

Albert-Ludwigs-Universität Freiburg  
Fakultät für Forst- und Umweltwissenschaften

# Molekularbiologische Untersuchungen der an der N<sub>2</sub>O Emission aus Waldböden beteiligten Mikroorganismen nach einem Frostereignis

*Durchführung am Forschungszentrum Karlsruhe Institut für Meteorologie und  
Klimaforschung Bereich Atmosphärische Umweltforschung (IMK-IFU), Garmisch-  
Partenkirchen*

*bei Prof. Dr. Jörg-Peter Schnitzler*

*zweiter Prüfer: Prof. Dr. Ernst Hildebrand, Institut für Bodenkunde und  
Waldernährungslehre, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg*

## Diplomarbeit

Vorgelegt von  
Katharina Zeller  
(Matrikel-Nr.: 1757293)

Freiburg im Breisgau, November 2008

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Diplomarbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Ich habe dazu keine weiteren als die angeführten Hilfsmittel benutzt und die aus anderen Quellen entnommenen Stellen als solche gekennzeichnet.

Datum

Unterschrift

## Zusammenfassung

Das klimarelevante Spurengas Distickstoffoxid ( $N_2O$ ), dessen Anteil am anthropogen verursachten Treibhauseffekt derzeit auf etwa 6% geschätzt wird, stammt zu einem Großteil aus natürlichen Ökosystemen (IPCC, 2007). Terrestrische Systeme zählen dabei als Hauptquelle von  $N_2O$  (Mosier und Kroeze, 1998). Durch mikrobielle Aktivitäten bei der Umsetzung von Stickstoff (N) im Boden (Nitrifikation und Denitrifikation) kann als Nebenprodukt  $N_2O$  entstehen, welches aus dem Boden in die Atmosphäre freigesetzt wird (FAO, 2001). Die Höhe dieser Emissionen unterliegt starken saisonalen Schwankungen (Brumme und Beese, 1992). Langzeitmessungen zeigten, dass in Wintermonaten nach einer Frostperiode enorme Mengen an  $N_2O$  aus Böden freigesetzt werden (Duxbury et al., 1982; Papen und Butterbach-Bahl, 1999). Die Ursache dafür ist eine veränderte mikrobielle Aktivität bzw. eine Veränderung der Zusammensetzung des mikrobiellen Kollektivs im Boden (Sharma, 2005). Da nur ein kleiner Bruchteil von Mikroorganismen kultivierbar ist, sind molekularbiologische Verfahren besonders dazu geeignet, Untersuchungen bezüglich der Diversität und metabolischen Aktivität der im Boden lebenden Organismen durchzuführen (Head et al., 1998; Wagner et al., 1993). Die direkte Isolierung von Nukleinsäuren aus dem Boden und eine anschließende Vervielfältigung dieser extrahierten DNA und RNA ermöglicht die anschließende Durchführung sowohl qualitativer wie auch quantitativer Nachweismethoden (Sharma et al., 2007). Dabei können Verfahren angewendet werden, die entweder eine taxonomische oder eine funktionelle Identifizierung der Organismen erlauben (Klappenbach et al., 2000; Mrkonjic et al., (in press)).

Im Rahmen dieser vorliegenden Arbeit sollten einige dieser molekularbiologischen Verfahren entwickelt und auf ihre Reproduzierbarkeit hin getestet werden, um darauf aufbauend die Veränderungen des mikrobiellen Kollektivs nach einem Frostereignis in Bodenproben aus Waldböden zu bestimmen.

Mit Bodensäulen der Versuchsfläche „Höglwald“ wurde ein Frostereignis simuliert und das während der Auftauphase emittierte  $N_2O$  wurde kontinuierlich gemessen. Basierend auf diesen Messungen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten in Abhängigkeit der  $N_2O$ -Emission Bodenproben entnommen, aus denen die Nukleinsäuren (DNA und RNA) extrahiert wurden. Die durchgeführten Extraktionen ergaben zufriedenstellende Ergebnisse bezüglich der Qualität wie auch Quantität der

isolierten Nukleinsäuren um sie für quantitative Bestimmungen der Genkopienzahl einzusetzen. Jedoch zeigte sich, dass die Reproduzierbarkeit der Extraktionsergebnisse, bedingt durch die hohe Variabilität der Ausbeute an Nukleinsäuren aus den Bodenproben, gering war.

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es, molekularbiologische Methoden wie die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) so weit zu optimieren, dass aus den extrahierten Nukleinsäuren der „Höglwald“-Proben unterschiedliche Gene identifiziert und quantifiziert werden konnten. So konnte eine erfolgreiche Anpassung der Reaktionsansätze für mehrere Bakteriengruppen bzw. deren Gene erreicht werden, die es erlaubten, diese Gene aus Bodenextrakten zu vervielfältigen, zu klonieren und ihre Identität nach der Sequenzierung über einen Abgleich mit bekannten Genen aus Datenbank zu verifizieren.

Eine Quantifizierung einiger Bakteriengruppen in der organischen Auflage (für die Gruppe der autotrophen Ammonium-Oxidierer und die Gruppe der Eubakterien) konnte mittels quantitativer Real-Time PCR (qRT-PCR) durchgeführt werden. Die Ergebnisse zeigten, dass die hohe Variabilität der extrahierten Nukleinsäuren aus den Bodenproben des „Höglwalds“ mit hoher Wahrscheinlichkeit die Heterogenität der Ergebnisse der durchgeführten qRT-PCR verursachte.

Im Nachhinein konnte berechnet werden, dass durch die ausgeführten Extraktionen nur etwa 10% der Nukleinsäuren der im Boden vorkommenden Mikroorganismen der „Höglwald“-Bodenproben erfasst werden. Aufgrund der großen mikrobiellen Diversität in Böden allgemein müssten demzufolge weitere Untersuchungen erfolgen, um durch eine Erweiterung des Stichprobenumfangs repräsentativere Aussagen über die mikrobielle Aktivität der Bodenproben des „Höglwalds“ im Verlauf des Frost-Auftau-Ereignisses treffen zu können.

Aufgrund der hohen Variabilität der Ergebnisse der aus den „Höglwald“-Bodenproben extrahierten Nukleinsäuren, erfolgten weitergehende Untersuchungen zur Überprüfung der Extraktionsmethode. Zum einen wurde die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse (Präzision) überprüft, zum anderen wurden versucht, die Verluste an Nukleinsäuren während der Aufarbeitung zu quantifizieren. Die ermittelten Resultate der durchgeführten Extraktionen waren mit anderen Untersuchungsergebnissen aus der Literatur vergleichbar.

Weitere Verbesserungen der Extraktionsdurchführung sollten trotzdem angestrebt werden, um repräsentativere Ergebnisse zu erzielen und eine höhere

Reproduzierbarkeit in anschließenden Analysen (wie z.B. die qRT-PCR) zu erreichen.

Zu diesem Zweck wurden erste Optimierungsversuche der Extraktionsmethode getestet. Die Ergebnisse dieser modifizierten Extraktionsansätze waren vielversprechend, darauf aufbauend sollten in Zukunft weitere Untersuchungen in diese Richtung geführt werden.

# Inhaltsverzeichnis

<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>I</b>
<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>IV</b>
<b>1 VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN</b> .....	<b>6</b>
<b>2 EINLEITUNG</b> .....	<b>10</b>
<b>2.1 TREIBHAUSEFFEKT, TREIBHAUSGASE UND DIE GLOBALE ERDERWÄRMUNG</b> .....	<b>10</b>
<b>2.2 N<sub>2</sub>O- ENTSTEHUNG UND ABBAU</b> .....	<b>11</b>
<b>2.3 NITRIFIKATION UND DENITRIFIKATION</b> .....	<b>13</b>
<b>2.4 FROSTEREIGNIS</b> .....	<b>15</b>
<b>2.5 METHODEN ZUR ERFASSUNG DER BODENBAKTERIEN</b> .....	<b>15</b>
<b>2.6 ZIELSETZUNG</b> .....	<b>19</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>20</b>
<b>3.1 DER BODEN</b> .....	<b>20</b>
3.1.1 Untersuchungsgebiet „Höglwald“ .....	20
3.1.2 Die Proben .....	20
<b>3.2 VERSUCHSDURCHFÜHRUNG</b> .....	<b>21</b>
3.2.1 Verlauf des Frostereignisses.....	21
3.2.2 N <sub>2</sub> O-Messungen am Gaschromatographen .....	22
3.2.3 Verfahren der Datenauswertung .....	23
<b>3.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE VERFAHREN</b> .....	<b>23</b>
3.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren aus dem Boden .....	24
3.3.2 Trennung und Aufreinigung der DNA und RNA.....	25
3.3.3 Überprüfung der Reinheit und Abschätzung der Konzentration von Nukleinsäuren .....	26
3.3.4 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung und Größenbestimmung von DNA- Fragmenten .....	26
3.3.5 Klonierungen: Ligation und Transformation.....	27
3.3.5.1 Ligation.....	27
3.3.5.2 Transformation .....	28
3.3.6 Plasmidpräparation: Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA.....	29
3.3.7 Restriktion von Plasmid-DNA .....	30
3.3.8 Analyse der Sequenzierungsergebnisse .....	31
3.3.9 Amplifizierung von DNA-Segmenten durch PCR (Polymerase Chain Reaction) .....	32
3.3.10 Quantitative Real-Time-PCR.....	34
3.3.11 Herstellung eines internen Standards für die qRT-PCR.....	35
3.3.12 Statistische Auswertung der qRT-PCR- Ergebnisse: t-Test für zwei unabhängige Stichproben .....	36
<b>4 ERGEBNISSE</b> .....	<b>37</b>
<b>4.1 N<sub>2</sub>O-EMISSIONEN AUS „HÖGLWALD“-BODEN</b> .....	<b>37</b>
<b>4.2 BODENPROBEN UND VERARBEITUNG</b> .....	<b>40</b>

4.2.1	Konzentration und Reinheit der DNA und RNA-Proben nach der Extraktion ..	40
4.2.2	PCR: Test der Primerspezifität und Optimierung der PCR-Bedingungen ...	44
4.2.2.1	Autotrophe Ammonium-Oxidierer .....	45
4.2.2.2	Gattung <i>Nitrobacter</i> .....	46
4.2.2.3	Acidobakterien .....	46
4.2.2.4	Actinobakterien .....	47
4.2.2.5	Firmicutes .....	47
4.2.2.6	$\alpha$ -Proteobacteria .....	48
4.2.3	Klonierungen und Sequenzierungen der PCR-Produkte .....	50
4.2.4	qRT-PCR .....	54
4.2.4.1	Eubakterien .....	54
4.2.4.2	Autotrophe Ammonium-Oxidierer .....	58
4.2.4.3	Quantifizierung der Eubakterien - Überprüfung der Signifikanz .....	62
4.2.4.4	Quantifizierung der autotrophen Ammonium-Oxidierer- Überprüfung der Signifikanz .....	63
4.2.5	Präzisionskontrolle und Wiederfindungsrate .....	63
<b>5</b>	<b>DISKUSSION UND AUSBLICK .....</b>	<b>72</b>
<b>5.1</b>	<b>N<sub>2</sub>O-EMISSIONEN AUS DEN „HÖGLWALD“-BODENSÄULEN .....</b>	<b>73</b>
<b>5.2</b>	<b>KONZENTRATION UND REINHEIT DER DURCHFÜHRTEN EXTRAKTIONEN DER „HÖGLWALD“-BODENPROBEN .....</b>	<b>75</b>
<b>5.3</b>	<b>PCR-ANSÄTZE (POLYMERASE CHAIN REACTION) MIT DNA AUS „HÖGLWALD“-BODEN .....</b>	<b>78</b>
<b>5.4</b>	<b>QUANTIFIZIERUNG VON MIKROORGANISMEN MITTELS QUANTITATIVER REAL-TIME-PCR (qRT-PCR) IN BODENPROBEN DER GASMESSUNGEN .....</b>	<b>80</b>
<b>5.5</b>	<b>PRÄZISIONSKONTROLLE DER EXTRAKTIONSMETHODE UND BESTIMMUNG VON VERLUSTEN WÄHREND DER AUFARBEITUNG .....</b>	<b>82</b>
<b>5.6</b>	<b>AUSBLICK .....</b>	<b>85</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>87</b>
<b>7</b>	<b>ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>94</b>
<b>7.1</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>94</b>
<b>7.2</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>96</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>97</b>
<b>8.1</b>	<b>VERWENDETE MATERIALIEN UND LÖSUNGEN .....</b>	<b>97</b>
<b>8.2</b>	<b>VERWENDETE PRIMER .....</b>	<b>99</b>
<b>8.3</b>	<b>ARCHIVIERTE DNA-SEQUENZEN .....</b>	<b>100</b>
8.3.1	Klasse $\alpha$ -Proteobacteria .....	100
8.3.2	Stamm Acidobacteria .....	101
8.3.3	Stamm Actinobacteria .....	101
8.3.4	Gruppe der autotrophen Ammonium-Oxidierer (Gattungen <i>Nitrosomonas</i> und <i>Nitrosospira</i> ) .....	102
8.3.5	Stamm Firmicutes .....	102
8.3.6	Gattung <i>Nitrobacter</i> .....	102
8.3.7	<i>NosZ</i> -Gen (partiell) .....	103

# 1 Verzeichnis der Abkürzungen

- ° Grad
- % Prozent
- $\alpha$  Alpha
- a Jahr
- Abb. Abbildung
- AD Anno Domini (nach Christus)
- a.dest Destilliertes Wasser
- Aeh-Horizont gebleichter Oberbodenhorizont (beginnende Podsolierung)
- Al-Horizont tonverarmter Oberbodenhorizont (durch Lessivierung)
- *AmoA* Ammoniak-Monooxygenase
- $\beta$  Beta
- bp Basenpaare
- BTG Bodentrockengewicht
- bzw. beziehungsweise
- C Celsius
- ca. circa
- cm Zentimeter
- CH<sub>4</sub> Methan
- CO<sub>2</sub> Kohlendioxid
- CTAB Cetyltrimethylammoniumbromid
- DEPC Diethyldicarbonat
- DGGE Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese
- d.h. das heißt
- DNA Desoxyribonukleinsäure (DNS)
- dNTP Desoxyribonukleosidtriphosphate
- EB "elution buffer" (Auswaschpuffer)
- ECD Electron capture detector
- EDTA Ethylendiamintetraessigsäure
- *E.coli* *Escherichia coli*
- et. al. et alii bzw. et aliae: und andere
- FCKW Fluorchlorkohlenwasserstoffe
- $\gamma$  Gamma



- g                   Gramm
- *g*                   Erdbeschleunigung
- GC                 Gaschromatograph
- GWP               Treibhauspotenzial („global warming potential“)
- h                   Stunde
- *HaoR*             Hydroxylaminoxidoreduktase
- H<sub>2</sub>O               Wasser
- ha                 Hektar
- i.d.R.             In der Regel
- IMK-IFU           Institut für Meteorologie und Klimaforschung - Bereich  
Atmosphärische Umweltforschung, Garmisch-Partenkirchen
- IPCC             Intergovernmental Panel on Climate Change
- Kap.              Kapitel
- kg                 Kilogramm
- km                 Kilometer
- KNO<sub>3</sub>            Kaliumnitrat
- λ                  Lambda
- l                   Liter
- L-Lage            oberste Streuschicht der organischen Bodenauflage
- *lacZ*             Beta-Galactosidase
- M                 Molar
- m                 Meter
- μ                  micro=10<sup>-6</sup>
- MCS              „multiple cloning site“
- mg                Milligramm
- Mg<sup>2+</sup>             Magnesium
- MgCl<sub>2</sub>            Magnesiumchlorid
- min               Minute
- ml                 Milliliter
- mm                Millimeter
- Mol               Stoffmenge
- MPN              „most probable number“-Technik
- *MyrS*             Myrcensynthase
- <sup>63</sup>Ni             radioaktives Nickel

- n Anzahl der Replikate
- N Stickstoff
- *NapA* Nitratreduktase (Periplasma)
- *NarG* Nitratreduktase (Membran)
- ng Nanogramm
- nm Nanometer
- N<sub>2</sub> molekularer Stickstoff
- N<sub>2</sub>O Distickstoffoxid
- NaCl Natriumchlorid
- NH<sub>2</sub>OH Hydroxylamin
- NH<sub>3</sub> Ammoniak
- NH<sub>4</sub><sup>+</sup> Ammonium
- NH<sub>4</sub>Cl Ammoniumchlorid
- *NirK* Nitritreduktase
- NN Normalnull
- NO Stickstoffmonoxid
- NO<sub>2</sub><sup>-</sup> Nitrit
- NO<sub>3</sub><sup>-</sup> Nitrat
- *Nor* Nitritoxidase
- *NosZ* Distickstoffmonoxidreduktase
- NAC "non amplification control" (ohne Oligonukleotidprimer)
- NTC "non template control" (ohne DNA-Template)
- O<sub>3</sub> Ozon
- Of-Horizont organischer Auflagenhorizont (weitgehend zersetzte Streu)
- Oh-Horizont dunkel gefärbter organischer Auflagenhorizont  
(fortgeschrittene Humifizierung)
- P Druck
- p Irrtumswahrscheinlichkeit
- PCR Polymerase-Kettenreaktion („polymerase-chain-reaction“)
- PEG Polyethylenglykol
- pH Negativ dekadischer Logarithmus der H<sup>+</sup>-Konzentration
- ppm Parts per million (1 Volumenteil auf 10<sup>6</sup> Volumenteile)
- ppb Parts per billion (1 Volumenteil auf 10<sup>9</sup> Volumenteile)
- qRT-PCR quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion

- $r^2$  Korrelationskoeffizient
- RDP „ribosomal database project“
- RNA Ribonukleinsäure (RNS)
- rRNA Ribosomale Ribonukleinsäure
- rpm Umdrehungen pro Minute („revolutions per minute“)
- s. siehe
- sec Sekunde
- SD Standardabweichung („standard deviation“)
- SF<sub>6</sub> Schwefelhexafluorid
- SOC „super optimal growth“ (Flüssignährmedium)
- Tab. Tabelle
- T<sub>a</sub> „Annealing“-Temperatur
- TAE Tris-Acetat-EDTA-Puffer
- T<sub>e</sub> „Elongation“-Temperatur
- Tg Terragramm
- TGGE Temperatur Gradienten Gel Elektrophorese
- Tris Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
- UV Ultraviolett (Strahlung < 380 nm)
- **Q-Z**
- v.a. Vor allem
- v/v Volumen pro Volumen
- WFPS „water filled pore space“ (Anteil der Bodenporen, der mit Wasser gefüllt ist)
- WFR Wiederfindungsrate
- w/v Gewicht pro Volumen
- z.B. Zum Beispiel

## 2 Einleitung

### 2.1 Treibhauseffekt, Treibhausgase und die globale Erderwärmung

Die Veröffentlichung des Vierten Sachstandsberichts des IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change) im Jahre 2007 war nicht nur auf politischer Ebene von immenser Bedeutung. Die beobachtete globale Erderwärmung und deren Ursachen, sowie Rückkopplungsprozesse und Szenarien konnten im Vergleich zum Dritten Sachstandsbericht aus dem Jahre 2001 verifiziert und aufgrund differenzierter Modellberechnungen besser quantifiziert werden. Die Ursachen des weltweiten Temperaturanstiegs sehen die Wissenschaftler übereinstimmend und mit einer Wahrscheinlichkeit von über 90 Prozent im Anstieg der Konzentration sogenannter Treibhausgase in der Atmosphäre: andere Faktoren, wie beispielsweise die natürliche Schwankung der Sonnenaktivität, spielen nur eine untergeordnete Rolle. Diese klimarelevanten Spurenstoffe können zum einen natürlichen Ursprungs sein, wie z.B. Wasserdampf ( $\text{H}_2\text{O}$ ), Kohlendioxid ( $\text{CO}_2$ ), Methan ( $\text{CH}_4$ ) oder auch Distickstoffoxid ( $\text{N}_2\text{O}$ ). Andere Spurenstoffe, wie z.B. verschiedene Fluorchlorkohlenwasserstoffe (FCKW) oder Schwefelhexafluorid ( $\text{SF}_6$ ), stammen ausschließlich aus anthropogenen Quellen (IPCC, 2007). Die genannten Gasmoleküle sind in der Lage, die energiereiche (kurzwellige) Strahlung der Sonne durchzulassen. Jedoch die energieärmere (langwellige) Erdstrahlung wird absorbiert und zum Teil wieder in Richtung Erde emittiert. Die dadurch entstehende Erwärmung der Atmosphäre nennt man Treibhauseffekt, die dafür verantwortlichen Gase demzufolge Treibhausgase. Ohne den Treibhauseffekt natürlich vorkommender Gase wie Wasserdampf, Kohlendioxid und Methan läge die Oberflächentemperatur der Erde im Mittel bei  $-18^\circ\text{C}$ , sie wäre somit völlig gefroren. Tatsächlich beträgt die mittlere Temperatur an der Erdoberfläche aber  $+15^\circ\text{C}$ , die Differenz von 33 Grad wird vom natürlichen Treibhauseffekt verursacht.

Mit Ausnahme des Wasserdampfs ist der gemessene Anstieg der Treibhausgase menschlichen Aktivitäten zuzuschreiben. Dies wird durch einen Vergleich der Gaskonzentrationen vor und nach der Industrialisierung, also der Nutzung fossiler Brennstoffe, offensichtlich (s. Tabelle 1).

**Tabelle 1: Zusammenstellung der wichtigsten anthropogen beeinflussten Treibhausgase und ihre Eigenschaften (aus IPCC, 2007) (<sup>1</sup>AD 1000-1750, <sup>2</sup>2005, <sup>3</sup>von 1750 bis 2005).**

Gase	Vorindustrielle Konzentration <sup>1</sup>	Aktuelle Konzentration <sup>2</sup>	Prozentuale Zunahme <sup>3</sup>	Verweilzeit in der Atmosphäre [a]	Treibhauspotenzial (GWP)
CO <sub>2</sub>	280 ppm	379 ppm	35%	5-200	1
CH <sub>4</sub>	700 ppm	1774 ppm	153%	12	25
N <sub>2</sub> O	270 ppb	319 ppb	18%	114	ca. 300

Bereits eine geringe Verstärkung des Treibhauseffekts, hervorgerufen durch gesteigerte Konzentrationen der einzelnen Gase, kann zu einer Erwärmung um mehrere Grad führen. Der direkte Zusammenhang zwischen der Konzentration der Treibhausgase in der Atmosphäre und der mittleren Temperatur der Erdoberfläche wird bestätigt durch aktuelle Untersuchungen an Eisbohrkernen in der Antarktis (Petit et al., 1999).

In den vergangenen Jahren lag der öffentliche Fokus hauptsächlich auf dem Anstieg der atmosphärischen CO<sub>2</sub>-Konzentration, der vor allem auf die Nutzung fossiler Brennstoffe (Kohle, Erdöl, Erdgas) zurückzuführen ist. Jedoch erlangen auch andere klimarelevante Spurengase, allen voran CH<sub>4</sub> und N<sub>2</sub>O, immer mehr an Bedeutung, nicht zuletzt wegen ihres relativ zu CO<sub>2</sub> gesetzten höheren Treibhauspotenzials (GWP) (s. Tabelle 1). Die Entstehung, aber auch der Abbau von N<sub>2</sub>O wird im Folgenden näher erläutert.

## 2.2 N<sub>2</sub>O- Entstehung und Abbau

Die chemische Bezeichnung für N<sub>2</sub>O lautet Distickstoffoxid, allgemein ist es jedoch unter der Bezeichnung Lachgas bekannt. Sein Absorptionsspektrum und eine mittlere atmosphärische Verweilzeit von etwa 100 Jahren machen es zu einem klimarelevanten Gas mit hohem Treibhauspotenzial (s. Tabelle 1). Das in der Troposphäre chemisch stabile (inerte) Spurengas wird erst in der unteren Stratosphäre durch Photolyse, bzw. durch Reaktion mit angeregtem atomarem Sauerstoff, abgebaut. Die Abbauprodukte (z.B. NO oder NO<sub>2</sub>) wiederum sind in der Lage, mit Ozon (O<sub>3</sub>) zu reagieren und haben somit einen negativen Einfluss auf die

Ozonkonzentration der Stratosphäre. Trotz der sehr geringen Konzentration von N<sub>2</sub>O in der Atmosphäre (derzeit bei ca. 320 ppb, s. Tabelle 1) beträgt sein Anteil am anthropogenen Treibhauseffekt heute etwa 6%.

In Tabelle 2 sind die wichtigsten Quellen für N<sub>2</sub>O dargestellt.

**Tabelle 2: Übersicht der natürlichen und anthropogenen Quellen für N<sub>2</sub>O. Mengenangaben in Tg N pro Jahr (nach IPCC, 2007).**

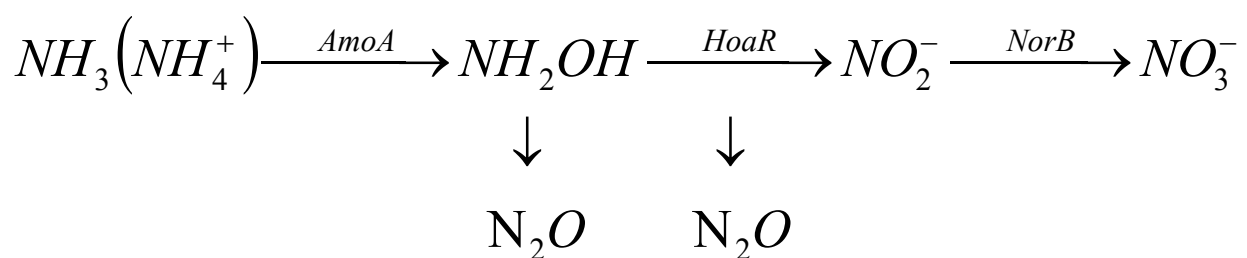
Natürliche Quellen	IPCC 2001, Bezugsjahr 1980	IPCC 2007, Bezugsjahr 1990
Böden mit natürlicher Vegetation	6,0 (3,3-9,9)	6,6 (3,3-9,0)
Ozeane	3,0 (1,0-5,7)	3,8 (1,8-5,8)
Atmosphäre (Oxidation von NH <sub>3</sub> )	0,6 (0,3-1,2)	0,6 (0,3-1,2)
Anthropogene Quellen		
Landwirtschaft	2,9 (0,9-17,9)	2,8 (1,7-4,8)
Verbrennungen fossiler Energieträger/ Katalysatoren	0,2-1,8 (0,2-1,8)	0,7 (0,2-1,8)
Biomasseverbrennung	0,5 (0,2-1,0)	0,7 (0,2-1,0)

Wie aus Tabelle 2 ersichtlich wird, ist die Spannweite der geschätzten N<sub>2</sub>O-Emissionen zum Teil sehr groß. Das ist dadurch zu erklären, dass die Entstehung von Lachgas an bestimmte Faktoren gekoppelt ist. So sind z.B. die Emissionen aus landwirtschaftlich genutzten Böden bis zu einem gewissen Grad an die eingesetzte Düngermenge (mineralische Düngung oder Wirtschaftsdüngung) gekoppelt (Granli und Bøckman, 1994a; Zou et al., 2007). Terrestrische Systeme mit natürlicher Vegetation emittieren global gesehen die größte Menge an N<sub>2</sub>O, hierbei sind vor allem klimatische Faktoren sowie physikalische und chemische Bodeneigenschaften von Bedeutung (FAO, 2001; Hoffmann et al., 2002). N<sub>2</sub>O wird bei mikrobiellen Abbauprozessen in Böden als Zwischen- oder Nebenprodukt gebildet (Christensen und Christensen, 1991). Diese Umsetzungsprozesse werden Nitrifikation und Denitrifikation genannt und nachfolgend erklärt.

## 2.3 Nitrifikation und Denitrifikation

Bei der vollständigen Zersetzung von totem organischem Material (Mineralisierung) wird der darin enthaltene Stickstoff (N) zunächst in Ammoniak ( $\text{NH}_3$ ) umgewandelt. Durch anschließende Lösung in Wasser kann Ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) entstehen. Destruenten unterschiedlichster Art (Pilze und Bakterien) sind in der Lage, bei dieser sogenannten Ammonifikation organischen Stickstoff in die anorganische Form zu überführen (Stevenson, 1986).

Die Umwandlung von  $\text{NH}_3$  bzw.  $\text{NH}_4^+$  zu Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) erfolgt in der Regel unter aeroben Bedingungen und gliedert sich in folgende Teilschritte:



**Abbildung 2-1: Teilschritte der Nitrifikation mit den jeweiligen Enzymen (nach Smith, 1982):**

**AmoA: Ammoniak-Monooxygenase**

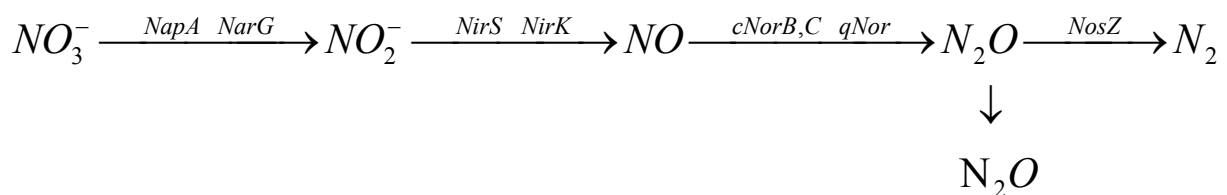
**HaoR: Hydroxylaminoreduktase**

**NorB: Nitritoxidase**

Der erste Teilschritt der Nitrifikation erfolgt durch sogenannte autotrophe Ammoniak-Oxidierer. Diesen werden verschiedene Bakterien der Klassen  $\beta$ - und  $\gamma$ -Proteobacteria zugeordnet (z.B. die Gattungen *Nitrosomonas*, *Nitrospira* und *Nitrosococcus*) (Smith, 1982). Auch einige Archeen sind in der Lage, Ammoniak zu oxidieren (z.B. die Abteilung Crenarchaeota) (Leininger et al.; 2006; Wuchter et al., 2006). Das Endprodukt dieses ersten Teilschritts ( $\text{NO}_2^-$ ) wird anschließend schnell von autotrophen Nitrit-Oxidierern zu  $\text{NO}_3^-$  umgewandelt. Bakterien der Gattung *Nitrospira* und auch einige Gattungen der Proteobacteria (z.B. *Nitrobacter* und *Nitrococcus*) sind für diesen Schritt verantwortlich (Smith, 1982). Die Nitrifikation wird beeinflusst durch den verfügbaren Ammoniumgehalt und die Sauerstoffkonzentration im Boden. Unter sauerstofflimitierten Bedingungen kann nach der Nitritbildung im Prozess der Nitrifikation eine Denitrifikation einsetzen, die als Nitrifikanten - Denitrifikation bezeichnet wird. Ammoniumoxidierer benutzen hierbei  $\text{NO}_2^-$  als alternative Sauerstoffquelle, wobei  $\text{N}_2\text{O}$  freigesetzt wird. Auch bei den Teilschritten

der Nitrifikation kann als Nebenprodukt  $N_2O$  entstehen (s. Abbildung 2-1) (Granli und Bøckman, 1994b).

Das im Boden vorhandene  $NO_3^-$  kann unter anaeroben Bedingungen über  $NO_2^-$ , zu  $NO$ ,  $N_2O$  und schließlich  $N_2$  reduziert werden. Dabei kontrolliert der Nitratgehalt im Boden bis zu einem gewissen Punkt die Höhe des gebildeten  $N_2O$ : je höher die Nitratkonzentration im Boden, desto größer die Menge des erzeugten  $N_2O$  (CAO et al., 2006). Alle Zwischenprodukte der Denitrifikation können entweder als Ausgangssubstrat für die nachfolgende Reaktion dienen oder bereits Endprodukt sein. Folgende Abbildung veranschaulicht die Schritte:



**Abbildung 2-2: Die vier Teilschritte der Denitrifikation mit den jeweiligen Enzymen (nach Philippot, 2002):**

**NapA, NarG: Nitratreduktase**

**NirS, NirK: Nitritreduktase**

**cNorB, C, qNor: Stickstoffmonoxidreduktase**

**NosZ: Distickstoffmonoxidreduktase**

Generell ist die Lachgasemission am größten, wenn der Porenraum im Boden zu etwa zwei Dritteln wassergesättigt ist (Bareth, 2000; Davidson, 1991). Denitrifizierende Bakterien sind in der Regel fakultativ anaerob, d.h. sie benötigen eigentlich Sauerstoff für ihren Stoffwechsel, können bei verminderter Sauerstoffverfügbarkeit im Boden jedoch Enzyme aktivieren, die ihnen eine anaerobe Lebensweise ermöglichen (Schlegel, 1985; Umarov, 1990). Zu diesen zählen einige Gattungen der Klassen  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Proteobacteria (*Paracoccus*, *Alcaligenes* und *Pseudomonas*), des Phylums Bacteroidetes (z.B. Gattung *Flavobacterium*) sowie des Superphylums Fibrobacteres/ Acidobacteres (z.B. Gattung *Acidobacterium*).

Nicht alle Mikroorganismen sind jedoch in der Lage,  $NO_3^-$  bis zum Endprodukt  $N_2$  zu reduzieren, zudem hängt die Aktivität der einzelnen Enzyme von verschiedenen Faktoren (Sauerstoffsättigung im Boden, pH-Wert der Bodenlösung, Nitratkonzentration) ab (Firestone et al., 1980). Dies kann bewirken, dass das



Zwischenprodukt  $N_2O$  zum maßgeblichen Produkt der Denitrifikation wird (Firestone, 1982).

