierten Bodenkernkerne $7,6 \times 10^8 \pm 1,2 \times 10^7$ Zellen g^{-1} TG Boden und für die 70 Tage inkubierten Bodenkernkerne $5,7 \times 10^8 \pm 1,6 \times 10^7$ Zellen g^{-1} TG Boden.

Für die Bestimmung der Zellzahlen wurden die selben Bodensuspensionen verwendet und auf die Medien NA und R2A mit jeweils zwei Medienkonzentrationen (siehe Kapitel 4.3) in einer Verdünnungsreihe ausplattiert. Die Zellzahlen lagen bei allen Medien und Konzentrationen zwischen $1,33 \times 10^8$ und $2,14 \times 10^8$ Zellen g^{-1} TG Boden (Tab. 5). In der Relation von Zellzahlen und Ergebnissen der DAPI-Zählung machte die kultivierbare Fraktion ca. 10 % der Gesamtzellzahl aus.

Tabelle 5: Zellzahlen auf NA und R2A-Medien der ein Tag- bzw. 70 Tage- Inokula pro Gramm TG Boden. Jedes Medium wurde in zwei Konzentrationen verwendet. Aufgelistet sind Mittelwerte von neun Verdünnungsreihen pro Messwert.

Medium ¹	Koloniebildende Einheiten der Bodenkerninkubation	
	ein Tag-Inokula	70 Tage-Inokula
R2A	$2,14 \times 10^8 \pm 8,5 \times 10^7$	$1,98 \times 10^8 \pm 7,0 \times 10^7$
R2A (1:100)	$1,61 \times 10^8 \pm 5,7 \times 10^7$	$1,83 \times 10^8 \pm 6,4 \times 10^7$
NA	$2,03 \times 10^8 \pm 7,6 \times 10^7$	$1,82 \times 10^8 \pm 9,1 \times 10^7$
NA (1:100)	$1,03 \times 10^8 \pm 8,9 \times 10^7$	$1,83 \times 10^8 \pm 9,1 \times 10^7$

¹Die Nährmedium-Konzentration der verdünnten Medien ist in Klammern angegeben.

Auf den unverdünnten Medien der ein Tag-Inokula bildeten sich im Vergleich zu den Medien der 70 Tage-Inokula sehr schnell Kolonien. Auf den Medien der ein Tag-Inokula wurden bereits nach zwei Tagen Zellzahlen (8×10^7 Zellen g⁻¹ TG Boden) erhalten, während die Isolate auf den Medien der 70 Tage-Inokula erst nach einer Inkubationszeit von fünf Tagen sichtbar wurden. Die Entwicklung der Zellzahlen auf den 1:100 konzentrierten Medien war zwischen den Medien der ein Tag- und der 70 Tage-Inokula gleich.

4.5 Sukzession der archaealen Lebensgemeinschaft

Für die Untersuchung der archaealen Lebensgemeinschaft sind dieselben Nukleinsäureextrakte in den vier Sauerstoffzonen der jeweiligen 11 Inkubationszeitpunkte verwendet worden, die für die Untersuchung der bakteriellen Gemeinschaft eingesetzt worden waren. Um einen Einblick in die Sukzession der archaealen Lebensgemeinschaft zu erhalten, wurde für die T-RFLP-Analyse von jeder Sauerstoffzone zu dem jeweiligen Inkubationszeitpunkt nur ein Fingerprintmuster basierend auf der 16S rDNA-Ebene erstellt. Dies sollte einen ersten Vergleich zwischen der bakteriellen und der archaealen Sukzession ermöglichen.

Um den Effekt der Faktoren Inkubationszeit und Sauerstoffzone zu testen, wurde ein Monte-Carlo-Permutationstest durchgeführt. Die Fingerprintmuster wurden signifikant durch die Inkubationszeit (trace = 0,36; p < 0,001) und durch die Sauerstoffzone (trace = 0,04; p < 0,009) beeinflusst. Mit einer KA konnten die Unterschiede in den Fingerprintmustern der archaealen Lebensgemeinschaft aufgedeckt werden. Im Gegensatz zu der bakteriellen Sukzession wurden während der Phase 0, I und II keine

Veränderungen der Fingerprintmuster der archaealen Gemeinschaft detektiert. In Phase III konnten zeitliche und räumliche Entwicklung unterschieden werden (Abb. 17).

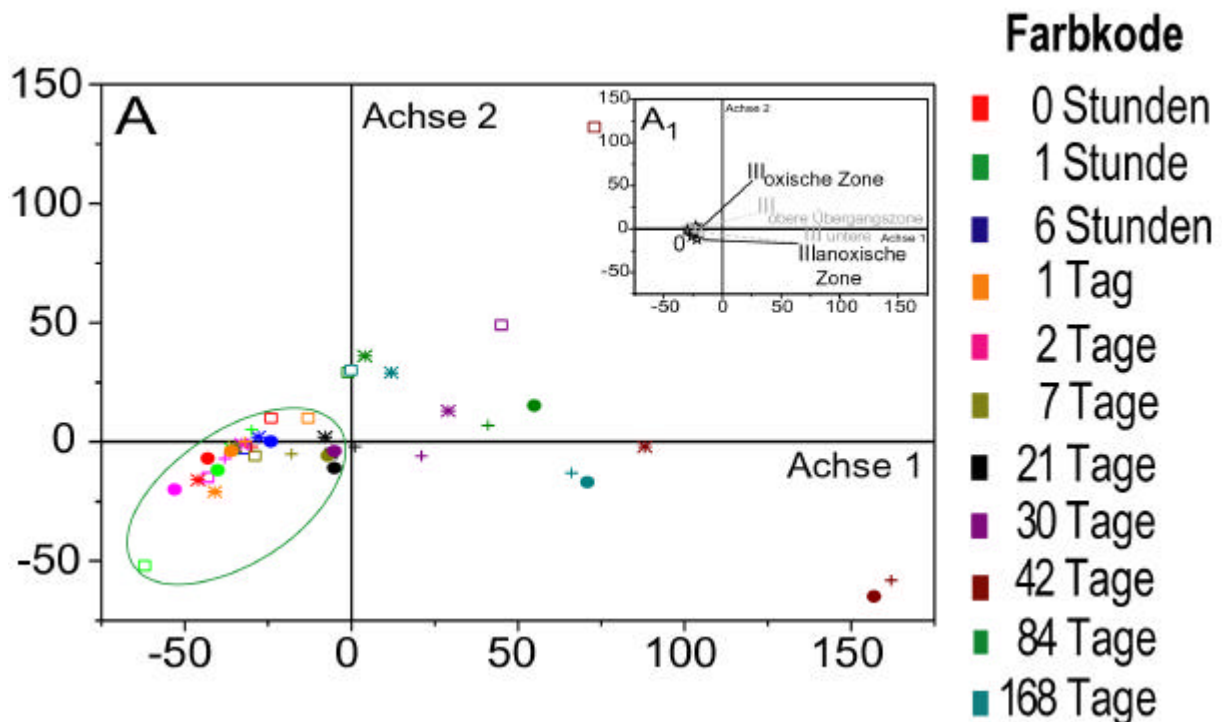


Abbildung 17: Korrespondenzanalyse der archaealen Fingerprintmuster auf rDNA-Ebene. Das Ordinationsdiagramm basiert auf der ersten und zweiten Achse der KA mit den Eigenwerten $\lambda_1 = 0.21$, $\lambda_2 = 0.08$. Die Sauerstoffzonierung wird durch (□) für die oxische Zone, (*) für die obere Übergangszone, (+) für die untere Übergangszone und (●) für die anoxische Zone kodiert. Der Farbkode gibt die Inkubationszeitpunkte wieder. Datenpunkte der für die bakterielle Sukzession definierten Phasen 0, I und II sind durch einen grünen Kreis umschlossen. A₁: Der Verlauf zeigt in der jeweiligen Sauerstoffzone die Sukzession auf 16S rDNA-Ebene. Die Eckpunkte (★) des Verlaufs sind die Mittelpunkte der Phasen I und II in dem Ordinationsdiagramm.

Von den insgesamt 17 detektierten T-RFs erfüllten 12 die Kriterien eines sigT-RFs (siehe Kapitel 4.2.2). Diese T-RFs werden im folgenden Text als *Archaea*-Signatur-T-RFs bezeichnet. Die phylogenetische Zuordnung zu den *Archaea*-Signatur-T-RFs erfolgte über bereits veröffentlichte Sequenzen aus dem gleichem Bodensystem sowie aus anderen Bodenhabitaten über die Ableitung theoretischer Schnittstellenmuster mit einer in das Softwareprogramm ARB implementierten Software (Ricke *et al.*, 2004). Diese phylogenetische Zuordnungen werden in Klammern hinter dem *Archaea*-Signatur-T-RF aufgeführt.

Die Phasen 0, I und II waren durch hohe relative Abundanzen der *Archaea*-Signatur-T-RFs 91-bp (*Methanobacteriaceae*; *Methanothermobacter*), 392-bp (Rice Cluster I, II und IV; *Methanomicrobiaceae*) und 736-bp (unkultivierte *Crenarchaeota*) charakterisiert, während die Phase III in der oxischen Zone durch das *Archaea*-Signatur-T-RFs 185-bp (*Methanosarcinaceae*, unkultivierte *Crenarchaeota*, *Methanomicrobiaceae*) und in der anoxischen Zone durch das *Archaea*-Signatur-T-RFs 75-bp (unkultivierte *Crenarchaeota* und *Korarchaeota*; Rice Cluster V) gekennzeichnet war (Abb. 18).

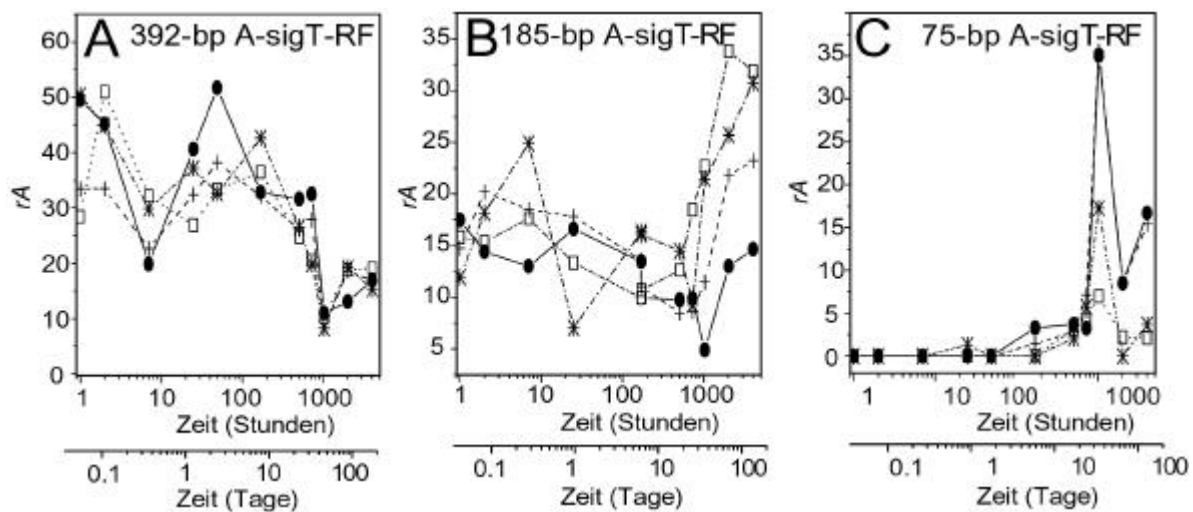


Abbildung 18: Charakteristische *Archaea*-Signatur-T-RFs in der Phasen 0, I, II (A) und der Phase III in der oxischen Zone (B) und der anoxischen Zone (C). Die Diagramme zeigen die *rA*-Verteilung der 16S rDNA-Analyse in den jeweiligen Sauerstoffzonen über Zeit für die *Archaea*-sigT-RFs 392-bp (A), 185-bp (B) und 75-bp (C). Die Sauerstoffzonierung wird durch (□) für die oxische Zone, (*) für die obere Übergangszone, (+) für die untere Übergangszone und (●) für die anoxische Zone gekennzeichnet.

5. Diskussion

5.1 Statistische Auswertung der T-RFLP-Ergebnisse

Die bakterielle Lebensgemeinschaft wurde mittels T-RFLP-Analyse in ihrer Zusammensetzung über eine Inkubationsdauer von 168 Tagen in vier definierten Sauerstoffzonen charakterisiert. Dafür wurden jeweils 132 Fingerprintmuster auf 16S rRNA- und 16S rDNA-Ebene aufgenommen. Ziel der Ordinationstechniken war es aus dem umfangreichen vorliegenden Datenmaterial die Effekte der Faktoren Inkubationszeit und Sauerstoffkonzentration extrahieren zu können. Von den zur Auswahl stehenden Ordinationstechniken hat die KA in Relation zu anderen Analysen, wie z. B. der Hauptkomponentenanalyse, sehr geringe Anforderungen an den Ausgangsdatensatz und zugleich eine gute Auflösung von den getesteten Faktoren (Gauch *et al.*, 1977). Bei ökologischen Fragestellungen erfüllen die Datensätze meist nur die Anforderungen für die Auswertung mit einer KA (Jongman *et al.*, 1987).