## 2.4 Frostereignis

Bisherige Untersuchungen zu  $N_2O$ -Emissionen wurden hauptsächlich mit landwirtschaftlich genutzten Flächen während der Vegetationsperiode durchgeführt (Ernst, 1997; Granli und Bøckman, 1994). Zweifelsohne sind Faktoren wie der Stickstoffgehalt im Boden und die Bodentemperatur wichtige Parameter, die die mikrobielle Aktivität und damit die Höhe der  $N_2O$ -Emission beeinflussen (Davidson, 1991). Bisher wurde davon ausgegangen, dass Waldböden nur geringe Mengen an  $N_2O$  freisetzen (Bouwman, 1995). Dies war jedoch eine Fehleinschätzung, wie sich vor einigen Jahren herausstellte (Laverman, 2000). Entgegen früherer Annahmen waren die Maximalwerte der  $N_2O$ -Emissionen im Jahresverlauf nicht während der Vegetationsperiode, sondern in den Wintermonaten zu beobachten (Flessa, 1995; Kamman, 1998). Langzeitmessungen mit Waldböden ergaben, dass bis zu 70% der jährlichen Gesamtemission im Winter binnen weniger Tage freigesetzt werden können (Papen und Butterbach-Bahl, 1999). Kurze Frostperioden, in denen der Boden einfriert und wieder auftaut, haben starke Auswirkungen auf die physikalischen Eigenschaften eines Bodens sowie die mikrobielle Aktivität und die Zusammensetzung der Bakteriengesellschaft (Lipson, 2004; Sharma, 2005; Six, 2004). Es ist davon auszugehen, dass aufgrund von Frostereignissen Bodenaggregate zerstört werden und zugleich eine Freisetzung von Nährstoffen aus organischem Material (Zerstörung der Zellwände von Bodenmikroorganismen) erfolgt (Schmidt, 2004).

Folglich stünde den überlebenden Bakterien nach dem Auftauen ein Überangebot an Nährstoffen zur Verfügung. Die extrem hohe  $N_2O$ -Emission wäre somit auf eine gesteigerte mikrobielle Aktivität nach dem Auftauen zurückzuführen (Christensen und Tiedje, 1990).

## 2.5 Methoden zur Erfassung der Bodenbakterien

Die Anfänge der Erforschung der Stickstoffumsetzung durch Bodenbakterien beschränkten sich auf die Quantifizierung der Umsetzungsraten und der Enzymaktivität (Firestone und Tiedje, 1979; Davidson und Swank, 1986). Hierbei ist jedoch anzumerken, dass es sich bei den meisten Versuchen um *ex-situ*-

Experimente handelte, d.h. sie wurden ausschließlich im Labor unter kontrollierten Bedingungen durchgeführt. Besondere Bodeneigenschaften wurden genauso wenig beachtet wie die genauere Zusammensetzung der Bakteriengesellschaften (Emmerling et al., 2002). Durch Isolation und Kultivierung von Bodenbakterien kann man deren Stoffwechselfvorgänge simulieren, um die Prozesse im Boden besser verstehen zu können (Amann et al., 1995). Zu diesem Zweck wird meist die sogenannte MPN-Methode („most probable number“) verwendet. Diese klassische Methode der mikrobiologischen Quantifizierung bestimmt über eine Verdünnungsreihe näherungsweise die Anzahl der Bakterien im Ausgangssubstrat. Mikrobielle Stoffwechselaktivität kann durch die Wahl der Nährmedien gesteuert und untersucht werden (Alef, 1991). Jedoch birgt auch diese Vorgehensweise enorme Nachteile. Zum einen sind bisher nur ca. 0,1% der Bakterien kultivierbar, was bedeutet, dass man den Großteil der an den Umsetzungen beteiligten Organismen außen vorlässt (Wagner et al., 1993). Zum anderen werden die komplexen Umsetzungen im Boden durch in-situ-Versuche mit gezüchteten Bakterienkulturen zu stark vereinfacht. In der Realität kann jeder Schritt der Substratumsetzung im Boden von einer Vielzahl verschiedenster Mikroorganismen geleistet werden, dies kann zum heutigen Zeitpunkt nicht im Labor simuliert werden.

Um diese Diversität erfassen zu können, werden seit einigen Jahren molekularbiologische Verfahren eingesetzt (Head et al., 1998). Phylogenetische Studien auf Basis der vergleichenden Sequenzanalyse der rRNA haben gezeigt, dass Prokaryoten in Form der Eubakterien und Archeen zwei von drei Hauptentwicklungslinien des Lebens bilden (Woese et al., 1977). Deren phylogenetische Verzweigungen sind um ein Vielfaches größer als die der Eukaryoten. Jedoch stehen über 1,3 Millionen beschriebenen eukaryotischen Spezies derzeit nur 4500 beschriebene Bakterien- und Archeen-Arten gegenüber (Torsvik, 2002; Heywood, 1995). Die Entwicklung molekulargenetischer Methoden hat in den letzten Jahren zum Nachweis einer großen Anzahl von Eubakterien und Archeen geführt, da sie unabhängig von der Kultivierbarkeit der Organismen durchgeführt werden können. Die Methoden beruhen auf der direkten Isolierung von Nukleinsäuren aus Probenmaterial, wie z.B. Boden. Anschließend können sogenannte 16S rRNA-Gene mittels Polymerase-Kettenreaktion vervielfältigt und detektiert werden. Das rRNA-Gen eignet sich als phylogenetischer Marker, da es ubiquitär vorkommt und sowohl spezies-spezifische wie auch variable Bereiche

enthält. Außerdem sind Datenbanken zum Vergleich der Sequenzen verfügbar. Somit wird eine eindeutige Identifizierung einzelner Spezies bzw. 16S rRNA-Typen ermöglicht (Klappenbach et al., 2000). Neben dieser phylogenetischen Zuordnung über 16S rRNA können auch sogenannte funktionelle Gene erfasst werden (Mrkonjic et al., (in press)). Die funktionellen Gene können in ähnlicher Form sowohl bei Eubakterien wie auch bei Archeen vorkommen, jedoch ist die phylogenetische Zuordnung bei dieser Bestimmung nicht das Primärziel der Arbeiten. Der Schwerpunkt der Untersuchung funktioneller Gene liegt auf der Beschreibung einer funktionellen Biodiversität, um ökosystemare Funktionen zu erfassen, wie z.B. die Nitrifikation und die Denitrifikation. Hierbei macht man sich zunutze, dass viele dieser funktionellen Gene ähnliche konservierte Genbereiche aufweisen. Am Stickstoffkreislauf sind verschiedene Bakterien und Archeen beteiligt, die dieselben funktionellen Gene besitzen wie z.B. zur Ammoniakoxidation *amoA*, zur Nitratreduktion *napA* und *napG*, zur Nitritreduktion *nirS* und *nirK* und zur Reduktion von Distickstoffoxid *nosZ* (s. Abbildung 2-1 und 2-2).

Es gibt prinzipiell zwei Vorgehensweisen, diese Gene mit molekularbiologischen Methoden zu bestimmen. Qualitative Verfahren geben Auskunft darüber, welche Bakterien und Archeen in der Umweltprobe vorhanden sind. Das bedeutet, die Struktur und Artenzusammensetzung von komplexen mikrobiellen Gemeinschaften kann untersucht werden, ohne von der Kultivierbarkeit der Organismen abhängig zu sein. Analyseverfahren zur qualitativen Messung sind elektrophoretische Auftrennungsmethoden wie z.B. die TGGE (Temperatur Gradienten Gel Elektrophorese) und die DGGE (Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese). Durch eine angelegte Spannung wandern aufgetragene Nukleinsäuren (DNA oder RNA) durch ein Polyacrylamidgel. Bei der TGGE verursacht ein steigender Temperaturgradient eine Auftrennung der Doppelstränge in Einzelstränge. Bei der DGGE ist eine steigende Konzentration einer im Gel enthaltenen Harnstoff- und Formamidmischung für die Denaturierung und somit die Spaltung in Einzelstränge verantwortlich. Das Ergebnis ist in der Regel ein Bandenmuster, wobei jede einzelne Bande die 16S rRNA eines Bakterienstamms oder ein funktionelles Gen repräsentiert (Sambrook, 1989).

Die zweite Vorgehensweise zur Bestimmung der mikrobiellen Diversität in Bodenproben ist der quantitative Nachweis. Er ermöglicht eine Aussage über die Anzahl der einzelnen Organismen sowie deren momentane Aktivität bzw. ihr

mögliches Potenzial. Die dazu verwendeten Methoden sind die kompetitive PCR, die MPN-PCR („most probable number“) oder die quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) (Sharma et al., 2007). Diese Verfahren beruhen auf dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), bei dem bestimmte DNA-Stücke durch eine festgelegte Temperaturabfolge mit Hilfe von spezifischen Primern effizient amplifiziert werden können. Bei der kompetitiven PCR erfolgt die Quantifizierung der Ziel-DNA über eine zugesetzte DNA-Vorlage vergleichbarer Größe. Beide DNA-Stränge werden gleichzeitig und unter denselben Bedingungen vervielfältigt. Am Ende erlaubt ein Vergleich der gebildeten Templates eine grobe Abschätzung der ursprünglich vorhandenen Ziel-DNA. Das Prinzip der MPN-PCR basiert auf derselben Idee wie die MPN-Methode in der Mikrobiologie zur Bestimmung von Bakterienzahlen in Kulturen. Auch hierbei wird eine Verdünnungsreihe erstellt, jedoch mit Nukleinsäuresuspensionen unbekannter Ausgangsmenge. Anhand der Verdünnung, bei der das Signal der PCR einen bestimmten Wert unterschreitet, lässt sich ungefähr die Ausgangsmenge kalkulieren (Rosado et al., 1996). Eine schnellere und genauere Quantifizierungsmethode stellt die qRT-PCR dar. Bei diesem Verfahren wird die Menge der gebildeten DNA-Templates nach jedem Zyklus gemessen. Dies wird ermöglicht durch die Zugabe eines interkalierenden Farbstoffs (z.B. SYBR<sup>®</sup> Green), welcher fluoresziert, wenn er in doppelsträngige DNA eingelagert wird. Um ausschließlich DNA-Produkte der Zielsequenz zu erhalten, wird die Verwendung spezifischer Primer vorausgesetzt. Zur exakten Berechnung der Ausgangsmenge der Ziel-DNA ist es notwendig, für jeden Ansatz eine Vergleichskurve mit DNA bekannter Konzentration zu erstellen (Raeymaekers, 2000).

Das Ausgangsmaterial für die PCR sind Nukleinsäuren (DNA und RNA), die möglichst ohne Verunreinigungen von z.B. Huminsäuren aus dem Boden extrahiert werden (3.3.1). Die Untersuchung genomischer DNA gibt Aufschluss über das Potential der in der Bodenprobe vorhandenen Mikroorganismen. Dies kann einerseits über die Bestimmung einzelner Gattungen bzw. Arten erfolgen, andererseits gibt auch die Bestimmung der funktionellen Gruppen eine Aussage über die Möglichkeiten der im Boden vorhandenen mikrobiellen Gemeinschaft. Analysen auf RNA-Ebene geben Auskunft über die momentane Aktivität der Mikroorganismen, da die Proteinsynthese innerhalb von Zellen an die RNA geknüpft ist. Um eine möglichst genaue Vorstellung über die mikrobielle Gemeinschaft im Boden und deren aktuelle Aktivität zu bekommen, ist eine gleichzeitige Extraktion von DNA und RNA

notwendig. Nur so kann die unvermeidbare Verzerrung einer Momentaufnahme minimiert werden. Um eine simultane Extraktion von DNA und RNA zu ermöglichen, muss gewährleistet sein, dass die Aktivität von RNasen inhibiert ist. Diese Enzyme bauen innerhalb kurzer Zeit RNA-Stücke ab (Griffiths, 2000). Trotz dieser Schwierigkeit sollte das Ziel eine gleichzeitige Extraktion von DNA und RNA sein, bei einer getrennten Extraktionsmethode wäre der Fehler einer Verzerrung bezüglich der Konzentration von DNA und RNA gegeben (Hurt, 2001).

## **2.6 Zielsetzung**

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die molekularbiologischen Verfahren entwickelt werden, um die Veränderungen der Zusammensetzung von Bodenmikroorganismen nach einem Frostereignis in Waldböden zu bestimmen. Dies sind zum einen die simultane Extraktion und Aufarbeitung von DNA und RNA mit dem Schwerpunkt der Reproduzierbarkeit und Präzision der Methodik. Zum anderen sollte die Spezifität der verwendeten Primer (für funktionelle Gene sowie taxonomische Gruppen) überprüft bzw. die Reaktionsbedingungen der RT-PCR-Systeme modifiziert werden. Darauf aufbauend sollten die etablierten Methoden an Bodenproben nach einem simulierten Frostereignis getestet werden.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Der Boden

#### 3.1.1 Untersuchungsgebiet „Höglwald“

Die untersuchten Bodenproben stammen aus dem „Höglwald“, einem ca. 370 ha großen Waldstück 50 km nordwestlich von München (Papen und Butterbach-Bahl, 1999). Das Gebiet liegt in der submontanen Klimastufe (540 m über NN) mit einer mittleren Jahrestemperatur von 7,3°C und einer mittleren jährlichen Niederschlagsmenge von 800 mm (Huber, 1997).

Das Teilstück des „Höglwalds“, aus dem die Bodenproben entnommen wurden, ist ausschließlich mit 98jährigen Fichten (*Picea abies* L. Karst.) bestockt.

Der Bodentyp an diesem Standort ist eine saure, podsolige Parabraunerde mit pH-Werten von 2,9 bis 3,9 in der organischen Auflage bzw. 3,2 im mineralischen Oberboden (A-Horizont) (Gasche, 1998). Die Humusform des Fichtenstandorts kann als typischer Moder charakterisiert werden (Rothe, 1997; Kreutzer, 1986). Sehr detaillierte Standortbeschreibungen finden sich bei Huber (1997) und Kreutzer (1998).

Aufgrund seiner Lage ist der „Höglwald“ hohen Stickstoffeinträgen ausgesetzt, maßgeblich verursacht durch die intensive Landwirtschaft in unmittelbarer Nähe (Butterbach-Bahl, 2002). Der jährliche Mittelwert für den Eintrag durch den Bestandesniederschlag liegt bei der Fichtenfläche bei 30 kg N Jahr<sup>-1</sup> ha<sup>-1</sup>, der Großteil des eingebrachten Stickstoffs liegt als Ammonium vor (Verhältnis von Ammonium zu Nitrat ist gleich 2:1). (Butterbach- Bahl, 2002; Huber, 1997)

Untersuchungen haben gezeigt, dass in den letzten Jahren der Stickstoffaustrag mit dem Sickerwasser unterhalb des Wurzelraumes der Fichten dieselbe Größenordnung besaß wie der Stickstoffeintrag durch den Niederschlag. Der „Höglwald“ ist somit per Definition ein stickstoffgesättigtes System (Agren, 1988; Rothe, 1997).

#### 3.1.2 Die Proben

Die insgesamt 12 Bodenproben wurden am 16.01.2008 an oben beschriebener Versuchsfläche entnommen. Mit Hilfe eines Stechzylinders wurden 13-15 cm tiefe

intakte Bodensäulen mit einem Durchmesser von 12 cm aus dem Waldboden gestochen und bis zum Beginn des Experiments bei 4°C im Kühlraum gelagert. Die Struktur und Schichtung des Bodens blieb in den Säulen erhalten, der Boden wurde weder gesiebt noch homogenisiert. Jede Säule wies demnach folgendes Profil auf:

- die oberen 7 bis 9 cm bestanden aus der organischen Auflage (L-Lage, Of-Horizont, Oh- Horizont)
- die unteren 4 bis 6 cm waren aufgrund des farblichen Unterschieds sowie der Homogenität des Bodens eindeutig dem Mineralboden (Aeh- Horizont, Al-Horizont) zuzuordnen (Kreutzer, 1998).

Es ist bekannt, dass die Ammonium- und Nitratgehalte des Bodens starken kleinräumlichen Schwankungen unterliegen (Matejek, 2008). Neuesten Forschungsergebnisse zufolge mit Bodenproben aus dem „Höglwald“ liegen die Werte der Ammoniumkonzentration bei 2,6 bis 3,8 µg N pro g Bodentrockengewicht (BTG), während die Nitratkonzentrationen mit 3,4 bis 6,0 µg N g<sup>-1</sup> BTG tendenziell etwas höher liegen (Haas, 2008).

## **3.2 Versuchsdurchführung**

### **3.2.1 Verlauf des Frostereignisses**

Es wurden zwei Versuchsreihen mit je 6 Bodensäulen zur Quantifizierung der Lachgas- Emissionen (N<sub>2</sub>O) aus Waldböden nach einem Frostereignis durchgeführt. Diese unterschieden sich in folgenden Rahmenbedingungen:

Den Bodenproben der ersten Versuchsreihe wurde kein Wasser zugesetzt, der WFPS-Wert lag demnach deutlich unter 70%. Sie wurden am 05.06.08 zunächst bei -20°C eingefroren, nach 48 Stunden wurde die Temperatur mit sofortiger Wirkung in einem Glykol-Wasserbad auf -5°C erhöht.

Am 08.06.08, also 72 Stunden nach dem Einfrieren, wurden alle sechs Säulen im Wasserbad bei konstanten +5°C aufgetaut und die drei ersten Säulen luftdicht verschlossen. Ab diesem Zeitpunkt begann die manuelle Entnahme der Gasproben und N<sub>2</sub>O-Messung (vier Mal pro Stunde). Um eventuelle Gasakkumulationen im Luftraum der Säulen über dem Boden zu vermeiden, wurden alle 60 Minuten die Deckel der drei beprobten Säulen komplett entfernt, für weitere 60 Minuten konnte somit ein Austausch mit der Raumluft stattfinden. In dieser Zeit wurden die anderen drei Säulen luftdicht verschlossen und deren N<sub>2</sub>O-Emissionen gemessen.

Entsprechend des Anstiegs der N<sub>2</sub>O-Bildung erfolgte die Entnahme der Bodenproben der einzelnen Säulen zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Da jeweils drei Proben entnommen wurden, war ein Minimum von sechs Bodenproben je Säule (von mindestens zwei verschiedenen Zeitpunkten) sichergestellt.

Die ausgestanzten Bodenproben erstreckten sich vertikal über das gesamte Bodenprofil (von der Auflage bis zum Mineralbodenhorizont) und hatten einen Durchmesser von 2 cm. Die Oberfläche der entnommenen Bodenproben betrug demnach maximal 18,8% der gesamten Oberfläche der Bodensäule.

Mit der letzten Gasmessung am 19.06.08 wurde nach elf Tagen die erste Versuchsreihe beendet und die Bodensäulen zur Aufbewahrung bei -20°C gelagert.

Den sechs Bodenproben der zweiten Versuchsreihe wurde zunächst jeweils 300 ml Wasser zugefügt, um einen WFPS-Wert von mindestens 70% zu gewährleisten. Die Wasserzufuhr erfolgte in 20 ml Dosen über 48 Stunden verteilt, um eine langsame und gleichmäßige Durchfeuchtung des gesamten Bodens sicherzustellen. Die Lösung enthielt pro Liter destilliertem Wasser 12,5 mg NH<sub>4</sub>Cl und 12,9 mg KNO<sub>3</sub>, dies entspricht der Konzentration an gelöstem Stickstoff im Niederschlagswasser des „Höglwalds“ (Huber, 1997). Anschließend wurden die Bodensäulen am 25.06.08 bei -14°C eingefroren und am 02.07.08 (also nach 168 Stunden) luftdicht verschlossen und bei +10°C Lufttemperatur (im Kühlschrank) zum Auftauen inkubiert. Die Entnahme der Gasproben und deren Messung begannen ab diesem Zeitpunkt. Die Vorgehensweise der Bodenprobenentnahme sowie der stündliche Gasaustausch zwischen Bodensäule und Umgebung wurden wie bei der ersten Versuchsreihe durchgeführt. Jedoch hatte eine geringere Anzahl an ausgestanzten Bodenproben je Säule zur Folge, dass der Anteil der ausgestanzten Proben nur noch maximal 13,8% der Gesamtoberfläche der Bodensäule betrug. Die zweite Versuchsreihe endete mit der letzten Gasmessung am 22.07.08 nach 20 Tagen, und die Bodensäulen wurden anschließend bei -20°C gelagert.

### **3.2.2 N<sub>2</sub>O-Messungen am Gaschromatographen**

Die N<sub>2</sub>O- Produktion der Bodenproben wurde mittels eines Gaschromatographen (GC-14A, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) mit Elektroneneinfangdetektor (Electron Capture Detector, kurz „ECD“) quantifiziert.

Der Trennsäule (Hayesep N, 60/80 mesh) des Gaschromatographen ist der Detektor angefügt, der im Wesentlichen aus einer Ionisationskammer besteht, die mit <sup>63</sup>Ni



beschichtet ist.  $^{63}\text{Ni}$  ist radioaktiv und ein  $\beta$ -Strahler, bildet also freie Elektronen, die bei angelegter Spannung zur Anode wandern und dabei zusätzlich das Trägergas ionisieren (Ionisationsgrundstrom). Wird dem Trägergas  $\text{N}_2$  5.0 eine Gasprobe zugegeben, verringert sich durch die höhere Elektronenaffinität des in der Probe enthaltenen  $\text{N}_2\text{O}$ s der Ionisationsgrundstrom linear zur Konzentration. Zusätzlich ist der Trennsäule eine mit Ascarite gefüllte Vorsäule vorgeschaltet, um störende Wasserdampf- und Kohlendioxidgehalte der Gasproben zu eliminieren (Instruction Manual, 1989, Gaschromatograph GC-14A, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). Dieses Messprinzip ermöglicht die genaue Messung gasförmiger Verbindungen, vor allem nitrierter, schwefelhaltiger und halogener Substanzen bis in den Ultrapurenbereich, welcher in den Einheiten ppm bzw. ppb angegeben wird.

Die manuelle Entnahme der Gasproben und deren Messung erfolgten zu Beginn jeder Versuchsreihe stündlich, und reduzierten sich nach vier Tagen auf drei Messreihen täglich. Die Detektortemperatur war während des gesamten Versuchs auf  $340^\circ\text{C}$  eingestellt, die Temperatur der Trennsäule betrug  $40^\circ\text{C}$ . Das Analysevolumen jeder Gasprobe war auf 3 ml justiert, zur internen Qualitätssicherung der Messwerte beinhaltete jede Messreihe, d.h. jede Stunde, drei Kontrollmessungen mit Prüfgas ( $\text{N}_2\text{O}$ -Konzentration: 400 ppb, Firma Messer, Griesheim).

### **3.2.3 Verfahren der Datenauswertung**

Mit Hilfe der Computersoftware „GC Solutions“ (Shimadzu, Kyoto, Japan) wird oben erwähnte Verringerung des Ionisationsgrundstroms automatisch als Kurve invertiert dargestellt (sogenannter „Peak“), wobei die Fläche unter dem Peak der in der Probe enthaltenen  $\text{N}_2\text{O}$ - Konzentration entspricht. Die Peakflächen wurden manuell nachintegriert, und die korrigierten Werte anschließend in ein Datenblatt übertragen. Die genaue Vorgehensweise zur Berechnung der  $\text{N}_2\text{O}$ -Flüsse wird im Ergebnisteil erläutert.

## **3.3 Molekularbiologische Verfahren**

Die in dieser Arbeit verwendeten Rezepte und Zusammensetzungen aller, nicht näher beschriebenen, Lösungen und Puffer sind im Anhang (8.1) aufgeführt.

### 3.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren aus dem Boden

Die in Kap. 3.2.1 beschriebenen ausgestanzten Bodenproben der Versuchsreihen wurden direkt nach der Entnahme separat als „Material des Auflagenhorizonts“ und „Material des Mineralbodenhorizonts“ in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Bis zur weiteren Verarbeitung lagerten sie bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Die Isolierung von Nukleinsäuren aus gefrorenem Boden wurde in abgewandelter Form nach der Methode von Griffiths et al. (2000) durchgeführt. Aufgrund der modifizierten Arbeitsweise und mit Hilfe des verwendeten CTAB-Puffers konnte so gleichzeitig genomische DNA und RNA gewonnen werden. Alle zur DNA- und RNA-Extraktion verwendeten Gefäße, Materialien und Lösungen wurden vor Gebrauch durch Autoklavieren sterilisiert. Zusätzlich waren die für die RNA-Präparation verwendeten Gefäße und Lösungen RNase-frei (zertifiziert oder mit DEPC behandelt). Zu diesem Zweck erfolgte bei den Lösungen (ohne primäre Amin-Gruppe) eine Zugabe von 0,1% (v/v) DEPC und die Gefäße wurden mit destilliertem Wasser befüllt, dem 0,1% (v/v) DEPC zugesetzt war. Nach einer Inkubationszeit von mindestens zwei Stunden bei  $37^{\circ}\text{C}$  wurden diese ebenfalls autoklaviert.

Die Vorgehensweise der simultanen DNA- und RNA-Extraktion lässt sich wie folgt beschreiben:

1. Jede Bodenprobe wurde mittels einer Laborschwingmühle (Mikro-Dismembrator II, BRAUN, Melsungen) mit maximaler Amplitude von 15 mm pulverisiert. Während des Zerkleinerns blieb der Boden stets gefroren.
2. Die gemahlten Proben mit einem Gewicht von ca. 0,2 g wurden in Kunststoff-Reaktionsgefäße eingewogen. Das exakte Gewicht wurde vermerkt. Auch hierbei wurde beachtet, dass die Proben nicht auftauen.
3. Dann wurde jeweils 500  $\mu\text{l}$  CTAB-Puffer zugegeben und für fünf Sekunden mit 2400 rpm auf einem Laborschüttler (Vortex-Shaker REAX 2000, Heidolph GmbH, Kehlheim) gemischt. Der Puffer hatte Raumtemperatur, demzufolge begann das darin gelöste Bodempulver aufzutauen. Da die Aktivität von RNasen nur im gefrorenen Zustand gehemmt ist, musste deshalb umgehend die Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (im Volumenverhältnis 25:24:1) erfolgen, um RNasen zu inaktivieren, die durch das Zerkleinern des Bodens und der darin enthaltenen Organismen freigesetzt wurden. Erneutes Mischen auf dem Laborschüttler für 30 Sekunden sollte die Bodenlösung homogenisieren.

4. Zur Phasentrennung wurden die Proben bei 4°C und 16000 x *g* für fünf Minuten zentrifugiert (SIGMA Laborzentrifugen GmbH, Osterode a.H.). Im direkten Anschluss daran wurden 500 µl der wässrigen Oberphase entnommen und in vorbereitete Zentrifugengefäße mit 1000 µl Chloroform:Isoamylalkohol-Lösung (Volumenverhältnis 24:1) pipettiert und gemischt.
5. Die restliche Bodensuspension wurde erneut mit 500 µl CTAB-Puffer 30 Sekunden auf dem Schüttler gemischt und dann zentrifugiert (siehe Punkt 4). Abermals wurden 500 µl der wässrigen Oberphase abpipettiert und zu den in Punkt 4 erhaltenen Proben zugegeben und durchmischt.
6. Nach erneuter Zentrifugation (s.o.) wurde die wässrige, obere Phase entnommen und in neuen Zentrifugengefäßen mit dem zweifachen Volumen PEG/NaCl-Lösung versetzt. Dies bewirkte ein Ausfallen der Nukleinsäuren. Die Inkubationszeit betrug hierfür wahlweise zwei Stunden bei Raumtemperatur oder eine Stunde bei 37°C (Wasserbad Julabo SW-20C, Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach).
7. Die Proben wurden 10 Minuten bei 18000 x *g* und 4°C zentrifugiert, der Überstand vorsichtig entfernt und die Sedimente mit je 1000 µl gekühltem 75%igem Ethanol gewaschen. Nach fünfminütiger Zentrifugation (18000 x *g* bei 4°C) erfolgte eine Wiederholung des Waschschrilles.
8. Die Sedimente wurden in einer Vakuumzentrifuge (Concentrator 5301, Eppendorf-Netheier-Hinz GmbH, Hamburg) für mindestens zehn Minuten getrocknet. Waren noch deutliche Ethanolreste in den Probengefäßen sichtbar, wurde die Trocknungszeit jeweils zwei Minuten verlängert.

Die Sedimente wurden mit je 20 µl TE-Puffer resuspendiert (Gesamtvolumen pro Extraktionsprobe 80µl) und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C aufbewahrt.

### **3.3.2 Trennung und Aufreinigung der DNA und RNA**

Um möglichst reines und vor allem in genomische DNA und RNA getrenntes Probenmaterial zu erhalten, wurde der QIAGEN RNA/DNA Mini-Kit verwendet (QIAGEN GmbH, Hilden). Die Vorgehensweise der einzelnen Arbeitsschritte entsprach der Anleitung (QIAGEN® RNA/DNA Handbook, 1998), lediglich die Menge des anfangs eingesetzten Probenvolumens variierte von 50 bis 90 µl. Das Prinzip der Trennung beruht auf der unterschiedlichen Adhäsion von RNA und DNA bei

verschiedenen Salzkonzentrationen bzw. pH-Werten der eingesetzten Puffer. So bleibt im ersten Schritt die RNA in der stationären Phase (Testsäule) gebunden, wohingegen die DNA unterhalb der Säule in einem Zentrifugengefäß aufgefangen werden kann. Nachdem die RNA mit Waschpuffer gereinigt wurde, kann sie mittels pH-Wert-Änderung bzw. Modifikation des Salzgehaltes des Elutionspuffers ebenfalls aus der Säule gelöst werden. In einem zweiten Schritt wird die DNA mit anderen Puffern auf gleiche Weise gereinigt und wieder aus der Säule gelöst. Sind DNA und RNA schließlich getrennt, werden sie mit Isopropanol ausgefällt, zwei Mal mit Ethanol gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Die DNA wird mit Tris-Puffer (10 mM, pH 8), die RNA mit RNase freiem destilliertem Wasser wieder in Lösung gebracht. Bezüglich der Menge der Resuspensionslösung des DNA-Materials variierten die Endvolumina der bearbeiteten Proben zwischen 50 und 100 µl.

### **3.3.3 Überprüfung der Reinheit und Abschätzung der Konzentration von Nukleinsäuren**

Der Nukleinsäuregehalt der Probenlösungen wurde photometrisch bestimmt (nanodrop ND-1000 Spectralphotometer, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen). Die Software des Messgeräts errechnet automatisch über den Absorptionsgrad des ausgesendeten Lichts (Wellenlängenbereich von 220-350 nm bei Nukleinsäuren) die DNA- bzw. RNA-Konzentration jeder Probe (über das Lambert-Beersche-Gesetz). Zusätzlich gibt der Quotient aus den Extinktionen bei 260 nm und 280 nm den Grad der Kontamination an (v.a. verursacht durch Proteine, ungesättigte Fettsäuren und Phenolringe). Der Wert sollte demnach zwischen 1,8 und 2,0 liegen, um eine ausreichende Reinheit zu gewährleisten. Der Quotient aus den Extinktionen bei 260 nm und 230 nm sollte zwischen 1,8 und 2,2 liegen, um Verunreinigungen der Proben mit Aminosäureverbindungen auszuschließen.

### **3.3.4 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung und Größenbestimmung von DNA-Fragmenten**

Zur Überprüfung der Reinheit, zur Mengenabschätzung, aber auch zur Restriktionsanalyse (3.3.7) wurden die Nukleinsäuren (DNA) auf Agarosegelen aufgetrennt (Sambrook, 1989). Das Trennungsprinzip beruht auf der unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit negativ geladener Nukleinsäure-

Moleküle in einem elektrischen Feld, wobei sich kleinere Moleküle schneller durch das Gel bewegen. Üblicherweise wurden 2%ige Agarosegele verwendet, nur in Ausnahmefällen (Größe der DNA-Fragmente größer als 1 kb) war die Agarosekonzentration auf 1% reduziert. Die angelegte Spannung betrug bei allen Analysen 120 V (Electrophoresis Power Supply PS3002, Life Technologies Gibco BRL, Karlsruhe).

Zur Herstellung des Gels wurde die entsprechende Menge Agarose (Invitrogen, Karlsruhe) abgewogen und in 80 ml 1x TAE-Puffer (8.1) durch Erhitzen in der Mikrowelle aufgelöst. Nach Zugabe von 3  $\mu$ l des in die DNA interkalierenden Farbstoffs Ethidiumbromid (Konzentration der Ethidiumbromidlösung: 10 mg ml<sup>-1</sup>) wurde die homogene Gellösung in den vorbereiteten Gelhalter (15x11 cm) gegossen und 30 Minuten bei Raumtemperatur zum Aushärten stehen lassen. Nach dem Entfernen des Kamms für die Auftragstaschen wurde das Gel in die mit 1x TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gebracht. Zum Auftragen der Proben wurden diese mit 1/5 Volumen Bromphenolblau-Glycerin-Lösung (8.1) gemischt und luftblasenfrei in die Taschen pipettiert. Als Größenmarker wurde eine DNA-Leiter verwendet und mitgeführt (100 bp bzw. 1 kb von Invitrogen, Karlsruhe). Die Dauer der Elektrophorese bei 120 V war abhängig von der gewünschten Auftrennung (nach optischer Kontrolle anhand der Farbfront des Probenpuffers). Die Auswertung erfolgte unter UV-Licht (Wellenlänge 312 nm) an einem Analysegerät (Intas, Göttingen). Sämtliche Analyseergebnisse konnten direkt dokumentiert und archiviert werden.

### **3.3.5 Klonierungen: Ligation und Transformation**

Um mit spezifischen DNA-Fragmenten arbeiten zu können, benötigt man meist große Mengen des Fragments in reiner Form. Um diese herzustellen, werden die jeweiligen Fragmente in Vektoren inkloniert. Dieses Vorgehen hat den Vorteil, dass die PCR-Fragmente in den Vektoren auf diese Weise gut weiterverarbeitet und konserviert werden können (Aufbewahrung in Glycerol-Stammlösung bei -80°C). Klonierungsvektoren sind in geeigneten Wirtszellen zur Replikation befähigt und vervielfältigen dabei passiv die inklonierte DNA mit.

#### **3.3.5.1 Ligation**

Bei einer PCR entstehen aufgrund der terminalen Transferase-Aktivität der Taq-

Polymerase Amplifikate, die an beiden Seiten mit ungepaarten Desoxyadenosinen (A) enden. Die beiden Enden eines linearisierten Vektors besitzen ungepaarte Desoxythymidine (T), so dass mittels einer Ligase das PCR-Fragment gebunden und ligiert werden kann.

Alle durchgeführten Ligationen von PCR-Segmenten wurden mit den Plasmid-Vektoren pCR®2.1-TOPO® bzw. pCR®II-TOPO® durchgeführt (Invitrogen, Karlsruhe). Beide Vektoren sind linearisiert und besitzen Gene für eine Ampicillin- und Kanamycin-Resistenz.

Außerdem liegt bei beiden Vektoren die MCS-Sequenz („multiple cloning site“) innerhalb des *lacZ*  $\alpha$ - (pCR®2.1-TOPO®) bzw. *lacZ*- Gens (pCR®II-TOPO®). Dieser Abschnitt kodiert einen aminoterminalen Bereich der  $\beta$ -Galactosidase und ist für die später durchgeführte Selektion der Bakterienkolonien (3.3.5.2) entscheidend (Knippers, 1997).

Die Ligationen erfolgten unter Verwendung des TOPO TA Cloning® Kits (Invitrogen, Karlsruhe) nach Herstellerangaben (TOPO TA Cloning®, User Manual, 2006). Die Menge der eingesetzten PCR-Lösung richtete sich nach deren Konzentration, und variierte von 1 bis 4  $\mu$ l:

- 1-4  $\mu$ l PCR-Produkt
- 1  $\mu$ l Salzlösung (1.2 M NaCl, 0.06 M MgCl<sub>2</sub>, Invitrogen)
- 0-3  $\mu$ l a.dest (je nach Menge des eingesetzten PCR-Produkts)
- 1  $\mu$ l TOPO®-Vektor (Invitrogen)

Die Gesamtmenge des Ligationsansatzes sollte 6  $\mu$ l ergeben.

Nach dem Mischen wurde der Ansatz 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und wurde anschließend zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert.

### **3.3.5.2 Transformation**

Die Transformation, also die Aufnahme der entstandenen Plasmide (3.3.5.1) in Bakterienzellen, wurde mit den kompetenten Zellen *E.coli* TOP10 des TOPO TA Cloning® Kits durchgeführt (Invitrogen, Karlsruhe). Als Arbeitsanleitung diente das One Shot® Chemical Transformation Protocol (TOPO TA Cloning®, User Manual, 2006). Wiederum unterschied sich die eingesetzte Menge des Ligationsansatzes von der Vorgabe, das Volumen lag entsprechend anfangs eingesetzter Menge an PCR-Fragmenten (und dementsprechend entstandenen ligierten Plasmiden) zwischen 2

und 6 µl. Diese Menge wurde der Bakteriensuspension vorsichtig untergemischt und für 30 Minuten auf Eis stehen lassen. Im Anschluss erfolgte eine Hitzeschockbehandlung für exakt 30 Sekunden bei 42°C. Dies bewirkt einen Aufschluss bzw. eine bessere Durchlässigkeit der Bakterienzellwände, die Effektivität der Transformation (also die Aufnahme der Plasmide in die Zellen) wird dadurch wesentlich erhöht.

Die Bakterien wurden danach sofort auf Eis gelagert. Nach anschließender Zugabe von 250 µl SOC-Medium („Super Optimal broth with Catabolite repression“, Invitrogen, Karlsruhe) folgte eine Inkubation bei 37°C für eine Stunde, um die konstitutiven Resistenzgene (gegen Ampicillin und Kanamycin) zu exprimieren.

Die Zellen wurden auf vorbereiteten LB-Agarplatten ausplattiert, denen 50 µg ml<sup>-1</sup> Ampicillin (8.1) sowie 80 µl X-Gal pro Platte zugesetzt waren. Je Probe wurden zwei Platten erstellt (40 µl und 250 µl des Reaktionansatzes), und bei 37°C über Nacht inkubiert. Nur Bakterienzellen, welche durch die Aufnahme des Vektors ampicillinresistent geworden waren, konnten so wachsen (3.3.5.1). Zusätzlich induzierte die Farbe der Bakterienkolonien, ob die Ligation der Fremd-DNA in die Vektoren erfolgreich war oder nicht. Bei gelungenem Einbau der Fremd-DNA in die MCS („multiple cloning site“) wurde das Leseraster des *lac Z*-Gens zerstört, und X-Gal konnte nicht mehr zum blauem Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlorindigo umgewandelt werden. Nur inserttragende, weiße Kolonien wurden demzufolge weiterbearbeitet.

### **3.3.6 Plasmidpräparation: Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA**

Zunächst wurden die positiven (weißen) Bakterienkolonien in je 5 ml LB-Flüssignährmedium (8.1) überimpft und über Nacht inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden von jeder Kultur 2 ml in ein Zentrifugengefäß abgefüllt, bei 6000 x g für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Plasmidpräparation wurde nachfolgend mittels eines QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kits (QIAGEN GmbH, Hilden) entsprechend der Arbeitsanleitung für den Gebrauch einer normalen Laborzentrifuge durchgeführt. Die Bakteriensedimente in den Zentrifugengefäßen wurden zunächst in einem Puffer resuspendiert, danach mit einem zweiten, alkalischen Puffer lysiert. Anschließende Zugabe eines Puffers mit hoher Salzkonzentration neutralisierte die Lösung und ermöglichte die Adhäsion der

freigesetzten Plasmid-DNA an die stationäre Phase (in diesem Fall das Kieselsäuregel der Testsäulen). Die gebundene DNA konnte so mittels eines vierten Puffers in den Säulen gewaschen werden und schließlich mit einem Eluierungspuffer (EB Buffer, QIAGEN) wieder in Lösung gebracht werden. Die in Zentrifugengefäßen aufgefangene Plasmid-DNA-Suspension wurde bis zur weiteren Bearbeitung bei -20°C eingefroren.

### 3.3.7 Restriktion von Plasmid-DNA

Um überprüfen zu können, ob das isolierte Plasmid (3.3.6) das gewünschte Insert (3.3.5.1) enthielt, musste zunächst mittels Restriktion das ligierte DNA-Stück aus dem Plasmid geschnitten werden. Dazu benötigt man Restriktionsenzyme (Restriktionsendonukleasen), welche in der Lage sind, wenige Basen lange DNA-Sequenzen zu erkennen und dort spezifisch zu schneiden. Wichtig ist dabei der Einsatz des richtigen Puffers, um die maximale Aktivität der eingesetzten Enzyme zu gewährleisten. Ebenso ist die Wahl des Restriktionsenzym aufgrund der spezifischen Aktivität an den Schnittstellen abhängig von dem für die Ligation verwendeten Vektor. Die unter Punkt 3.3.5.1 beschriebenen Vektoren (pCR®2.1-TOPO® und pCR®II-TOPO®) besitzen jeweils zwei *EcoRI*-Schnittstellen, die jeweils nur wenige Basen vor bzw. hinter der Insertionsstelle des PCR-Amplifikats liegen. Die DNA-Sequenz wird demzufolge um insgesamt 17 Basen verlängert aus dem Vektor geschnitten. Der Restriktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

6,5 µl a.dest

1 µl REact® 3-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, Invitrogen)

0,5 µl *EcoRI* (Invitrogen)

2 µl Plasmid-DNA-Lösung

Sämtliche Komponenten wurden gemischt und bei 37°C für zwei Stunden inkubiert. Anschließend wurde mittels Agarosegelelektrophorese (3.3.4) überprüft, ob das herausgetrennte PCR-Insert die erwartete Größe besaß. Hierfür wurde die Gesamtmenge des Restriktionsansatzes verwendet. Proben, bei denen Banden der gewünschten Größe sichtbar waren, wurden zur Sequenzierung verschickt. Ein



Fremdunternehmen (Eurofins MWG Operon, Martinsried) bestimmte die DNA-Sequenz.

### 3.3.8 Analyse der Sequenzierungsergebnisse

Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden im sogenannten FASTA-Format übermittelt. Dieses textbasierte Dateiformat zur Darstellung und Speicherung der Primärstruktur von Nukleinsäuren (Nukleinsäuresequenz) erlaubt es, den Sequenzen einen Namen und Kommentare voranzustellen (Kopfzeile). Die erlaubten Codes für Nukleinsäuren im FASTA-Format sind nachfolgend in Tabelle 3 dargestellt, wobei Lücken in der Nukleinsäuresequenz durch einen Bindestrich dargestellt werden.

**Tabelle 3: Erlaubte Codes für Nukleinbasen (nach IUB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology))**

Code	Bedeutung	Code	Bedeutung
A	Adenosin	M	A C
C	Cytosin	S	G C
G	Guanin	W	A T
T	Thymin	B	G T C
U	Uracil	D	G A T
R	G A	H	A C T
Y	T C	V	G C A
K	G T	N	A G C T

In dieser Form konnten die ermittelten DNA-Sequenzen mit bereits in Datenbanken vorhandenen Sequenzen verglichen werden. Die dafür verwendeten Programme waren „BLAST“ (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) von NCBI und „CLUSTALW2“ (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) von EMBL-EBI. Das allgemein zugängliche Computerprogramm „BLAST“ zeigt einerseits die Menge lokaler „Alignments“ an, d.h. die Übereinstimmung von Teilbereichen der Sequenz mit ähnlichen Stücken aus der Datenbank. Darüber hinaus berechnet „BLAST“ über

Algorithmen, wie signifikant die gefundenen Treffer sind. Die Wahrscheinlichkeit einer zufälligen Übereinstimmung mit Genen aus der Datenbank wird über den sogenannten E-Wert angezeigt („E-value“). Je kleiner dieser Wert ist, desto höher ist die Präzision der getesteten Sequenz. Um multiple Sequenzalignments, den Vergleich mehrerer Sequenzen, durchzuführen, wurde das Programm „CLUSTALW2“ verwendet, welches ebenfalls allgemein genutzt werden kann. Es errechnet über eine Bewertungsfunktion die Stärke der Homologien zwischen den (möglichst gleich langen) zu untersuchenden Sequenzen.

### **3.3.9 Amplifizierung von DNA-Segmenten durch PCR (Polymerase Chain Reaction)**

Die Polymerase-Kettenreaktion ermöglicht es, definierte DNA-Bereiche *in vitro* zu vervielfältigen. Der Bereich, der amplifiziert werden soll, wird durch zwei Primermoleküle festgelegt. PCR-Primer sind kurze Oligonukleotide, die zum einen gegenläufig sind, und zum anderen Homologien zum linken bzw. rechten Ende der Zielsequenz aufweisen. Die verwendeten Primer wurden vor Gebrauch getestet, indem sie *in silico* mit Daten einer Gendatenbank (Ribosomal Database Project) speziell für 16S-Gene verglichen wurden (<http://rdp.cme.msu.edu>).

Der Ablauf der PCR gliedert sich in drei Schritte:

#### 1. Denaturierung („Melting“):

Im ersten Schritt wird die doppelsträngige DNA, welche die Zielsequenz enthält, bei 94°C denaturiert, d.h. Wasserstoffbrückenbindungen werden aufgebrochen und die DNA liegt als Einzelstränge vor.

#### 2. Primerbindung („Annealing“):

Im zweiten Schritt wird die Temperatur abgesenkt (meist im Bereich von 45 bis 65°C, abhängig von der Länge und der Sequenz der eingesetzten Primer), dass sich die beiden Primer an die jeweils homologen Bereiche der Zielsequenz anlagern.

#### 3. Amplifikation („Elongation“):

Im dritten Schritt wird von einer thermostabilen DNA-Polymerase (z.B. der *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus*) die Zielsequenz synthetisiert. Die DNA-Polymerase beginnt dabei jeweils am linken und rechten Primermolekül und füllt die fehlenden Stränge mit freien Nukleotiden auf. Die Ziel-DNA wird in diesem Schritt verdoppelt (Sambrook, 2001).

Der Zyklus aus den oben beschriebenen drei Schritten wird mehrmals wiederholt

(meist 30 Zyklen). Unter idealen Reaktionsbedingungen verdoppelt sich bei jedem Zyklus die Anzahl der gewünschten DNA-Moleküle, da auch diejenigen DNA-Templates als Vorlage dienen können, die in den vorherigen Zyklen synthetisiert wurden. So erfolgt eine exponentielle Amplifizierung der Zielsequenz, und in 40 Zyklen könnten aus einem DNA-Molekül im Idealfall  $2^{40}$  (ungefähr  $10^{12}$ ) Moleküle entstehen. Diese Menge an DNA-Fragmenten kann im Agarosegel sichtbar gemacht, kloniert und sequenziert werden. Unspezifische Primerbindung und die daraus resultierende Vervielfältigung unerwünschter DNA-Stücke sind dadurch erkennbar, dass im Agarosegel mehrere Banden zu sehen sind. Die Auswahl geeigneter Primer sowie Adaptionen (Veränderung der Annealing- und Elongation-Temperatur, Erhöhung der Magnesiumkonzentration, Variation der Zyklenanzahl) für eine Amplifizierung der gewünschten DNA-Segmente werden im Ergebnisteil (4.2.2) detailliert beschrieben. Hier soll lediglich der Standard-Ansatz aufgeführt werden, der als Ausgangspunkt für später durchgeführte Modifikationen diene:

- 2,5 µl PCR-Puffer (10 x konzentriert, Invitrogen)
- 0,75 µl MgCl<sub>2</sub> (50 mM, Invitrogen, Karlsruhe)
- 1 µl dNTP-Mix (5 mM, Invitrogen, Karlsruhe)
- 0,25 µl Forward Primer (100 µM, MWG BIOTECH, Ebersberg)
- 0,25 µl Reverse Primer (100 µM, MWG BIOTECH)
- 18 µl a.dest
- 1 µl DNA Template (unbekannter Konzentration)
- 0,25 µl *Taq*-DNA-Polymerase (1 U µl<sup>-1</sup>, Invitrogen)

Alle PCR-Ansätze wurden in programmierbaren Thermocyclern inkubiert (wahlweise Personal Cycler oder TRIO Thermoblock™, Biometra biometrische Analytik GmbH, Göttingen). Zur Durchführung der PCR wurden Bodenproben verwendet, die nicht aus der Versuchsreihe der Gasmessungen stammten, sondern zu einem früheren Zeitpunkt am gleichen Standort („Höglwald“) entnommen wurden. Dazu wurde Boden von einer Kahlschlagsfläche (K) und von einer bewaldeten Fläche (W) abgetragen. Das Bodenmaterial wurde getrennt nach organischer Auflage (O) und Mineralbodenhorizont (A) nach beschriebenen Verfahren verarbeitet (3.3.1). Des Weiteren war die Qualität der extrahierten Nukleinsäure-Proben bestätigt (3.3.3). Eine eventuelle negative Beeinflussung der PCR-Reaktionen (verursacht durch

Inhibitoren in den Proben) war somit ausgeschlossen und sie konnten zur Überprüfung und Modifizierung der PCR-Reaktionsbedingungen verwendet werden.

### **3.3.10 Quantitative Real-Time-PCR**

Die quantitative Real-Time-PCR (kurz qRT-PCR) beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR und ist somit eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren. Zusätzlich ermöglicht sie mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen die Quantifizierung der gewonnenen DNA. Durch Einlagerung eines (interkalierenden) Fluoreszenzfarbstoffes in doppelsträngige DNA wird das Fluoreszenzsignal verstärkt und somit erst detektierbar. Die Messung dieses Signals erfolgt während eines PCR-Zyklus. Insgesamt werden normalerweise 40 Zyklen durchgeführt (3.3.9)

Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der eingesetzten DNA zu, und wird am Ende jedes Zyklus nach der Elongationsphase gemessen. Zwischen spezifischen und unspezifischen PCR-Produkten kann bei dieser Methode nicht unterschieden werden. Daher muss nach dem PCR-Lauf eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden. Hierbei wird die Temperatur langsam erhöht (von 60°C auf 95°C), so dass bei der für das DNA-Fragment spezifischen Schmelztemperatur die doppelsträngige DNA in zwei Einzelstränge denaturiert wird. Dabei wird der interkalierende Farbstoff wieder freigesetzt, und eine Abnahme der Fluoreszenz ist die Folge. Unspezifische PCR-Produkte (z.B. Primerdimere) differieren von der Ziel-DNA bezüglich ihres Schmelzpunkts, und können so unterschieden werden (Sambrook, 1989).

Um die RT qPCR auswerten zu können, ist die Festsetzung eines sogenannten Schwellenwerts („Threshold“) notwendig. Dieser Wert definiert denjenigen Zyklus, bei dem die gemessene Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Er sollte sich in der exponentiellen Phase der DNA-Amplifikation befinden (d.h. bei einer logarithmischen Darstellung in der linearen Phase), nur dann ist die Menge der gebildeten PCR-Produkte quantifizierbar (Sambrook, 1989).

Mit Hilfe eines mitgeführten Standards (3.3.11) mit bekannter DNA-Konzentration kann für jeden PCR-Lauf eine Standardkurve erstellt werden. Dies ermöglicht eine relative Quantifizierung der Proben, deren Ausgangsmenge an DNA unbekannt ist.

Um eventuelle Kontaminationen mit Fremd-DNA auszuschließen, wird in jedem Lauf eine Negativkontrolle ohne DNA („Non-template-control“, kurz NTC) mitgeführt. Um falsch positive Amplifikationen auszuschließen, verwendet man eine Negativkontrolle ohne Primer („Non-amplification-control“, kurz NAC).

Alle qRT-PCRs wurden mit QuantiFast™SYBR® Green oder QuantiTect™SYBR® Green (QIAGEN GmbH, Hilden) an einem RT-PCR- Analysegerät durchgeführt (GeneAmp 5700, Sequence Detection System, Applied Biosystems, Weiterstadt). Diese einsatzbereite Reaktionsmischung (sogenannter „Master Mix“) enthält unter anderem den interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I und das Enzym HotStarTaq *Plus* DNA Polymerase. Die Standardbedingungen werden im Folgenden beschrieben, eventuelle Modifikationen sowie die Beschreibung der spezifischen Primer sowie der damit erzielten Ergebnisse erfolgt im Ergebnisteil (4.2.2).

12,5 µl SYBR® Green-Master Mix (QIAGEN)

5 µl DNA-Template (unbekannter Konzentration)

7,5 µl Primer-Verdünnung (jeweils Forward und Revers- Primer in Gesamtverdünnung 1:50, Endkonzentration 0,3 bzw. 0,6 µM, MWG BIOTECH)

Die Datenauswertung der qRT-PCR beinhaltete eine manuelle Nachkorrektur einzelner Werte. Von jeder Probe wurden bei einem qRT-PCR-Ansatz drei Replikate gemessen. Stark nach oben oder unten abweichende Werte, die auf eine unpräzise Arbeitsmethode zurückzuführen waren, wurden nicht zur Berechnung verwendet. Von jeder Probe konnten somit mindestens zwei maximal drei Werte zur Erstellung eines Mittelwerts herangezogen werden. Um alle Werte direkt vergleichen zu können, wurde die Ergebnisse der qRT-PCR entsprechend der eingesetzten Verdünnung umgerechnet. Die Division dieser Werte durch die Menge an Gesamt-DNA in der Probe bzw. der abgewogenen eingesetzten Menge an Bodenmaterial ermöglichte im Anschluss einen direkten Vergleich. Die Auswertung und graphische Darstellung erfolgte mit dem Programm SigmaPlot.

### **3.3.11 Herstellung eines internen Standards für die qRT-PCR**

Gereinigte Plasmid-DNA, die nach beschriebener Methode hergestellt wurde (3.3.6), diente verdünnt als interner Standard für die qRT-PCR. Zu diesem Zweck wurde

zunächst die genaue Konzentration ( $=K$  in  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) ermittelt (3.3.3). Mit Hilfe des mittleren Basengewichts ( $B = 308,95 \text{ g mol}^{-1}$ ) und der Anzahl der Basen von Vektor und Insert ( $N$ ) konnte über die Molmasse die Anzahl der Plasmide ( $=A$ , pro ml) bestimmt werden:

$$A = \frac{N_A \cdot K}{N \cdot B}$$

mit

$N_A = 6,023 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$  (Avogadro-Konstante)

Die Anzahl der Plasmide wurde dann auf  $10^8$  pro  $5 \mu\text{l}$  eingestellt und über eine Verdünnungsreihe für alle Ansätze (1:10 Verdünnungen) bis  $10^2$  Plasmide pro  $5 \mu\text{l}$  hergestellt.

In analoger Weise konnten so für alle Ansätze die Standards mit üblicherweise  $10^2$  bis  $10^8$  Kopien in  $5 \mu\text{l}$  Verdünnungsreihen hergestellt werden.

### **3.3.12 Statistische Auswertung der qRT-PCR- Ergebnisse: t-Test für zwei unabhängige Stichproben**

Mit diesem Signifikanztest lässt sich prüfen, ob die Grundgesamtheiten beider Stichproben gleiche arithmetische Mittelwerte aufweisen. Durch den Vergleich der Mittelwerte zweier unabhängiger Stichproben werden folgende Hypothesen getestet:  $H_0$  (Nullhypothese):  $\mu_1 = \mu_2$  und  $H_A$  (Alternativhypothese):  $\mu_1 \neq \mu_2$ . Die Annahme der Nullhypothese lässt dann den Schluss zu, dass die zwei Stichproben aus der gleichen Grundgesamtheit stammen. Voraussetzungen für die Durchführung eines t-Tests sind ein metrisches Skalenniveau, normalverteilte Grundgesamtheiten und homogene Varianzen. Die Anzahl beider Stichproben sollte in etwa gleich sein. Die Voraussetzungen der Normalverteilung der Grundgesamtheiten sowie die Homogenität der Varianzen wurden für die Ergebnisse der qRT-PCR mittels Kolmogorow-Smirnow-Test bestätigt. Die Resultate der unterschiedlichen Zeitpunkte konnten daraufhin durch den t-Test auf ihre Signifikanz untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde das Computerprogramm SPSS 8.0 verwendet (SPSS Inc., Chicago, USA).

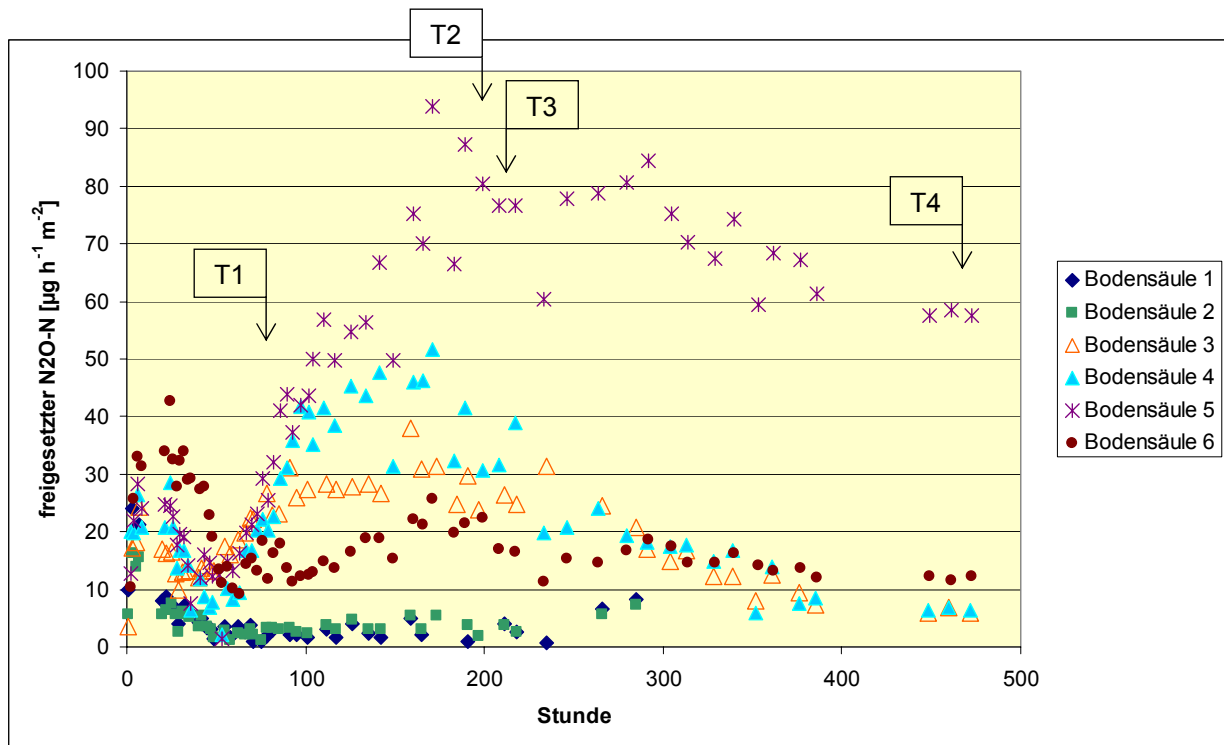
## 4 Ergebnisse

In dieser Arbeit sollte zum einen die vorher entwickelte Methodik der simultanen DNA- und RNA-Extraktion aus Bodenmaterial bezüglich der Präzision untersucht werden. Ein anderer Schwerpunkt lag in der anschließenden Untersuchung verschiedener Gene, die bei Bakterien und Archeen nachzuweisen sind, welche an der Stickstoffumsetzung im Boden beteiligt sind. Dies setzte eine Optimierung der Reaktionsbedingungen der Polymerasekettenreaktionsansätze voraus, wie z.B. die Überprüfung der Primerspezifität und eine angepasste Temperaturwahl. Basierend auf diesen Entwicklungen sollte die mikrobielle Aktivität im Boden während eines Frost-Tau-Zyklus quantifiziert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Frost-Auftau-Versuchsreihen mit Bodensäulen aus dem „Höglwald“ durchgeführt. Der quantitative Nachweis funktioneller Gene und dessen Korrelation mit der N<sub>2</sub>O-Emission aus den Bodenproben stellte das angestrebte Endziel der Analysen dar.

### 4.1 N<sub>2</sub>O-Emissionen aus „Höglwald“-Boden

Insgesamt 12 Bodensäulen aus dem „Höglwald“ wurden in zwei getrennten Messreihen beprobt; die unterschiedliche Vorbehandlung der Bodensäulen ist in Kapitel 3.2.1 beschrieben. Den Bodensäulen der ersten Messreihe wurde kein Wasser zugesetzt, weder vor noch nach dem Einfrieren. Die gemessenen N<sub>2</sub>O-Emissionen waren während der gesamten Messung auf einem sehr niedrigen Niveau (kleiner als 50 µg N<sub>2</sub>O-N h<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup>). Der erwartete „Peak“ nach dem Frostereignis, bzw. nach dem Auftauen, war nicht erkennbar. Die Messperiode, in der tägliche Gasmessungen stattgefunden haben, erstreckte sich über elf Tage. Die Bodensäulen und die während der Versuchsreihe entnommenen Bodenproben wurden in gefrorenem Zustand gelagert und nicht weiter molekularbiologisch untersucht. Aus diesem Grund werden an dieser Stelle vor allem die Ergebnisse der N<sub>2</sub>O-Messungen der zweiten Versuchsreihe dargestellt und erläutert.

Den sechs Bodensäulen der zweiten Messkampagne wurde vor dem Einfrieren je 300 ml Wasserlösung zugesetzt (3.2.1). Nach dem Auftauen wurden insgesamt höhere N<sub>2</sub>O-Emissionen gemessen als bei der ersten Versuchsreihe. Jedoch waren die Gasemissionen der einzelnen Bodensäulen sehr heterogen, wie Abbildung 4-1 veranschaulicht.



**Abbildung 4-1: N<sub>2</sub>O-Emission [µg N m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup>] aus Bodensäulen während und nach dem Auftauen. Dargestellt sind die Werte der einzelnen Bodensäulen aus der zweiten Versuchsreihe. Die Berechnung erfolgte nach der im Text beschriebenen Formel. Die Zeitpunkte der Bodenprobenentnahmen (T1 bis T4) sind eingezeichnet.**

In der Abbildung (4-1) sind die einzelnen Gasflüsse der jeweiligen Bodensäulen dargestellt. Bodensäule eins und zwei weisen eindeutig die niedrigsten N<sub>2</sub>O-Emissionen auf. Da anzunehmen war, dass die Emissionen auf einem sehr niedrigen Niveau bleiben würden, wurden beide Bodensäulen 285 Stunden nach dem Auftauen wieder eingefroren und bei -20°C gelagert. Zu diesem Zeitpunkt war bei Bodensäule drei, vier und sechs die maximale N<sub>2</sub>O-Freisetzung ebenfalls überschritten. Die höchsten N<sub>2</sub>O-Emissionsraten wurden bei den Säulen drei und vier zwischen 150 und 220 Stunden nach dem Auftauen beobachtet. Bei Säule sechs dagegen war die höchste N<sub>2</sub>O-Emission relativ zeitnah an der Auftauphase (20 bis 40 Stunden nach dem Auftauen) messbar. Die Säule mit der insgesamt höchsten N<sub>2</sub>O-Emission war Säule fünf. Nach einem kleineren Anstieg der Emission direkt nach dem Auftauen (25 bis 35 Stunden nach dem Auftauen) konnte eine relativ konstant hohe N<sub>2</sub>O-Freisetzung während der gesamten Versuchsreihe gemessen werden.

Die Berechnung der jeweiligen Emissionsrate der Bodensäule wurde in drei Teilschritten durchgeführt.

Zunächst wurde die Konzentration der einzelnen Gasproben ermittelt. Anhand der manuell nachintegrierten Peakflächen der Gasproben und der Peakflächen des



Prüfgases lässt sich zu jedem Zeitpunkt die  $N_2O$ -Konzentration berechnen.

$$c[N_2O_{\text{Probe}}] = \frac{PA_{\text{Probe}} \cdot c[N_2O_{\text{Standard}}]}{PA_{\text{Standard}}}$$

mit

$c[N_2O_{\text{Probe}}]$ :  $N_2O$ -Konzentration in der Probe [ppb]

$c[N_2O_{\text{Standard}}]$ :  $N_2O$ -Konzentration im Prüfgas [400 ppb]

$PA_{\text{Standard}}$ : Größe der Peakfläche (peak area) des Prüfgas [ms V]

$PA_{\text{Probe}}$ : Größe der Peakfläche der Probe [ms V]

In jeder Stunde wurden pro Bodensäule mindestens drei Gasproben entnommen. Somit konnte mittels einer linearen Regression die Steigung  $b$  [ppb  $\text{min}^{-1}$ ] der Zunahme der  $N_2O$ -Konzentration im Gasraum über dem Boden errechnet werden. Regressionen, deren Bestimmtheitsmaß ( $r^2$ ) kleiner als 0,7 waren, wurden zur Gasflussberechnung nicht verwendet. Die Qualität des linearen Zusammenhangs war in diesen Fällen nicht sicher gewährleistet.

Zur Berechnung der Emissionsraten war im Voraus eine Korrektur des Molvolumens erforderlich. Die Gasproben der Bodensäulen unterschieden sich sowohl bezüglich der Temperatur als auch des Gasdrucks von den Standardbedingungen. Mit folgender Formel wurde dies berichtigt:

$$MV_{\text{korr}} = 0,02241 \text{ m}^3 \cdot \left( \frac{273,15 + T}{273,15} \right) \cdot \left( \frac{0,1013 \text{ MPa}}{\rho_T} \right)$$

mit

$\rho$ : mittlerer Luftdruck des Zimmers [Pa]

$T$ : Temperatur über der Bodensäule [ $10^\circ\text{C}$ ]

Die so berechneten Werte wurden schlussendlich in die Formel zur Berechnung der Emissionsraten eingesetzt:

$$E = \frac{b \cdot V_B \cdot M(N_2O) \cdot 60 \cdot 10^6}{A_B \cdot MV_{\text{korr}} \cdot 10^9}$$

mit

- E:  $\text{N}_2\text{O}$ -Emissionsrate [ $\mu\text{g N m}^{-2} \text{h}^{-1}$ ]  
b: Konzentrationsanstieg in der Messkammer [ $\text{ppb min}^{-1}$ ]  
 $V_B$ : Volumen des Gasraums über dem Boden [ $\text{m}^3$ ]  
M ( $\text{N}_2\text{O}$ ): Molekulargewicht  $\text{N}_2\text{O}$ -N [ $28 \text{ g mol}^{-1}$ ]  
 $A_B$ : Grundfläche der Bodensäule [ $\text{m}^2$ ]  
 $MV_{\text{korr}}$ : Temperatur- und druckkorrigiertes Molvolumen [ $\text{m}^3 \text{mol}^{-1}$ ]

## 4.2 Bodenproben und Verarbeitung

Entsprechend der oben beschriebenen  $\text{N}_2\text{O}$ -Emissionsraten bzw. deren Kurvenverlauf, wurden im Rahmen der Untersuchung zu verschiedenen Zeitpunkten Bodenproben entnommen (3.2.1). Die Anzahl der jeweiligen Bodenproben pro Bodensäule sowie der Zeitpunkt (in Stunden nach dem Auftauen) sind im Folgenden verzeichnet:

Zeitpunkt 0 (T0): je eine Probe von jeder Säule (eins bis sechs) direkt nach dem Auftauen

Zeitpunkt 1 (T1): je zwei Proben von Säule zwei, drei, fünf und sechs, 88 Stunden nach dem Auftauen

Zeitpunkt 2 (T2): je zwei Proben von Säule eins bis drei, 199 Stunden nach dem Auftauen

Zeitpunkt 3 (T3): je zwei Proben der Säulen vier bis sechs, 211 Stunden nach dem Auftauen

Zeitpunkt 4 (T4): je zwei Proben der Säulen drei bis sechs, 474 Stunden nach dem Auftauen

Wie bereits in Kapitel 3.2.1 beschrieben wurden die Bodenproben nach der Entnahme tief gefroren, wobei die organische Auflage vom Mineralboden getrennt aufbewahrt wurde. Aus Zeitgründen konnten im Rahmen dieser Arbeit lediglich die Bodenproben der organischen Auflage weiterverarbeitet werden (3.3.1 und 3.3.2).