Die KA ist ein exploratives Verfahren zur graphischen und numerischen Darstellung von Zeilen und Spalten beliebiger Kontingenztabellen. In dieser Arbeit setzte sich die Kontingenztafel aus der Probenentnahme in den Zeilen und der relativen Abundanz der einzelnen T-RFs in den Spalten zusammen. Die Probenentnahme untergliederte sich in die beiden Faktoren der Inkubationszeit und der Sauerstoffkonzentration. Die KA berechnet mit diesen Informationen eine Distanzinterpretation der Proben und T-RFs untereinander, so dass sie als Punkte in einem zweidimensionalen Ordinationsdiagramm dargestellt werden können (Greenacre, 1984). Dadurch ermöglicht die KA eine Differenzierung der Proben in den Faktoren Inkubationszeit und Sauerstoffkonzentration. Die Berücksichtigung der relativen Abundanz der TRFs für die KA erwies sich schon in den Studien von Braker *et al.* (2000) und Edel-Hermann *et al.* (2004) als sinnvoll und ebenso wurden auch relative Bandenintensitäten für die Auswertung von DGGE-Profilen verwendet (Fromin *et al.*, 2002, Muylaert *et al.*, 2002).

Die Signifikanz der Ordination wurde für den T-RFLP-Datensatz sowohl auf 16S rRNA- als auch auf 16S rDNA-Ebene durch Monte-Carlo-Permutationstests getestet. Als Ergebnis konnte festgestellt werden, dass die Faktoren Inkubationszeit und Sauerstoffkonzentration und die Interaktion der beiden Faktoren einen signifikanten Effekt auf die bakterielle Lebensgemeinschaft hatten und diese Effekte dadurch in der Zusammensetzung der Fingerprintmuster reflektiert wurden. Direkt nach dem Fluten

konnte mit voranschreitender Inkubationsdauer eine Sukzession der bakteriellen Lebensgemeinschaft mit der KA aufgelöst werden (Abb. 5). Bei den homogenisierten Proben wurde davon ausgegangen, dass die bakterielle Gemeinschaft sich direkt nach dem Fluten in ihrer Zusammensetzung nicht unterschied. Dieser Zustand der bakteriellen Gemeinschaft wurde durch die enge Gruppierung der Fingerprintmuster der Phase 0 bestätigt. Die hohe Reproduzierbarkeit der T-RFLP-Methode wurde zuvor auch in anderen Studien beschrieben (Osborn *et al.*, 2000, Lukow *et al.*, 2000).

5.2 Die bakterielle Sukzession

Aufgrund des Flutungsprozesses wurden die Habitatbedingungen der präsenten bakteriellen Lebensgemeinschaft dramatisch verändert. Aus diesem Grund wurde der Flutungszeitpunkt als Start einer Sekundärsukzession definiert. Direkt nach der Flutung bis zu einer Inkubationsdauer von 168 Tagen wurden charakteristische Veränderungen in der Zusammensetzung der bakteriellen Lebensgemeinschaft mittels molekularbiologischer Analysen und mittels Kultivierung festgestellt (vergleiche Abb. 5 mit Abb. 11). Die Dynamik der bakteriellen Sukzession, basierend auf den Ergebnissen der TRFLP-Analyse, nahm mit voranschreitender Inkubationsdauer ab. Anhand dieser Dynamiken wurden drei Phasen der Entwicklung in der bakteriellen Lebensgemeinschaft definiert. Phase I zeichnete sich durch eine Dominanz von wenigen sich schnell entwickelnden Populationen aus, Phase II stellte einen Übergang zwischen der bakteriellen Zusammensetzung der Gemeinschaft der Phase I und der Phase III dar, während die Phase III durch eine zeitlich und räumlich stabile Lebensgemeinschaft charakterisiert war.

Eine solche zeitliche Entwicklung von Lebensgemeinschaften hängt wahrscheinlich von unterschiedlichen Lebensstrategien einzelner Mikroorganismen bzw. funktionell homogener Gruppen ab. Derartige Strategien in sich ändernden Habitatbedingungen wurde für Pflanzen (MacArthur und Wilson, 1967), aber auch von Mikroorganismen (Andrews und Harris, 1986) anhand der r- und K-Strategie diskutiert.

Neben der Dynamik zeigte auch die Identifikation charakteristischer Vertreter einzelner Phasen, dass die Ergebnisse dieser Arbeit mit dem Konzept der r/K-Selektion erklärt werden können. Da die Ergebnisse auf rein phylogenetischer Ebene erzielt wurden, wird das r/K-Konzept nicht auf spezifische funktionelle Gilden angewendet. Obwohl einzelne Organismen weder als r- noch als K-Strategie definiert werden können (Gadgil und Solbrig, 1972), so ist es jedoch möglich, die Organismengruppen in ihrer

zeitlichen Entwicklung auf einer relativen Basis anhand des r/K-Konzeptes zu vergleichen. In diesem Kontext dient das r/K-Konzept der systematischen Beschreibung der gesamten bakteriellen Gemeinschaft unter sich ändernden Habitatbedingungen. Die erzielten phylogenetischen Informationen werden dann in den Kontext der phänotypischen Eigenschaften von nah verwandten taxonomisch beschriebenen Mikroorganismen gestellt, wenn dies in der biologischen Interpretation hinsichtlich des r/K-Konzeptes sinnvoll erscheint. Die Gliederung der Diskussion richtet sich nach den drei zuvor definierten Phasen (Phase I, II und III).

5.2.1 Phase I – Dominanz von r-Strategen

Für die dominierenden bakteriellen Gruppen der Phase I können anhand ihrer frühen Detektion drei generelle Charakteristika von r-Strategen angenommen werden:

1. Hohe Wachstums- und Reproduktionsrate
2. Schnelle Reaktion auf Umweltveränderungen, Stoffwechsel mit einem vermutlich breiten Spektrum an Substraten
3. Übergang von einem aktiven Stoffwechsel zu einem Erhaltungstoffwechsel

Eine hohe Reproduktionsrate konnte in Korrespondenz zu dem Sauerstoffgradienten, der sich bereits nach sechs Stunden entwickelt hatte, mittels KA durch einen enormen Umbruch der Zusammensetzung der Fingerprintmuster interpretiert werden (Abb. 5). Die Veränderungen der Fingerprintmuster wurde in Phase I besonders auf 16S rRNA- aber auch auf 16S rDNA-Ebene beobachtet (Abb. 5).

In vielen molekularökologischen Studien wurden die Populationen in einer vergleichenden Analyse anhand der extrahierten 16S rRNA und 16S rDNA untersucht (Amann *et al.*, 1991; Teske *et al.*, 1996; Felske *et al.*, 1997). Die 16S rDNA-Ebene reflektiert das präsente genomische Potential aller Organismen einer Lebensgemeinschaft. Im Gegensatz dazu kann die Detektion der 16S rRNA als der metabolisch aktive Teil von der Lebensgemeinschaft interpretiert werden. Diese Interpretation basiert auf Wachstumsversuche von Reinkulturstudien, bei denen die metabolische Aktivität und der Ribosomengehalt einer Zelle und daher mit ihrem zellulären 16S rRNA-Gehalt korrelierte (Schaechter *et al.*, 1958, Rosset, 1966). Demnach setzt sich der detektierte 16S rRNA-Gehalt aus zwei Faktoren nämlich der Populationsgröße und der metabolischen Aktivität zusammen. Um spezifische Wachstumsraten von verschiedenen Bakterien innerhalb der mikrobiellen Gemeinschaft und ihres Habitates zu messen, wurde FISH mit Spezies-spezifischen rRNA-Sonden durchgeführt (Leser *et al.*,

1995; Moller *et al.*, 1996; Poulsen *et al.*, 1993). Jedoch scheint die Beziehung zwischen Wachstumsrate und rRNA-Gehalt nicht für alle funktionellen Gruppen gleichermaßen zu gelten, denn es zeigte sich bei autotrophen Nitrifizierern trotz spezifischer Inhibition keine messbare Abnahme des zellulären rRNA-Gehaltes (Wagner *et al.*, 1995).

Obwohl T-RFs nicht in allen Fällen zu einer einzigen phylogenetisch kohärenten Population korrespondieren (Dunbar *et al.*, 2000), so ist es doch möglich die Fingerprintmuster in einem relativen Verhältnis zwischen den Inkubationszeitpunkten miteinander vergleichen zu können (Pesaro *et al.*, 2004). Unter Berücksichtigung dieser Einschränkung konnten durch den Vergleich von der T-RF-Anzahl (S) und der TRF-Äquitabilität (E) der Fingerprintmuster (Abb. 10) über die Inkubationszeit folgende Aussagen getroffen werden: Im Vergleich zwischen der rRNA- und rDNA-Ebene deutete sowohl die T-RF-Anzahl als auch die T-RF-Äquitabilität in der Phase I darauf, dass die rRNA-Ebene die Ausprägung der Dynamik stärker wiedergab.

In Kombination mit den Ergebnissen aus der KA und der Identifikation abundanter sigT-RFs der Phase I konnte gezeigt werden, dass ein phylogenetisch und funktionell definierter Teil der gesamten bakteriellen Gemeinschaft die r-selektierenden Bedingungen durch hohe Wachstums- und Reproduktionsraten nutzen konnten. Diese r-Strategen waren in der oxischen Zone *Betaproteobacteria* und in der anoxischen Zone Clostridien. Diese Populationen sind durch ihre schnelle Reaktion auf Umweltveränderungen für die Beschreibung der bakteriellen Sukzession besonders interessant und werden im folgenden Text hinsichtlich des r/K-Konzeptes diskutiert.

Oxische Zone: Die oxische Zone wurde von Mitgliedern der *Betaproteobacteria* dominiert. Die Sequenzen der Isolate und der Klone, die der Phase I zugeordnet werden konnten, standen in enger Verwandtschaft miteinander (Abb. 7). Dies lässt zwei Vermutungen zu. Zum einen, dass die Mehrheit der Klonsequenzen metabolisch aktive Mikroorganismen repräsentiert und zum anderen, dass ein Großteil der isolierten Bakterien *in situ* präsent und dominant ist.

In der Regel decken die Sequenzinformationen von 16S rRNA-Gen-Bibliotheken natürlicher bakterieller Lebensgemeinschaften nicht die Diversität von Isolaten aus gleichen oder ähnlichen Proben ab (Hiorns *et al.*, 1997; Suzuki *et al.*, 1997; Hugenholtz *et al.*, 1998). In dieser Arbeit konnte allerdings eine phylogenetische Übereinstimmung zwischen den Sequenzen der Isolate und der Klone beobachtet werden (Abb. 7, 9, 12, 13, 14, 15, 16). Diese Übereinstimmung war in der Phase I besonders ausgeprägt, während in der Phase III diese Übereinstimmungen nicht so offensichtlich waren (siehe Kapitel 4.3.1). Der Vergleich zwischen Kultivierung und Umweltanalyse, also zwischen zwei methodisch

unabhängigen Ansätzen, bestätigten sich gegenseitig, so dass davon auszugehen ist, dass abundante Vertreter der bakteriellen Sukzession nachgewiesen worden waren.

Bei einem Vergleich der 454-bp, 484-bp und 489-bp sigT-RFs, die den Gattungen des Phylums *Betaproteobacteria* zugeordnet werden konnten, wurden unterschiedliche relative Abundanzen über die Inkubationszeit zwischen den drei sigT-RFs nachgewiesen. Bei dem Kultivierungsansatz wurden ebenfalls unterschiedliche Vertreter der *Betaproteobacteria* von beiden Probennahmezeitpunkten isoliert. *Betaproteobacteria* sind eine physiologisch heterogene Gruppe (Kerstens *et al.*, 2001). An einigen Beispielen der *Betaproteobacteria* konnte gezeigt werden, dass diese Organismen verschiedene Strategien zur Bewältigung von Umweltstress entwickelt haben (Klappenbach *et al.*, 2000). Dies ist eine mögliche Erklärung für ein zeitlich differenziertes Auftreten von Gruppen innerhalb der *Betaproteobacteria*. Die ausschließliche Detektion des 454-bp sigT-RFs in einer Phase und Sauerstoffzone weist daraufhin, dass die Vertreter dieses sigT-RFs eine funktionell homogene Gruppe bilden. Das 454-bp sigT-RF ließ sich Sequenzen der Isolate R20 und R264 und Klonsequenzen zuordnen, die alle innerhalb der Gattung *Aquabacterium* gruppierten (Abb. 7). Diese Gattung wird durch mikroaerophile heterotrophe Organismen charakterisiert, die ein breites Spektrum an kurzkettigen organischen Säuren zum Wachstum verwerten können (Kalmbach *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu repräsentierte das 489-bp sigT-RF eine phylogenetisch und funktionell heterogene Gruppe. Dieses sigT-RF wies zu allen Inkubationszeitpunkten in der oxischen Zone eine hohe relative Abundanz auf und umfasst eine phylogenetisch umfangreiche Liste an Gattungen innerhalb der *Betaproteobacteria*, wie z. B. *Herbaspirillum*, *Janthinobacterium* und *Telluria* (Abb. 7). Mitglieder dieser Genera sind bekannt als strikt aerobe (*Telluria* und *Janthinobacterium*) oder fakultativ aerobe Organismen (*Herbaspirillum*) und können ein breites Spektrum an einfachen Kohlenstoffverbindungen zum Wachstum verwerten (Baldani *et al.*, 1996, Bowman *et al.*, 1993).