### 4.2.1 Konzentration und Reinheit der DNA und RNA-Proben nach der Extraktion

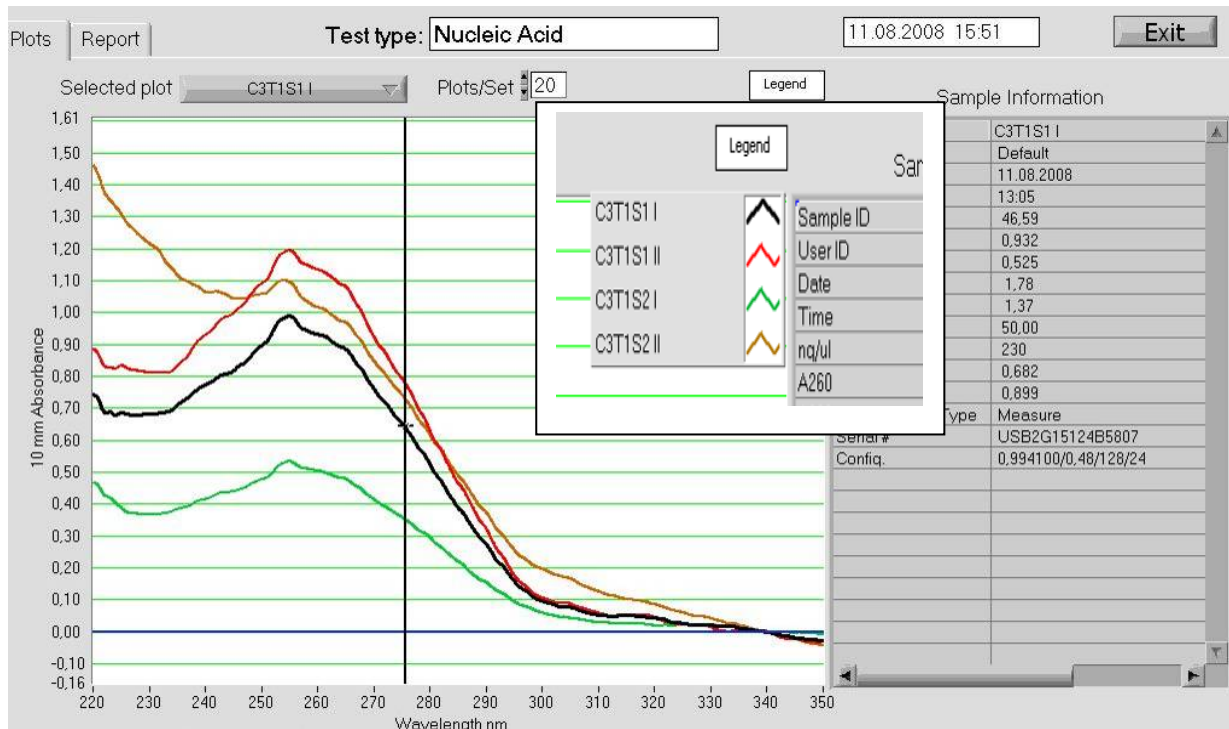
Die Nukleinsäuren wurden nach der in Kapitel 3.3.1 beschriebenen Methode extrahiert. Von jeder Bodenprobe wurde zwei Extraktionen durchgeführt, um eine eventuelle Heterogenität innerhalb der Probe zu erfassen. Anschließend erfolgte eine Reinigung und Auftrennung der Nukleinsäuren in DNA und RNA, wie in Kapitel 3.3.2

erklärt. Zur Kontrolle des Reinheitsgrades der extrahierten und separierten DNA bzw. RNA-Proben, wurde photometrisch der Nukleinsäuregehalt der Probenlösungen bestimmt. Über die Berechnung der Quotienten aus den Extinktionen bei 260 nm und 280 nm, bzw. 260 nm und 230 nm ließ sich eine Aussage über den Reinheitsgrad der Nukleinsäure-Lösungen treffen (3.3.3).

Die Abbildungen 4-2 und 4-3 zeigen die Ergebnisse der photometrischen Messung von vier DNA-Probenlösungen der Bodensäule drei. Graphik 4-2 kann entnommen werden, dass drei Proben (C3T1S1I, C3T1S1II und C3T1S2I, siehe Legende 4-2) ihre höchsten Absorptionen bei ungefähr 260 nm Wellenlänge aufweisen. Ein solcher Kurvenverlauf ist typisch für Nukleinsäuren, und die Höhe des dargestellten Peaks korreliert mit der Konzentration der DNA in der Probenlösung. Die vierte Probe (C3T1S2II), in Abbildung 4-2 als braune Kurve dargestellt, zeigt keinen charakteristischen Verlauf. Der Anstieg der Kurve im linken Bereich der Darstellung (Wellenbereich 220 nm bis 250 nm) deutet auf möglichen Verunreinigungen der Nukleinsäurelösung durch Proteine oder Fettsäuren hin. Der Quotient aus den Extinktionen bei 260 nm und 280 nm sowie vor allem der Quotient der Extinktionen bei 260 nm und 230 nm bestätigt die Vermutung (siehe Abbildung 4-3) Idealerweise sollten die Werte jeweils zwischen 1,8 und 2,0 bzw. 2,2 liegen.

Für die Durchführbarkeit einer PCR und vor allem für die präzise Quantifizierung von Genen in einer Probe (mittels qRT-PCR) sollte man nur Nukleinsäurelösungen mit möglichst hohem Reinheitsgrad verwenden. Demzufolge müsste eine Probelösung mit derart auffälligen Analysewerten bei der photometrischen Messung (C3T1S2II) ein zweites Mal gereinigt werden (3.3.2). Andernfalls wäre eine Amplifizierung der DNA mit Hilfe eines PCR-Systems möglicherweise negativ beeinflusst und das Ergebnis einer quantitativen Bestimmung (mittels qRT-PCR) nicht verlässlich.

Aus Zeitgründen war es im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, solche DNA-Proben mit fragwürdiger Verunreinigung erneut zu bearbeiten.



**Abbildung 4-2: Absorptionsspektren von Nukleinsäureextrakten aus der organischen Auflage. Graphische Darstellung der UV-Absorption der isolierten und gereinigten DNA der beiden Bodenproben (S1 und S2) von Bodensäule drei (C3) zum Zeitpunkt T1.**

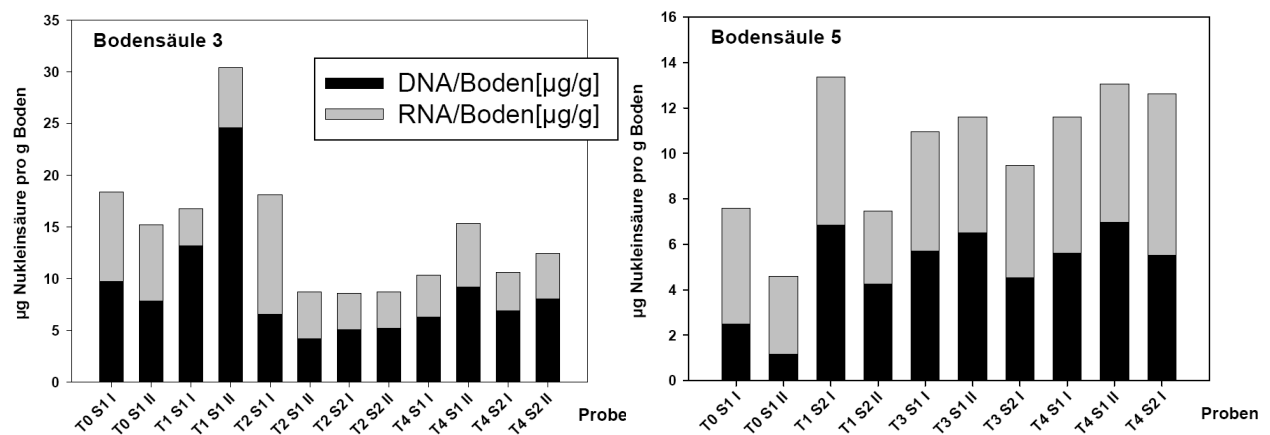
Sample ID	User ID	Date	Time	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230	Constant	Cursor Pos.	Cursor abs.	340 raw
C3T1S1 I	Default	11.08.2008	13:05	46,59	0,932	0,525	1,78	1,37	50,00	230	0,682	0,899
C3T1S1 II	Default	11.08.2008	13:06	56,70	1,134	0,632	1,79	1,40	50,00	260	1,134	0,923
C3T1S2 I	Default	11.08.2008	13:07	25,22	0,504	0,295	1,71	1,38	50,00	260	0,504	0,151
C3T1S2 II	Default	11.08.2008	13:08	50,78	1,016	0,616	1,64	0,83	50,00	260	1,016	0,597

**Abbildung 4-3: Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration aus Extrakten der organischen Auflage. Die gemessene Konzentration sowie die berechneten Quotienten der einzelnen Bodenproben (S1 und S2) der Säule drei zum Zeitpunkt T1 sind dargestellt.**

Die photometrisch gemessenen Konzentrationen an DNA lagen zwischen 3,1 ng und 56,70 ng pro  $\mu\text{l}$  Probenlösung. Der Mittelwert wurde mit  $17,1 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$  bei einer Standardabweichung von 63% berechnet. Die Werte der RNA-Konzentrationen wurden mit 4,67 ng und 36,45 ng pro  $\mu\text{l}$  gemessen. Die ermittelte durchschnittliche RNA-Konzentration von  $16,4 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$  (Standardabweichung: 53%) liegt damit in der gleichen Größenordnung wie die DNA-Konzentration. Proben mit auffälligem Kurvenverlauf wurden in die Berechnung (DNA und RNA) nicht miteinbezogen. Da bei der Aufarbeitung der Proben die Sedimente der Nukleinsäure mit unterschiedlichen Volumina resuspendiert wurden, können die gemessenen

Konzentrationen der einzelnen Proben nicht direkt miteinander verglichen werden (3.3.2).

Die Berechnung der jeweiligen DNA- bzw. RNA-Gehalte in Bezug zur eingesetzten Menge an Boden ermöglicht einen direkten Vergleich. Für die DNA konnte ein Mittelwert von 4,9  $\mu\text{g}$  pro g Boden bei einer Standardabweichung von 80% errechnet werden (Streuung der Einzelwerte von 0,25 bis 24,67  $\mu\text{g g}^{-1}$ ). Der Durchschnitt der RNA-Gehalte berechnet sich mit 4,77  $\mu\text{g}$  pro g eingesetztem Bodenmaterial, bei einer Standardabweichung von 55% (Streuung der Einzelwerte von 1,37 bis 14,57  $\mu\text{g g}^{-1}$ ). Bei der Berechnung wurde das jeweils verwendete Volumen zur Resuspension berücksichtigt. Die Unterschiede der DNA- bzw. RNA-Extraktionen sind am Beispiel der organischen Auflage der Bodensäulen drei und fünf dargestellt (Abbildung 4-4).



**Abbildung 4-4:** Menge der extrahierten DNA und RNA pro eingesetzter Menge der organischen Auflage. Die linke Graphik zeigt die Nukleinsäuregehalte der Bodensäule drei, die rechte Graphik die Werte der Bodensäule fünf. T steht für Zeitpunkt, S für Bodenprobe, I oder II bezeichnet die beiden Extraktionen einer Bodenprobe.

Die Variabilität der Nukleinsäureextraktionen aus der organischen Auflage ist relativ hoch, es gibt Extremwerte wie z.B. Probe S1 II des Zeitpunkts T1 der Säule drei. Dies erklärt die sehr hohe Standardabweichung des Mittels aller durchgeführten Extraktionen (Abbildung 4-4).

Bis auf wenige Ausnahmen war der Reinheitsgrad zufriedenstellend, eventuelle Verunreinigungen der Proben (z.B. durch Humin- oder Fulvinsäuren) konnten somit ausgeschlossen werden. Die Voraussetzungen für weitergehende Tests, wie z.B. die PCR, waren demzufolge gegeben.

#### 4.2.2 PCR: Test der Primerspezifität und Optimierung der PCR-Bedingungen

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist gut dazu geeignet in kleinen Reaktionsansätzen zu überprüfen, ob Oligonukleotide (Primer) spezifisch die Ziel-DNA amplifizieren. Ebenso sollte vor der Durchführung weiterführender Tests wie z.B. die quantitative RT-PCR eine Optimierung der Reaktionsbedingungen mittels herkömmlicher PCR überprüft werden. Besonders hervorzuheben sei hierbei das Design der Primer (8.2), welche ausschließlich nur mit der Ziel-DNA reagieren sollten. Die verwendeten Primer der durchgeführten PCRs wurden der Fachliteratur entnommen, ihre Spezifität war deshalb schon getestet (*in silico* gegen Sequenzdatenbank und *in vivo* auf biologisches Material). Die Primer können jedoch auf jede Probe anders reagieren, zudem werden die Gendatenbanken täglich aktualisiert. Deshalb ist es unumgänglich, die Spezifität der Primer auf das verwendete Probenmaterial zu überprüfen.

Neben der Überprüfung der Primer können mittels der herkömmlichen PCR die Reaktionsbedingungen für eine erfolgreiche Amplifizierung der Ziel-DNA erprobt und modifiziert werden. Zum Beispiel ist die Wahl der „Annealing“-Temperatur ( $T_a$ ) abhängig von den eingesetzten Primern. Deren sogenannte Melting Temperatur ( $T_m$ ), d.h. die Temperatur, bei der nur die Hälfte des Primers binden kann, sollte nicht überschritten werden. Die  $T_a$  ist erstmal so zu wählen, dass sie 3 bis 5°C unter der  $T_m$  der verwendeten Primer liegt. Ist das Ergebnis einer PCR allerdings unspezifisch, d.h. sind mehrere Banden auf dem Agarosegel erkennbar, muss die  $T_a$  der PCR etwas erhöht werden. Im gegenteiligen Fall, d.h. wenn gar keine Bande mittels Agarosegelelektrophorese zu sehen ist, muss die  $T_a$  um einige Grad erniedrigt werden. Eine weitere Anpassung der Reaktionsbedingungen kann die Konzentration des eingesetzten  $Mg^{2+}$  darstellen. Die Standardkonzentration von 1,5 mM kann auf 2 mM in der Endkonzentration erhöht werden, wenn die Effizienz der PCR zu gering ist, d.h. keine oder nur schwache Banden zu sehen sind. Eine geringere  $Mg^{2+}$  Konzentration erhöht zwar die Spezifität der PCR, verringert aber die Menge des gebildeten PCR-Produkts. Die Anzahl der Zyklen kann ebenfalls variiert werden, eine Erhöhung der Zyklenzahl erhöht die Menge der amplifizierten DNA.

Mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese (3.3.4) erfolgt anschließend der Nachweis, ob die gewünschten Ergebnisse erzielt wurden. Eine spezifische Amplifizierung der Ziel-DNA durch die PCR wird dadurch bestätigt, dass im Agarosegel nur eine Bande

(in der gewünschten Größe) sichtbar ist. Unspezifische Primerbindung und die daraus resultierende Vervielfältigung unerwünschter DNA-Stücke sind dadurch erkennbar, dass im Agarosegel mehrere Banden zu sehen sind. Um endgültig sicher zu stellen, dass das gebildete PCR-Produkt der gewünschten Ziel-DNA entspricht, ist eine Sequenzierung notwendig.

Im Folgenden werden anhand der durchgeführten PCRs verschiedene Modifikationen des PCR-Standard-Reaktionsansatzes aufgeführt. Alle DNA-Sequenzen der genannten Primer sind im Anhang (8.2) aufgeführt.

Die hier getesteten Primern basieren i.d.R. auf den 16S rRNA Genen, die bei allen Prokaryoten vorkommen. Das rRNA-Gen enthält sowohl spezies-spezifische (hoch konservierte) Bereiche wie auch variable Bereiche. Die konservativen Bereiche erlauben ein Design von Primern, die generell alle 16S Gene von Eubakterien amplifizieren können (z.B. Eubak For und Rev). Die variablen Bereiche ermöglichen eine Definierung von spezifischen Primern bis zur Gattungs-Ebene. Die Quantifizierung der allgemeinen bakteriellen Genkopien einer Probe reflektiert ihre bakterielle Biomasse. Da jedoch nicht alle Prokaryoten an der Stickstoffumsetzung im Boden beteiligt sind, ist es interessant, spezielle Gruppen (mittels spezifischen 16S Primern) sowie funktionelle Gene (wie z.B. *AmoA*, *NirK* oder *NosZ*) zu quantifizieren. Der Anteil dieser phylogenetischen Gruppen bzw. den funktionellen Genen an den allgemeinen bakteriellen 16S Genkopien reflektiert ihre Bedeutung in der bakteriellen Gemeinschaft während der Umsetzung von Stickstoff im Boden.

#### 4.2.2.1 Autotrophe Ammonium-Oxidierer

Die Gruppe der Ammonium-Oxidierer umfasst verschiedene Klassen von Bakterien (z.B. die Klassen  $\beta$ - und  $\gamma$ -Proteobacteria), sowie einige Archeen (z.B. in der Abteilung Crenarchaeota). Im ersten Teilschritt der Nitrifikation oxidieren diese Mikroorganismen Ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) zu Nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) (Richards, 1987). Die Primer CTO189fA/B, CTO189fC und RT1r (8.2) wurden definiert, um Ammonium-Oxidierer der Klasse  $\beta$ -Proteobacteria zu erkennen (Kowalchuck et al, 1997, Hermannsson und Lindgren, 2000). Ein Vergleich dieser Primern mit einer Gendatenbank (RDP) zeigt, dass sie spezifisch für die Gattungen *Nitrosomonas* und *Nitrospira* sind (8.3.4). Die Zyklenanzahl in der PCR betrug 35 und die  $T_a$  eines Zyklus war auf  $53^\circ\text{C}$  eingestellt. Die übrigen Analysebedingungen entsprachen dem Standard-Ansatz (3.3.10). Die Länge der vervielfältigten DNA-Sequenz sollte mit diesem Ansatz 116 bp (=Basenpaar). betragen. Als Kontrolle diente die Größenabschätzung mittels

Agarosegelelektrophorese (s. Abbildung 4-5A). Es war erkennbar, dass das Hauptprodukt der PCR mit oben genannten Primern die Vervielfältigung von DNA mit gewünschter Größe war (ca. 116 bp). Die unspezifische Amplifikation von kleineren DNA-Stücken (=Primerdimer), sichtbar als schwache Banden unterhalb der 100 bp Markierung können aufgrund der geringen Menge für die Klonierung vernachlässigt werden. Sie könnten aber ein Problem für die quantitative Bestimmung mittels RT-PCR darstellen, was dann überprüft werden sollte (3.3.10). Zur Klonierung wurden die Proben KO (=organische Auflage der Kahlschlagsfläche) und WO (=organische Auflage der bewaldeten Fläche) verwendet (3.3.9).

#### 4.2.2.2 Gattung *Nitrobacter*

Die Gattung *Nitrobacter* zählt zur Klasse der  $\alpha$ -Proteobacteria und können als autotrophe Nitrit-Oxidierer  $\text{NO}_2^-$  zu Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) umwandeln (Richards, 1987). Für den Nachweis mittels PCR wurden die Primer FGPS872 und FGPS1269' eingesetzt (Degrange und Bardin, 1995). Die *in silico* Analyse zeigt, dass der erstgenannte Primer nicht besonders spezifisch ist. Der zweite Primer hingegen bindet hoch spezifisch an bakterielle 16S Gensequenzen der Gattung *Nitrobacter*, und erfasst dabei 70% aller zugehörigen Arten. Die gewählte „Annealing“-Temperatur ( $T_a$ ) eines PCR-Zyklus betrug  $45^\circ\text{C}$ , insgesamt wurde der Ansatz mit 35 Zyklen durchgeführt. Die Endkonzentration des eingesetzten  $\text{Mg}^{2+}$  betrug 2 mM. Abgesehen von diesen Modifikationen wurde die Messung gemäß dem Standardprotokoll durchgeführt (3.3.10). Durch die PCR sollte ein Stück genomischer DNA amplifiziert werden, das die Länge von 397 bp besitzt

Die PCR-Produkte wurden zur Überprüfung der Größe gelelektrophoretisch aufgetrennt (s. Abbildung 4-5A). Die PCR-Produkte KO und WO wurden weiterverarbeitet, d.h. kloniert.

#### 4.2.2.3 Acidobakterien

Unter den Bakterien bilden Acidobakterien einen eigenen Stamm und sind in terrestrischen- wie auch marinen Ökosystemen weit verbreitet. Bei der Umsetzung von Stickstoff im Boden spielen sie bei der Denitrifikation eine wichtige Rolle (Richards, 1987). Zur spezifischen Erfassung des Phylums Acidobacteria wurden die Primer Acid31 und Eub518 verwendet (Fierer et al., 2005). Eub518 ist ein genereller bakterieller Revers-Primer, wohingegen Acid31 hoch spezifisch für das Phylum Acidobacteria reagiert, jedoch nur ungefähr 20% davon erkennt. Der Unterschied



zum Standard-Protokoll lag in der  $T_a$  von 49°C und der Zyklenanzahl von insgesamt 35. Die Gelelektrophorese bestätigte die erwartete Größe der Ziel-DNA von 500 bp (s. Abbildung 4-5B). Zur Klonierung wurde Probe WO weiterverwendet.

#### 4.2.2.4 Actinobakterien

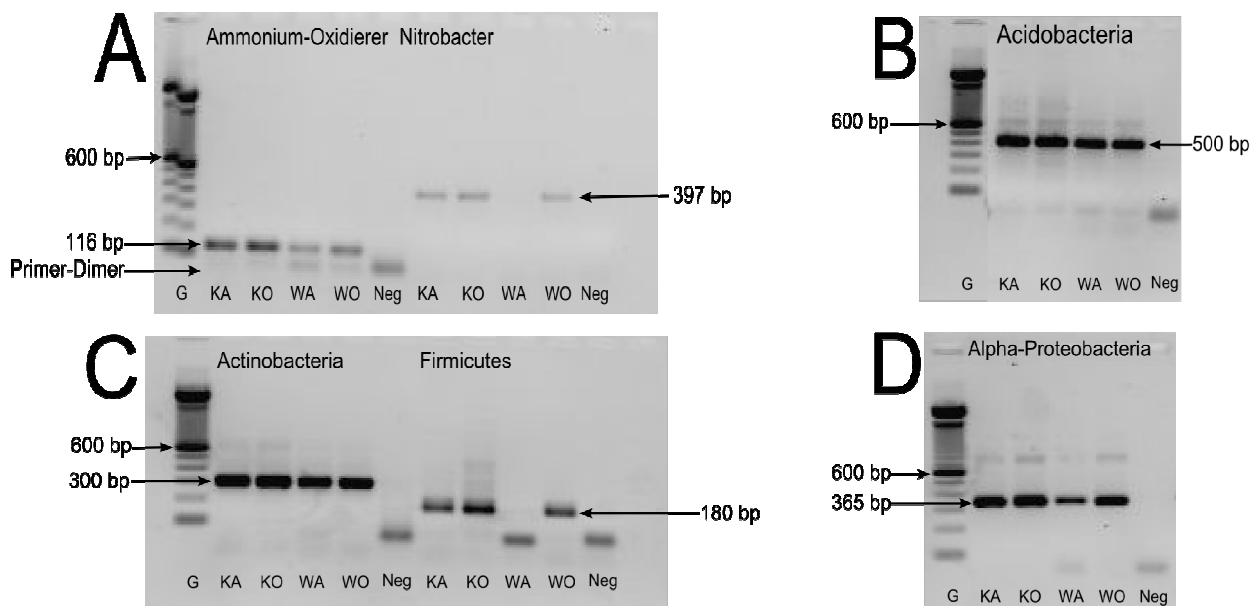
Bakterien der Gattung *Streptomyces* gehören zur Familie der Aktinomyzeten und damit zum artenreichen Stamm der Actinobacteria. Im gesamten Stickstoffkreislauf innerhalb eines Ökosystems spielen verschiedene Familien der Actinobacteria eine bedeutende Rolle. Die Gattung *Streptomyces* beispielsweise lebt hauptsächlich in Böden und kann unter anaeroben Bedingungen Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) als Elektronenakzeptor verwenden, wobei  $\text{N}_2\text{O}$  freigesetzt wird (Richards, 1987). Zur Identifizierung von DNA-Sequenzen des Stamms Actinobacteria wurde für die PCR das Primerpaar Actino235 und Eub518 benutzt (Fierer et al., 2005). Die *in silico* Analyse über eine 16S Gendatenbank (RDP) zeigte, dass der spezifische Primer Actino235 56% der Actinobakterien sowie 13% des kleinen Phylums Verrucomicrobia erfasst. Die gewählte  $T_a$  in der PCR betrug 55°C, die Zyklenzahl wurde auf 30 angepasst. Die Zielgröße des DNA-Fragments von 300 bp wurde durch die Agarosegelelektrophorese bestätigt (s. Abbildung 4-5C). Die anschließende Klonierung wurde mit dem PCR-Produkt der Probe WO durchgeführt.

#### 4.2.2.5 Firmicutes

Bakterien des Stamms Firmicutes sind bei der Umsetzung von Stickstoff in Ökosystemen ähnlich bedeutend wie Acido- und Actinobakterien und maßgeblich bei der Denitrifikation beteiligt. Bekannte Bakteriengattungen wie *Clostridium* und *Streptococcus* zählen zum Stamm der Firmicutes (Richards, 1987). Der Nachweis erfolgte über die in der PCR eingesetzten Primer Lgc353 und Eub518 (Fierer et al., 2005). Erstgenannter bindet spezifisch an Gene von Firmicutes, erfasst dabei allerdings nur 14% der Klassen. Die Ordnung Bacillales wird dagegen zu 68% abgedeckt. Die besten Ergebnisse wurden mit einer Endkonzentration von 2 mM  $\text{Mg}^{2+}$  im Reaktionsansatz sowie einer  $T_a$  von 52°C erzielt. Die Zyklusanzahl der Amplifizierung betrug 35. Die Gelelektrophorese erbrachte den Nachweis, dass das Gen der gewünschten Länge von 180 bp vervielfältigt wurde (s. Abbildung 4-5C). Die Probe WO wurde im Folgenden kloniert und sequenziert.

#### 4.2.2.6 $\alpha$ -Proteobacteria

Autotrophe Nitrit-Oxidierer (z.B. die Gattung *Nitrobacter*) sowie denitrifizierende Bakterien (z.B. die Gattung *Paracoccus*) zählen zur Klasse der  $\alpha$ -Proteobacteria (Richard, 1987). Zum Nachweis über PCR wurde das Primerpaar Eub338 und Alf685 verwendet (Fierer et al., 2005). Eub 338 ist ein genereller Forward-Primer für Eubakterien, Alf685 zeigt dagegen eine Spezifität für  $\alpha$ -Proteobakterien, deren Ordnungen er zu ungefähr 65% abdeckt. Dennoch erkennt er zudem 84% des kleinen Phylums Fusobacteria. Spezifische Ergebnisse wurden mit einer  $T_a$  von 53°C und einer Zyklenanzahl von 30 erreicht. Die Gelelektrophorese bestätigte die erwartete Größe der DNA-Sequenz von 365 bp (s. Abbildung 4-5D). Es waren auch Banden erkennbar, die darauf hinweisen, dass auch andere DNA-Stücke mit einer Größe von mehr als 600 bp amplifiziert wurden. Die Stärke der sichtbaren Banden lies jedoch die Schlussfolgerung zu, dass die Menge an unspezifischer Reaktion vernachlässigt werden konnte. Probe WO konnte somit kloniert werden.



**Abbildung 4-5: Agarosegele zur Überprüfung der Fragmentlängen ausgewählter 16S RNA Gene in verschiedenen Bakteriengruppen. (A) Gruppe der Ammonium-Oxidierer (der Klasse  $\beta$ -Proteobacteria) und Gattung der *Nitrobacter* (Klasse:  $\alpha$ -Proteobacteria), (B) Phylum Acidobacteria, (C) Stamm der Actinobacteria und Stamm der Firmicutes, (D) Klasse  $\alpha$ -Proteobacteria. G: Größenmarker (100 bp DNA-Leiter), Neg: negative Kontrolle (ohne DNA), KA: oberer Mineralbodenhorizont (A) der Kahlschlagsfläche, KO: organische Auflage (O) der Kahlschlagsfläche, WA: oberer Mineralbodenhorizont (A) der bewaldeten Fläche, WO: organische Auflage (O) der bewaldeten Fläche.**

Neben oben beschriebenen PCR-Ansätzen zur Bestimmung von 16S-Typen wurden auch Analysen zum Nachweis funktioneller Gene durchgeführt.

Das Enzym Distickstoffmonoxidreduktase ist im letzten Teilschritt der Denitrifikation verantwortlich für die Reduktion von  $N_2O$  zu  $N_2$  und wird durch das Gen *NosZ* kodiert (2.3). Die für die PCR verwendeten Primer NosZ2F und NosZ2R waren spezifisch getestet zur Bestimmung von *NosZ* (Henry et al., 2006). Die  $T_a$  der durchgeführten PCR betrug  $60^\circ\text{C}$ , die Zyklenanzahl 30. Die Analyse im Agarosegel ergab zwei sichtbare Banden: eine stärkere Bande mit einer Größe von ca. 260 bp und eine schwächere Bande mit ca. 230 bp. Beide Genfragmente wurden kloniert und zur endgültigen Bestätigung der Identität zur Sequenzierung verschickt (4.2.3).

Auch das kodierende Gen der Cytochrom-Nitratreduktase (*NirS*), welche im zweiten Teilschritt der Denitrifikation  $\text{NO}_2^-$  zu  $\text{NO}$  reduziert, wurde mittels PCR untersucht. Laut Literaturangaben sollten die verwendeten Primer NirSF und NirSR eine Sequenz von ca. 430 bp amplifizieren (Kandeler et al., 2006). Die Reaktionsbedingungen der durchgeführten PCR wurden aus Kandeler et al., 2006 entnommen. In den vorliegenden Proben konnte jedoch kein spezifisches Genfragment vervielfältigt werden. Daher wurden in ergänzenden Ansätzen folgende Anpassungen der Reaktionsbedingungen überprüft: (i) das Herabsetzen der  $T_a$ , (ii) eine Erhöhung der  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration auf 2 mM Endkonzentration, (iii) eine Steigerung der Zyklenzahl sowie (iv) die Verwendung von Platinum-*Taq*-Polymerase (Invitrogen) anstelle der herkömmlichen *Taq*-Polymerase. Die Platinum-*Taq*-Polymerase besitzt gegenüber der *Taq*-Polymerase den Vorteil, dass sie erst durch sehr hohe Temperaturen aktiviert wird ( $95^\circ\text{C}$ ). Dadurch werden im PCR-Ansatz unspezifische Reaktionen verhindert.

Zudem wurde auch getestet, ob durch die Zugabe von nicht acetyliertem Rinderserumalbumin („Bovines Serum Albumin“ (BSA)) zu dem Reaktionsansatz eine Effizienzsteigerung bezüglich der Menge an gebildetem PCR-Produkt möglich war. Eine Verbesserung der PCR-Bedingungen wird dadurch bewirkt, dass mögliche Inhibitoren (wie z.B. Humin- oder Fulvinsäuren) an BSA binden und die Ziel-DNA ertragreicher amplifiziert werden kann (Kreider, 1995). Alle durchgeführten Anpassungen zum Nachweis von *NirS* erbrachten jedoch keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Ein möglicher Grund hierfür könnte das Fehlen des *NirS*-Gens in den untersuchten Bodenproben sein. Viel wahrscheinlicher ist jedoch die Annahme, dass

die spezifische Bindung der eingesetzten Primer an die Proben-DNA durch noch in der Probe vorhandene Inhaltsstoffe der organischen Auflage verhindert wurde.

Im Rahmen der Versuche wurden die Bodenproben auch hinsichtlich des Vorhandenseins spezifischer 16S RNA-Gruppen von Archeen, Bacteroidetes, Planctomycetes, Verrucomicrobia, Chlorofexi sowie  $\beta$ -Proteobacteria hin untersucht. Die Sequenzierung der isolierten und klonierten PCR-Produkte zeigte jedoch, dass die ausgewählten Primerpaare nicht spezifisch genug für die jeweiligen Prokaryotengruppen waren. Das Überprüfen möglicher Anpassungen der PCR-Reaktionsbedingungen für diese 16S-Typen oder die Erprobung anderer spezifischer Primer waren im Rahmen dieser Diplomarbeit jedoch nicht möglich. Im Folgenden werden die jeweils verwendeten Primer aufgeführt.

Archeen: Primerpaar Parch519f und Arch915 (Coolen et al., 2004)

Bacteroidetes: Primerpaar Cfb319 und Eub518 (Fierer et al., 2005)

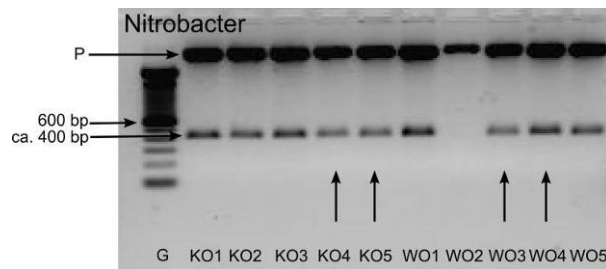
Planctomycetes: Primerpaar Eub338II und Eub518 (Daims et al., 1999, Fierer et al., 2005)

Verrucomicrobia und Chlorofexi: Primerpaar Eub338III und Eub518 (Daims et al., 1999, Fierer et al., 2005)

$\beta$ -Proteobacteria: Primerpaar Bet680 und Eub338 (Daims et al., 1999, Fierer et al., 2005)

### **4.2.3 Klonierungen und Sequenzierungen der PCR-Produkte**

Zur Überprüfung der Spezifität der PCR-Bedingungen und zur Identifizierung der erhaltenen Produkte ist eine Sequenzanalyse unumgänglich. Diese Analyse kann entweder direkt nach der PCR erfolgen oder nach der Klonierung des Genfragments in kompetenten Bakterienzellen und der daraus resultierenden effizienten Vervielfältigung (3.3.5). Nach der Klonierung und Isolierung der erhaltenen Plasmid-DNA, kann das anfangs ligierte DNA-Stück wieder herausgetrennt werden. Gelelektrophoretisch kann überprüft werden, ob die Klonierung erfolgreich war, d.h. das gewünschte Stück DNA in großer Menge reproduziert wurde. Sämtliche Produkte der in Kapitel 4.2.2 beschriebenen und erfolgreich modifizierten PCR-Ansätze wurden auf diese Art und Weise weiterverarbeitet.



**Abbildung 4-6: Gelelektrophoretische Überprüfung der Klonierung eines PCR-Fragments der 16S rRNA aus *Nitrobacter* (EcoRI-Restriktion). P: linearisiertes Plasmid, und Fragment mit ca. 400 bp. Sequenziert wurden die Klone KO4, KO5, WO3 und WO4.**

Die oben dargestellte gelelektrophoretische Kontrolle (Abbildung 4-6) bestätigt eine erfolgreiche Klonierung eines 16S rRNA Fragments aus *Nitrobacter* bei fast allen Klonen. Lediglich Klon WO2 besitzt offensichtlich ein leeres Plasmid, die gewünschte Zielsequenz des Inserts von ca. 400 bp ist im Agarosegel nicht sichtbar.