Neben den *Betaproteobacteria*-Isolaten aus den ein Tag-Inokula wurden auch zwei Isolate aus den 70 Tage-Inokula isoliert. Diese beiden Isolate waren im Gegensatz zu den ein Tag-Inokula in naher Verwandtschaft mit Klonsequenzen aus der Phase III (Abb. 7) und mit dem Bakterium *Herbaspirillum seropedicae*. *Herbaspirillum* spp. sind heterotroph, haben eine Sauerstoff-Chemotaxis und können unter mikroaerophilen Bedingungen Stickstoff fixieren (Baldani *et al.*, 1996). Ferner sind *Herbaspirillum* spp. unter anoxischen Bedingungen in der Lage, Nitrat dissimilatorisch und/oder assimilatorisch zu reduzieren (Baldani *et al.*, 1986). Daher kann angenommen werden, dass die Isolate

der Phase III im Vergleich zu den Isolaten der Phase I eine andere Lebensstrategie reflektieren und dass das 489-bp sigT-RF sowohl Vertreter mit r-Strategie als auch mit K-Strategie repräsentiert.

Anoxische Zone: Die anoxische Zone wurde von Mitgliedern der Gattung *Clostridium* (vor allem des Clusters I) dominiert (Abb. 8). In der T-RFLP-Analyse wurden die drei sigT-RFs, die mit Vertretern der Gattung *Clostridium* korrespondierten, ausschließlich in Phase I der anoxischen Zone nachgewiesen. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass diese drei sigT-RFs trotz ihrer phylogenetischen Heterogenität (Abb. 6) eine funktionell homogene Gruppe bilden. Kultivierte Vertreter innerhalb der Clostridien des Clusters I können ein breites Spektrum an Poly- und Monosacchariden verwerten (Collins *et al.*, 1994) und gehören zu den dominanten Populationen bei der Kolonisation und Degradation von Reisstroh in gefluteten Reisfeldböden (Liesack *et al.*, 2000; Weber *et al.*, 2001). Saccharolytische Clostridien des Clusters I erwiesen sich zudem in einem Chemostatexperiment bei hohen Stärkekonzentrationen als schnellwachsende Gilde, während *Bacteriodes* sich effektiv bei limitierenden Substratbedingungen durchgesetzt haben (Sharp und MacFarlane, 2000). Diese Studien unterstützen die Interpretation, dass die Clostridien des Clusters I als klassische anaerobe r-Strategen beschrieben werden können.

Die meisten Bakterien sind bis zu einem gewissen Grad in der Lage, für eine Periode erschwerner Bedingungen ihre Aktivität zu reduzieren, um bei günstigeren Zeiten die Aktivität wieder zu erhöhen. Keine Bakterien sind bei diesem Prozess so effektiv wie Clostridien oder Bacillen (Driks, 2003). Beide Gattungen haben die Fähigkeit Endosporen zu bilden und können dadurch eine Reihe von unterschiedlichen Umweltbelastungen, wie z. B. Trockenheit, Hitze und Strahlung überdauern (Nicholson *et al.*, 2000; Setlow, 2000; Dürre und Hollergschwandner, 2004). Westphal *et al.* (2003) konnten anhand von *Bacillus thuringiensis* zeigen, dass bereits nach ein bzw. acht Minuten die Mantelproteine der Sporen dieser Spezies auf eine erhöhte Luftfeuchtigkeit reagieren und somit sehr schnell auf Veränderungen der Umwelt physiologisch antworten. Die Fähigkeit, schnell von einem Erhaltungsstoffwechsel zu einem aktiven Stoffwechsel bzw. von einem aktiven Stoffwechsel zu einem Erhaltungsstoffwechsel umschalten zu können, ist eine typische Eigenschaft von r-Strategen (Andrews und Harris, 1986). Diese beiden Gattungen wurden in der T-RFLP-Analyse den 145-bp (Abb. 15), 270-bp, 510-bp und 519-bp (Abb. 8) sigT-RFs zugeordnet, deren relative Abundanzen auf 16S rRNA-Niveau mit Beginn der Phase II stetig abnahmen. Die 16S rDNA-basierten Ergebnisse dieser sigT-RFs wiesen direkt nach dem Fluten hohe relative Abundanzen mit einer gemeinsamen relativen

Abundanz von 25 % auf, die mit voranschreitender Sukzession stark abnahmen. Dies deutet darauf, dass ein hoher Anteil der Clostridien und Bacillen im getrockneten Boden in Form von Sporen überdauert haben. Bei den sigT-RFs, die zu den Clostridien korrespondierten, konnten in Phase III in den 16S rDNA-basierten Studien relative Abundanzen von bis zu 5 % festgestellt werden, so dass die Vertreter der Clostridien ebenfalls in der Phase III als genetisches Potential präsent waren. Es wurden sowohl bei den ein Tag-Inokula als auch bei den 70 Tage-Inokula Vertreter der Gattung *Bacillus* isoliert. Jedoch konnten nur die Isolate von den ein Tag-Inokula zu einem sigT-RF zugeordnet werden, während das Isolat von den 70 Tage-Inokula keinem detektiertem T-RF entsprach (Abb. 15). Diese Befunde bei den Gattungen *Bacillus* und *Clostridium* lassen die Schlussfolgerung zu, dass Vertreter dieser Gattung in der Phase I aktiv und in den Phasen II und III als Spore präsent waren.

5.2.2 Phase II – Der Übergang von r- zur K-Strategen

Die Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft veränderte sich mit voranschreitender Inkubationsdauer. In dieser Entwicklung kann die Phase II als Übergang zwischen den sigT-RFs der Phase I und der Phase III interpretiert werden. Bei diesem Wechsel in der bakteriellen Zusammensetzung war daher keine scharfe Abgrenzung bei der Etablierung von abundanten sigT-RFs zu verzeichnen, so dass bereits in Phase II ein Großteil der in Phase III abundanten sigT-RFs detektiert werden konnten. Die 160-bp und 439-bp sigT-RFs wiesen in diesem Entwicklungsprozess ihre höchste relative Abundanz in der Phase II auf, wenngleich sie auch in Phase III nachgewiesen werden konnten. Beachtenswert war das 439-bp sigT-RF (Abb. 14), das in der anoxischen Zone die sigT-RFs ablöste, die den Clostridien zugeordnet werden konnten. Das 439-bp sigT-RF korrespondierte mit Vertretern des Phylums *Alphaproteobacteria*. Zusätzlich korrespondierten einige Sequenzen der Isolate der 70 Tage-Inokula, die ebenfalls innerhalb der *Alphaproteobacteria* gruppierten (Abb. 14). Es konnte allerdings keine direkte Verwandtschaft zwischen den Sequenzen der Isolate und denen der Klone nachgewiesen werden. Dies könnte durch folgende drei Ursachen begründet sein:

i) Die Klonsequenzen stammen von Mikroorganismen, die mittels der zur Anwendung gekommenen Standardmethoden nicht isoliert werden können. Um solche Organismen in Reinkultur zu gewinnen, müssten für diese Organismen spezifische Kultivierungstechniken erarbeitet werden. Dies war aber nicht Ziel dieser Arbeit, denn durch den angewendeten Kultivierungsansatz sollte ein Vergleich zwischen der

Diversität von Populationen unter gleichen Kultivierungsbedingungen zu einem frühen und einem späten Zeitpunkt der Sukzession ermöglicht werden.

ii) Die Extraktion der Nukleinsäuren und die nachfolgende PCR bzw. RT-PCR können mögliche Fehlerquellen bei der T-RFLP-Analyse darstellen und selektiv bestimmte Sequenztypen bevorzugen. Da Sequenzen sowohl von Gram-positiven (z. B. *Clostridium*, *Nocardia*) als auch von Gram-negativen (*Zoogloea*, *Polyangium*) Mikroorganismen erhalten worden waren, lässt diese Datengrundlage die Schlussfolgerung zu, dass Mikroorganismen mit verschiedenen Zellwandtypen mit der angewandten Extraktionsmethode aufgeschlossen werden konnten. Daher kann angenommen werden, dass eine repräsentative Extraktion der Nukleinsäuren stattgefunden hat. Systematische Fehler der Amplifikation und der anschließenden T-RFLP-Analyse konnten durch die Justierung der optimalen PCR- bzw. RT-PCR-Bedingungen und -Zykluszahlen minimiert werden.

iii) Die geringe Stichprobenzahl der Klonsequenzen und der Isolate reflektiert nur einen kleinen Teil der Sequenzen, die durch die beiden Analysemethoden theoretisch erfasst werden könnten. Doch sowohl bei den Klonen als auch bei den Isolaten konnten innerhalb einer Inkubationszeit sehr hohe Sequenzähnlichkeiten erzielt werden. Daher ist eine zufällige Verteilung der Sequenzen unwahrscheinlich. Außerdem ist die vermehrte Isolation von phylogenetisch nah verwandten Bakterien in zwei verschiedenen Komplexmedien und Medienkonzentrationen eines Kultivierungszeitpunktes ein Hinweis darauf, dass repräsentative Bakterien aus den Verdünnungsstufen der Inokula isoliert werden konnten.

5.2.3 Phase III – Äquitabilität von K-Strategen

Aufgrund der stabilen Zusammensetzung der Lebensgemeinschaft in Phase III können drei generelle Charakteristika von K-Strategen für die abundanten bakteriellen Populationen angenommen werden:

1. Anpassung an eine stabile Umwelt
2. Konkurrenz um Substrate und Anpassung an geringe Substratkonzentrationen
3. Wechsel zu einem effizienten Stoffwechsel mit langsamer Reproduktionsrate

Da während der gesamten Inkubationsdauer keine Energiequellen hinzugefügt wurden, kann davon ausgegangen werden, dass sich eine konstante Verfügbarkeit und ein einheitliches Spektrum von Substraten in der Phase III eingestellt hat. Lu *et al.* (2002) konnten einen nahezu konstanten Anteil an gelöstem organischen Kohlenstoff pro g TG in unbepflanzten Bodenkernen von Reisfeldboden über eine

Inkubationszeit von 130 Tagen detektieren. Während einer anaeroben Inkubation ebenfalls von dem gleichen Reisfeldboden wurde nach 49 Tagen ein Fließgleichgewicht in der Produktion von Methan und Kohlendioxid gemessen. Basierend auf diesen Akkumulationsmustern wurde eine stabile mikrobielle Aktivität abgeleitet (Yao *et al.*, 1999). Aus diesen Gründen können stabilisierte Habitatbedingungen angenommen werden. In der T-RFLP-Analyse wurde die Phase III durch sehr ähnliche Fingerprintmuster charakterisiert (Abb. 5). Diese hohe Konvergenz der Fingerprintmuster mit einer hohen T-RF-Äquitabilität deutet auf eine Klimaxgemeinschaft hin.

Ein Veränderung der Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft über die Inkubationszeit konnte auch bei dem Kultivierungsansatz festgestellt werden. Bei beiden Kultivierungszeitpunkten wurden die Ergebnisse der DAPI-Zählungen und der Real-Time-PCR in Relation zu den Ergebnissen des Koloniezählverfahren gesetzt. Diese Relation ergab eine kultivierbare Fraktion von ca. 10 %. Obgleich die koloniebildenden Einheiten zwischen den beiden Kultivierungszeitpunkten in derselben Größenordnung lagen (ca. $1,8 \times 10^8$ Zellen g^{-1} TG), wurden auf Basis der vergleichenden Sequenzanalyse phylogenetisch völlig unterschiedliche Mikroorganismen isoliert (Abb. 11). Dieses Ergebnis legt nahe, dass die Inkubationsdauer des gefluteten Reisfeldbodens ein entscheidender Faktor dafür ist, welche Mikroorganismen aus den endpositiven Verdünnungsstufen isoliert werden. Es ist daher anzunehmen, dass die isolierten Organismen die kultivierbare Fraktion der dominanten Organismen der Phase III repräsentieren.

Die Veränderungen in der Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft, die zur Etablierung der Phase III-Lebensgemeinschaft führte, kann durch eine mit voranschreitender Inkubationsdauer steigende Konkurrenz um die verfügbaren Substrate erklärt werden. Dabei sind die Organismen im Vorteil, die eine Anpassung an geringe Substratkonzentrationen vollziehen können. In den T-RFLP-Analysen konnten Vertreter von solchen Spezialisten abundant nachgewiesen werden. Diese Vertreter wiesen eine klare Präferenz für eine Sauerstoffkonzentration auf (Abb. 9), obwohl die gesamten Fingerprintmuster der Phase III in der KA keine räumliche Differenzierung zuließen (Abb. 5). Aus diesem Grund werden die nächsten Verwandten der sigT-RFs und der Isolate in Abhängigkeit zu ihrer Sauerstoffzone erläutert.

Oxische Zone: Die oxische Zone wurde durch Mitglieder der Phyla *Verrucomicrobia*, *Acidobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* und *Nitrospira* charakterisiert. Mit Ausnahme des Phylums *Nitrospira* konnte dieser Befund auch mit Isolaten aus den 70 Tage-Inokula bestätigt werden.

Bakterien des Phylums *Verrucomicrobia* wurden bereits im gleichen Reisfeldboden sowohl in molekularen (Hengstmann *et al.*, 1999) als auch in kultivierungsabhängigen Versuchen (Chin *et al.*,

1999) als abundante Gruppe in der anoxischen Zone detektiert. In der vorliegenden Studie waren allerdings nur *Verrucomicrobia*-spezifische T-RFs in der oxischen Zone nachgewiesen worden. Außerdem stellen die Klonsequenzen und sogar auch die erhaltenen Isolate mit einer Sequenzähnlichkeit von > 93,5 % zu dem nächsten kultivierten Vertreter phylogenetisch völlig neue Bakterien dar. Daher kann aufgrund fehlender naher verwandter Reinkulturen der Phänotyp nicht diskutiert werden. Das 290-bp sigT-RF wies im Vergleich zu den *Verrucomicrobia*-korrespondierenden sigT-RFs (Abb. 9) ähnliche relative Abundanzen über die Inkubationszeit auf. Dieses 290-bp sigT-RF korrespondierte mit einer definierten Gruppe der *Acidobacteria* (Abb. 12), von denen bisher noch keine Reinkulturen charakterisiert wurden. Ohne die phänotypischen Eigenschaften der bakteriellen Vertreter dieser beiden sigT-RFs zu kennen, kann vermutet werden, dass diese Bakterien auf ähnliche Weise auf Veränderungen in dem Habitat reagierten. Vertreter des Phylums *Acidobacteria* wurden bei der Entstehung von Biofilmen ebenfalls als abundante Organismen einer Klimaxgemeinschaft beschrieben (Martiny *et al.*, 2003).

Die Detektion des 600-bp sigT-RFs in nur einer Phase und Sauerstoffzone weist daraufhin, dass die Vertreter dieses sigT-RFs eine funktionell homogene Gruppe bilden. Das 600-bp sigT-RF ließ sich Klonsequenzen zuordnen, die alle innerhalb der Gattung *Nitrospira* gruppierten (Abb. 9). *Nitrospira* spp. wachsen obligat chemolithotroph und gewinnen durch die Oxidation von Nitrit zu Nitrat Energie (Ehrich *et al.*, 1995). In einer anderen Studie wurden in einem nitrifizierenden Bioreaktor die Abundanzen der beiden Taxa *Nitrospira* und *Nitrobacter* über die Zeit verglichen (Schramm *et al.*, 1999). *Nitrospira* spp. wiesen sich als typische K-Strategen mit einer Adaption an geringe Nitrit- und Sauerstoffkonzentrationen aus. Im Gegensatz dazu wurden *Nitrobacter* spp. als r-Strategen eingestuft, da diese sich besonders bei höheren Nitrit- und Sauerstoffkonzentrationen entwickelten. Klonsequenzen dieser Arbeit konnten *Nitrospira moscoviensis* als nächsten Verwandten zugeordnet werden (Abb. 9). Da *Nitrospira moscoviensis* und die weiteren kultivierten und taxonomisch beschriebenen Mitglieder der Gattung *Nitrospira* klar definierte phänotypische Eigenschaften haben, deutet die Detektion nah verwandter Organismen darauf hin, dass diese Organismen einen ähnlichen Stoffwechsel vollziehen. *Nitrospira moscoviensis* kann aufgrund der phänotypischen Eigenschaften zu den K-Strategen gezählt werden, da diese Bakterien eine maximale Verdopplungszeit von 12 h mit einem sehr geringen Zellertrag haben. Zudem wird das Wachstum bereits bei Substratkonzentrationen über 0,75 g Nitrit pro Liter inhibiert, so dass sie besonders auf oligotrophe Habitate spezialisiert sind (Ehrich *et al.*, 1995).

Die kultivierbare Fraktion der 70 Tage-Inokula bestand zu einem Großteil aus Vertretern des Phylums *Alphaproteobacteria*. In einer Studie von Klappenbach *et al.* (2000) wurden Isolate aus einem japanischen Reisfeldboden anhand ihrer Wachstumsgeschwindigkeit auf 1:100 verdünnten Komplexmedien und an ihrer rRNA-Operon-Kopienanzahl in das r/K-Konzept eingeordnet. Während isolierte Vertreter des Phylums *Betaproteobacteria* von der Studie von Klappenbach *et al.* (2000) sowohl durch ihre Wachstumsgeschwindigkeit als auch durch ihre Operonanzahl von ein bis sechs Kopien als r- und als K-Strategen eingestuft wurden, so wurden alle Vertreter des Phylums *Alphaproteobacteria* als K-Strategen charakterisiert. Die dort beschriebenen *Alphaproteobacteria*-Isolate hatten ein bis zwei rRNA-Operon-Kopien (Klappenbach *et al.*, 2000) und wurden ausschließlich von sechs Tage lang inkubierten Agarplatten isoliert (Mitsui *et al.*, 1997). Zudem waren diese Isolate nah verwandt mit den Isolaten aus dieser Arbeit, so dass die geschilderten Eigenschaften auch den Isolaten dieser Arbeit angenommen werden können (Abb. 14).

Anoxische Zone: Die anoxische Zone der Phase III ist am ehesten durch die hohe relative Abundanz des durch *Myxococcales* repräsentierten 502-bp sigT-RF charakterisiert (Abb. 9). Das 502-bp sigT-RF konnte neben den hohen relativen Abundanzen in der anoxischen Zone allerdings auch in der oxischen und der oberen Übergangszone detektiert werden. *Myxobacteria* sind bekannt für einen strikt aeroben organotrophen Metabolismus mit hohen Reproduktionsraten und der Fähigkeit, Fruchtkörper zu bilden (Dawid, 2000). Es wurden jedoch auch *Myxobacteria*, wie z. B. *Anaeromyxobacter dehalogenans*, mit davon abweichenden phänotypischen Eigenschaften isoliert (Sanford *et al.*, 2002) (Abb. 9). Diese können eine Reihe von alternativen Elektronenakzeptoren [NO_3^- , Fe^{3+} , Fumarat] dissimilatorisch nutzen und scheinen an geringe Substratkonzentrationen adaptiert zu sein. Aus dem untersuchten Vercelli-Reisfeldboden wurde ein solcher Stamm isoliert und konnte als dissimilatorischer Eisenreduzierer charakterisiert werden (Treude *et al.*, 2003). Daher ist es möglich, dass die durch Klonsequenzen detektierten Vertreter der *Myxobacteria* in Phase III ebenfalls an oligotrophe Bedingungen adaptiert sind und ihre Energie unter Nutzung von alternativen Elektronenakzeptoren, wie z. B. der Fe^{3+} -Verbindungen, gewinnen.

Der Sauerstoffverbrauch der gesamten Lebensgemeinschaft wurde aus Sauerstoffprofilen sowohl von Bodenkernen der Phase I und als auch der Phase III berechnet (siehe Kapitel 4.1.1). Als Ergebnis konnte festgestellt werden, dass mit voranschreitender Inkubationszeit der Sauerstoffverbrauch der Lebensgemeinschaft abnahm und somit die abgeleitete Stoffwechselaktivität der Lebensgemeinschaft sich

verringerte. Bei den Bodenkernen der Phase III wurde in den tieferen Bodenschichten im Vergleich zu den oberflächennahen Bodenschichten eine höhere Respirationsrate berechnet. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass die Diffusion von chemischen Verbindungen zwischen der anoxischen und der oxischen Zone, die durch die bakterielle Gemeinschaft zur Reduktion genutzt werden können, in den älteren Bodenkernen an Bedeutung gewonnen hat. Biologische Prozesse, die bei der Umsetzung von reduzierten zu oxidierten Reaktanden profitieren, können die aerobe Methanoxidation (Gilbert und Frenzel, 1998), die Eisenoxidation (Ratering und Schnell, 2000) und die Nitrifikation (Arth und Frenzel, 2000) sein. Weitere Hinweise für die Prozesse der Methanoxidation und der Nitritoxidation konnten durch das abundante Auftreten von Vertretern der Gattung *Methylobacter* und *Nitrospira* während der Phase III in der T-RFLP-Analyse erzielt werden, so dass dies die Annahme der Diffusion von reduzierten Reaktanden stützen.

5.3 Mögliche Widersprüche zur Interpretation der bakteriellen Sukzession anhand des r/K-Konzeptes

Durch ein zeitliches Auftreten ungünstiger Habitatbedingungen könnten Organismengruppen die phänotypisch als typische r-Strategen eingeteilt werden würden, erst in der späten Inkubationsphase die Habitatbedingungen für sich nutzen. Folgende Situationen sind denkbar:

1. Substratquelle: Essentielle Substrate werden erst mit voranschreitender Sukzession verfügbar. Obwohl keine weiteren Substrat- und Energiequellen während der Inkubation hinzugefügt wurden, können zusätzliche Substrate aus biologischen Prozessen verfügbar werden. Ein Beispiel für eine mit voranschreitender Sukzession entstehende Substratquelle ist die CH_4 -Produktion von methanogenen *Archaea* in der anoxischen Zone des Reisfeldes (Frenzel *et al.*, 1992). Dies induziert die Entwicklung methanotropher Gilden in dem Reisfeldboden. Demnach können bakterielle Gruppen auch indirekt durch den Flutungsprozess metabolisch aktiviert werden.

2. Konkurrenz: Aufgrund von Konkurrenz können sich typische r-Strategen in ihrer funktionellen Gilde nicht entwickeln. Dies könnte durch eine funktionelle Gilde geschehen, die indirekt eine andere funktionelle Gilde beeinflusst. In der Konkurrenz um Ressourcen in gefluteten Reisfeldsystemen können z. B. Nitrat-, Eisen- und Sulfatreduzierer durch ihre Reduktionsprozesse den H_2 -Partialdruck senken und somit den Prozeß der hydrogenotrophen Methanogenese, der erst bei einem hohen H_2 -Partialdruck exergonisch wird, supprimieren (Yao und Conrad, 1999; Roy *et al.*, 1997). Zusätzlich können die

gleichen Organismen erfolgreich um das Substrat Acetat konkurrieren, so dass die acetoklastische Methanogenese ebenfalls suppremiert werden würde. In anderen Studien wurde die Kompetition zwischen Ammoniak-Oxidierern und Methanotrophen im Reisfeldboden untersucht. Dabei konnten die Methanotrophen einen Großteil der gemessenen Ammoniumoxidation für ihre Zwecke nutzen (Bodelier *et al.*, 2000; Bodelier und Frenzel, 1999).

3. Rolle von Parasiten und Prädatoren: In einer Untersuchung der Beziehung zwischen Ciliatenfauna und mikrobieller Lebensgemeinschaft im gleichen Reisfeldsystem wurde gezeigt, dass über eine Inkubationszeit von 160 Tagen eine Beweidung der Mikroorganismen durch Protozoen stattgefunden hat (Schwarz *et al.*, 2003). Dies wird mit einer Veränderung in der Zusammensetzung der individuellen Zellvolumina der Mikroorganismen über die Zeit begründet, bei dem die von Protozoen zum Fraß bevorzugten Zellvolumina in der späten Inkubation abnahmen.