Bei allen durchgeführten Klonierungen der oben beschriebenen PCR-Ansätze mit zufriedenstellendem Ergebnis (4.2.2) wurden jeweils zwei bis vier Klone zur Sequenzierung verschickt (3.3.8). Waren geringe Größenunterschiede von Banden erkennbar, so wurden diese Klone ausgewählt und sequenziert. Denn nur die genaue Bestimmung der DNA-Sequenz der verschiedenen Genfragmente und der anschließende Vergleich mit bekannten DNA-Sequenzen aus der Genbank erlaubt eine sichere Aussage über die Identität der amplifizierten DNA.

Wie in Kapitel 3.3.8 beschrieben wurde mittels des Programms „BLAST“ der Abgleich gegen Genbanken („Nucleotide collection nr“ von NCBI) durchgeführt sowie deren Signifikanz überprüft. Im Fall oben beschriebener Klone (*Nitrobacter*) wurden z.B. für WO4 die höchsten Sequenzhomologien zu folgenden Genen gefunden:

16S Gensequenz (partiell) aus einem unkultiviertem Klon eines  $\alpha$ -Proteobacterium (aus einer Bodenprobe) ([EF220660.1](#))

16S Gensequenz (partiell) aus einem unkultiviertem Klon eines *Methylocystaceae* Bakteriums (aus einer Bodenprobe) ([EF020321.1](#))

16S Gensequenz (partiell) aus einem unkultiviertem Klon eines Rhizobiales Bakteriums (Probenmaterial: zerfallenes Holz) ([FJ198112.1](#)).

Alle durchgeführten Vergleiche zeigten sehr kleine E-Werte, z.B. für WO4 kleiner als  $2 \times 10^{-179}$ , was eine hohe Spezifität beweist (3.3.8). Die Gattung *Nitrobacter* zählt zur Ordnung Rhizobiales, welche wiederum der Klasse  $\alpha$ -Proteobacteria angehört. Die

Gattung *Methylocystaceae* wird ebenfalls der Ordnung Rhizobiales zugeordnet. Es liegt die Vermutung nahe, dass die verwendeten Primer FGPS872 und FGPS1269' nicht nur spezifisch für die Gattung *Nitrobacter* reagierten, sondern weitergreifend für die Ordnung Rhizobiales.

Mit Hilfe des Programms „CLUSTALW2“ wurden anschließend die sequenzierten Klone (alle hatten die Größe 350 bp) miteinander verglichen (3.3.8). Hierbei zeigte sich, dass die Klone KO4, WO3 und WO4 identisch waren (Sequenzhomologie von 100%). Die Klone KO5 und WO4 zeigten Unterschiede in mehr als 10 Basen und können somit als unterschiedliche Klone angesehen werden (s. Abbildung 4-7). Sie wurden in die Molekularbiologische Datenbank des Instituts aufgenommen und bei -80°C archiviert.

```

WO4      GGGTCGCCCCCTTTGCCTCCCGTTGTCACCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGCCTGT
KO5      GGGTTGCCCCCTTCGCGTCCCGTTGTCACCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGCCTGT
Homologien ***** ** *****

WO4      AAGGGCCATGAGGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGCTTATCACCGGCAGTCCCC
KO5      AAGGGCCATGAGGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGCTTATCACCGGCAGTCCCC
Homologien *****

WO4      CTGGAGTGCCCAACTGAATGATGGCAACTAAGGGCGAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTT
KO5      CTAGAGTGCCCAACTGAATGATGGCAACTAAGGGCGAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTT
Homologien ** *****

WO4      AACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTTCCCGGCTCC
KO5      AACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTTCTCGGGCTCC
Homologien *****

WO4      GAAGAGAAGATCGCATCTCTGCAATCCGTCCAGGACATGTCAAAAGCTGGTAAGGTTCTG
KO5      GAAGAGAGGAAACCATCTCTGGTATCCGTCCAAGACATGTCAAAAGCTGGTAAGGTTCTG
Homologien ***** ** *****

WO4      CGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCG
KO5      CGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCG
Homologien *****

```

**Abbildung 4-7: Sequenzvergleich der Klone WO4 und KO5 (*Nitrobacter*) mit Hilfe von „CLUSTALW2“. Gleiche Sequenzen sind durch \* markiert.**

Zur Untersuchung von funktionellen Genen konnte in dieser Arbeit lediglich *NosZ* erfolgreich amplifiziert (PCR) und kloniert werden. Es wurde die Gensequenz von vier Klonen bestimmt und anschließend mit der Gendatenbank verglichen. Lediglich die zwei längeren Klone (*NosZ2.2* mit 267 bp und *NosZ2.3* mit 266 bp) konnten spezifisch zugeordnet werden, wie z.B. *NosZ2.2*:

Vermeintliches *NosZ*-Gen (partiell) aus einem unkultivierten Bakterienklon (aus Waldboden) ([AY912976.1](#))

NosZ-Gen (partiell) aus einem unkultivierten Klon eines Bodenbakteriums (aus Waldboden) ([AF315447.1](#))

NosZ-Gen (partiell) aus einem nicht identifizierten Bakterium (aus Ackerboden) ([DQ010846.1](#))

Die Signifikanz der Sequenzhomologien konnte durch die berechneten E-Werte belegt werden. Diese waren sehr gering, im Fall von NosZ2.2 kleiner als  $2 \times 10^{-84}$ .

Die zwei kürzeren Klone (NosZ2.1 mit 226 bp und NosZ2.5 mit 220 bp) ergaben keine präzise Zuordnung der gefundenen DNA-Sequenz mit Einträgen in der Datenbank. Für NosZ2.1 z.B. wurden folgende Ergebnisse angezeigt:

Vollständiges Genom von *Saccharopolyspora erythraea* (Abteilung Actinobacteria) ([AM420293.1](#))

Vollständiges Genom von *Streptomyces griseus subsp. griseus* (Abteilung Actinobacteria) ([AP009493.1](#))

Vollständiges Genom von *Salinispora arenicola* (Abteilung Actinobacteria) ([CP000850.1](#))

Anhand der geringen Übereinstimmung der Ergebnisse können die Gene nicht mit Sicherheit einer bestimmten Genfunktion zugeordnet werden, der kleinste angezeigte E-Wert ist z.B. für NosZ2.2 bei  $10^{-23}$  angegeben.

Insgesamt zeigt die Analyse der sequenzierten PCR-Produkte, dass die Amplifizierung der DNA in den Proben der organischen Auflage mit den verwendeten Primern NosZ2F und NosZ2R z.T. aspezifisch erfolgt. Nur die längeren PCR-Produkte (266 bp bzw. 267 bp) entsprechen tatsächlich dem gewünschten NosZ-Gen. Um eine Quantifizierung mittels RT-PCR durchführen zu können, muss vorher das Problem der aspezifischen Reaktion der Primer beseitigt werden. Dies kann durch Adaptionen der Reaktionsbedingungen des RT-PCR-Systems erfolgen. Auch der Entwurf neuer Primer und deren Überprüfung (*in silico*, auf dem verwendeten Material und die Bestätigung durch die Sequenzierung) ist eine Möglichkeit, die Spezifität zur Bestimmung von NosZ zu verbessern.

Nach dem Nachweis der Unterschiede der Klone NosZ2.3 und NosZ2.2 mittels „CLUSTALW2“ wurden diese in der Molekularbiologischen Datenbank des Instituts archiviert (bei  $-80^{\circ}\text{C}$ ).

Die Ergebnisse der Sequenzierung, d.h. die genauen DNA-Sequenzen der Klone,

sind im Anhang (8.3) aufgelistet. Diese verzeichneten DNA-Stücke brachten zufriedenstellende Ergebnisse und waren spezifisch den jeweiligen Bakteriengruppen zuzuordnen. Die genannten Bakterienklone wurden in der Molekularbiologischen Datenbank des Instituts aufgenommen und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  archiviert.

Durch spätere Isolierung und Reinigung der Plasmid-DNA der Klone konnten diese als interner Standard bei RT-PCR-Systemen eingesetzt werden.

#### **4.2.4 qRT-PCR**

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und die anschließende gelelektrophoretische Überprüfung der Genfragmentlängen liefert in erster Linie qualitative Ergebnisse. Über die präzise Ausgangsmenge der gesuchten Bakterien-DNA in den Bodenproben lassen sich allerdings keine Aussagen treffen. Daher wurde für eine schnelle Quantifizierung der Genkopienzahlen die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR) durchgeführt (3.3.10).

Nach der in Kapitel 3.3.1 beschriebenen Methode wurden von jeder Bodenprobe der organischen Auflage des Auftau-Experiments (4.2) jeweils zwei DNA-Extraktionen durchgeführt. Nach der Isolierung und Aufreinigung der DNA (3.3.2) wurden diese als Ausgangsmaterial in die qRT-PCR eingesetzt. Zur genauen Konzentrationsbestimmung der bakteriellen DNA bei qRT-PCR-Systemen wurden wie oben beschrieben interne Standards eingesetzt (3.3.11). Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit konnte jedoch nur ein ausgewählter Teil der in Kapitel 4.2.2 erwähnten PCR-Ansätze mittels qRT-PCR durchgeführt werden. Neben der Quantifizierung der Eubakterien-Genkopien in der organischen Auflage des zweiten Frost-Auftau-Experiments, wurde die Gruppe der Ammonium-Oxidierer nachgewiesen. Die Auswertung aller Ergebnisse zeigte eine hohe Variabilität der Genkopienzahlen zwischen den einzelnen Proben. Ehe weitere 16S-Gene bzw. funktionelle Gene mittels qRT-PCR bestimmt werden konnten, war es daher erforderlich, die Gründe für diese große Variabilität der Messergebnisse zu bestimmen, die sogar zwischen zwei Extraktionen von ein und derselben Bodenprobe auftraten.

##### **4.2.4.1 Eubakterien**

Eubakterien werden zusammen mit den Archeen den Prokaryoten zugeordnet.



Prokaryoten besitzen keinen abgetrennten Zellkern, sondern lediglich ein Kernäquivalent (Nucleoid). Neben den Eukaryoten bilden sie damit eine der drei Domänen, in die alle Lebewesen eingeteilt werden. Alle Prokaryoten, die nicht den Archeen zugeordnet werden, zählen somit zu den Eubakterien, wobei diese oftmals auch einfach als Bakterien bezeichnet werden. Zur Amplifizierung einer derart großen und ungleichen Menge an DNA-Sequenzen wurden Primer verwendet, die an mehreren Stellen degeneriert sind. Solche Oligonukleotide ermöglichen punktuell, verschiedene Basen an betreffender Stelle zu erkennen. Die DNA-Sequenz wird trotz Unterschieden an einzelnen Stellen vervielfältigt. Das verwendete Primerpaar der durchgeführten qRT-PCR zur Identifizierung von Eubakterien war Eubak for und Eubak rev (Bach et al, 2002). Vorausgegangene Tests hatten gezeigt, dass dieses Primerpaar tatsächlich spezifisch ist (40% Abdeckung der gesamten Eubakteriensequenzen der RDP, Sequenzierung von PCR-Produkten). Die quantitative Analyse wurde mit QuantiFast™SYBR®Green I durchgeführt, wobei die eingesetzten Mengen dem Standardansatz entsprachen (3.3.10). Die genaue Temperaturabfolge wurde wie folgt einprogrammiert: zwei Minuten bei 50°C und fünf Minuten bei 95°C als Vorlaufzeit. Ein einzelner Zyklus hatte die Temperaturabfolge: 15 sec bei 95°C und 60 sec bei 60°C, wobei die Zyklen insgesamt 40 Mal wiederholt wurden. Neben der NTC („Non Template Control“, d.h. keine extrahierte DNA im Reaktionsansatz) und NAC („Non Amplification Control“, d.h. keine Primer im Ansatz) wurden Standardverdünnungen mit Konzentrationen von  $10^3$  bis  $10^7$  eingesetzt. Als Standard diente eine definierte Mischung aus Plasmid-DNA mit 16S-rRNA-Genen (im Vorfeld durch Sequenzierung getestet). Die Standardkurven der durchgeführten qRT-PCRs zeigten eine Korrelation von  $>0,99$ , d.h. die Abweichung der einzelnen Standardwerte war sehr gering und die Kurve damit als sehr stabil zu bewerten. Der Schwellenwert („Threshold“) für die Auswertung wurde auf 0,5 angesetzt. Bei diesem Wert zeigten alle Amplifizierungskurven in der logarithmischen Darstellung einen linearen Verlauf. Alle eingesetzten Bodenproben wurden in der Verdünnung 1:500 verwendet.

Die Ergebnisse einzelner Proben aus der organischen Auflage sind in Abbildung 4-8 dargestellt. Bodensäule eins, für die im Rahmen des Auftau-Experiments nur minimale  $N_2O$ -Emissionen nachgewiesen werden konnten (4.1), wurde nicht untersucht. Pro Säule sind zwei Graphiken dargestellt. Das Ergebnis der qRT-PCR

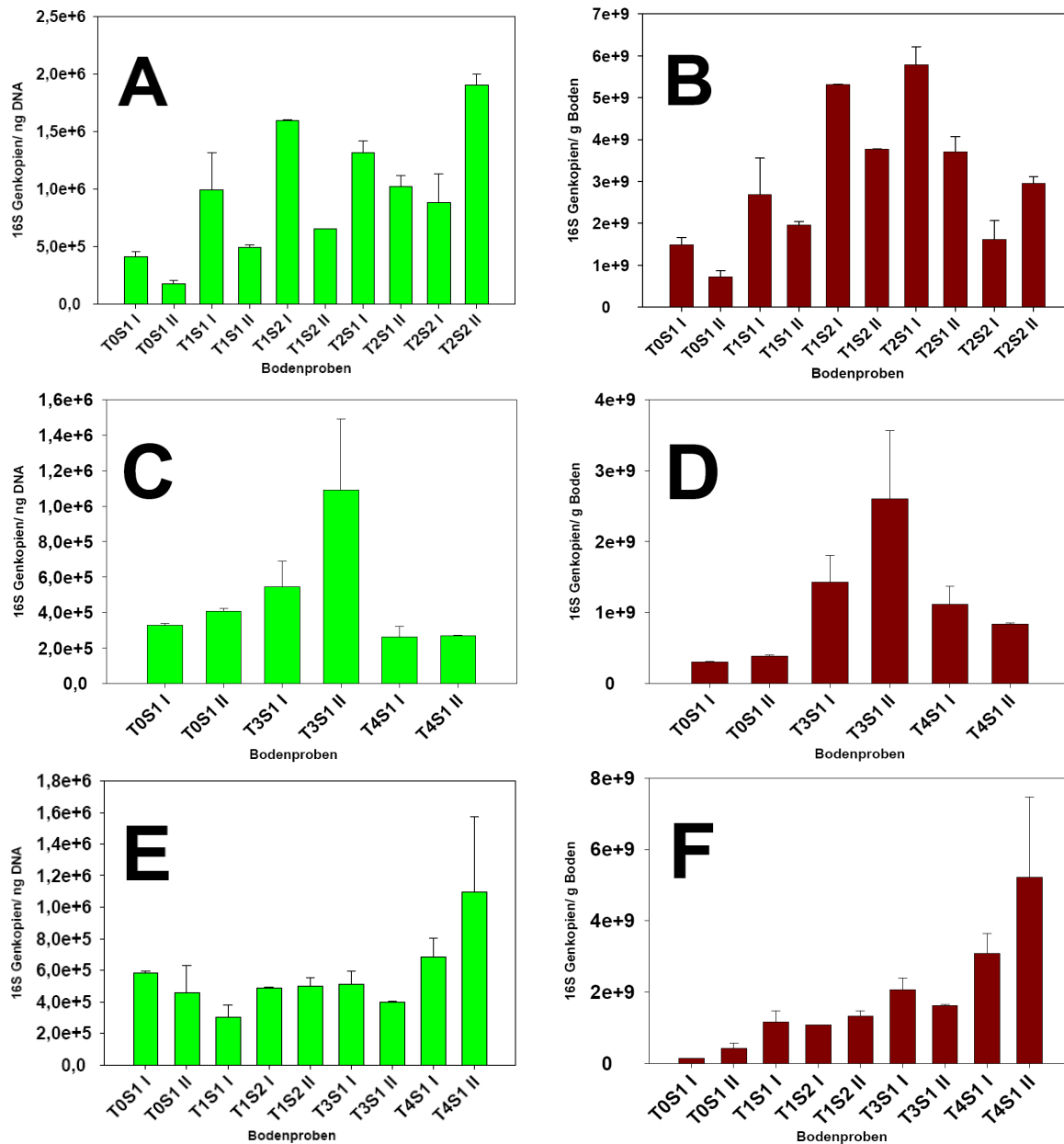
wurde zum einen unter Berücksichtigung der eingesetzten Verdünnung (1:500) auf die Gesamtmenge der gemessenen DNA der Probe bezogen. Zum anderen war die Bezugsgröße die anfangs eingesetzte Menge an gemahlener organischer Auflage, auch hier wurde die Verdünnung (1:500) in die Berechnung miteinbezogen.

Die Ergebnisse der qRT-PCR wurden im Anschluss mittels statistischer Verfahren verglichen, um eindeutigere Aussagen treffen zu können.

Die berechneten Werte für die organische Auflage der Bodensäule zwei (s. Abbildung 4-8A und B) zeigen eine hohe Variabilität zwischen zwei Extraktionen von ein und derselben Bodenprobe (als I und II angegeben). Die maximale Differenz findet sich zwischen Probe S2 I und S2 II des Zeitpunkts T1, bezogen auf die Gesamt-DNA-Menge. Der gemessene Wert der Probe S2 I ist fast dreimal so hoch wie S2 II. Dagegen bewegen sich die Abweichungen innerhalb der Proben gleicher Zeitpunkte (T) in einem kleineren Rahmen. Es existieren allerdings Differenzen in den Ergebnissen zwischen den Bezugsgrößen „Gesamt-DNA“ und „eingesetztes Bodengewicht“. Die geringen bis sehr geringen Standardabweichungen der gemessenen Werte bestätigen die qRT-PCR als geeignete Methode zur Quantifizierung von Eubakterien.

Von Bodensäule vier (s. Abbildung 4-8C und D) wurden zum Zeitpunkt T1 keine Bodenproben entnommen, zudem konnten aufgrund mangelnder Qualität der isolierten DNA (geringer Reinheitsgrad) nur ein Teil der Proben für die qRT-PCR verwendet werden. Dementsprechend gering sind die vergleichbaren Ergebnisse. Im Gegenteil zu den Resultaten der übrigen Bodensäulen weisen die Ausprägungen der Säule vier jedoch eine allgemeine Homogenität innerhalb der Extraktionen auf (s. Abbildung 4-8C und D). Beide Bezugsgrößen geben vergleichbare Werte an.

Wie der Vergleich der Ergebnisse der organischen Auflage der Bodensäule sechs verdeutlicht, existieren mitunter große Unterschiede zwischen den Resultaten der Bezugsgrößen (s. Abbildung 4-8E und F). Bezogen auf die Gesamt-DNA scheinen die Werte aller Zeitpunkte außer Zeitpunkt T4 in der gleichen Größenordnung zu liegen. Dagegen zeigen die Daten bezogen auf das Bodengewicht abweichende Mengenangaben.

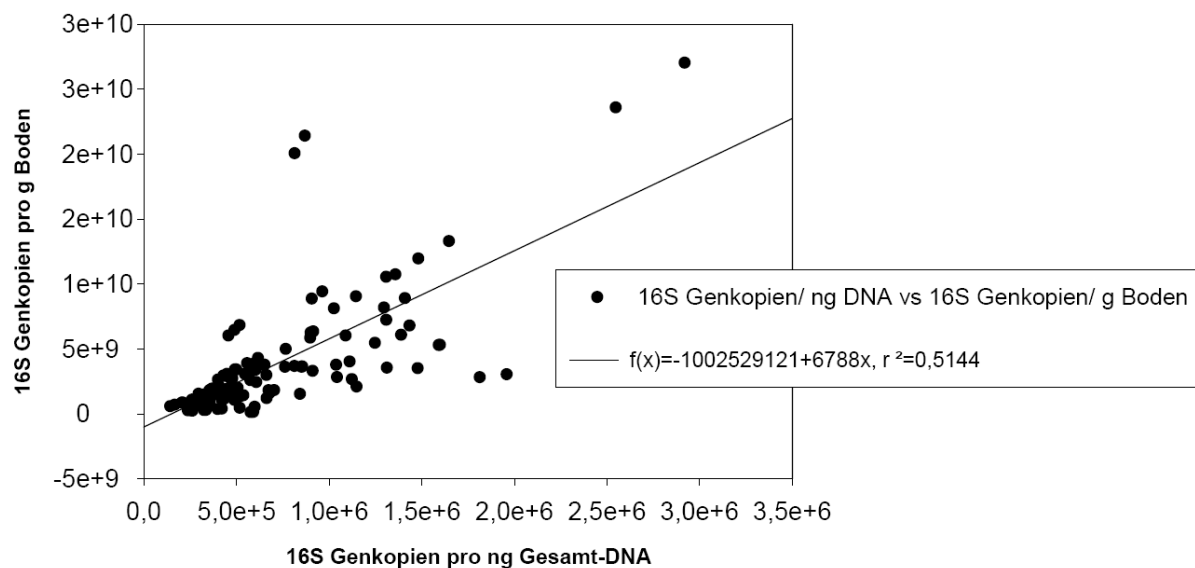


**Abbildung 4-8: Quantifizierung der 16S DNA von Eubakterien in der organischen Auflage der Bodensäulen zwei (A und B), vier (C und D) und sechs (E und F) zu unterschiedlichen Zeitpunkten des zweiten Frost-Auftau-Experiments. (A), (C), und (E) Anzahl der Genkopien bezogen auf Gesamt-DNA; (B), (D) und (F) Anzahl der Genkopien bezogen auf Bodengewicht; T steht für Zeitpunkt, S für Bodenprobe, I oder II bezeichnet die beiden Extraktionen einer Bodenprobe (4.2). n = 2-3 Replikate +SD.**

Im Allgemeinen bestätigen die geringen bis sehr geringen Standardabweichungen der gemessenen Einzelwerte die Reproduzierbarkeit der qRT-PCR.

Die Ergebnisse aller Säulen zeigen jedoch eine hohe Variabilität zwischen Parallel-Extraktionen (als I und II angegeben) der gleichen Bodenprobe. Im Vergleich dazu erscheinen die Abweichungen innerhalb der Proben (S1 und S2) gleicher Zeitpunkte (T) relativ gering. Es existieren allerdings Differenzen in den Ergebnissen zwischen

den Bezugsgrößen „Gesamt-DNA“ und „eingesetztes Bodengewicht“. Ein Grund dafür könnte in der unterschiedlichen Ausbeute an DNA nach den durchgeführten Extraktionen liegen (4.2.1). Die einfache lineare Regressionsanalyse zwischen 16S Genkopien/ ng Gesamt-DNA und 16S Genkopien/ g Boden ergab einen linearen Zusammenhang beider Größen (Probenumfang 117 Einzelwerte). Der berechnete Korrelationskoeffizient  $r^2$  ist mit 0,5144 relativ gering, dies ist vermutlich durch einzelne Ausreißerwerte zu erklären (s. Abbildung 4-9).



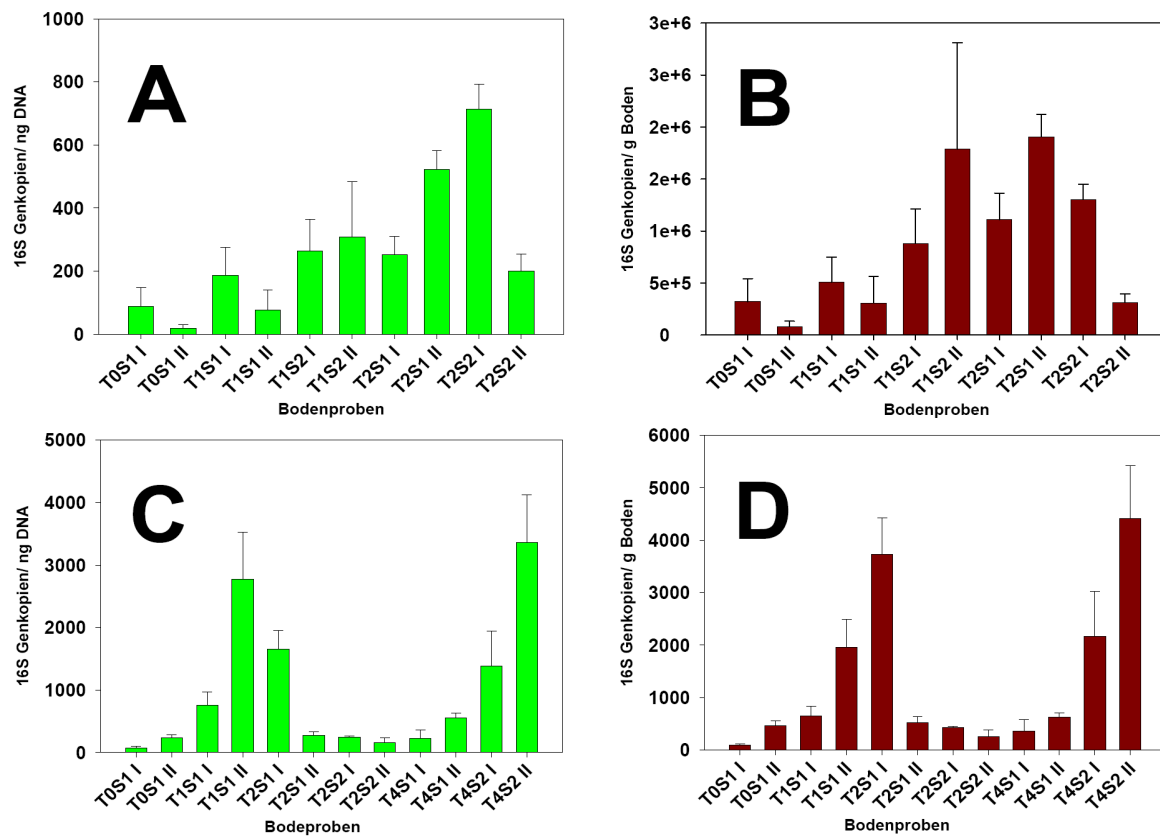
**Abbildung 4-9: Korrelation der 16S DNA Genkopienzahlen in der organischen Auflage für Eubakterien in Abhängigkeit der Bezugsgröße „Gesamt-DNA“ und „verwendetes Bodenmaterial“.  $r^2=0,5144$ ;  $P = 117$ . Einbezogen wurden die Messwerte aller Zeitpunkte (T0 bis T4).**

#### 4.2.4.2 Autotrophe Ammonium-Oxidierer

Wie bereits in Kapitel 4.2.2.1 beschrieben, nehmen die autotrophen Ammonium-Oxidierer eine wichtige Rolle bei der Umsetzung von Stickstoff im Boden ein. Sie oxidieren im ersten Teilschritt der Nitrifikation Ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) zu Nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ). Der Testansatz zum quantitativen Nachweis der Ammonium-Oxidierer (Nitrosomonadales) mittels RT-PCR basierte auf dem modifizierten PCR-Ansatz, der in Kapitel 4.2.2.1 dargestellt ist. Eine Optimierung der qPCR war erforderlich, da die Standardbedingungen ( $T_a = 60^\circ\text{C}$ ) keine zufriedenstellenden Ergebnisse in der qRT-PCR erbrachten (Bildung von unspezifischen Amplifikationsprodukten). Um eine höhere „Annealing“-Temperatur benutzen zu können wurde der Enzym-Master-Mix QuantiTect™ SYBR® Green verwendet. Somit ergab sich ein Vorlauf von  $50^\circ\text{C}$  für 2

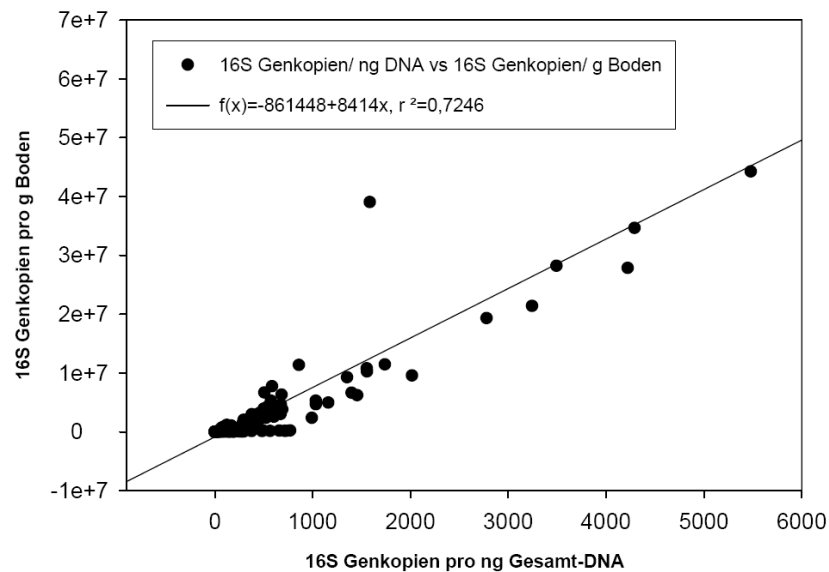
min und 95°C für 15 min. Pro PCR-Zyklus wurden die Proben auf 95°C für 15 sec erhitzt, die  $T_a$  war auf 63°C für 30 sec eingestellt, und die  $T_e$  betrug 72°C für 45 sec. Insgesamt wurden 45 PCR-Zyklen wegen der angenommenen geringen Konzentration an Ausgangs-DNA in der organischen Auflage der Bodenproben durchgeführt. Die eingesetzten Extrakte der Bodenproben wurden dabei 1:200 verdünnt. Zur Erstellung einer Standardkurve wurde eine Mischung aus Plasmid-DNA mit 16S-rRNA-Genen der Klone KO3, KO4 und WO2 (4.2.3, 8.3.4), die in den Konzentrationen  $10^2$  bis  $10^6$  verwendet wurden. Die Standardkurve war aufgrund der berechneten Korrelation mit  $> 0,99$  sehr vertrauenswürdig. Der Schwellenwert („Threshold“) zur Analyse der qRT-PCR wurde bei 0,3 festgesetzt. In jeder Messreihe wurden zwei Negativkontrollen (NTC und NAC, 3.3.10) mitgeführt.

Verglichen mit den bisherigen Ergebnissen für die Eubakterien (Abbildung 4-8) ist die Genkopienzahl der quantifizierten Gene der Ammonium-Oxidierer in der organischen Auflage erwartungsgemäß deutlich geringer. Wählt man als Bezugsgröße die gemessene Gesamt-DNA, liegen die errechneten Ausgangskonzentrationen im Bereich weniger Hundert bis Tausend Kopien pro ng DNA bei einer Gesamtstandardabweichung von 35% im Mittel. Die kalkulierten Werte bezogen auf das eingesetzte Bodengewicht liegen etwa im Bereich von  $10^5$  bis  $10^6$ . Es ergeben sich auch in diesem Fall Differenzen für die beiden Bezugsgrößen. Dieser Unterschied ist z.B. bei Bodensäule zwei deutlich ausgeprägt (s. Abbildung 4-10A und B). Dagegen sind z.B. bei Säule drei die Ergebnisse beider Bezugsgrößen gut vergleichbar (s. Abbildung 4-10C und D). Allgemein zeigte sich bei allen Bodensäulen eine hohe Variabilität der Messwerte zwischen zwei Extraktionen von ein und derselben Bodenprobe (I und II). Die Standardabweichungen sind z.T. deutlich höher als bei der Quantifizierung von Eubakterien, was angesichts der geringeren Menge an Ausgangs-DNA besonders auffällig ist (s. Abbildung 4-10B).



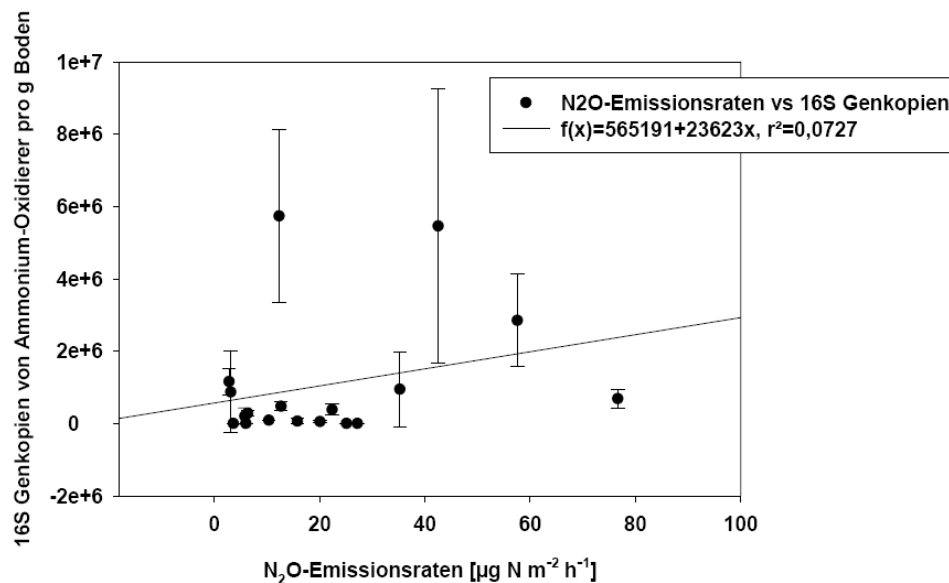
**Abbildung 4-10: Quantifizierung der 16S DNA für autotrophe Ammonium-Oxidierer in der organischen Auflage der Bodensäulen zwei (A und B) und drei (C und D) zu unterschiedlichen Zeitpunkten des zweiten Frost-Auftau-Experiments. (A) und (C) Anzahl der Genkopien bezogen auf Gesamt-DNA; (B) und (D) Anzahl der Genkopien bezogen das eingesetzte Bodengewicht; T steht für Zeitpunkt, S für Bodenprobe, I oder II bezeichnet die beiden Extraktionen einer Bodenprobe (4.2). n = 2-3 Replikate +SD.**

Die einfache lineare Regressionsanalyse zwischen 16S Genkopien/ ng Gesamt-DNA und 16S Genkopien/ g Boden ergab einen linearen Zusammenhang beider Größen (Probenumfang 124 Einzelwerte). Der berechnete Korrelationskoeffizient  $r^2$  liegt mit 0,7246 höher als bei der Quantifizierung der 16S Eubakteriengene (s. Abbildung 4-11).