5.4 Die archaeale Sukzession

Eine Analyse der archaealen Lebensgemeinschaft innerhalb eines definierten Sauerstoffgradienten über die Zeit ist bisher noch nicht in dem Reisfeldsystem durchgeführt worden. In Korrespondenz zu den molekularen Untersuchungen der bakteriellen Lebensgemeinschaft wurde ein erster Einblick in die Zusammensetzung der *Archaea*-Lebensgemeinschaft erhalten. Eine phylogenetischen Einordnung war somit nicht das Ziel der Analyse.

Bei der KA mit den archaealen Fingerprintmustern wurde erst nach 30 Tagen eine zeitliche Differenzierung aufgedeckt (Abb. 17). In allen folgenden Inkubationszeitpunkten separierten sich die Fingerprintmuster entsprechend den spezifischen Sauerstoffzonen, wobei die Fingerprintmuster der oxischen Zone besonders divergent zu den Mustern der anoxischen Zone waren. Die stabile Zusammensetzung der *Archaea*-Lebensgemeinschaft bis zu einem gefluteten Inkubationszeitpunkt von 21 Tagen wurde ebenfalls bei anaeroben Bodensuspension-Inkubationen mit dem gleichen Vercelli-Reisfeldboden beobachtet (Lüders und Friedrich, 2000). Weber *et al.* (2001) konnten bei der Degradation von Reisstroh in der anoxischen Zone des gleichen Reisfeldbodens keine Veränderung der *Archaea*-Lebensgemeinschaft über eine Inkubationsdauer von 57 Tagen feststellen.

Die Veränderungen der Fingerprintmuster der Phase III in der anoxischen Zone basierten auf einen Anstieg des 75-bp *Archaea*-sigT-RFs und einer gleichzeitigen Abnahme des 392-bp *Archaea*-sigT-RFs. Sowohl in der Studie von Weber *et al.* als auch in der Studie von Lüders und Friedrich (2000)

konnten keine Veränderungen dieser beiden *Archaea*-sigT-RFs festgestellt werden. Daher ist davon auszugehen, dass sich eine spezifische bisher unbeschriebene *Archaea*-Lebensgemeinschaft an den Sauerstoffgradienten angepasst hat. Aus diesem Grund wäre eine Identifikation für solche Organismen, die die Phase III charakterisieren, aufschlussreich.

Die Daten weisen darauf hin, dass die Sukzession der *Archaea*-Lebensgemeinschaft im Vergleich zur Sukzession der bakteriellen Lebensgemeinschaft über einen längeren Zeitraum abläuft.

5.5 Schlußfolgerungen und offene Fragen

Die kultivierungsunabhängigen molekularbiologischen Analysen und die Ergebnisse des Kultivierungsansatzes geben klare Hinweise darauf, dass eine bakterielle Sukzession stattgefunden hat. Die hohe Übereinstimmung der Replikate der jeweiligen Inkubationszeitpunkte bei beiden unabhängigen Analysen demonstrieren, dass die bakterielle Sukzession nach einem übergeordneten Prinzip verläuft. Dieses Prinzip konnte mit dem Konzept der r- und K-Selektion erklärt werden. Durch das Fluten des Bodens wurde eine Veränderung von einem K- zu einem r-selektierenden Habitat verursacht, die dramatische Veränderungen in der Zusammensetzung der bakteriellen Lebensgemeinschaft herbeiführte. Der Flutungsprozess hat vermutlich eine erhöhte Verfügbarkeit eines großen Spektrums schnell verwertbarer Substraten bewirkt, die in Abhängigkeit vom Sauerstoffgradienten von r-Strategen genutzt werden konnten. Die r-Strategen konnten eindeutig spezifischen ausschließlich heterotrophen Gattungen der *Betaproteobacteria* in der oxischen und zu Clostridien (insbesondere zum Cluster I [sensu Collins *et al.*, 1994]) in der anoxischen Zone zugeordnet werden.

Mit voranschreitender Sukzession entwickelte sich eine Klimaxgemeinschaft, die durch spezifische Stoffwechselprozesse charakterisiert wurde. In der oxischen Zone waren dies Nitritoxidierer (*Nitrospira*), Methanotrophe (*Methylobacter*) und Organismen, deren Stoffwechselfunktionen nicht eindeutig zugeordnet werden konnten (*Verrucomicrobia* / *Acidobacteria*). In der anoxischen Zone konnten sich fakultative Nitratreduzierer (*Herbaspirillum*) und Eisenreduzierer (*Myxococcales*) durchsetzen.

Bei dem Kultivierungsansatz wurde trotz der Beschränkung auf organoheterotroph wachsende Organismen ebenfalls eine eindeutige Veränderung der kultivierbaren Fraktion zwischen den ein Tag-Inokula und den 70 Tage-Inokula festgestellt. Dies war im Einklang mit den Ergebnissen der T-RFLP-Analyse und kann als zusätzliche Bestätigung für das r/K-Konzept aufgefasst werden.

Eine phänotypische Charakterisierung der Isolate hinsichtlich ihrer Wachstumsdynamik auf unterschiedlichen Substraten und Substratkonzentrationen können einen weiteren Beitrag für die Bestätigung des Konzeptes der r-/K-Selektion liefern. Durch kontinuierliche Kulturen, wie z. B. Chemostaten, können Isolate der ein Tag-Inokula direkt mit Isolaten der 70 Tage-Inokula unter Laborbedingungen verglichen werden. Dadurch ist eine weitere physiologische Unterscheidung zwischen den Isolaten der beiden Kultivierungszeitpunkte möglich. Zusätzlich könnte eine genotypische Charakterisierung der Isolate nach der rRNA-Operonanzahl eine weitere Klassifikationsmöglichkeit des Strategietyps ermöglichen.

Das Experiment wurde unter vielen konstanten Umweltfaktoren (wie z. B. Temperatur, Wassergehalt, Dunkelheit) durchgeführt. Die Interpretation konnte daher auf die variablen Parameter Inkubationszeit und Sauerstoffkonzentration reduziert werden. Auf Basis dieser Daten ist es möglich, weitere Umweltfaktoren für die Entwicklung der bakteriellen Lebensgemeinschaft zu untersuchen. Interessant wären dabei fluktuierende Faktoren, wie z. B. ein Tag/Nacht-Rhythmus oder ein periodischer Fluten/Trocken-Rhythmus.

Ferner sollten die T-RFLP-Ergebnisse der *Archaea*-Lebensgemeinschaft durch 16S rRNA-Genklonbibliotheken ergänzt werden, um phylogenetische Informationen zu den interessanten Prozessen der Phase III zu erhalten. In diesem Kontext wäre es zudem interessant, die Beziehung zwischen der *Bacteria*- und der *Archaea*-Lebensgemeinschaft in diesem Sauerstoffgradientensystem in Bezug auf den Methankreislauf aufzulösen. Hierzu könnten die Markergene der Methyl-Coenzym-M-Reduktase (*mcrA*) und der Methan-Monooxygenasen (*pmoA*, *mmoX*) eingesetzt werden.

6. Literaturverzeichnis

Amann, R. I., Ludwig, W. und Schleifer, K. H. (1988) α -subunit of ATP-synthase: a useful marker for studying the phylogenetic relationship of bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **134**:2815-2821.

Amann, R. I., Krumholz, L. und Stahl, D. A. (1990) Fluorescent oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* **172**:762-770.

Amann, R. I., Springer, N., Ludwig, W., Görtz, H. D., und Schleifer, K. H. (1991) Identification in situ and phylogeny of uncultured bacterial endosymbionts. *Nature* **351**:161-164.

Andrews, J. H. und Harris, R. F. (1986) r- and K-selection and microbial ecology. *Adv. Microb. Ecol.* **9**:99-147.

Arth, I. und Frenzel, P. (2000) Nitrification and denitrification in the rhizosphere of rice: the detection of processes by a new multi-channel electrode. *Biol. Fert. Soils* **31**:427-435.

Bakken, L. R. und Olsen, R. A. (1987) The relationship between cell size-and viability of soil bacteria. *Microb. Ecol.* **13**: 103-114.

Baldani, J. I., Baldani, V. L. D., Seldin, L. und Döbereiner, J. (1986) Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **36**:86-93.

Baldani, J. I., Pot, B., Kirchof, G., Falsen, E., Baldani, V. L. D., Olivares, F. L., Hoste, B., Kersters, K., Hartmann, A., Gillis, M. und Döbereiner, J. (1996) Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov., and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**:802-810.

Bardgett, R. D. und Walker, L. R. (2004) Impact of coloniser plant species on the development of decomposer microbial communities following deglaciation. *Soil Biol. Biochem.* **36**:555-559.

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

Begon, M., Harper, J. L. und Townsend, C. R. (1996) Ecology: Individuals, Populations and Communities. Blackwell Science Ltd., London, England. S. 480-490

Béjà, O., Suzuki, M. T., Heidelberg, J. F., Nelson, W. C., Preston, C. M., Hamadas, T., Eisen, J. A., Fraser, C. M. und DeLong, E. F. (2002) Unsuspected diversity among marine aerobic anoxygenic phototrophs. *Nature* **415**:630-633.

Berg, P. (1998) Manual for PROFILE (version 1.0), S. 1-12.

- Berg, P., Risgaard-Petersen, N. und Rysgaard, S.** (1998) Interpretation of measured concentration profiles in sediment pore water. *Limnol. Oceanogr.* **43**:1500-1510.
- Berner, R. A.** (1980) Early diagenesis. A theoretical approach. Princeton University Press. Princeton, England, S. 1-241.
- Blumberg, D. D.** (1987) Creating a ribonuclease-free environment. *Methods Enzymol.* **152**: 20-24.
- Bodelier, P. L., Roslev, P., Henckel, T. und Frenzel, P.** (2000) Stimulation by ammonium-based fertilizers of methane oxidation in soil around rice roots. *Nature* **403**:421-424.
- Bodelier, P. L. und Frenzel, P.** (1999) Contribution of methanotrophic and nitrifying bacteria to CH₄ and NH₄ oxidation in the rhizosphere of rice plants as determined by new methods of discrimination. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:1826-1833.
- Bowman, J. P., Sly, L. I., Hayward, A. C., Spiegel, Y. und Stackebrandt, E.** (1993) *Telluria mixta* (*Pseudeomonas-mixta* Bowman, Sly, and Hayward 1988) gen. nov., comb. nov., and *Telluria chitinolytica*, sp. nov., soil-dwelling organisms which actively degrade polysaccharides. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**:120-124.
- Braker, G., Zhou, J., Wu, L., Devol, A. H. und Tiedje, J. M.** (2000) Nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in pacific northwest marine sediment communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:2096-2104.
- Braker, G., Ayala-del-Rio, H. L., Devol, A. H., Fesefeldt, A. und Tiedje, J. M.** (2001). Community structure of denitrifiers, *Bacteria*, and *Archaea* along redox gradients in Pacific Northwest marine sediments by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of amplified nitrite reductase (*nirS*) and 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:1893-1901.
- Broecker, W. und Peng, T.** (1974) Gas exchange rates between air and sea. *Tellus* **17**:21-35.
- Brune, A., Frenzel, P. und Cypionka, H.** (2000) Life at the oxic-anoxic interface: microbial activities and adaptations. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**:691-710.
- Chandler, D. P., Li, S. M., Spadoni, C. M., Drake, G. R., Balkwill, D. L., Fredrickson, J. K. und Brockman, F. J.** (1997) A molecular comparison of culturable aerobic heterotrophic bacteria and 16S rDNA clones derived from a deep subsurface sediment. *FEMS Microb. Ecol.* **23**:131-144.
- Chin, K. J., Hahn, D., Hengstmann, U., Liesack, W. und Janssen, P. H.** (1999) Characterization and identification of numerically abundant culturable bacteria from the anoxic bulk soil of rice paddy microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:5042-5049.
- Chin, K. J., Liesack, W. und Janssen, P. H.** (2001) *Opitutus terrae* gen. nov., sp. nov., to accommodate novel strains of the division 'Verrucomicrobia' isolated from rice paddy soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**:1965-1968.
- Clements, F. E.** (1916) Plant succession. An analysis of the development of vegetation. Carnegie Institution of Washington, Publication No. 242, Washington, D. C.

- Clements, F. E.** (1936) Nature and structure of climax. *J. Ecol.* **24**:252-284.
- Collins, M. D., Lawson, P. A., Willems, A., Cordoba, J. J., Fernandez-Garayzabal, J., Garcia, P., Cai, J., Hippe, H. und Farrow, J. A.** (1994) The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**:812-826.
- Conrad, R., Frenzel, P. und Cohen, Y.** (1995) Methane emission from hypersaline microbial mats: lack of aerobic methane oxidation activity. *FEMS Microbiol. Ecol.* **16**:297-306.
- Conrad, R. und Frenzel, P.** (2002) Flooded soils. In: Encyclopedia of environmental microbiology. Britton, G. (Hrsg.). Wiley. New York, N. Y. S. 1316-1333.
- Cowles, H. C.** (1899) The ecological relations of the vegetation of the sand dunes of lake Michigan. *Bot. Gazette* **27**: 95-117, 167-202, 281-308, 361-391.
- Crank, J.** (1980) Mathematics of diffusion. Oxford University Press. Oxford, England. S. 1-424.
- D'Hondt, S., Rutherford, S. und Spivack, A. J.** (2002) Metabolic activity of subsurface life in deep-sea sediments. *Science* **295**:2067-2070.
- Daims, H., Nielsen, J. L., Nielsen, P. H., Schleifer, K. H. und Wagner, M.** (2001) In situ characterization of *Nitrospira*-like nitrite oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:5273-5284.
- Dalsgaard, T. und Revsbech, N. P.** (1992) Regulation factors of denitrification in trickling filter biofilms as measured with the oxygen/nitrous oxide microsensor. *FEMS Microbiol. Ecol.* **101**:151-164.
- Dawid, W.** (2000) Biology and global distribution of myxobacteria in soils. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**:403-427.
- DeLeij, F. A. A. M., Whipps, J. M. und Lynch, J. M.** (1993) The use of colony development for the characterization of bacterial communities in soil and on roots. *Microb. Ecol.* **27**:81-97.
- DeLong, E. F., Ying Wu, K., Prézelin, B. B. und Jovine, R. V. M.** (1994) High abundance of *Archaea* in antarctic marine picoplankton. *Nature* **371**:695-697.
- Derakshani, M., Lukow, T. und Liesack, W.** (2001) Novel bacterial lineages at the (sub)division level as detected by signature nucleotide-targeted recovery of 16S rRNA genes from bulk soil and rice roots of flooded rice microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:623-631.
- Dollhopf, S. L., Hashsham, S. A. und Tiedje, J. M.** (2001) Interpreting 16S rDNA T-RFLP data: Application of self-organizing maps and principal component analysis to describe community dynamics and convergence. *Microb. Ecol.* **42**:495-505.

- Driks, A.** (2003) The dynamic spore. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**:3007-3009.
- Duarte, G. F., Rosado, A. S., Seldin, L., de Araujo, W. und van Elsas, J. D.** (2001) Analysis of bacterial community structure in sulfurous-oil-containing soils and detection of species carrying dibenzothiophene desulfurization (*dsz*) genes. *Appl. Environ. Microb.* **67**:1052-1062.
- Duineveld, B. M., Kowalchuk, G. A., Keijzer, A., van Elsas, J. D. und van Veen, J. A.** (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., Ticknor, L. O. und Kuske, C. R.** (2000) Assessment of microbial diversity in four southwestern United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:2943-2950.
- Dürre, P. und Hollergschwandner, C.** (2004) Initiation of endospore formation in *Clostridium acetobutylicum*. *Anaerobe* **10**:69-74.
- Edel-Hermann, V., Dreumont, C., Pérez-Piqueres, A. und Steinberg, C.** (2004) Terminal restriction fragment length polymorphism analysis of ribosomal RNA genes to assess changes in fungal community structure in soils. *FEMS Microb. Ecol.* **47**:397-404.
- Edwards, U., Rogall, T., Blocker, H., Emde, M. und Bottger, E. C.** (1989) Isolation and direct complete determination of entire genes. *Nucleic Acids Res.* **17**:7843-7853.
- Egert, M. und Friedrich, M. W.** (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**:2555-2562.
- Ehrich, S., Behrens, D., Lebedeva, E., Ludwig, W. und Bock, E.** (1995) A new obligately chemolithoautotrophic, nitrite-oxidizing bacterium, *Nitrospira moscoviensis* sp. nov., and its phylogenetic relationship. *Arch. Microbiol.* **164**:16-23.
- Eichner, C. A., Erb, R. W., Timmis, K. N. und Wagner-Dobler, I.** (1999) Thermal gradient gel electrophoresis analysis of bioprotection from pollutant shocks in the activated sludge microbial community. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:102-109.
- Euzéby, J. P.** (1997) List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the Internet (URL: <http://www.bacterio.cict.fr/>). *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**:590-592
- Felsenstein, J.** (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach *J. Mol. Evol.* **17**:368-376.
- Felsenstein, J.** (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**:783-791.
- Felske, A., Engelen, B., Nübel, U. und Backhaus, H.** (1996) Direct ribosome isolation from soil to extract bacterial rRNA for community analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:4162-4167.

- Felske, A., Rheims, H., Wolterink, A., Stackebrandt, E. und Akkermans, A. D. L.** (1997) Ribosome analysis reveals prominent activity of an uncultured member of the class *Actinobacteria* in grassland soils. *Microbiology* **143**:2983-2989.
- Ferrell, R. T. und Himmelblau, D. M.** (1967) Diffusion coefficients of nitrogen and oxygen in water. *J. Chem. Eng. Data* **12**:111-115.
- Forstner, H. und Gnaiger, E.** (1983) Calculation of equilibrium oxygen concentration. *In: Polarographic oxygen sensors. Aquatic and physiological applications.* Gnaiger, E. und Forstner, H. (Hrsg.) Springer. New York, N. Y., S. 321-333
- Ferrari, V. C. und Hollibaugh, J. T.** (1999) Distribution of microbial assemblages in the Central Arctic Ocean Basin studied by PCR/DGGE: analysis of a large data set. *Hydrobiologia* **401**:55-68.
- Frenzel, P., Thebrath, B. und Conrad, R.** (1990) Oxidation of methane in the oxic surface layer of a deep lake sediment (Lake Constance). *FEMS Microbiol. Ecol.* **73**:149-158.
- Frenzel, P., Rothfuss, F. und Conrad, R.** (1992) Oxygen profiles and methane turnover in a flooded rice microcosm. *Biol. Fertil. Soils* **14**:84-89.
- Fromin, N., Hamelin, J., Tarnawski, S., Roesti, D., Jourdain-Miserez, K., Forestier, N., Teyssier-Cuvelle, S., Gillet, F., Aragno, M. und Rossi, P.** (2002) Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environ. Microbiol.* **4**:634-643.
- Fuhrman, J. A., McCallum, K. und Davis, A. A.** (1992) Novel major archaeobacterial group from marine plankton. *Nature* **356**:148-149.
- Fründ, C. und Cohen, Y.** (1992) Diurnal cycles of sulfate reduction under oxic conditions in cyanobacterial mats. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:70-77.
- Gadgil, M. und Solbrig, O. T.** (1972) The concept of r- and K-selection: evidence from wildflowers and some theoretical considerations. *Am. Nat.* **106**:14-31.
- Garrity, G. M., Winters, M. und Searles, D. B.** (2001) Taxonomic outline of the Prokaryotic Genera Bergey's manual of systematic Bacteriology, Garrity, G.M. (Hrsg.) 2. Auflage, Springer. New York, N. Y.
- Gauch, H. G. Jr., Whittaker R., H. und Wentworth, T. R.** (1977) A comparative study of reciprocal averaging and other ordination techniques. *J. Ecol.* **65**:157-174.
- Gilbert, B. und Frenzel, P.** (1998) Rice roots and CH₄ oxidation: the activity in paddy soil by profile studies. *Biogeochemistry* **48**:341-365.
- Gieseke, A. Bjerrum, L., Wagner, M. und Amann, R.** (2003) Structure and activity of multiple nitrifying bacterial populations co-existing in a biofilm. *Environ. Microbiol.* **5**:355-369
- Greenacre, M. J** (1984) Theory and Applications of Correspondence Analysis. Academic Press. London, England

- Grosskopf, R., Janssen, P. H. und Liesack, W.** (1998) Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:960-969.
- Grotzschel, S. und de Beer, D.** (2002) Effect of oxygen concentration on photosynthesis and respiration in two hypersaline microbial mats. *Microb. Ecol.* **44**:208-216.
- Hedrick, D. B., Peacock, A., Stephen, J. R., Macnaughton, S. J., Brüggemann, J. und White, D. C.** (2000) Measuring soil microbial community diversity using polar lipid fatty acid and denaturing gradient gel electrophoresis data. *J. Microbiol. Methods* **41**:235-248.
- Hengstmann, U., Chin, K. J., Janssen, P. H. und Liesack, W.** (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.
- Henckel, T., Friedrich, M. und Conrad, R.** (1999) Molecular analyses of the methane-oxidizing microbial community in rice field soil by targeting the genes of the 16S rRNA, particulate methane monooxygenase, and methanol dehydrogenase. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:1980-1990.
- Heuer, H. und Smalla, K.** (1997) Application of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Temperature Gradient Gel Electrophoresis for Studying Soil Microbial Communities. In: Van Elsas, J. D., Trevors, J. T. and Wellington, E. M. H. (Hrsg.), Marcel Dekker Inc. New York, N. Y. S. 353-373.
- Hines, M. E., Faganeli, J. und Planinc, R.** (1997) Sedimentary anaerobic microbial biogeochemistry in the Gulf of Trieste, northern Adriatic Sea: influences of bottom water oxygen depletion. *Biogeochemistry* **39**:65-87.
- Hiorns, W. D., Methé, B. A., Nierzwicki-Bauer, S. A. und Zehr, J. P.** (1997) Bacterial diversity in Adirondack mountain lakes as revealed by 16S rRNA gene sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:2957-2960.
- Holzappel-Pschorn, A., Conrad, R. und Seiler, W.** (1985) Production, oxidation and emission of methane in rice paddies. *FEMS Microbiol. Ecol.* **31**:343-351.
- Hugenholtz, P., Goebel, B. M. und Pace, N. R.** (1998) Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.* **180**:4765-4774.
- Janssen, P. H.** (1991) Characterization of a succinate-fermenting anaerobic bacterium isolated from a glycolate-degrading mixed culture. *Arch. Microbiol.* **155**:288-293.
- Jongman, R. H. G., Ter Braak, C. J. F. und van Tongeren, O. F. R.** (1987) Data analysis in community and landscape ecology. Pudoc. Wageningen, The Netherlands.
- Kalmbach, S., Manz, W., Wecke, J. und Szewzyk, U.** (1999) *Aquabacterium* gen. nov., with description of *Aquabacterium citratiphilum* sp. nov., *Aquabacterium parvum* sp. nov. and *Aquabacterium commune* sp. nov., three *in situ* dominant bacterial species from the Berlin drinking water system. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**:769-777.

- Kersters, K., de Vos, P., Gillis, M., Swings, J., Vandamme, P. und Stackebrandt, E.** (2001) Introduction to the Proteobacteria. In: The Prokaryotes: an Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community. Kersters, K. *et al.* (Hrsg.), 3. Ausgabe, Springer, New York. (URL: <http://link.springer-ny.com/link/service/books/10125/>).
- Klappenbach, J. A., Dunbar, J. M. und Schmidt, T. M.** (2000) rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:1328-1333.
- Klugbauer, N., Ludwig, W., Bauerlein, E. und Schleifer, K. H.** (1992) Subunit α of adenosine triphosphate synthase of *Pectinatus frisingensis* and *Lactobacillus casei*. *Syst. Appl. Microbiol.* **15**:323-330.
- Kolb, S., Knief, C., Stubner, S. und Conrad, R.** (2003) Quantitative detection of methanotrophs in soil by novel *pomA*-targeted real-time PCR assays. *Appl. Env. Microb.* **69**:2423-2429
- Kormas, K. A., Smith, D. C., Edgcomb, V. und Teske A.** (2003) Molecular analysis of deep subsurface microbial communities in Nankai Trough sediments (ODP Leg 190, Site 1176). *FEMS Microb. Ecol.* **45**:115-125
- Kowalchuk, G. A., Stienstra, A. W., Heilig, G. H., Stephen, J. R. und Woldendorp, J. W.** (2000) Changes in the community structure of ammonia-oxidizing bacteria during secondary succession of calcareous grasslands. *Environ. Microbiol.* **2**:99-110.
- Krüger, M., Meyerdierks, A., Glockner, F. O., Amann, R. I., Widdel, F., Kube, M., Reinhardt, R., Kahnt, J., Bocher, R., Thauer, R. K. und Shima, S.** (2003) A conspicuous nickel protein in microbial mats that oxidize methane anaerobically. *Nature* **426**:878-81.
- Kuivila, K. M., Murray, J. W. und Devol, A. H.** (1989) Methane production, sulfate reduction and competition for substrates in the sediments of Lake Washington. *Geochim. Cosmochim. Acta* **53**:409-416.
- Kuske, C. R., Barns, S. M. und Busch, J. D.** (1997) Diverse uncultivated bacterial groups from soils of the arid southwestern United States that are present in many geographical regions *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:3614-3621
- Laanbroek, H. J., Geerlings, H. J., Sijtsma, L. und Veldkamp, H.** (1984) Competition for sulfate and ethanol among *Desulfobacter*, *Desulfobulbus*, and *Desulfovibrio* species isolated from intertidal sediments *Appl. Environ. Microbiol.* **47**:329-334
- Lane, D. J.** (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: E. Stackebrandt und M. Goodfellow (Hrsg.), Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England, S. 115-175.
- Lane, D. J., Field, K. G., Olsen, G. J. und Pace, N. R.** (1988) Reverse transcriptase sequencing of ribosomal RNA for phylogenetic analysis. *Meth. Enzymol.* **167**:138-144.
- Lee, S. Y., Bollinger, J., Bezdicek, D. und Ogram, A.** (1996) Estimation of the abundance of an uncultured soil bacterial strain by a competitive quantitative PCR method. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:3787-3793.