**Abbildung 4-11: Korrelation der 16S DNA Genkopienzahlen in der organischen Auflage für die Gruppe der Ammonium-Oxidierer in Abhängigkeit der Bezugsgröße „Gesamt-DNA“ und „verwendetes Bodenmaterial“.  $r^2=0,7246$ ;  $P = 124$ . Einbezogen wurden die Messwerte aller Zeitpunkte (T0 bis T4).**

Basierend auf den gemessenen  $N_2O$ -Emissionsraten des zweiten Frost-Auftau-Versuchs mit Bodensäulen der Versuchsfläche „Höglwald“ konnten die Emissionen [ $\mu\text{g N m}^{-2} \text{h}^{-1}$ ] zu den Zeitpunkten (T0 bis T4) der Bodenprobenentnahme ermittelt werden (4.2). Die Abhängigkeit zwischen der beobachteten Höhe der  $N_2O$ -Emissionen (der jeweiligen Bodensäule) und der mittels qRT-PCR quantifizierten Menge an 16S DNA Genkopien der Gruppe der Ammonium-Oxidierer in Bodenproben der organischen Auflage des jeweiligen Zeitpunkts der entsprechenden Bodensäule ist in Abbildung 4-12 dargestellt (Bezugsgröße der quantifizierten 16S Gene ist das jeweils verwendete Bodengewicht [ $\text{ng g}^{-1}$ ]). Die berechnete Korrelation zeigt einen positiven Trend (Steigung der Regressionsgerade 23623). Aufgrund der z.T. sehr hohen Standardabweichungen (in Abbildung 4-12 als vertikale Balken dargestellt) zwischen den gemessenen 16S DNA Genkopien für die Gruppe der Ammonium-Oxidierer der zwei Bodenproben eines Zeitpunkts T (mit je zwei durchgeführten Extraktionen) ist der ermittelte Korrelationskoeffizient  $r^2=0,0727$  jedoch zu gering, um eine Abhängigkeit beweisen zu können (s. Abbildung 4-12).



**Abbildung 4-12: Korrelation der 16S DNA Genkopienzahlen in der organischen Auflage für die Gruppe der Ammonium-Oxidierer (Bezugsgröße eingesetztes Bodengewicht) in Abhängigkeit der gemessenen N<sub>2</sub>O-Emissionsraten [µg N m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup>] der jeweiligen Zeitpunkte der Bodenprobenentnahme.  $r^2=0,0727$ ;  $P = 18$ . Zur Berechnung der 16S DNA Genkopienzahlen der Ammonium-Oxidierer [ng g<sup>-1</sup>] wurden die Mittelwerte der jeweiligen Zeitpunkte (T0 bis T4) verwendet und die SD berechnet.**

Die Signifikanz der unterschiedlichen 16S Genkopienzahlen (von Eubakteriengen und der Gruppe der Ammonium-Oxidierer) zu den verschiedenen Zeitpunkten nach Beginn des Auftauens der Bodensäulen wurde mittels statistischer Verfahren überprüft (SPSS 8.0, 3.3.12).

#### 4.2.4.3 Quantifizierung der Eubakterien - Überprüfung der Signifikanz

Die Ergebnisse der einzelnen t-Tests (3.3.12) sind sehr heterogen und lassen kein einheitliches Bild erkennen. Bezogen auf das Bodengewicht zeigten die gemessenen Genkopienzahlen für die Eubakterien bei den Bodensäulen zwei und sechs signifikante Unterschiede. So zeigte sich, dass in der organischen Auflage der Bodensäule zwei und sechs zum Zeitpunkt T0 die Genkopienzahl für Eubakterien signifikant ( $p < 0,01$ ) niedriger war als zu den späteren Zeitpunkten T1 bzw. T2. Dagegen waren die Ausprägungen der Zeitpunkte T1 und T2 nicht unterschiedlich ( $p > 0,05$ ). Dieselben Ergebnisse wurden ebenfalls mit der Bezugsgröße DNA erreicht. Alle Messergebnisse der Bodensäule sechs (Bezugsgröße Bodengewicht) sind mindestens signifikant unterschiedlich ( $p < 0,05$ ), wobei jeweils die Ausprägungen des



späteren Zeitpunkts höher ist als der vorausgegangene. Wird als Bezugsgröße die Gesamt-DNA herangezogen, sind die Unterschiede weniger deutlich. Die Werte des Zeitpunkts T4 sind signifikant höher ( $p < 0,05$ ) als T1 und T3. Alle anderen Messwerte der verschiedenen Zeitpunkte zeigen einen P-Wert größer als 0,05.

#### **4.2.4.4 Quantifizierung der autotrophen Ammonium-Oxidierer- Überprüfung der Signifikanz**

Bezüglich der Quantifizierung der autotrophen Ammonium-Oxidierer ergab sich ein ähnliches Bild. Die aufschlussreichsten Resultate zeigen die Messungen in der organischen Auflage der Bodensäulen zwei und fünf. Unabhängig von der zur Berechnung verwendeten Bezugsgröße waren bei Bodensäule zwei die Messwerte des Zeitpunkts T0 signifikant ( $p < 0,05$ ) kleiner als zu den Zeitpunkten T1 und T2. Die Ausprägungen der Zeitpunkte T1 und T2 waren hingegen nicht signifikant verschieden. Die Proben der organischen Auflage der Bodensäule fünf sind unabhängig von der verwendeten Bezugsgröße signifikant unterschiedlich ( $p < 0,01$ ): T0 kleiner als T1 sowie T4, T1 größer als T3, und T3 größer als T4. Lediglich T0 und T3 können nicht signifikant unterschieden werden, der P-Wert liegt deutlich über 0,05. Die Resultate der Bodensäulen drei, vier und sechs für die Gruppe der Ammonium-Oxidierer zeigen jedoch gravierende Unterschiede je nach Bezugsgröße (Gesamt-DNA bzw. Bodengewicht) bei der statistischen Auswertung. Um konkrete Aussagen treffen zu können sind daher weitergehende Experimente mit einem größerem Stichprobenumfang notwendig.

Der einzig signifikante Unterschied ( $p < 0,01$ ) aller Proben der Bodensäulen (zwei bis sechs), bei denen eine Quantifizierung der autotrophen Ammonium-Oxidierer und Eubakterien erfolgte, ist der Unterschied zwischen den Zeitpunkten T0 und T4.

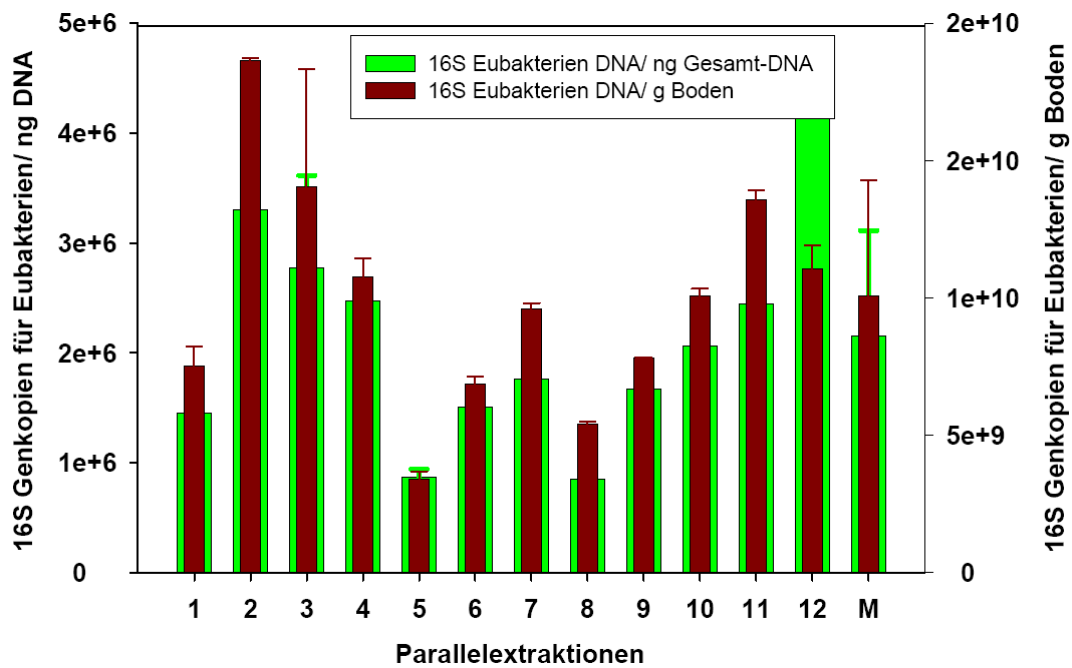
#### **4.2.5 Präzisionskontrolle und Wiederfindungsrate**

Die Auswertung der Ergebnisse der qRT-PCR für die Eubakterien und autotrophen Ammonium-Oxidierer (4.2.4) deutete auf einige Probleme der Reproduzierbarkeit der Parallelproben hin. Zum einen gab es enormen Differenzen zwischen den Resultaten je nach der zur Berechnung verwendeten Bezugsgröße (Gesamt-DNA bzw. Bodengewicht). Zum anderen unterschieden sich die ermittelten Genkopienzahlen innerhalb einer Bodenprobe zwischen den zwei durchgeführten Extraktionen bisweilen enorm. Es konnte auch keine Abhängigkeit zwischen den gemessenen

N<sub>2</sub>O-Emissionsraten aus den Bodensäulen mit „Höglwald“-Boden und der quantitativ bestimmten Menge an 16S DNA Genkopienzahlen der Gruppe der Ammonium-Oxidierer aus der organischen Auflage festgestellt werden (s. Abbildung 4-12). Aus diesen Gründen kamen Zweifel bezüglich der Verlässlichkeit der Extraktionsmethode von Nukleinsäuren aus Bodenmaterial auf. Das Verfahren der Extraktion wurde im Vorfeld der Diplomarbeit bezüglich der Menge und Reinheit der gewonnenen Nukleinsäuren getestet und optimiert. Eine Analyse der Präzision, das heißt die Überprüfung einer möglichst hohen Reproduzierbarkeit der Extraktionsergebnisse, wurde bislang jedoch nicht durchgeführt.

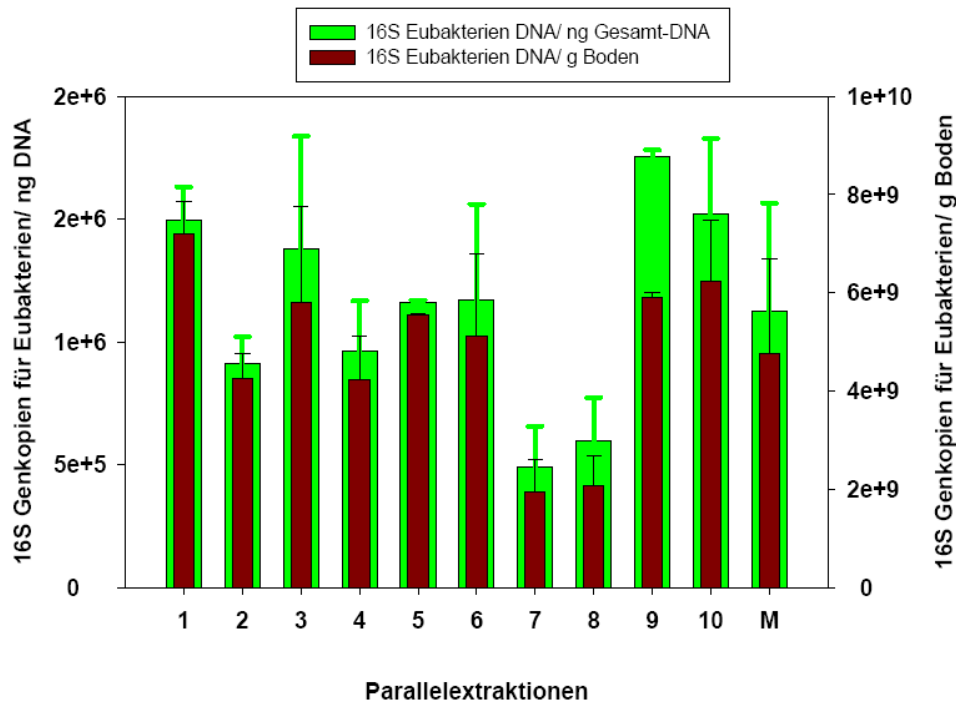
Für eine genaue Analyse der Präzision wurden Bodenproben aus einer homogenen pulverisierten Bodenmischung entnommen und exakt eingewogen. Hierfür wurde Bodenmaterial der organischen Auflage aus der ersten Versuchsreihe (Bodensäule drei) verwendet. Die theoretisch identischen Bodenproben wurden in mehreren Ansätzen extrahiert, wobei jeder Ansatz mindestens sechs unabhängige Stichproben umfasste. Nach beschriebener Methode (3.3.2) wurden die Nukleinsäuren gereinigt und in DNA und RNA getrennt. Die DNA wurde zur Bestimmung ihrer Reinheit und Konzentration photometrisch gemessen (3.3.3) und mittels RT-PCR quantifiziert (3.3.10). Die photometrisch ermittelte Konzentration an DNA der Parallelproben des Zeitpunkts T0 lag bei durchschnittlich 4,9 ng µl<sup>-1</sup> bei einer Standardabweichung von 20%. Die Werte der DNA-Konzentrationen des Zeitpunkts T5 wurden mit 4,3 ng µl<sup>-1</sup> bei einer Standardabweichung von 14% berechnet.

Zur Quantifizierung mittels qRT-PCR wurde der in Kapitel 4.2.4.1 dargestellte Ansatz zur Bestimmung der 16S-Gene für Eubakterien verwendet. Die Ergebnisse wurden mittels SigmaPlot 2000 (Systat Software Inc., San Jose, USA) graphisch dargestellt. Im Anschluss wurde eine statistische Auswertung mit dem Computerprogramm SPSS 8.0 durchgeführt (SPSS Inc., Chicago, USA).



**Abbildung 4-13: Quantifizierung der 16S Eubakterien DNA in 12 unabhängigen Extraktionen der gleichen Bodenprobe. Die verwendete organische Auflage entstammt der Bodensäule drei der ersten Versuchsreihe zum Zeitpunkt T0. Die verwendete Verdünnung der DNA-Proben war 1:200. Die zur Berechnung verwendete Bezugsgröße Gesamt-DNA wird durch die grünen Balken dargestellt, die Bezugsgröße Bodengewicht wird durch die roten Balken symbolisiert. n=2-3 qRT-PCR Reaktionen + SD. M symbolisiert den Mittelwert und die Standardabweichung aller Werte der jeweiligen Bezugsgröße.**

Die Analyse der Genkopien für 16S Eubakteriengene aus zwölf Parallelproben zeigte eine deutliche Inhomogenität der Ergebnisse (s. Abbildung 4-13). Probe zwei z.B. zeigt eine doppelt so hohe Genkopienzahl wie Probe eins auf, obwohl beide derselben Bodenmischung entstammen. Die errechnete Standardabweichung aller Werte liegt bei 44,7% (Bezugsgröße DNA), bzw. 41,5% (Bezugsgröße Bodengewicht). Aufgrund der Unterschiede der einzelnen Resultate ist die errechnete gesamte Standardabweichung dementsprechend sehr groß (Fehlerfortpflanzungsgesetz) (Abbildung 4-13).



**Abbildung 4-14: Quantifizierung der 16S Eubakterien DNA in zehn unabhängigen Extraktionen der gleichen Bodenprobe. Die verwendete organische Auflage entstammt der Bodensäule drei der ersten Versuchsreihe zum Zeitpunkt T5. Die Verwendete Verdünnung der DNA-Proben war 1:200. Die zur Berechnung verwendete Bezugsgröße Gesamt-DNA wird durch die grünen Balken dargestellt, die Bezugsgröße Bodengewicht wird durch die roten Balken symbolisiert. n=2-3 qRT-PCR Reaktionen + SD. M symbolisiert den Mittelwert und die Standardabweichung aller Werte der jeweiligen Bezugsgröße.**

Wie aus Abbildung 4-14 deutlich wird, sind die Messunterschiede für die 16S Eubakterien-DNA zum zweiten untersuchten Zeitpunkt T5 niedriger als zum Zeitpunkt T0 (s. Abbildung 4-13). Die untersuchten zehn Parallelproben zeigten jedoch ebenfalls große Unterschiede zwischen den Werten der Extraktionen. Die mittlere Standardabweichung ist mit 39,5% (Bezugsgröße DNA) bzw. 40,3% (Bezugsgröße Bodengewicht) ebenfalls sehr groß.

Die statistische Auswertung mittels t-Test zeigt einen hoch signifikanten Unterschied ( $p < 0,01$ ) zwischen den Werten von T0 und T5. Die Homogenität der Extraktionen der Parallelproben wurde zwar mittels statistischer Analysen (Varianzanalyse zum Vergleich mehrerer Mittelwerte) bestätigt ( $p > 0,05$ ), jedoch sind die errechneten Standardabweichungen der gesamten Proben relativ groß.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde in einem Anschlussexperiment versucht, die DNA-Verluste während der Aufarbeitung (Extraktion und Separation) zu quantifizieren. Als interner Standard wurde eine bestimmte Menge an Plasmid-DNA

eingesetzt, die das Gen der Myrcensynthese (*MyrS*, AJ304839) der Steineiche (*Quercus ilex* L.) enthielt (Fischbach et al., 2001). Da das Gen *MyrS* nicht in den Bodenproben des „Höglwalds“ vorkommt, waren falsch hohe Wiederfindungsraten (WFR) ausgeschlossen. Durch ein bereits erprobtes RT-PCR-System (Heuser, 2002) konnte die Anzahl der *MyrS*-Genkopien nach der Aufarbeitung in jeder Probe bestimmt werden. Anhand folgender Formel konnte dann die Wiederfindungsrate der eingesetzten Genkopien (i.d.R.  $2 \times 10^8$ ) berechnet werden.

$$WFR = \frac{Myr_P \cdot V_G}{Myr_S \cdot V_P} \cdot 100\%$$

$Myr_P$  : mittels Real Time PCR gemessene Kopienzahl des *MyrS*-Gens in der Probe

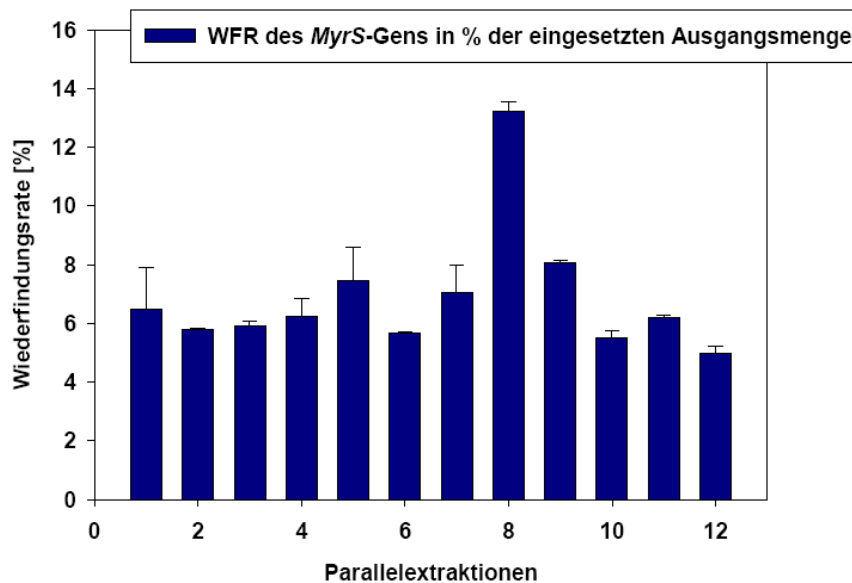
$V_G$  : Gesamtvolumen [ $\mu$ l] der DNA-Lösung nach der Aufarbeitung (Extraktion und Separation)

$Myr_S$  : eingesetzte Kopienzahl des Myrcensynthese-Plasmids [i.d.R.  $2 \times 10^8$ ]

$V_P$  : eingesetztes Volumen [ $\mu$ l] der DNA-Lösung zur Untersuchung der Probe mittels Real Time PCR [bei allen Proben 5  $\mu$ l]

Verwendet wurden zwölf Parallelproben des Zeitpunkts T0 der homogenen Bodenmischung der organischen Auflage der Bodensäule drei aus der ersten Versuchsreihe (s. Abbildung 4-15). Jeder Probe wurden  $2 \times 10^8$  Genkopien des internen Standards (*MyrS*) zugegeben. Nach der Aufarbeitung wurden die Proben 1:200 verdünnt und mittels qRT-PCR gemessen. Die verwendeten Primer Myrfor1 und Myrrev1 (8.2) reagierten spezifisch auf das in der Probe zugesetzte *MyrS*-Gen. Zur Ermittlung einer Standardkurve wurden Konzentrationen von  $10^3$  bis  $10^7$  Genkopien des *MyrS*-Plasmids eingesetzt. Die Auswertung der Standardkurve erbrachte eine Korrelation von  $>0,99$ . Die  $T_a$  eines Zyklus der RT-PCR war auf  $60^\circ\text{C}$  eingestellt, insgesamt wurden 40 Zyklen durchgeführt. Zur Analyse wurde ein Schwellenwert von 0,3 festgesetzt. Da die Zugabe des internen Standards *MyrS* nach der Aliquotierung des gemahlten Bodens in die Zentrifugengefäße erfolgte, entfiel eine Berechnung des eingesetzten Bodengewichts bzw. der gemessenen Gesamt-DNA. Jeder Probe wurde die gleiche Genkopienzahl an *MyrS* zugesetzt. Demzufolge sollte dieselbe Anzahl nach der Aufarbeitung wiedergefunden werden. Die nach oben dargestellter Formel berechnete Wiederfindungsrate (WFR) des *MyrS*-Gens der zwölf Parallelproben betrug im Mittel 6,8% bei einer gesamten

Standardabweichung von 32%. Die einzelnen Werte der Wiederfindungsrate des *MyrS*-Gens schwankten zwischen 4,9 und 13,2%. Die Abbildung 4-15 zeigt die Abweichungen der zwölf Einzelwerte.

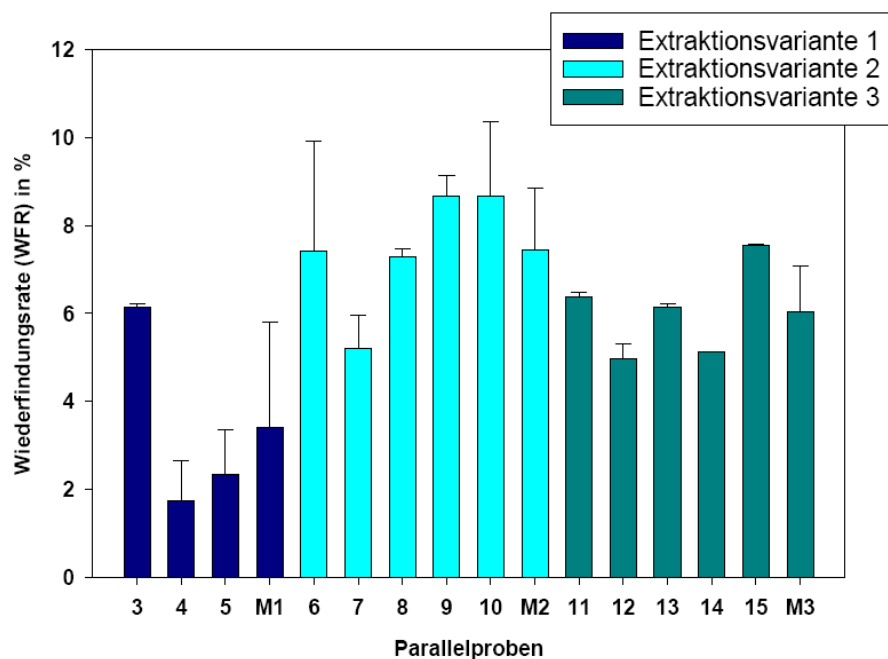


**Abbildung 4-15: Wiederfindungsrate (WFR) des zu Bodenproben zugesetzten *MyrS*-Gens in zwölf Parallelproben. Verwendet wurde die organische Auflage des Zeitpunkts T0 der Säule drei aus dem ersten Frost-Auftau-Versuch. Die WFR der Einzelproben wurde bezogen auf die anfangs eingesetzte Kopienzahl an *MyrS* berechnet. n=3 qRT-PCR Reaktionen + SD.**

Bis auf einen Extremwert (Probe acht) liegen alle Relativwerte eng zusammen. Die Aufarbeitungsmethode selbst scheint somit stabil und reproduzierbar zu sein. Jedoch deutet die geringe WFR für das *MyrS*-Gen auf eine ungenügende Ausbeute an Nucleinsäuren bei der Extraktion hin. Dies kann zum einen dadurch verursacht werden, dass Nucleinsäuren eine stärkere Bindung zu Bodenpartikeln besitzen als zum eingesetzten Extraktionspuffer. Das Pulverisieren mit einer Laborschwingmühle ist eventuell nicht ausreichend, um die Masse der Bakterien mechanisch aufzuschließen. Somit würde der Großteil der im Boden vorhandenen Nucleinsäuren demnach nicht in Lösung gehen und mit dem Boden verworfen werden (siehe Kapitel 3.3.1). Ein anderer Grund für eine geringe Ausbeute nach der Verarbeitung kann daraus resultieren, dass es große Verluste gibt, z.B. nach den einzelnen Zentrifugationsschritten.

Um eine unzureichende Erschließung der Nucleinsäuren aus dem Bodenmaterial bzw. die anschließende Bindung an den eingesetzten Extraktionspuffer als mögliche

Gründe zu identifizieren, wurden weitere Versuche mit *MyrS* als internen Standard durchgeführt. Aus einer homogenen Bodenmischung der Säule drei der ersten Versuchreihe (Zeitpunkt T2) wurden insgesamt 13 Proben abgewogen und jeweils  $2 \times 10^8$  Genkopien des *MyrS*-Gens hinzugefügt (s. Abbildung 4-16). Die Aufarbeitung von drei Proben erfolgte gemäß oben beschriebener Anleitung (3.3.1). Fünf Proben wurde eine abgewogene Menge an kleinen Glaskugeln zugefügt, pro Probe 0,5 g (in Mischung zu gleichen Anteilen mit einem Durchmesser von 0,65-0,89 mm und 1,2-1,4 mm). Nach Zugabe von 500  $\mu$ l CTAB-Puffer und starkem Mischen für eine Minute wurde ebenfalls nach der Standardanleitung weitergearbeitet. Die letzten fünf Proben wurden mit einem modifizierten Extraktionspuffer behandelt. Die Menge an NaCl des bisher verwendeten CTAB-Puffers betrug 0,35 M in der Endkonzentration. Der modifizierte CTAB-Puffer enthielt doppelt soviel, also 0,7 M NaCl in der Endkonzentration. Die Verarbeitung erfolgte nach beschriebener Anleitung (3.3.1). Zur Quantifizierung wurde oben erwähnter qRT-PCR-Ansatz für das *MyrS*-Gen verwendet. Die Auswertung bei festgesetztem Schwellenwert von 0,3 zeigte eine gute Korrelation der Standardkurve ( $>0,99$ ).



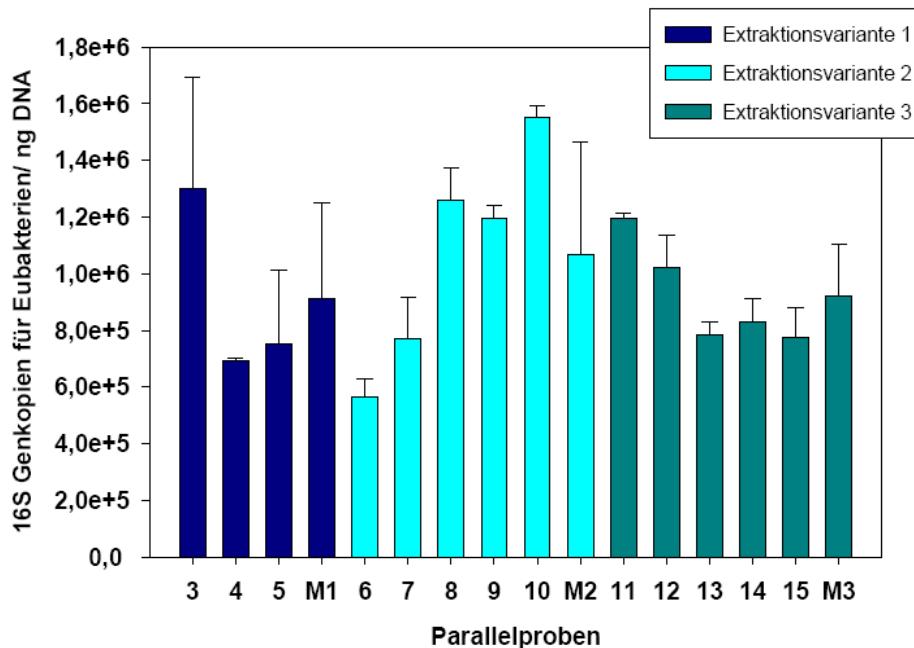
**Abbildung 4-16: Wiederfindungsrate (WFR) des zu Bodenproben zugesetzten *MyrS*-Gens in modifizierten Extraktionsansätzen. Die Proben drei bis fünf wurden nach der Standardanleitung aufgearbeitet (Variante 1). Den Proben sechs bis zehn wurden Glaskugeln zugegeben (Variante 2), die Proben elf bis 15 wurden mit modifiziertem Extraktionspuffer mit höherer Salzkonzentration behandelt (Variante 3). Verwendet wurde organische Auflage des Zeitpunkts T2 der Säule drei des ersten Frost-Auftau-Experiments.  $n=3 +SD$ . M bezeichnet den jeweiligen Mittelwert.**

Die Auswertung der Ergebnisse der qRT-PCR zur Wiederfindung der eingesetzten Menge an *MyrS*-Gen (Abbildung 4-16) bestätigte vorangegangene Resultate (Abbildung 4-15). Die Proben drei bis fünf, die als Kontrolle unter unveränderten Bedingungen extrahiert wurden (Variante 1), ergaben eine WFR der eingesetzten Kopienzahl des *MyrS*-Gens von durchschnittlich 3,4% bei einer hohen Standardabweichung von 70%. Dagegen bewirkte der Zusatz der Glaskugeln (Variante 2) einen effizienteren mechanischen Aufschluss der Bodenpartikel und führte zu einer WFR von 7,5% im Mittel mit einer deutlich geringeren Standardabweichung von 19%. Eine Erhöhung der Salzkonzentration des Extraktionspuffers erbrachte im Vergleich zur Variante 1 ebenfalls eine Verbesserung. Damit konnte eine WFR von durchschnittlich 6% bei einer Standardabweichung von 17,3% erzielt werden.

Die statistische Auswertung, d.h. der Vergleich der Mittelwerte der errechneten WFR des *MyrS*-Gens der drei unterschiedlichen Extraktionsverfahren (Variante 1-3) bestätigt die beobachteten Annahmen. Sowohl Variante 2 als auch Variante 3 unterscheiden sich signifikant ( $p < 0,05$ ) von Variante 1 bezüglich der ermittelten WFR des internen Standards *MyrS*. Variante 2 und 3 zeigen dagegen keine signifikanten Unterschiede ( $p > 0,05$ ).

Zur weiteren Analyse dieser Beobachtungen wurde mit den extrahierten DNA-Proben der drei Varianten eine zweite qRT-PCR durchgeführt. Im Gegensatz zur *MyrS*-Bestimmung wurden hierbei allerdings die spezifischen Primer zur Amplifizierung der 16S-Gene von Eubakterien eingesetzt (4.2.4.1). Die Reaktionsbedingungen wurden ebenfalls wie beschrieben übernommen (s. Abbildung 4-17).





**Abbildung 4-17: Vergleich der Genkopien der 16S-Gene für Eubakterien bei unterschiedlicher Aufarbeitung. Verwendet wurden Proben der drei verschiedenen Extraktionsvarianten (s. Abbildung 4-14): Den Proben sechs bis zehn wurden Glaskugeln zugegeben (Variante 2), die Proben elf bis 15 wurden mit modifiziertem Extraktionspuffer mit höherer Salzkonzentration behandelt (Variante 3). Verwendet wurde organische Auflage des Zeitpunkts T2 der Säule drei des ersten Frost-Auftau-Experiments. n= 3+SD. Alle Resultate sind bezogen auf die Menge der gemessenen Gesamt-DNA. Die Standardabweichung ist über den jeweiligen Balken angezeigt.**

Die Resultate der durchgeführten RT-PCR zur Quantifizierung des eingesetzten internen Standards (*MyrS*-Gen) weichen zum Teil von den Ergebnissen dieser qRT-PCR ab (s. Abbildung 4-16 und 4-17). Der berechnete Mittelwert von Variante 1 unterscheidet sich kaum von denen der modifizierten Ansätze (Variante 2 und 3). Jedoch ist die recht hohe Standardabweichung von 41,5% sowie die Inhomogenität der Proben drei bis fünf insgesamt als schlecht zu beurteilen. Die mittlere Abweichung von Variante 2 (Glaskugeln) ist mit 35,9% nur unwesentlich kleiner, auch hier ist die Heterogenität der Proben sechs bis zehn recht groß. Die Ergebnisse der Variante drei (modifizierter CTAB-Puffer) weisen in diesem Fall die größte Reproduzierbarkeit auf. Sie zeigten eine geringe mittlere Abweichung von 13,5% und eine größere Homogenität zwischen den Messwerten (s. Abbildung 4-17).

Der statistische Vergleich der Mittelwerte der 16S Genkopien für Eubakterien wurde für alle drei Varianten mittels t-Test durchgeführt. Es zeigte sich, dass sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den jeweiligen Varianten ermitteln lassen.

## 5 Diskussion und Ausblick

Böden emittieren nach einem Frostereignis während des Auftauens höhere Mengen des Treibhausgases  $N_2O$  (Christensen und Tiedje, 1990). Dies kann im Extremfall einen Anteil von bis zu 70% der gesamten Emission eines Jahres darstellen und wurde sowohl auf landwirtschaftlich genutzten Böden wie auch auf Waldböden beobachtet (Röver et al 1998; Papen und Butterbach-Bahl, 1999). Ursache für die  $N_2O$ -Emissionen aus Böden ist die Umsetzung von Stickstoff (N) durch Bodenmikroorganismen (Philippot, 2002; Smith, 1982).