Legan, J. D., Owens, J. D. und Chilvers, G. A. (1987) Competition between specialist and generalist methylotrophic bacteria for an intermittent supply of methylamine. *J. Gen. Microbiol.* **133**:1061–1073.

Legan, J. D. und Owens, J. D. (1988) Bacterial competition for methylamine: Computer simulation of a three-strain continuous culture supplied continuously or alternatively with two nutrients. *FEMS Microbiol. Ecol.* **53**:307–314.

Legendre, P. und Legendre, L. (1998) Numerical ecology. 2. Ausgabe. Elsevier. Amsterdam, The Netherlands.

Leser, T. D., Boye, M. und Hendriksen, N. B. (1995) Survival and activity of *Pseudomonas* sp. strain B13(FR1) in a marine microcosm determined by quantitative PCR and an rRNA-targeting probe and its effect on the indigenous bacterioplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:1201-1207.

Liesack, W., Janssen, H. P., Rainey, F. A., Ward-Rainey, N. L. und Stackebrandt, E. (1997) Microbial diversity in soil: the need of a combined approach using molecular and cultivation techniques. *In: Modern soil microbiology.* Van Elsas, J. D., Trevors, J. T. und Wellington, E. M. H. (Hrsg.), Marcel Dekker, New York, N. Y. S. 375-439.

Liesack, W., Schnell, S. und Revsbech, N. P. (2000) Microbiology of flooded rice paddies. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**:625-645.

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

Lovley, D. R., Dwyer, D. F. und Klug, M. J. (1982) Kinetic analysis of competition between sulfate reducers and methanogens for hydrogen in sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**:1373–1379.

Lu, Y., Watanabe, A. und Kimura, M. (2002) Contribution of plant-derived carbon to soil microbial biomass dynamics in a paddy rice microcosm. *Biol. Fertil. Soils* **36**:136–142

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

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

Lüders, T. und Friedrich, M. W. (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.

Ludwig, W., Wizenegger, M., Betzl, D., Leidel, E., Lenz, T., Ludvigsen, A., Möllenhoff, D., Wenzig, P. und Schleifer, K. H. (1990) Complete nucleic sequence of seven eubacterial genes coding for the elongationfactor *Tu*: functional, structural and phylogenetic evaluations. *Arch. Microbiol.* **153**:241-247.

- Ludwig, W. und Schleifer, K. H.** (1994) Bacterial phylogeny based on 16S and 23 rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* **15**:155-173.
- Ludwig, W., Bauer, S. H., Bauer, M., Held, I., Kirchhof, G., Schultze, R., Huber, I., Spring, S., Hartmann, A. und Schleifer, K. H.** (1997) Detection and in situ identification of representatives of a widely distributed new bacterial phylum. *FEMS Microbiol. Lett.* **153**:181-190.
- Ludwig, W., Strunk, O., Klugbauer, S., Klugbauer, N., Weizenegger, M., Neumaier, J., Bachleitner, M. und Schleifer, K. H.** (1998) Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. *Electrophoresis* **19**:554-568.
- Lukow, T., Dunfield, P. F. und Liesack, W.** (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.
- MacArthur, R. H. und Wilson, E. O.** (1967) The theory of island biogeography, Princeton University Press. Princeton, England.
- Margalef, R.** (1963) On certain unifying principles in ecology. *Amer. Naturalist* **97**:357-374.
- Martiny, A. C., Jørgensen, T. M., Albrechtsen, H. J., Arvin, E. und Molin, S.** (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.
- Mitsui, H., Gorlach, K., Lee, H. J., Hattori, R. und Hattori, T.** (1997) Incubation time and media requirements of culturable bacteria from different phylogenetic groups. *J. Microbiol. Methods* **30**:103-110.
- Muylaert, K., Van Der Gucht, K., Vloemans, N., Meester, L. D., Gillis, M. und Vyverman, W.** (2002) Relationship between bacterial community composition and bottom-up versus top-down variables in four eutrophic shallow lakes. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:4740-4750.
- Muyzer, G., de Waal, E. C. und Uitterlinden, A. G.** (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:695-700.
- Muyzer, G.** (1999) DGGE/TGGE, a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**:317-322.
- Nakatsu, C. H., Torsvik, V. und Øvreås, L.** (2000) Soil community analysis using DGGE of 16S rDNA polymerase chain reaction products. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **64**:1382-1388.
- Nicholson, W. L., Fajardo-Cavazos, P., Rebeil, R., Slieman, T. A., Riesenman, P. J., Law, J. F. und Xue, Y.** (2002) Bacterial endospores and their significance in stress resistance. *Antonie Van Leeuwenhoek* **81**:27-32.

Nübel, U., Bateson, M. M., Vandieken, V., Wieland, A., Kuhl, M. und Ward, D. M. (2002) Microscopic examination of distribution and phenotypic properties of phylogenetically diverse Chloroflexaceae-related bacteria in hot spring microbial mats. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:4593-603.

Odum, E. P. (1969) The strategy of ecosystem development. *Science* **164**:262-270.

Olsen, G. J., Matsuda, H., Hagstrom, R. und Overbeck, R. (1994) Fast DNAm1: a tool for construction of phylogenetic trees of DNA sequences using maximum likelihood. *Comput. Appl. Biosci.* **10**:41-48.

Osborn, A. M., Moore, E. R. B. und Timmis, K. N. (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.

Overbeck, J. (1972) Zur Struktur und Funktion des aquatischen Ökosystems. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* **85**:553-579.

Pachur, H. J., Denner, H. D. und Walter, H. (1984) A freezing device for sampling the sediment-water interface of lakes. *Catena* **11**:65-70.

Pernthaler, J., Glöckner, F. O., Schönhuber, W. und Amann, R. (2001) Fluorescence in situ hybridization (FISH) with rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Methods Microbiol.* **30**:207-226.

Pesaro, M., Nicollier, G., Zeyer, J. und Widmer, F. (2004) Impact of soil drying-rewetting stress on microbial communities and activities and on degradation of two crop protection products. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:2577-2587.

Ponnamperuma, F. N. (1972) The chemistry of submerged soils. *Adv. Agron.* **24**:29-96.

Poulsen, L. K., Ballard, G. und Stahl, D. A. (1993) Use of rRNA fluorescence in situ hybridization for measuring the activity of single cells in young and established biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:1354-1360.

Pühler, G., Leffers, H., Gropp, F., Palm, P., Klenk, H. P., Lottspeich, F., Garrett, R. A. und Zillig, W. (1989) Archaeobacterial DNA-dependent RNA polymerase testify the evolution of the eukaryotic nuclear genome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**:4569-4573.

Purkhold, U., Pommerening-Roser, A., Juretschko, S., Schmid, M. C., Koops, H. P. und Wagner, M. (2000) Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and amoA sequence analysis: implications for molecular diversity surveys. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:5368-5382.

Rabouille, C., Denis, L., Dedieu, K., Stora, G., Lansard, B. und Grenz, C. (2003) Oxygen demand in coastal marine sediments: comparing in situ microelectrodes and laboratory core incubations. *J. Experimen. Marine Biol. Ecol.* **285-286**:49-69.

Raeymaekers, L. (2000) Basic Principles of Quantitative PCR. *Mol. Biotech.* **15**:115-122.

- Raeymaekers, L.** (1993) Quantitative PCR - theoretical considerations with practical implications. *Anal. Biochem.* **214**: 582-585.
- Ramsing, N. B., Kühl, M. und Jørgensen, B. B.** (1993) Distribution of sulfate-reducing bacteria, O₂, and H₂S in photosynthetic biofilms determined by oligonucleotide probes and microelectrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:3840-3849.
- Ratering, S. und Schnell, S.** (2000) Localization of iron-reducing activity in paddy soil by profile studies. *Biogeochemistry* **48**:341-365.
- Raskin L., Poulsen, L. K., Noguera, D. R., Rittmann, B. E. und Stahl, D. A.** (1994) Quantification of methanogenic groups in anaerobic biological reactors by oligonucleotide probe hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:1241-1248.
- Repeta, D. J., Simpson, D. J., Jørgensen, B. B. und Jannasch, H. W.** (1989) Evidence for anoxygenic photosynthesis from the distribution of bacteriochlorophylls in the Black Sea. *Nature* **342**:69-72.
- Revsbech, N. P., Jørgensen, B. B. und Blackburn, T. H.** (1980) Oxygen in the sea bottom measured with a microelectrode. *Science* **207**:1355-1356.
- Revsbech, N. P.** (1989) An oxygen microsensor with a guard cathode. *Limnol. Oceanogr.* **34**:474-478.
- Ricke, P., Kolb, S. und Braker, G.** (2004) Application of a newly developed ARB-integrated *in silico* T-RFLP tool reveals the dominance of a novel *pmoA* cluster in a forest soil. Unveröffentlicht.
- Robinson, J. A. und Tiedje, J. M.** (1984) Competition between sulfate-reducing and methanogenic bacteria for H₂ under resting and growing conditions. *Arch. Microbiol.* **137**:26-32.
- Roller, C., Wagner, M., Amann, R. I., Ludwig, W. und Schleifer, K. H.** (1994) *In situ* probing of gram-positive bacteria with high DNA G+C content using 23S rRNA targeted oligonucleotides. *Microbiology-UK* **140**:2849-2858.
- Rosset, R., Julien, J. und Monier, R.** (1966) Ribonucleic acid composition of bacteria as a function of growth rate. *J. Mol. Biol.* **18**:308-320.
- Rothfuss, F., Frenzel, P. und Conrad, R.** (1994) Gas diffusion probe for measurement of CH₄ gradients. In: *Microbial Mats: Structure, Development and Environmental Significance*. Stal, L. J. und Cumette, P. (Hrsg.), Springer. New York, N. Y. S. 167-172.
- Rothfuss, F. und Conrad, R.** (1998) Effects of gas bubbles on the diffusional flux of CH₄ from anoxic paddy soil. *Limnol. Oceanogr.* **43**:1511-1518.
- Rotthauwe, J. H., Witzel, K. P. und Liesack, W.** (1997) The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:4704-4712.

- Roy, R., Klüber, H. D. und Conrad, R.** (1997) Early initiation of methane production in anoxic rice soil despite the presence of oxygen. *FEMS Microb. Ecol.* **24**:311-320.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. und Erlich, H. A.** (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**:487-491.
- Sanford, R. A., Cole, J. R. und Tiedje, J. M.** (2002) Characterization and description of *Anaeromyxobacter dehalogenans* gen. nov., sp. nov., an aryl-halorespiring facultative anaerobic myxobacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:893-900.
- Schaechter, M., Maaloe, O. und Kjeldgaard, N. O.** (1958) Dependency on medium and temperature of cell size and chemical composition during balanced growth of *Salmonella typhimurium*. *J. Gen. Microbiol.* **19**:592-606.
- Schink, B.** 1994. Diversity, ecology and isolation of acetogenic bacteria. In: Acetogenesis. Drake, H. L. (Hrsg.), Chapman & Hall, New York, N. Y. S. 197-235.
- Schleifer, K. H.** (2004) Microbial diversity: facts, problems and prospects. *Sys. Appl. Microb.* **27**:3-9.
- Schmidt, H. A., Strimmer, K., Vingron, M. und von Haeseler, A.** (2002) TREE-PUZZLE: maximum likelihood phylogenetic analysis using quartets and parallel computing. *Bioinformatics* **18**:502-504.
- Schöniger, M. und von Haeseler, A.** (1994) A stochastic model for the evolution of autocorrelated DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* **3**:240-247.
- Schramm, A., de Beer, D., van den Heuvel, J. C., Ottengraf, S. und Amann, R.** (1999) Microscale distribution of populations and activities of *Nitrospira* and *Nitrospira* spp. along a macroscale gradient in a nitrifying bioreactor: Quantification by in situ hybridization and the use of microsensors. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:3690-3696.
- Schütz, H., Seiler, W. und Conrad, R.** (1989) Processes involved in formation and emission of methane in rice paddies. *Biogeochemistry* **7**:33-53.
- Schwarz, J. M. V. und Frenzel, P.** (2003) Population dynamics and ecology of ciliates (Protozoa, Ciliophora) in an anoxic rice field soil. *Biol. Fertil. Soils* **38**:245-252.
- Setlow, P.** (2000) Resistance of bacterial spores. In: Bacterial Stress Responses. Storz G. und Hengge-Aronis, R. (Hrsg.); American Society for Microbiology, Washington. S. 217-230.
- Sharp, R. und MacFarlane, G. T.** (2000) Chemostat enrichments of human feces with resistant starch are selective for adherent butyrate-producing clostridia at high dilution rates. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:4212-4221.
- Sigler, W. V., Crivii, S. und Zeyer, J.** (2002). Bacterial succession in glacial forefield soils characterized by community structure, activity and opportunistic growth dynamics. *Microb. Ecol.* **44**:306-16.