Die beobachteten Maxima der Emissionsraten in der Auftauphase nach einem Frostereignis werden dadurch erklärt, dass ein Großteil der im Boden lebenden Organismen bedingt durch die negativen Temperaturen zerstört werden. Demzufolge steht den überlebenden Organismen während der Auftauphase ein Überangebot an Nährstoffen zur Verfügung (freigesetzt aus zerstörten Mikroorganismen). Eine enorm gesteigerte mikrobielle Aktivität wäre die Folge und als Ursache für die hohen  $N_2O$ -Emissionsraten zu nennen (Christensen und Christensen, 1991; Flessa et al., 1995).

Zur Erforschung der an diesen N-Umsetzungen beteiligten Bakteriengruppen und ihrer physiologischen Aktivität, sind molekularbiologische Methoden eine sinnvolle Ergänzung zu den klassischen mikrobiellen Methoden, da über 99% der Mikroorganismen nicht kultivierbar sind (Wagner et al., 1993). Die Entwicklung neuer molekularbiologischer Techniken, vor allem die Möglichkeit zur Amplifizierung von 16S rRNA-Genen, hat im letzten Jahrzehnt zur Entdeckung von vielen neuen Mikroorganismen geführt (Pace, 1997). Die Bestimmung und Charakterisierung von unkultivierten Mikroorganismen wird ermöglicht durch den Einsatz geeigneter Markergene, wie z.B. des 16S rRNA-Gens (Olsen et al., 1986). Zusätzlich lassen sich auf Basis des genetischen Potentials metabolisch relevante Eigenschaften ableiten, wie z.B. die Umsetzung von Stickstoff in Böden (Philippot, 2002). In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, mit Hilfe von molekularbiologischen Methoden (qRT-PCR) Veränderungen der an den N-Umsetzungsprozessen im Boden beteiligten Bakteriengruppen in der Auftauphase nach einem Frostereignis zu quantifizieren. Grundvoraussetzung für diese Methodik sind klonier- und identifizierbare Nukleinsäuren, die mit hohem Reinheitsgrad aus dem Boden

extrahiert werden müssen. Die Überprüfung der Reproduzierbarkeit und Präzision der Extraktion und Isolierung dieser Nukleinsäuren war ebenfalls Gegenstand der Diplomarbeit.

## 5.1 N<sub>2</sub>O-Emissionen aus den „Höglwald“-Bodensäulen

Die gemessenen Flussraten der N<sub>2</sub>O-Emissionen der Bodensäulen aus dem „Höglwald“ lagen nach dem Auftauen im Bereich von 0,1 bis 94 µg N<sub>2</sub>O-N m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup>, wobei die Emissionsraten der einzelnen Säulen untereinander sehr stark differierten (4.1). Der jeweilige Mittelwert der gemessenen Flussraten lag im niedrigsten Fall bei 4,5 µg N<sub>2</sub>O-N m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup> (Säule zwei) und im höchsten Fall bei 44,5 µg N<sub>2</sub>O-N m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup> (Säule fünf). Die Frostperiode der durchgeführten Versuchsreihe dauerte eine Woche (bei -14°C).

Verglichen mit *in-situ*-Messungen im „Höglwald“, wo die Bodenproben entnommen wurden, liegen die Werte der durchgeführten N<sub>2</sub>O-Messungen deutlich darunter. Papen und Butterbach-Bahl (1999) beobachteten nach einer langen Frostperiode (länger als 2 Monate bei -1,5°C im Mittel) Werte größer als 70 µg N<sub>2</sub>O-N m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup> während der Auftauphase (der gemessene Maximalwert lag bei 480 µg N<sub>2</sub>O-N m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup>).

Generell ist es allerdings gewagt, Werte von Freilandmessungen direkt mit Ergebnissen von Laborversuchen, die unter kontrollierten Bedingungen durchgeführt wurden, zu vergleichen.

Labormessungen zur Erfassung von N<sub>2</sub>O-Emissionen nach einem Frostereignis zeigen Werte derselben Größenordnung an. So haben Hu et al. (2006) bei der Erprobung verschiedener Auftau-Methoden mit intakten Bodensäulen einer ungedüngten landwirtschaftlich genutzten Fläche Mittelwerte von 7,56 bis 46,8 µg N<sub>2</sub>O-N m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup> gemessen. Die dabei simulierte Frostperiode war relativ kurz (-4°C für 27 Stunden, anschließend für 18 Stunden bei -10°C), die Auftautemperatur betrug +10°C. Andere Laboruntersuchungen mit intakten Bodenproben einer landwirtschaftlichen Fläche geben deutlich höhere N<sub>2</sub>O-Emissionen an. Teepe et al. (2001) untersuchten ebenfalls intakte Bodensäulen einer landwirtschaftlichen Fläche und erfassten Mittelwerte von 14 bis 100 µg N<sub>2</sub>O-N m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup>, mit einem Maximalwert von 330 µg N<sub>2</sub>O-N m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup>. Die Intensität der Frostperiode war wesentlich stärker (-16°C für zwei Wochen), die Auftauphase wurde bei Raumtemperatur durchgeführt.

Es liegt somit die Vermutung nahe, dass die Intensität der Frostperiode (Temperatur

und Dauer) einen starken Einfluss auf die Höhe der N<sub>2</sub>O-Emissionen während der Auftauphase hat.

Ein direkter Vergleich mit Resultaten ähnlicher Laborversuche kann jedoch nicht auf die Stärke des Frostereignisses reduziert werden. So weisen z.B. unterschiedliche Bodentypen verschieden hohe Lachgasemissionen auf (Koponen et al., 2004). Ebenso ist der Wassergehalt der Bodenproben entscheidend für die Höhe des emittierten N<sub>2</sub>O (Koponen und Martikainen, 2004). Je höher der Anteil der mit Wasser gefüllten Bodenporen (WFPS) ist, desto höher liegt die messbare Emission (für WFPS-Werte von 50-90%) (Kamp et al., 2001).

Der Kurvenverlauf der gemessenen N<sub>2</sub>O-Flussraten zeigte bei allen Bodensäulen zwei Maxima (Peaks), die je nach Säule unterschiedlich stark ausgeprägt waren. Das erste Maximum lag innerhalb der ersten 25 Stunden nach dem Auftauen und erreichte lediglich Höchstwerte von 43 µg N<sub>2</sub>O-N m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup>. Das zweite Maximum war deutlich stärker ausgeprägt und erstreckte sich über einen längeren Zeitraum (150 bis 220 Stunden nach dem Ende der Frostperiode).

Andere Studien mit intakten Bodensäulen messen dagegen nur ein markantes Emissionsmaximum während der Auftauphase. Dieses trat innerhalb der ersten Stunden nach Beenden der Frostperiode auf, 30 bis 40 Stunden nach dem Auftauen verringern sich die gemessenen N<sub>2</sub>O-Emissionsraten (Kamp et al., 2001, Primé und Christensen, 2001). Dagegen konnten Sharma et al. (2006) mit homogenisierten Bodenproben erst fünf Tage nach dem Auftauen den transienten Anstieg der N<sub>2</sub>O-Emission beobachten (maximale Konzentrationen der entnommenen Gasproben betragen 6 ppm). Die dabei verwendeten Bodenproben waren zerkleinert, gesiebt und anschließend in Säulen gefüllt. Daher sollte ein Vergleich mit diesen Werten nur unter Vorbehalt durchgeführt werden, da sämtliche Bodenstrukturen zerstört wurden und größere Bodenpartikel selektiv entfernt wurden.

Das erste kleinere Emissionsmaximum der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen könnte auf die rein physikalisch bedingte Freisetzung des im Boden akkumulierten N<sub>2</sub>O zurückzuführen sein, das bei Temperaturen unterhalb des Gefrierpunkts nicht mehr frei diffundieren kann (Burton und Beauchamp, 1994). Demnach würde das zweite zeitlich spätere aber viel stärker ausgeprägte Maximum die N<sub>2</sub>O-Emissionsraten darstellen, die (bedingt durch eine starke Zunahme

mikrobieller Aktivität) nach einem Frostereignis auftreten (Primé und Christensen, 2001).

Ausgehend von der Tatsache, dass die Bodensäulen nach der Entnahme relativ lange bei +4°C gelagert wurden, könnte auch eine andere Ursache den beobachteten Verlauf der N<sub>2</sub>O-Emissionen erklären. Viele Mikroorganismen im Boden sind in der Lage, unter schlechten Lebensbedingungen in sogenannte Dauerstadien überzugehen. Durch physiologische und morphologische Anpassungen sind sie dann in der Lage, längere Zeit zu überleben. Bei einer Verbesserung der Lebensbedingungen können sie wieder aktive Formen annehmen (Schlegel, 1985). Diese Umwandlung bedingt möglicherweise die gemessenen zeitverzögerte N<sub>2</sub>O-Emissionen.

Die beobachtete Variabilität bezüglich der Höhe sowie des zeitlichen Verlaufs der N<sub>2</sub>O-Emissionen zwischen den Bodensäulen wird auch in anderen Untersuchungen festgestellt (Primé und Christensen, 2001).

Aufgrund der unterschiedlichen Versuchsbedingungen jeder Studie (z.B. bezüglich Bodentyp, Wassergehalt des Bodens und Intensität des Frostereignisses) erscheint jedoch ein direkter Abgleich der Ergebnisse nicht sinnvoll.

## **5.2 Konzentration und Reinheit der durchgeführten Extraktionen der „Höglwald“-Bodenproben**

Die Mengen der aus der organischen Auflage extrahierbaren DNA lagen im Mittel bei 4,9 µg pro g Boden mit einer Standardabweichung von 3,94 µg g<sup>-1</sup> (=80%). Die Menge an gleichzeitig extrahierter RNA aus der organischen Auflage betrug im Mittel 4,79 µg pro g Boden bei einer Standardabweichung von 2,64 µg g<sup>-1</sup> berechnet (=55%) (4.2.1). Die erzielte Ausbeute an Nukleinsäuren aus dem Boden erscheint auf den ersten Blick wenig. Ebenso deutet die große Abweichung bei Parallelproben auf eine geringe Zuverlässigkeit der Methoden hin. Vergleiche mit anderen Studien weisen jedoch auf eine ähnliche Ausbeute und Messunsicherheit hin.

Die Ausbeute an DNA und RNA bei Griffith et al. (2000) bei einer gleichzeitig durchgeführten Extraktion lag zwischen 10 und 20 µ DNA bzw. 2 und 5 µl RNA pro Bodentrockengewicht (BTG). Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass diese Aufarbeitung ohne anschließende Reinigung der Nukleinsäuren erfolgte, was sowohl den Verlust der extrahierten Nukleinsäuren als auch die Variabilität der Ausbeute

minimiert (Griffith et al., 2000). Die Qualität, d.h. die Reinheit der extrahierten Nukleinsäuren wurde nicht photometrisch, sondern lediglich über die Durchführbarkeit von PCR-Ansätzen bestätigt. Die anschließende gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte erlaubt jedoch keine präzise Aussage über den Reinheitsgrad der extrahierten Nukleinsäureproben. Außerdem wurde als Bezugsgröße das Trockengewicht des Bodens (BTG) eingesetzt, somit kann kein direkter Abgleich der Ergebnisse der „Höglwald“-Proben erfolgen.

Andere Veröffentlichungen zur Extraktion von DNA aus Boden (ohne RNA) geben teilweise eine höhere Ausbeute an, weisen aber ähnlich hohe Standardabweichungen auf. Zhou et al. (1996) untersuchten acht verschiedene Bodentypen bezüglich der Extraktion von DNA. Die dazu verwendete Methode differiert von der hier benutzten simultanen Aufarbeitung von DNA und RNA. Abhängig vom verwendeten Bodentyp konnte bei Zhou et al. (1996) eine Konzentration von 2,5 bis 27  $\mu\text{g}$  DNA pro g BTG erzielt werden, mit einer mittleren Abweichung von 26%. Die detektierten Unterschiede verschiedener Bodentypen sind darauf zurückzuführen, dass die im Boden vorhandene Menge an Inhibitoren (wie z.B. Humin- oder Fulvinsäuren) je nach Bodentyp starke Unterschiede aufweist (Griffith, 2000). Die hohe Variabilität der Ausbeute in Abhängigkeit des verwendeten Bodenmaterials wurde auch für die Extraktion von RNA bestätigt (Hurt et al., 2001).

Martin-Laurent et al. (2001) führten Untersuchungen zur DNA-Extraktion an drei verschiedenen Böden mit drei unterschiedlichen Methoden durch. Es wurde festgestellt, dass die Ausbeute an DNA der gleichen Bodenprobe in Abhängigkeit der verwendeten Methode bis zu zehn Mal höher war. Die erzielte Ausbeute lag zwischen 0,19 und 2,52  $\mu\text{g}$  DNA pro g Boden bei einer mittleren Standardabweichung von 45%.

Für die Extraktion von RNA aus Boden wurden vergleichbare Zusammenhänge zwischen der Menge an isolierter RNA und der eingesetzten Methode festgestellt (Sessitsch et al., 2002).

Um einen Vergleich von extrahierten Nukleinsäuren aus Bodenmaterial zu ermöglichen, bedarf es somit einer einheitlichen Bezugsgröße (Boden getrocknet oder mit natürlichem Feuchtegehalt) sowie einer einheitlichen Extraktionsmethode. Des Weiteren muss darauf bedacht werden, dass die erzielte Ausbeute abhängig vom untersuchten Bodentyp stark variieren kann.

Die Ausbeute der extrahierbaren Nucleinsäuren (DNA und RNA) aus der organischen Auflage der Fichtenfläche im „Höglwald“ ist demnach nicht auf eine fehlerhafte Aufarbeitung zurückzuführen. Die technischen Möglichkeiten einer simultanen Extraktion von DNA und RNA sind begrenzt, was sich vor allem aus der Notwendigkeit der Erhaltung der schnell abbaubaren RNA begründet (Felske et al., 1996). Dies hat zur Folge, dass die Aufarbeitung keine vollständige Lyse der im Boden vorhandenen Mikroorganismen ermöglicht und somit ein Teil der Nucleinsäuren nicht erfasst werden kann. Ein weiteres sehr generelles, die Ausbeute stark beeinträchtigendes Problem ist der große Verlust der negativ geladenen Nucleinsäuren durch ihre starke Bindung an Bodenpartikel (Frostegard et al., 1999; Kresk und Wellington, 1999). Zur Erhöhung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wäre eine geringere Variabilität der durchgeführten Extraktionen jedoch sehr wünschenswert.

Bezüglich der Qualität der extrahierten Nucleinsäuren der organischen Auflage erbrachten die durchgeführten Aufreinigungen zufriedenstellende Ergebnisse. Die photometrischen Messungen bestätigten den angestrebten Reinheitsgrad der Nucleinsäuren durch die Auswertung der angezeigten Extinktionen. Die Quotienten der Extinktionen 260 nm/ 230 nm bzw. 260 nm und 280 nm lagen zwischen 1,5 und 2,6 (4.2.1).

Jedoch zeigten einige Proben z.B. der Bodensäule vier auffällige Absorptionsspektren, was auf eine Verunreinigung durch Proteine oder Huminsäuren schließen lässt. Die Effektivität von PCR-Untersuchungen wäre folglich negativ beeinflusst (Straub et al., 1994).

Um den Reinheitsgrad solcher Proben zu Erhöhen kann z.B. eine wiederholte Aufreinigung durchgeführt werden. Dies hätte jedoch eine Abnahme der Konzentration der Nucleinsäure zur Folge, was auf Verluste während der Aufarbeitung zurückzuführen ist (Griffith et al., 2000). Eine andere Möglichkeit, eventuelle Verunreinigungen zu verringern, liegt in der Verdünnung der Proben. Eine gleichzeitige Abnahme der DNA- bzw. RNA-Konzentration in der Probe wäre die Folge. Deshalb ist diese Alternative nur bei Proben mit hohen Nucleinsäure-Konzentrationen sinnvoll. Der Einsatz sogenannter PCR-Verstärker („enhancer“) ist eine wirksame Methode, um verunreinigte Proben zu behandeln und um gleichzeitig die Konzentration der Nucleinsäuren nicht zu beeinflussen (Kreader, 1995). Nach der

Zugabe solcher „enhancer“ werden die in der Probe vorhandenen Inhibitoren gebunden und der Wirkungsgrad der PCR-Amplifikationen bleibt erhalten. Rinderserumalbumin (BSA) und das T4 Gen 32 Protein haben sich als wirkungsvolle PCR-„enhancer“ erwiesen (Kreader, 1995).

### **5.3 PCR-Ansätze (Polymerase Chain Reaction) mit DNA aus „Höglwald“-Boden**

Zur Überprüfung der spezifischen Aktivität der eingesetzten Oligonukleotidprimer für die verschiedenen PCR-Systeme sowie zur optimalen Anpassung der Reaktionsbedingungen, wurden extrahierte DNA-Proben aus Bodenmaterial verwendet, das nicht aus der Versuchsreihe der Gasmessungen stammte. Es handelte sich jedoch um Boden derselben Versuchsfläche („Höglwald“) (3.3.9) Die Verarbeitung war vergleichbar: die Horizonte (organische Auflage und oberer Mineralbodenhorizont) wurden getrennt aufgearbeitet (3.3.1). Eine ausreichende Qualität dieser Proben war gegeben (3.3.3). Störende Einflüsse der Amplifikationen der Genfragmente während der PCR (verursacht durch Inhibitoren in den Proben) konnten somit ausgeschlossen werden.

Die eingesetzten Oligonukleotidprimer wurden der Literatur entnommen. Die Veröffentlichungen bestätigten eine erfolgreiche und spezifische Reaktion der jeweiligen Oligonukleotide (4.2.3). Die Anzahl der Gensequenzen, die in Datenbanken erfasst sind, nimmt exponentiell zu (über 180.000 16S rRNA-Gensequenzen in RDP („Ribosomal Database Project“) im Jahr 2007) (Schmidt, 2006). Daraus resultiert die Notwendigkeit eines regelmäßigen aktuellen Abgleichs der Primer-Sequenzen mit einer rRNA Gendatenbank (wie z.B. die RDP), bevor die spezifische Aktivität der Primer mittels PCR getestet werden kann (Cole et al., 2003). Wie in Kapitel 5.2 beschrieben und diskutiert wurde, existieren große Unterschiede bezüglich der Qualität wie auch der Quantität (Konzentration und Reinheitsgrad) der extrahierten Nukleinsäuren aus unterschiedlichen Bodenproben. Ebenso variiert die Menge der Inhibitoren (z.B. Huminsäuren) je nach Bodentyp (5.2). Aus diesem Grund muss die in der Literatur angegebene spezifische Eignung eines Primers auf den jeweils eingesetzten Proben (extrahierte DNA aus „Höglwald“-Boden) immer überprüft werden. Eine endgültige Bestätigung der spezifischen Effektivität der durchgeführten PCRs wird durch die Sequenzierung der PCR-Produkte und



anschließendem Abgleich mit einer Gendatenbank (BLAST) erreicht.

Die durchgeführten PCR-Ansätze wurden ausgehend von dem Standardansatz den jeweils eingesetzten Primern angepasst und modifiziert, um ein zufriedenstellendes Ergebnis zu erreichen (4.2.2). In einigen Fällen konnten allerdings trotz bestätigter spezifischer Aktivität des Primerpaares (Literatur) sowie einem Datenbankvergleich mit allen bekannten Sequenzen keine (spezifische) Genfragmente in der PCR vervielfältigt werden.

Ein Beispiel hierfür ist das funktionelle Gen *NirS*, dessen Genprodukte als Nitritreduktase einen Zwischenschritt in der Denitrifikation katalysieren. Trotz vielfacher Modifikationen der Reaktionsbedingungen des PCR-Ansatzes konnte für dieses Gen kein Resultat erreicht werden. Die in der Literatur untersuchten DNA-Proben aus Bodenmaterial sind nicht mit den verwendeten DNA-Proben aus der organischen Auflage des „Höglwald“-Bodens gleichzusetzen, was die unterschiedliche Effektivität des eingesetzten Primerpaares erklären kann (Kandeler et al., 2006, Kreader, 1995). In diesem Fall wäre das Design eines neuen Oligonukleotidprimerpaares sinnvoll (Henry et al. 2006). Ein neu entworfener Primer muss wiederum mehrfach getestet werden (*in-silico*, *in vitro*, *in vivo*), den endgültigen Beweis der spezifischen Aktivität liefert aber nur ein Sequenzvergleich der gebildeten PCR-Produkte mit den Gendatenbanken (3.3.8).

Für das funktionelle Gen *NosZ*, welches die *NO*-Reduktase in der Denitrifikation kodiert, konnte zwar ein zufriedenstellendes PCR-Ergebnis bezüglich der Menge der amplifizierten Gene erzielt werden. Jedoch zeigte die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte zwei Banden im Agarosegel, was auf eine unterschiedliche Größe der gewonnenen Produkte schließen lässt (3.3.4). Die Klonierung und anschließende Sequenzierung beider Produkte ermöglichten einen Vergleich mit Genen einer Datenbank (BLAST). Dabei zeigte sich, dass die durchgeführte PCR neben einer spezifischen Amplifikation des Ziel-Gens (mit einer Länge von 266 bzw. 267 bp) auch ein unspezifisches Produkt vervielfältigte (mit einer Länge von 220 bzw. 226 bp) (4.2.3). Das getestete Primerpaar (Henry et al., 2006) kann somit nicht für die DNA-Proben des „Höglwald“-Bodens verwendet werden. Um das *NosZ*-Gen mittels PCR-Methoden (herkömmliche PCR oder qRT-PCR) spezifisch amplifizieren zu können

bedarf es daher entweder der Entwicklung und Überprüfung eines neuen Primerpaares (s.o.). Alternativ könnten auch weitergehende Modifikationen des angewandten Reaktionsansatzes ausgetestet werden, um die Spezifität während der PCR zu erhöhen (3.3.9). Dies war jedoch durch die zeitliche Begrenzung der vorliegenden Arbeit nicht möglich.

Ein Großteil der durchgeführten PCR-Ansätze erbrachte gute Resultate. Die in Kapitel 4.2.2 beschriebenen 16S rRNA-Gene zum Nachweis von Gattungen bzw. Gruppen von Mikroorganismen konnten erfolgreich amplifiziert werden (PCR). Ein Vergleich der sequenzierten PCR-Produkte mit einer Gendatenbank (BLAST) bestätigte die Spezifität der isolierten Gene (4.2.3).

#### **5.4 Quantifizierung von Mikroorganismen mittels quantitativer Real-Time-PCR (qRT-PCR) in Bodenproben der Gasmessungen**

Zur Quantifizierung von 16S rRNA-Genkopien des Phylums Eubakterien und der Gruppe der autotrophen Ammonium-Oxidierer wurden DNA-Proben der Bodenproben der organischen Auflage aus der Versuchsreihe verwendet (Gasmessungen) (4.2). Der Nachweis erfolgte mittels qRT-PCR (4.2.4). Von jeder Probe wurden die Werte von drei Parallelmessungen ermittelt, der daraus gebildete Mittelwert wurde zur weiteren Auswertung verwendet. Die Standardabweichung der drei Einzelwerte war insgesamt gering: 11% im Mittel bei allen durchgeführten qRT-PCRs zum Nachweis der Eubakterien, 35% im Mittel beim Nachweis der Ammonium-Oxidierer. Dies spricht für eine hohe Reproduzierbarkeit der Methodik an sich.

Die Bodenproben der organischen Auflage (und analog dazu die DNA-Proben) wurden zum einen unterschieden nach den Entnahmezeitpunkten im Verlauf der Gasmessungen. In der Regel wurden von jeder Bodensäule zwei Proben entnommen, davon wurden jeweils zwei DNA-Extraktionen getrennt durchgeführt. Die Auswertung der qRT-PCR erbrachte zum Teil große Unterschiede zwischen den beiden Proben einer Säule oder gar zwischen den Extraktionen einer Probe (Differenzen von bis zu 150% zwischen zwei Extraktionen) (4.2.4). Es ist sehr wahrscheinlich, dass diese Unterschiede durch eine unterschiedlich gute Extraktion der Nukleinsäuren aus den Bodenproben bedingt sind (5.2). Somit ist zu erwarten, dass durch eine weitere Verbesserung der DNA-Extraktionen eine Erhöhung der

Reproduzierbarkeit der qRT-PCR-Ergebnisse erreicht werden kann.

Zusätzlich könnte die Variabilität insgesamt minimiert werden, indem man die Bodenproben lediglich nach ihren Entnahmezeitpunkten einteilt und untersucht. Eine Vereinigung beider Proben (sowie beider Extraktionen) zur Durchführung der qRT-PCR würde vermutlich ein stabileres Ergebnis mit geringerer Standardabweichung nach sich ziehen. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass daraus resultierend nur noch eine Unterscheidung nach den Entnahmezeitpunkten erfolgen kann. Die Erfassung der Variabilität innerhalb einer Bodensäule (begründet auf der Inhomogenität des Bodens) wäre nicht mehr möglich.

Wie aus der Literatur zu erwarten war (Hermansson und Lindgren, 2001), waren die Mengen an Genkopien zum Nachweis der autotrophen Ammonium-Oxidierer sehr gering. Mit Hundert bis Tausend Genkopien pro ng Gesamt-DNA lagen die Werte deutlich unter den Mengen für die anderen untersuchten Gene für Eubakterien (5.2). Um eine Optimierung der qRT-PCR zum Nachweis dieser Organismengruppe zu bewirken, ist eine Erhöhung der Zyklenzahl angezeigt. Zudem ermöglicht der Einsatz eines Standards mit einer Konzentration von  $10^1$  µl Genkopien pro 5 µl eine präzisere Auswertung bei geringen Kopienzahlen.

Ein Vergleich der Ergebnisse der durchgeführten qRT-PCR-Systeme (Bestimmung der 16S Genkopienzahlen für Eubakterien und für die Gruppe der Ammonium-Oxidierer) lässt den Schluss zu, dass die hohe Standardabweichung beim Nachweis der Gruppe der Ammonium-Oxidierer (durchschnittlich 35%) im Zusammenhang mit der ermittelten, sehr geringen Genkopienzahl zu sehen ist. Durch weitere Verbesserungen des Reaktionsansatzes der qRT-PCR, wie beispielsweise eine Erhöhung der Zyklenzahl, könnte ein höheres Ergebnis der Gesamtkopienzahl erreicht werden und daraus resultierend eine höhere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der qRT-PCR erzielt werden.

Basierend auf den gemessenen N<sub>2</sub>O-Emissionsraten des zweiten Frost-Auftau-Versuchs mit Bodensäulen der Versuchsfläche „Höglwald“ konnten die Emissionen zu den verschiedenen Zeitpunkten der Bodenprobenentnahme ermittelt werden (4.2). Die Abhängigkeit zwischen der beobachteten N<sub>2</sub>O-Emission (der jeweiligen Bodensäule) und der mittels qRT-PCR quantifizierten Menge an 16S DNA Genkopien der Gruppe der Ammonium-Oxidierer in Bodenproben der organischen

Auflage des jeweiligen Zeitpunkts konnte somit errechnet werden. Die berechnete Korrelation zeigte einen positiven Trend, jedoch ergibt der ermittelte Korrelationskoeffizient ( $r^2=0,0727$ ) keine Beweis für eine Abhängigkeit.

Ein Grund dafür kann in den z.T. sehr hohen Standardabweichungen gesehen werden (s. Abbildung 4-12).

Ammonium-Oxidierer sind bei der Nitrifikation für den ersten Teilschritt verantwortlich, nämlich die Umsetzung von  $\text{NH}_3$  bzw.  $\text{NH}_4^+$  (s. Abbildung 2-1). Die Bildung (und somit mögliche Freisetzung) von  $\text{N}_2\text{O}$  aus dem Boden erfolgt jedoch erst in den nachfolgenden Teilschritten der Nitrifikation bzw. der Denitrifikation (s. Abbildung 2-1 und 2-2). Demzufolge ist eine direkte Abhängigkeit der  $\text{N}_2\text{O}$ -Emissionen aus dem Boden zur quantifizierten Anzahl der Mikroorganismen der Gruppe der Ammonium-Oxidierer eher fragwürdig. Um ein genaues Bild der für die im zweiten Frost-Auftau-Experiment gemessenen  $\text{N}_2\text{O}$ -Emissionsraten verursachenden Bodenmikroorganismen zu erhalten, bedarf es weiterführender Quantifizierungen anderer Organismen in der organischen Auflage der verwendeten Bodenproben des „Höglwalds“.

Des Weiteren muss beachtet werden, dass extrazelluläre DNA-Fragmente sehr lange Zeit an Bodenpartikeln haften bleiben können (Lorentz und Wackernagel, 1994). Mit den in dieser Untersuchung angewendeten Verfahren kann nicht unterschieden werden, ob die extrahierte DNA aus lebenden und aktiven Mikroorganismen extrahiert wurde oder ob es sich um extrazelluläre DNA-Fragmente bzw. um extrahierte DNA aus toten Mikroorganismen handelt. Zu diesem Zweck bedarf es einer Untersuchung auf RNA-Ebene. RNA wird zum einen sehr schnell abgebaut (durch Nukleasen), d.h. es können keine falsch hohen quantitativen Ergebnisse durch extrazelluläre RNA, die aus Bodenmaterial extrahiert wurde, auftreten. Zum anderen zeigt die Höhe der gemessenen, aus Boden extrahierten RNA-Konzentration die momentane Aktivität der Bodenmikroorganismen an.

## **5.5 Präzisionskontrolle der Extraktionsmethode und Bestimmung von Verlusten während der Aufarbeitung**

Die Auswertung der durchgeführten Extraktionen von Nukleinsäuren aus Bodenproben des „Höglwalds“ zeigte eine sehr hohe Variabilität bezüglich der Ausbeute an DNA und RNA (4.2.1). Um eventuelle Fehler während der Aufarbeitung

auszuschließen, wurde eine Präzisionskontrolle mit Bodenproben eines homogenen Pulvers der organischen Auflage durchgeführt (4.2.5).

Vergleicht man die Ergebnisse der Extraktionen dieser Parallelproben mit denen der Proben aus der Versuchsreihe (Gasmessungen), so ergeben sich Konzentrationen derselben Größenordnung von DNA und RNA (4.2.5). Die ermittelten Werte der Parallelproben lagen im Mittel bei 5,44 µg DNA pro g Bodengewicht, bei einer mittleren Standardabweichung von 24,8%. Für RNA konnte ein Durchschnittswerte von 2,71 µg RNA pro g Bodengewicht mit einer mittleren Abweichung von 42% bestimmt werden.

Die hohe Variabilität zwischen den untersuchten und theoretisch identischen Parallelproben repräsentiert keine zufriedenstellende Reproduzierbarkeit der Extraktionsmethode.

Jedoch beschreibt eine Untersuchung von Bach et al. (2002) eine ähnlich hohe Variabilität. Fünf parallele Bodenproben wurden mittels drei unterschiedlichen Extraktionsmethoden aufgearbeitet (nur DNA) und quantifiziert (TaqMan-PCR). Dabei wurde eine Standardabweichung von maximal 44% je nach Extraktionsmethode sowie bis zu 57% zwischen den Parallelproben (im Mittel 48%) zwischen den Ergebnissen der Quantifizierung (TaqMan PCR) festgestellt.

Vergleiche mit anderen Studien weisen auf eine ähnlich hohe Variabilität zwischen extrahierten Nukleinsäuregehalten aus Bodenmaterial in Parallelproben hin. In Kapitel 5.2 wurden bereits genaue Angaben darüber gemacht sowie mögliche Ursachen für diese Beobachtungen gegeben.

Unter anderem kann ein möglicher Grund für eine unterschiedlich hohe Ausbeute an DNA bzw. RNA bei der Extraktion aus homogenen Bodenproben durch verschieden hohe Verluste während der Aufarbeitung bedingt sein. Um diese Verluste an Nukleinsäuren quantifizieren zu können, wurde ein interner Standard (mit bekannter DNA-Konzentration) verwendet (Gen der Myrcensynthase aus der Steineiche, AJ 304839, Fischbach et al., 2001). Die berechnete Wiederfindungsrate (WFR) des internen Standards aus der organischen Auflage betrug im Durchschnitt 6,8%.

Verglichen mit Werten aus der Literatur bestätigt sich diese scheinbar niedrige Wiederfindungsrate (WFR). Frostegård et al. (1999) führten Untersuchungen zur WFR an verschiedenen Böden mit unterschiedlichen Extraktionsmethoden (nur DNA) durch. Dabei wurden sechs Bodentypen verwendet, die sowohl bezüglich ihres

Tongehalts wie auch des Anteils an organischer Bodensubstanz differierten. Als interner Standard wurde  $\lambda$ -Phagen-DNA (23 kb) verwendet. In der Bodenprobe mit dem höchsten Tongehalt (tropischer Boden) konnte die eingesetzte Phagen-DNA nach der Aufarbeitung nicht bestimmt werden, die anderen Proben zeigten WFR von 3,6 bis 24%, wobei die höchste WFR in einem Boden mit niedrigem Tongehalt (13%) berechnet wurde.

Mindestens 75 bis 90% der zugegebenen DNA ( $\lambda$ -Phage) blieben demnach an die Bodengrundsubstanz (Matrix) gebunden. Dies konnte auch in anderen Untersuchungen festgestellt werden (Lee et al., 1996). Zudem wurde eine Abhängigkeit der berechneten WFR zum jeweiligen Tongehalt der Bodenproben beobachtet (Frostegård et al., 1999). Aus diesem Grund kann ein direkter Vergleich der Ergebnisse mit den Resultaten der vorliegenden Arbeit nur unter Vorbehalt erfolgen, da die Bodenproben des „Höglwalds“ einem anderen Bodentyp zugeordnet werden konnten.

Insgesamt gesehen zeigen die Versuche der Präzisionskontrolle und die Überprüfung der Wiederfindung für das interne Standardgen *MyrS*, dass die Extraktionsmethode verbessert werden muss. Eine homogenere Ausbeute an Nukleinsäuren aus dem Boden sollte angestrebt werden, wobei gleichzeitig die Reinheit der Proben gegeben sein muss. Die hätte eine bessere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der RT-PCR-Systeme zur Folge.