- Sørensen, J., Jørgensen, B. B. und Revsbech, N. P.** (1979) A comparison of oxygen, nitrate, and sulfate respiration in coastal marine sediments. *Microb. Ecol.* **5**:105-115.
- Sorokin, Y. I.** (1970) Interrelations between sulphur and carbon turnover in meromictic lakes. *Archiv für Hydrobiologie* **66**:391-446.
- Sorokin, Y. I.** (1972) The bacterial population and process of sulfide oxidation in the Black Sea. *J. Cons. Int. Explor. Mer.* **34**:423-454.
- Stahl, D. A., Flesher, B., Mansfield, H. R. und Montgomery, L.** (1988) Use of phylogenetically based hybridization probes for studies of ruminal microbial ecology. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:1079-1084.
- Strimmer, K. und von Haeseler, A.** (1996) Quartet Puzzling: A Quartet Maximum-Likelihood method for reconstructing tree topologies. *Mol. Biol. Evol.* **13**:240-247.
- Strunk O., Gross, O., Reichel, B., May, M., Hermann, S., Stuckman, N., Nonhoff, B., Lemke, M., Ginhart, A., Vilbig, A., Ludwig, T., Bode, A. und Schleifer, K. H.** (1998) ARB: a Software Environment for Sequence Data. Technische Universität München, München.
- Stubner, S.** (2002) Enumeration of 16S rDNA of *Desultomaculum* Lineage 1 in Rice Field soil by Real-Time PCR with SybrGreenTM Detection. *J. Microbiol. Met.* **50**:155-164.
- Suzuki, M. T., Rappé, M. S., Haimberger, Z. W., Winfield, H., Adair, N., Ströbel, J. und Giovannoni, S. J.** (1997) Bacterial diversity among small-subunit rRNA gene clones and cellular isolates from the same seawater sample. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:983-989.
- Taras, M. J., Greenberg, A. E., Hoak, D. R. und Rand, M. C.** (1976) Standard methods for the examination of water and wastewater. 14. Ausgabe, American Public Health Association, Washington, D. C..
- Ter Braak, C. J. F. und Šmilauer, P.** (1998) Canoco Reference Manual and User's Guide to Canoco for Windows: Software for Canonical Community Ordination (Version 4), Ithaca, N. Y.
- Teske, A., Wawer, C., Muyzer, G. und Ramsing, N. B.** (1996) Distribution of sulfate-reducing bacteria in a stratified fjord (Mariager Fjord, Denmark) as evaluated by most-propable-number counts and denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified ribosomal DNA fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:1405-1415.
- Thoreau, H. D.** (1860) Succession of forest trees. *Mass. Board Agric. Rep.* VIII.
- Torsvik, V., Goksør, J., Daae, F. L., Sørheim, R., Michalsen, J. und Salte, K.** (1994) Use of DNA analysis to determine the diversity of microbial communities *In: Beyond the Biomass: Compositional and Functional Analysis of Soil Microbial Communities.* K. Ritz, J. Dighton, und K. E. Giller (Hrsg.) British Society of Soil Science/John Wiley. Chichester, England. S. 39-48.
- Tansley, A.G.** (1939) British ecology during the past quarter-century: the plant community and the ecosystem. *J. Ecol.* **27**: 513-530.

- Treude, N., Rosencrantz, D., Liesack, W. und Schnell, S.** (2003) Strain FAc12, a dissimilatory iron-reducing member of the *Anaeromyxobacter* subgroup of *Myxococcales*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **44**:261-269.
- Visscher, P. T., Baumgartner, L. K., Buckley, D. H., Rogers, D. R., Hogan, M. E., Raleigh, C. D., Turk, K. A. und Des Marais, D. J.** (2003) Dimethyl sulphide and methanethiol formation in microbial mats: potential pathways for biogenic signatures. *Environ. Microbiol.* **5**:296-308.
- von Wintzingerode, F., Göbel, U. B. und Stackebrandt, E.** (1997) Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* **21**:213-229.
- Wagner, M., Rath, G., Amann, R. I., Koops, H. P. und Schleifer, K. H.** (1995) In situ identification of ammonia-oxidizing bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* **18**:251-264.
- Ward, D. M., Bateson, M. M., Weller, R. und Ruff-Roberts, A. L.** (1992) Ribosomal RNA analysis of microorganisms as they occur in nature. *Adv. Microb. Ecol.* **12**:219-286.
- Warming, E.** (1896) Lehrbuch der ökologischen Pflanzengeographie. Eine Einführung in die Pflanzenvereine. Gebrüder Bornträger, Berlin.
- Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I., Moore, L. H., Moore, W. E. C., Murray, R. G. E., Stackebrandt, E., Starr, M. P. und Trüper, H. G.** (1987) Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**:463-464.
- Weber, S., Lüders, T., Friedrich, M. W. und Conrad, R.** (2001) Methanogenic populations involved in the degradation of rice straw in anoxic paddy soil. *FEMS Microb. Ecol.* **38**:11-20.
- Weber, S., Stubner, S. und Conrad, R.** (2001) Bacterial populations colonizing and degrading rice straw in anoxic paddy soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:1318-1327.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. und Lane, D. J.** (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* **173**:697-703.
- Westphal, A. J., Price, P. B., Leighton, T. J. und Wheeler, K. E.** (2003) Kinetics of size changes of individual *Bacillus thuringiensis* spores in response to changes in relative humidity. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* **100**:3461-3466.
- Whittaker, R. H. A.** (1953) consideration of climax theory: the climax as a population and pattern. *In: Ecological Monographs.* **23**; S. 41-78.
- Whittaker, R. H. A.** (1974) Climax concepts and recognition. *In: Handbook of vegetation science.* Knapp, R. (Hrsg.) Vegetation dynamics. Junk, The Hague. S. 137-154.
- Widdel, F.** (1992) The dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing bacteria. *In: The Prokaryotes: an Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community.* Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W. und Schleifer, K. H. (Hrsg.), 3. Ausgabe, Springer. New York, N. Y. (URL: <http://link.springer-ny.com/link/service/books/10125/>).

- Wind, T. und Conrad, R.** (1995) Sulfur compounds, potential turnover of sulfate and thiosulfate, and numbers of sulfate-reducing bacteria in planted and unplanted paddy soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **18**:257-266.
- Wind, T. und Conrad, R.** (1997) Localization of sulfate reduction in planted and unplanted rice field soil. *Biogeochemistry* **37**:253-278.
- Woese, C. R.** 1987. Bacterial evolution. *Microb. Rev.* **51**:221-271.
- Yao, H., Conrad, R., Wassmann, R. und Neue, H. U.** (1999) Effect of soil characteristics on sequential reduction and methane production in sixteen rice paddy soils from China, the Philippines, and Italy. *Biogeochemistry* **47**:269-295.
- Yao, H. und Conrad, R.** (1999) Thermodynamics of methane production in different rice paddy soils from China, The Philippines, and Italy. *Soil Biol. Biochem.* **31**:463-473.
- Zehnder, A. J. B. und Stumm, W.** (1988) Geochemistry and biogeochemistry of anaerobic habitats. *In: Biology of anaerobic microorganisms.* Zehnder, A. J. B. (Hrsg.). Wiley Interscience Publications. New York. N. Y. S. 1-38.
- Zhang, T. und Fang, H. H. P.** (2000) Digitization of DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) profile and cluster analysis of microbial communities. *Biotech. Lett.* **22**:399-405.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt **Priv.-Doz. Dr. Werner Liesack** für die Überlassung des Themas, die Betreuung der Arbeit und die Diskussionsbereitschaft, die immer wieder zu neuen Impulsen in der Arbeit führte.

Ebenso möchte ich mich bei meiner Prüfungskommission **Prof. Dr. W. Buckel, Prof. Dr. D. Matthies** und **Prof. Dr. R. Renkawitz-Pohl** für die Betreuung in den letzten drei Jahren bedanken. In diesem Kontext möchte ich mich besonders bei Prof Dr. D. Matthies für die Einführung in die Statistik und den regen wissenschaftlichen Austausch bedanken.

Bei **Prof. Dr. P. Frenzel** möchte ich mich für die Einführung in die Mikroelektrodenmesstechnik bedanken, und dass durch seine Mithilfe mit der Kalkulation von Respirationsraten ein weiterer Aspekt in dieser Arbeit eingebracht wurde. Weiterhin danke ich **Dr. S. Stubner** für die Einführung in die Real-Time-PCR.

Dr. Sharon Avrahami, Mohamed Baani, Dr. Gesche Braker, Dr. Manigee Derakshani, Nahid Derakshani, Christoph Erkel, Andrea Graff, Dr. Jun Murase, Holger Penning, Peter Ricke, Dr. Daniel Scheid, Julia Schwarz, Dr. Julian Schwarz und **Pravin Shrestha** verdanke ich ein angenehmes Arbeitsklima und in jeder Situation hilfsbereite Unterstützung. Neben der wissenschaftlichen Arbeit war auch die notwendige Ablenkung stets gegeben. Besonders danke ich **Dr. Steffen Kolb** für die gute Nachbarschaft im Labor und das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Meinen Eltern danke ich für ihre fortwährende Unterstützung während meines Studiums und **meinen Freunden** für die schöne Zeit, die in meiner Erinnerung bleiben wird. Mein ganz besonderen Dank gebührt der Geduld und Muße **meiner kleinen Familie Mone** und **Jonas** mit der ich bald ein neues Familienmitglied begrüßen kann.

Lebenslauf

Matthias Noll, geboren am 09.09.1974 in Kassel

Schulausbildung

1981-1985	Grundschule , Ehlen
1985 - 1991	Gesamtschule , Zierenberg
1991 - 1994	Gymnasium , Wolfhagen
1994	Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

08/1994 – 10/1995	Zivildienst als Rettungshelfer, ASB, Habichtswald
-------------------	--

Studium

10/1995	Biologie (Diplom) an der Universität Kassel
10/1997	Vordiplom
02/98 – 03/98	Stationshelfer, Unesco, Man and Biosphere project Climate Impact Research Center in Abisko/Schweden
02/99 – 04/99	Praktikum, Bayer AG Leverkusen, Geschäftsbereich Pflanzenschutz, Abteilung Metabolismusforschung und Rückstandsanalytik, Landwirtschaftszentrum Monheim
08/1999 – 10/1999	Studentische Hilfskraft am Institut für forstliche Biometrie und Informatik an der Georg-August-Universität, Göttingen
06/2000 – 05/2001	Diplomarbeit in der Abteilung Mikrobiologie unter Anleitung von Prof. Dr. F. Schmidt Thema: „Etablierung und Charakterisierung einer Genbank aus Boden-Gesamt-DNA“

Promotion

06/2001 – 06/2004	Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg, unter Anleitung von Priv. -Doz. Dr. Werner Liesack
-------------------	---

Beiträge zu Tagungen und Symposien

- 03/2002 Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie e. V.
VAAM, Göttingen 2002
M. Noll, J. Höppner, P. Frenzel, M. Derakshani and W. Liesack
**„Temporal development of bacterial populations along a vertical oxygen
gradient in flooded paddy soil microcosms “** (Poster)
- 03/2003 Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie e. V.
VAAM, Berlin 2003
M. Noll and W. Liesack
**“Spatial and temporal dynamics of bacterial populations along a vertical
oxygen gradient in flooded paddy soil cores”** (Poster)
- 09/2003 Internationales Symposium „Structure and function of soil microbiota”, Marburg
2003
M. Noll and W. Liesack
**“Spatial and temporal dynamics of bacterial populations along a vertical
oxygen gradient in flooded paddy soil cores”** (Poster)
- 11/2003 Mini Symposium, Wageningen, Niederlande
M. Noll
“Bacterial community dynamics under varying soil oxygen concentrations“
(Vortrag)
- 03/2004 Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie e. V.
VAAM, Braunschweig 2004
M. Noll and W. Liesack
“Spatio-temporal population dynamics in flooded paddy soil cores”
(Vortrag)

Erklärung

ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Mikrobielle Sukzession in geflutetem Reisfeldboden“

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, den