Die Verluste an DNA während der Aufarbeitung wurden über die WFR für jede Parallelprobe berechnet. Darüber sollte eine vermeintliche Korrektur der Ergebnisse der durchgeführten qRT-PCRs erfolgen (4.2.5). Jedoch ergab sich daraus eine Verschlechterung der Resultate, die Variabilität der Parallelproben erhöhte sich noch weiter. Der eingesetzte interne Standard (Gen der Myrcensynthase) wurde als reine DNA-Lösung zugefügt. Dagegen lag die untersuchte DNA der Mikroorganismen teils frei im Boden, teils in den Zellen vor. Eine erfolgreiche Extraktion von Nukleinsäuren aus Bodenmaterial setzt aus diesem Grund auch eine effektive Lyse der Zellwände der Mikroorganismen voraus (Frostegård et al., 1999). Ein interner Standard, der als reine DNA zugegeben wird, hat somit keine Aussagekraft über die Wirksamkeit der Lyse und kann demzufolge nicht zur Korrekturberechnung eingesetzt werden. Besser geeignet wäre die Verwendung eines Gens, das in Bakterien vorliegt.

Da die hier durchgeführten Untersuchungen auch Analysen zur Quantifizierung von 16S rRNA für Eubakterien beinhalteten, war jedoch nur der Einsatz von reiner DNA als interner Standard (*MyrS*-Gen) möglich. Durch die Verwendung eines Gens, das in Bakterien vorliegt, wären die ermittelten Ergebnisse der qRT-PCR (zum Nachweis von 16S rRNA-Genen für Eubakterien) falsch positiv errechnet worden, da der eingesetzte Standard zu den in der Probe vorhandenen Genkopien addiert würde.

Die durchgeführten Versuche mit Adaptionen der Extraktionsdurchführung erbrachten gute Resultate (4.2.5). Weiterführende Tests zur Optimierung der Vorgehensweise sind absolut essentiell für ihre spätere Anwendbarkeit auf Bodenproben aus Freiland- oder Lysimeterstudien (wie sie am IMK-IFU geplant sind).

Denkbar wäre die Kombination der beiden getesteten modifizierten Extraktionsansätze (Variante 2 und 3). Das bedeutet, einen besseren mechanischen Aufschluss der Bodenmikroorganismen durch die Verwendung von Glasskugeln beim Homogenisieren der Bodenlösung zu erreichen und gleichzeitig die freigesetzten Nukleinsäuren durch eine Erhöhung der Salzkonzentration des Extraktionspuffers stärker in Lösung zu bringen.

Denkbar wäre auch die Addition eines Lysozyms zum Extraktionsansatz, um Zellwände enzymatisch anzugreifen und so die Wirksamkeit des mechanischen Aufschlusses durch das Pulverisieren in der Laborschwingmühle zu erhöhen. Eine effektive physikalische Zerstörung der Bakterienzellen in den pulverisierten und gelösten Extraktionsansätzen mit Bodenmaterial könnte möglicherweise auch mittels ergänzender Ultraschallbehandlung erreicht werden (Frostegård et al., 1999).

Die beiden beschriebenen Varianten besitzen allerdings den Nachteil, dass ohne vorausgehende spezielle und aufwendige Behandlung der pulverisierten Bodenproben nur DNA extrahiert werden kann, da die im Boden vorhandene RNA sehr schnell abgebaut wird (bei Temperaturen oberhalb des Gefrierpunkts).

## **5.6 Ausblick**

Ziel dieser Arbeit war es, molekularbiologische Verfahren zu entwickeln, um Veränderungen der Zusammensetzung von Mikroorganismen in Waldböden bestimmen zu können. Das Hauptinteresse lag dabei auf den bei der Bildung von

N<sub>2</sub>O (nach einem Frostereignis) beteiligten Mikroorganismen, bzw. der dafür verantwortlichen funktionellen Gene.

Die Überprüfung der Extraktionsmethode zur Isolierung von Nukleinsäuren aus Bodenmaterial brachte zufriedenstellende Ergebnisse (5.2, 5.5). Jedoch sollten weiterführende Anpassungen der Durchführung erprobt werden, um einen besseren mechanischen bzw. chemischen Aufschluss der Zellwände der Mikroorganismen zu erreichen. Die Ausbeute an isolierter Nukleinsäure aus Bodenmaterial sowie die Reproduktivität der Extraktion muß gesteigert werden (5.5).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nur eine gewisse Anzahl an Tests zur Überprüfung der spezifischen Amplifikation von 16S rRNA-Genen (zur taxonomischen Bestimmung von Mikroorganismen) sowie von funktionellen Genen durchgeführt werden. Erfolgreiche Modifikationen der Reaktionsbedingungen wurden demzufolge nur bei einigen Ansätzen erreicht (4.2.2). Da molekularbiologische Verfahren besonders dafür geeignet sind, die große Diversität von Mikroorganismen im Boden zu erfassen, deren Großteil nicht kultivierbar ist, sollten weitere Untersuchungen zur Identifizierung und spezifischen Vervielfältigung dieser Gene erfolgen.

Bedingt durch die hohe Variabilität der Extraktionsmethode von Nukleinsäuren im Boden ist es schwierig, die erzielten quantitativen Ergebnisse (qRT-PCR) zu interpretieren. Es kann nicht unterschieden werden, ob die großen Differenzen zwischen den Resultaten auf tatsächliche Veränderungen der extrahierten DNA-Menge der Bodenproben zurückzuführen sind oder auf die große Heterogenität innerhalb einer Bodenprobe (auf sehr kleinem Maßstab).

Die durchgeführten molekularbiologischen Untersuchungen dieser Arbeit wurden mit Ausnahme der Extraktion ausschließlich mit DNA-Proben durchgeführt. Da extrazelluläre DNA im Boden sehr lange Zeit erhalten bleibt, kann somit nicht unterschieden werden, ob die ermittelten Mengen (qRT-PCR) den Konzentrationen der aktuell aktiven Bakterien entspricht oder auf zurückliegende Aktivitäten schließen lässt. Zur Erfassung der momentanen Aktivität von Mikroorganismen im Boden sind Untersuchungen auf RNA-Ebene wesentlich besser geeignet. Um einen exakten zeitlichen Verlauf zu dokumentieren, sind deshalb weitergehende Analysen in dieser Richtung unumgänglich.



## 6 Literaturverzeichnis

- AGREN, G.I., BOSATTA, E. 1988: Nitrogen saturation of terrestrial ecosystems, *Environmental Pollution* 54, 185-197.
- ALEF, K. 1991: Methodenhandbuch Bodenmikrobiologie: Aktivitäten, Biomasse, Differenzierung, Ecomed Verlagsgesellschaft, Landsberg/ Lech.
- AMANN, R.I., LUDWIG, W., SCHLEIFER K.H. 1995: Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation, *Microbiology Review* 143-169.
- BARETH, G. 2000: Emissionen klimarelevanter Gase aus der Landwirtschaft -Regionale Darstellung und Abschätzung unter Nutzung von GIS am Beispiel des Württembergischen Allgäus, *Hohenheimer Bodenkundliche Hefte*, Heft 56, Universität Hohenheim, Stuttgart.
- BURTON, D.L., BEAUCHAMP, E.G. 1994: Profile nitrous oxide and carbon dioxide concentrations in a soil subjected to freezing, *Soil Science Society American Journal* 58, 115-122.
- BOUWMAN, A.F., VAN DER HOEK, K.W., OLIVER, J.G. 1995: Uncertainty in the global source distribution of nitrous oxide, *Journal of Geophysical Research* 100, 2785-2800.
- BRONSON, K.F., MOSIER, A.R. 1993: Nitrous oxide emissions and methane consumption in wheat and corn-cropped systems in northeastern Colorado. In: *Agricultural Ecosystem Effects on Trace Gases and Global Climate Change*, ASA Spec. Publ. 55, Madison Wisconsin, USA, 133-144.
- BUTTERBACH-BAHL, K., WILLIBALD, G., PAPEN, H., GASCHE, R. 2002: Exchange of N-gases at the spruce and beech sites at the Höglwald Forest – A summary, *Plant and Soil* 240, 117-123.
- CAO, B., HE, F.-Y., XU, Q.-M., YIN, B., CAI, G.-X. 2006: Denitrification losses and N<sub>2</sub>O emissions from nitrogen fertilizer applied to a vegetable field, *Pedosphere* 16 (3), 390-397.
- CHRISTENSEN, S., CHRISTENSEN, B.T. 1991: Organic matter available for denitrification in different soil fractions: Effects of freeze/thaw cycles and straw disposal, *Journal of Soil Science* 42, 637-647.
- CHRISTENSEN, S., TIEDJE, J.M. 1990: Brief and vigorous N<sub>2</sub>O production by soil at spring thaw, *Journal of Soil Science* 41, 1-4.
- COOLEN, M.J.L., HOPMANS, E.C., RIJPSTRA, W.I.C., MUYZER, G., SCHOUTEN, S., VOLKMAN, J.K., DAMSTÉ, J.S.S. 2004: Evolution of the methane cycle in Ace Lake

- (Antarctica) during the Holocene: response of methanogens and methanotrophs to environmental change, *Organic Geochemistry* 35, 1151-1167.
- DAIMS, H., BRÜHL, A., AMMANN, R., SCHLEIFER, K.-H., WAGNER, M. 1999: The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set, *Systematic Applied Microbiology* 22, 434-444.
- DAVIDSON, E.A., SWANK, W.T. 1986: Environmental parameters regulating gaseous nitrogen losses from two forested ecosystems via nitrification and denitrification, *Applied Environmental Microbiology* 52, 1287-1292.
- DAVIDSON, E.A. 1991: Fluxes of nitrous oxide and nitric oxide from terrestrial ecosystems. In: Rogers, J.E., Whitman, W.B. (Eds.), *Microbial Production and Consumption of Greenhouse Gases: Methane, Nitrogen Oxides and Halomethanes*, American Society for Microbiology, 219–235.
- DEGRANGE, V., BARDIN, R. 1995: Detection and counting of *Nitrobacter* populations in soil by PCR, *Applied Environmental Microbiology* 61, 2093-2098.
- EMMERLING, C., SCHLOTTER, M., HARTMANN, A., KANDELER, E. 2002: Functional diversity of soil organisms- a review of recent research activities in Germany, *Plant Nutrition Soil Science* 165, 408-420.
- ERNST, M. 1997: N<sub>2</sub>O und CH<sub>4</sub> Flußraten einer Ackerfläche- Quantifizierung, Parametrisierung und Frost-/ Tauzyklus im Winter, Dissertation Universität Braunschweig.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) 2001: Global estimates of gaseous emissions of NH<sub>3</sub>, NO and NO<sub>2</sub> from agricultural land, Rome.
- FIERER, N, JACKSON, J.A., VILGALYS, R., JACKSON, R.B. 2005: Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays, *Applied Environmental Microbiology* 71 (7), 4117-4120.
- FIRESTONE, M.K., TIEDJE, J.M. 1979: Temporal change in nitrous oxide and dinitrogen from denitrification following onset of anaerobiosis, *Applied Environmental Microbiology* 38, 673-679.
- FIRESTONE, M.K. FIRESTONE, R.B., TIEDJE, J.M. 1980: Nitrous oxide from soil denitrification: factors controlling biological production, *Science* 208, 749-751.
- FIRESTONE, M.K. 1982: Biological denitrification, *Nitrogen in Agricultural Soils—*

- Agronomy Monograph no. 22, ASA-CSSA-SSSA, Madison, Wisconsin, USA, 289–326.
- FIRESTONE, M.K., DAVIDSON, E.A. 1989: Microbiological basis of NO and N<sub>2</sub>O production and consumption in soil in Exchange of Trace Gases between Terrestrial Ecosystems and the Atmosphere, edited by M.O. Andreas and D.S. Schimel, 7-21, John Wiley, New York.
- FISCHBACH R. J., ZIMMER W., SCHNITZLER J.-P. 2001: Isolation and functional analysis of a cDNA encoding a myrcene synthase from holm oak (*Quercus ilex* L.), Eur. J. Biochem. 268, 5633-5638.
- FLESSA, H., DÖRSCH, P. AND BEESE, F. 1995: Seasonal variation of N<sub>2</sub>O and CH<sub>4</sub> fluxes in differently managed arable soils in southern Germany, Journal of Geophysical Research 100, 23115–23124.
- GASCHE, R. 1998: Ganzjährige Messungen zur Quantifizierung der NO/ N<sub>2</sub>O-Flüsse in einem Stickstoff-übersättigten Waldökosystem (Höglwald) und Identifizierung der an der N-Oxid-Emission beteiligten mikrobiellen Prozesse, Schriftenreihe des Fraunhofer Instituts für Atmosphärische Umweltforschung, Bd. 51.
- GRANLI, T., BØCKMAN, O.C. 1994a: Nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) emissions from soils in warm climates, Fertilizer Research 42, 159-163.
- GRANLI, T. & O. BØCKMANN 1994b: Nitrous oxide from agriculture, Norwegian journal of agricultural sciences, supplement No. 12.
- GRIFFITHS, R.I., WHITELEY, A.S., O'DONNELL, A.G., BAILEY, M.J. 2000: Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition, Applied Environmental Microbiology, 5488-5491.
- HAAS, P. 2008: Der Einfluss der Baumart auf Bruttoreaten der N-Umsetzungen im Mineralboden eines N-gesättigten Waldökosystems (Höglwald, Süd-Deutschland) – eine zeitlich hoch aufgelöste 15N-Pool-Verdünnungs- und Tracing-Studie, Bachelorarbeit Universität Bayreuth.
- HAUSENBULLER, R.L. 1978: Soil science, principles and practices, second edition, Wm.C. Brown Company Publishers, Dubuque, Iowa.
- HEAD, I. M., SAUNDERS, J. R., PICKUP, R. W. 1998: Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated micro-organisms, Microb. Ecology 35, 1–21.
- HENRY, H.A.L. 2007: Review: Soil freeze–thaw cycle experiments: Trends,

- methodological weaknesses and suggested improvements, *Soil Biology & Biochemistry* 39, 977-986.
- HERMANSSON, A., LINDGREN, P.-E. 2001: Quantification of ammonia-oxidizing bacteria in arable soil by Real-Time PCR, *Applied Environmental Microbiology* 67 (2), 972-976.
- HEYWOOD, V.H. 1995: *Global Biodiversity Assessment*, Cambridge: Cambridge University Press.
- HOFFMANN, C., ANGER, M., KÜHBAUCH, W. 2002: N<sub>2</sub>O-Freisetzung auf gemähtem Dauergrünland in Abhängigkeit von Standort und N-Düngung, *Journal of Agronomy and Crop Science* 187 (3), 153-159.
- HUBER, C. 1997: Untersuchungen zur Ammoniakimmission und zum Stoffhaushalt auf ungekalkten und neugekalkten Flächen in einem stickstoffübersättigten Fichtenökosystem (Höglwald), *Reihe Ökologie*, 1-183, Hieronymus-Verlag.
- HURT, R.A., QIU, X., WU, L., ROH, Y., PALUMBO, A.V., TIEDJE, J.M., ZHOU, J. 2001: Simultaneous Recovery of RNA and DNA from Soils and Sediments, *Applied Environmental Microbiology*, 4495-4503.
- IPCC (2007): SOLOMON, S., QIN, D., MANNING, M., CHEN, Z., MARQUIS, M., AVERYT, K.B., TIGNOR, M. UND MILLER, H.L. (Eds.): Zusammenfassung für politische Entscheidungsträger, in: *Klimaänderung 2007: Wissenschaftliche Grundlagen, Beitrag der Arbeitsgruppe I zum Vierten Sachstandsbericht des Zwischenstaatlichen Ausschusses für Klimaänderung (IPCC)*, Cambridge University, Press, Cambridge, United Kingdom und New York, NY, USA.
- KANDELER, E., DEIGLMAYR, K., TSCHERKO, D., BRU, D., PHILIPPOT, L. 2006: Abundance of *narG*, *nirS*, *nirK*, and *nosZ* Genes of Denitrifying bacteria during Primary Successions of a Glacier Foreland, *Applied Environmental Microbiology*. 72 (9), 5957-5962.
- KAMMAN, C., GRÜNDHAGE, L., JACOBI, S. AND JÄGER, H.-J. 1998: Seasonal variability and mitigation options for N<sub>2</sub>O emissions from differently managed grasslands, *Environmental Pollution* 102 (S1), 179–186.
- KLAPPENBACH, J.A., DUNBAR, J.M., SCHMIDT, T.M., 2000: rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria, *Applied Environmental Microbiology* 66, 1328–1333.
- KNIPPERS, R. 1997: *Molekulare Genetik*, Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- KOWALCHUCK, G.A., STEPHEN, J.R., DE BOER, W., PROSSER, J.I., EMBLEY, T.M.,

- WOLDENDORP, J.M. 1997: Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the  $\beta$  subdivision of the class Proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments, *Applied Environmental Microbiology* 63 (4), 1489-1497.
- KREADER, C.A. 1996: Relief of Amplification Inhibition in PCR with Bovine Serum Albumin or T4 Gene 32 Protein, *Applied Environmental Microbiology*. 62 (3), 1102-1106.
- KREUTZER, K., BITTERSOHL, J. 1986: Untersuchungen über die Auswirkungen des sauren Regens und der kompensatorischen Kalkung im Wald, *Forstwiss.Cbl.*105, 273-282.
- KREUTZER, K., WEISS, T. 1998: The Höglwald field experiments- aims, concept and basic data, *Plant and Soil*, 199, 1-10.
- LAVERMAN, A.M., ZOOMER, H.R., ENGELBRECHT, D., BERG, M.P., STRAALEN, N.M., VAN VERSEVELD, H.W., VERHOEF, H.A. 2000: Soil layer-specific variability in net nitrification and denitrification in an acid coniferous forest, *Biology & Fertility of Soils* 32, 427-434.
- LIPSON, D.A., SCHMIDT, S.K. 2004: Seasonal changes in an alpine soil bacterial community in the Colorado Rocky Mountains, *Applied Environmental Microbiology* 70, 2867-2879.
- MATEJEK, B., KOHLPAINTNER, M., GASCHE, R., HUBER, C., DANNENMANN, M., PAPEN, H. 2008: The small-scale pattern of seepage water nitrate concentration in an N saturated spruce forest is regulated by net N mineralization in the organic layer, *Plant and Soil* 310, 167-179.
- MOSIER, A., KROEZE, C. 1998: A new approach to estimate emissions of nitrous oxide from agriculture and its implications to the global N<sub>2</sub>O budget, *IGACTivities news Letter* 12, 17-25.
- MRKONJIC, M., ENGEL, M., GATTINGER, A., EMBACHER, A., BAUSENWEIN, U., SOMMER, M., MUNCH, J.C., SCHLOTTER, M., in press: Spatial and temporal variability of soil proteolytic bacteria and their activities in an arable field, *Applied Environmental Microbiology*.
- OKANO, Y., HRISTOVA, K. R., LEUTENEGGER, C. M., JACKSON, L. E., DENISON, R. F., GEBREYESUS, B., LEBAUER, D., AND SCOW, K. M. 2004: Application of real-time PCR to study effects of ammonium on population size of ammonia-oxidizing bacteria in soil, *Applied Environmental Microbiology* 70,1008–1016.

- PACE, N.R. 1997: A molecular view of microbial diversity and the biosphere, *Science* 276, 734-740.
- PAPEN, H., BUTTERBACH-BAHL, K. 1999: A 3-year continuous record of nitrogen trace gas fluxes from untreated and limed soil of a N-saturated spruce and beech forest ecosystem in Germany, *Journal of Geophysical research*, Vol. 104, No. D15, 18487-18503.
- PETIT, J.R. ET AL. 1999: Climate and atmospheric history of the past 420.000 years from the Vostok ice core, Antarctica, *Nature* 399, 429-436.
- RAEYMAEKERS, L. 2000: Basic principles of quantitative PCR, *Molecular Biotechnology* 15, 115–122.
- ROSADO, A.S., SELDIN, L., WOLTERS, A.C., VAN ELSAS, J.D. 1996: Quantitative 16S rDNA-targeted polymerase chain reaction and oligonucleotide hybridization for the detection of *Paenibacillus azotofixans* in soil and the wheat rhizosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* 19, 153-164.
- ROTHER, A. 1997: Einfluss des Baumartenanteils auf Durchwurzelung, Wasserhaushalt, Stoffhaushalt und Zuwachsleistung eines Fichten- Buchen-Mischbestandes am Standort Höglwald, *Forstliche Forschungsberichte München*, Bd. 163.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. 1989: *Molecular cloning – a laboratory Manual*, Zweite Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- SCHMIDT, S.K., LIPSON, D.A. 2004: Microbial growth under the snow: implications for nutrient and allelochemical availability in temperate soils, *Plant Soil* 259, 1-7.
- SCHLEGEL, H.G. 1985: *Allgemeine Mikrobiologie*, 6.Auflage, Thieme, Stuttgart
- SHARMA, S., SZELE, Z., SCHILLING, R., MUNCH, J.C., SCHLOTTER, M. 2006: Influence of Freeze-Thaw Stress on the Structure and Function of Microbial Communities and Denitrifying Populations in Soil, *Applied Environmental Microbiology* 72, 2148-2154.
- SHARMA, S., RADL, V., HAI, B., KLOOS, K., FUKA, M.M., ENGEL, M., SCHAUSS, K., SCHLOTTER, M. 2006: Review: Quantification of functional genes from prokaryotes in soil by PCR, *Journal of Microbiological Methods* 68 (2007), 445-452.
- SMITH, O.L. 1982: *Soil Microbiology: a model of decomposition and nutrient cycling*, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida.
- SIX, J., BOSSUYT, H., DEGRYSE, S., DENEFF, K. 2004: A history of research on the link

- between (micro)aggregates, soil biota, and soil organic matter dynamics, *Soil Tillage Research* 79, 7-31.
- STEVENSON, F.J. 1986: Cycles of soil, Carbon, nitrogen, phosphorus, sulphur, micronutrients, Wiley-Interscience publication, Wiley&Sons, New York.
- STUBNER, S. 2002: Enumeration of 16S rDNA of *Desulfotomaculum* lineage 1 in rice field soil by real-time PCR with SybrGreen (TM) detection, *Journal of Microbiology Methods* 50,155–164.
- TORSVIK, V., OVREAS, L., THINGSTAD, T.F. 2002: Prokaryotic diversity--magnitude, dynamics and controlling factors, *Science* 296, 1064-1066.
- TEEPE, R., BRUME, R., BEESE, F. 2001: Nitrous oxide emission from soil during freezing and thawing periods, *Soil Biology and Biochemistry* 33, 1269-1275.
- TIETEMA, A., BOUTEN, W., WARTENBERGH, P.E. 1991: Nitrous oxide dynamics in an oak-beech forest ecosystem in the Netherlands, *Forestry Ecological Management* 44, 53-61.
- UMAROV, M.M. 1990: Biotic sources of nitrous oxide. In: A.F. Bouwman, A.F.(ed.): *Soils and the Greenhouse Effect*, 263-268, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, U.K..
- WAGNER, M., AMANN, R., LEMMER, H., AND SCHLEIFER, K.H. 1993: Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure, *Applied Environmental Microbiology* 59, 1520-1525.
- WALLENSTEIN, M.D., VILGALYS, R.J. 2005: Quantitative analyses of nitrogen cycling genes in soils, *Pedobiologia* 49, 665-672.
- WOESE, C.R., FOX, G.E. 1977: Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74 (11), 5088-5099.
- WRAGE, N., VELTHOF, G.L., VAN BEUSICHEM, M.L., OENEMA, O. 2001: Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide, *Soil Biology and Biochemistry* 33, 1723-1732.
- ZOU, J., HUANG, Y., ZHENG, X., WANG, Y. 2007: Quantifying direct N<sub>2</sub>O emissions in paddy fields during rice growing season in mainland China: Dependence on water regime, *Atmospheric Environment* 41 (37), 8030-8042.

## 7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### 7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1:	Teilschritte der Nitrifikation mit den jeweiligen Enzymen (nach Smith, 1982).	11
Abbildung 2-2:	Die vier Teilschritte der Denitrifikation mit den jeweiligen Enzymen (nach Philippot, 2002).	12
Abbildung 4-1:	N <sub>2</sub> O-Emissionsraten aus Bodensäulen mit „Höglwald“-Boden während und nach dem Auftauen. Dargestellt sind die Werte der zweiten Versuchsreihe mit den Zeitpunkten der Bodenprobenentnahmen.	38
Abbildung 4-2:	Absorptionsspektren von Nukleinsäureextrakten aus der organischen Auflage. Graphische Darstellung der UV-Absorption der isolierten und gereinigten DNA am Beispiel einer Bodenprobe.	42
Abbildung 4-3:	Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration aus Extrakten der organischen Auflage. Die gemessene Konzentration sowie die berechneten Quotienten sind am Beispiel einer Bodenprobe dargestellt.	42
Abbildung 4-4:	Menge der extrahierten DNA und RNA pro eingesetzter Menge der organischen Auflage am Beispiel der Bodensäulen drei und fünf.	43
Abbildung 4-5:	Agarosegele zur Überprüfung der Fragmentlängen ausgewählter 16S RNA Gene in verschiedenen Bakteriengruppen.	48
Abbildung 4-6:	Gelelektrophoretische Überprüfung der Klonierung eines PCR-Fragments der 16S RNA aus Nitrobacter.	51
Abbildung 4-7:	Sequenzvergleich zweier Klonen (Nitrobacter) mit Hilfe von „CLUSTALW2“.	52
Abbildung 4-8:	Quantifizierung der 16S DNA von Eubakterien in der organischen Auflage am Beispiel von drei Bodensäulen zu unterschiedlichen Zeitpunkten des zweiten Frost-Auftau-	57



- Experiments.
- Abbildung 4-9: Korrelation der 16S DNA Genkopienzahlen in der 58 organischen Auflage für Eubakterien in Abhängigkeit der Bezugsgröße „Gesamt-DNA“ und „verwendetes Bodenmaterial“.
- Abbildung 4-10: Quantifizierung der 16S DNA für autotrophe Ammonium- 60 Oxidierer in der organischen Auflage am Beispiel von zwei Bodensäulen zu unterschiedlichen Zeitpunkten des zweiten Frost-Auftau-Experiments.
- Abbildung 4-11: Korrelation der 16S DNA Genkopienzahlen in der 61 organischen Auflage für die Gruppe der Ammonium-Oxidierer in Abhängigkeit der Bezugsgröße „Gesamt-DNA“ und „verwendetes Bodenmaterial“.
- Abbildung 4-12: Korrelation der 16S DNA Genkopienzahlen in der 62 organischen Auflage für die Gruppe der Ammonium-Oxidierer in Abhängigkeit der gemessenen N<sub>2</sub>O-Emissionsraten der jeweiligen Zeitpunkte der Bodenprobenentnahme.
- Abbildung 4-13: Quantifizierung der 16S Eubakterien DNA in 12 65 unabhängigen Extraktionen der gleichen Bodenprobe (Präzisionskontrolle der Methode).
- Abbildung 4-14: Quantifizierung der 16S Eubakterien DNA in zehn 66 unabhängigen Extraktionen der gleichen Bodenprobe (Präzisionskontrolle der Methode).
- Abbildung 4-15: Wiederfindungsrate (WFR) des zu Bodenproben 68 zugesetzten internen Standards (MyrS-Gen) in zwölf Parallelproben.
- Abbildung 4-16: Wiederfindungsrate (WFR) des zu Bodenproben 69 zugesetzten internen Standards (MyrS-Gen) in modifizierten Extraktionsansätzen.
- Abbildung 4-17: Vergleich der Genkopien der 16S-Gene für Eubakterien bei 71 unterschiedlicher Aufarbeitung (modifizierte Extraktionsansätze).

## 7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Zusammenstellung der wichtigsten anthropogen beeinflussten Treibhausgase und ihre Eigenschaften (aus IPCC, 2007).	11
Tabelle 2:	Übersicht der natürlichen und anthropogenen Quellen für N <sub>2</sub> O (nach IPCC, 2007).	12
Tabelle 3:	Erlaubte Codes für Nukleinbasen (nach IUB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology)).	31

## 8 Anhang

### 8.1 Verwendete Materialien und Lösungen

Agarose, hoch rein	Invitrogen, Karlsruhe
Ampicillin Natriumsalz	Roche Diagnostics, Mannheim
Bromphenolblau Natriumsalz	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
Pepton aus Casein, tryptisch verdaut	Roth, Karlsruhe
Phenol, puffergesättigt	Invitrogen, Karlsruhe
Restriktionsenzym <i>Eco</i> RI	Invitrogen, Karlsruhe
Tris [Tris(-hydroxymethyl)-aminomethan]	Roth, Karlsruhe
X-Gal [5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -galaktosid]	Roth, Karlsruhe

Alle weiteren, nicht in obiger Liste aufgeführten Chemikalien wurden entweder von Merck Eurolab (Darmstadt) oder von Roth (Karlsruhe) bezogen.

Agarosegel (zur gelelektrophoretischen Auftrennung von Nukleinsäuren)

0,8 - 2% Agarose (w/v) in 1x TAE-Puffer

(Konzentration der eingesetzten Agarose abhängig von Größe der DNA-Sequenz)

Ampicillin-Stammlösung

50 mg Ampicillin

In 1ml a.dest

(Verdünnung im Medium 1:1000 (v/v), Endkonzentration 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$ )

CTAB-Puffer (Cetyltrimethylammoniumbromid-Puffer)

100 mM Tris/ HCl pH 8

2% CTAB (w/v)

1,4 M NaCl (w/v)

20 mM EDTA (w/v)

0,2% 2-Mercaptoethanol (v/v)

---

LB-Medium (Lauria-Bertani-Medium) zur Anzucht von *E.coli*-Zellen, pH-Wert 7 (nach Sambrook et al., 2001)

1% Pepton aus Casein (w/v)

1% NaCl (w/v)

0,5% Hefeextrakt (w/v)

auf 1 l a.dest

LB-Agar zur Anzucht von *E.coli*-Zellen, pH-Wert 7 (nach Sambrook et al., 2001)

1,5% Agar-Agar (w/v) in LB Medium

Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung (Volumenverhältnis 25:24:1)

500 ml puffergesättigtes Phenol

480 ml Chloroform

20 ml Isoamylalkohol

SOC-Medium (Fertiglösung, Zusammensetzung laut Hersteller Invitrogen, Karlsruhe)

20 g Pepton

5 g Hefeextrakt

3,6 g Glukose (= 20 mM)

1,2 g MgSO<sub>4</sub> (= 10 mM)

0,953 g MgCl<sub>2</sub> (= 10 mM)

0,585 g NaCl (= 10 mM)

0,187 g KCl (= 2,5 mM)

TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer), pH-Wert 8, 50x Stammlösung

242 g Tris (w/v)

60 ml Eisessig (Acetat 96%) (v/v)

18,6 g EDTA (w/v)

In 1 l a.dest

TE-Puffer (Tris-EDTA-Puffer)

10 mM Tris/ HCl pH 7-9 (v/v)

1 mM EDTA (v/v)

Tris-Puffer (Tris-EDTA-Salz-Puffer), pH-Wert 8

100 mM NaCl

10 mM Tris

1 mM EDTA

## 8.2 Verwendete Primer

Es werden folgende Abkürzungen verwendet:

- F: Forward Primer
- 100  $\mu\text{M}$  = 100 pmol  $\mu\text{l}^{-1}$
- R: Reverse Primer

Acid31 (F) (50 $\mu\text{M}$ ):	5'-GAT CCT GGC TCA GAA TC-3'
Actino235 (F) (50 $\mu\text{M}$ ):	5'-CGC GGC CTA TCA GCT TGT TG-3'
Alf685 (R) (100 $\mu\text{M}$ ):	5'-TCT ACG (AG)AT TTC ACC (CT)CT AC-3'
Arch915 (R) (50 $\mu\text{M}$ ):	5'-GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT-3'
Bet680 (R) (100 $\mu\text{M}$ ):	5'-TCA CTG CTA CAC G(CT)G-3'
Cfb319 (F) (50 $\mu\text{M}$ ):	5'-GTA CT GAGA CAC GGA CCA-3'
CTO189fA/B (F) (45 $\mu\text{M}$ ):	5'-GGA GRA AAG CAG GGG ATC G-3'
CTO189fC (F) (45 $\mu\text{M}$ ):	5'-GGA GGA AAG TAG GGG ATC G-3'
Eub338 (F) (50 $\mu\text{M}$ ):	5'-ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG-3'
Eub338II (F) (50 $\mu\text{M}$ ):	5'-ACA CCT ACG GGT GGC TGC-3'
Eub338III (F) (50 $\mu\text{M}$ ):	5'-ACA CCT ACG GGT GGC AGC-3'
Eub518 (R) (50 $\mu\text{M}$ ):	5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3'
Eubak for (F) (100 $\mu\text{M}$ ):	5'-GGT AGT CYA YGC MST AAA CG-3'
Eubak rev (R) (100 $\mu\text{M}$ ):	5'-GAC ARC CAT GCA SCA CCT G-3'
FGPS872 (F) (45 $\mu\text{M}$ ):	5'-CTA AAA CTC AAA GGA ATT GA-3'
FGPS1269' (R) (45 $\mu\text{M}$ ):	5'-TTT TTT GAG ATT TGC TAG-3'
Lgc353 (F) (50 $\mu\text{M}$ ):	5'-GCA GTA GGG AAT CTT CCG-3'
Myrfor1 (F) (50 $\mu\text{M}$ ):	5'-AAC CAT TCC TTG GAG TTC CCA-3'
Myrrev1 (R) (50 $\mu\text{M}$ ):	5'-TGC TTC CAA CCT AGG CAT CCT-3'
NirSF (F)(100 $\mu\text{M}$ ):	5'-AAC GYS AAG GAR ACS GG-3'
NirSR (R) (100 $\mu\text{M}$ ):	5'-GAC TTS GGR TGS GTC TTS AYG AA-3'

NosZ2F (F) (100 µM): 5'-CGC RAC GGC AAS AAG GTS MSS GT-3'  
 NosZ2R (R) (100 µM): 5'-CAK RTG CAK SGC RTG GCA GAA-3'  
 Parch519f (F) (50 µM): 5'-CAG CCG CCG CGG TAA-3'  
 RT1r (R) (90 µM): 5'-CGT CCT CTC AGA CCA RCT ACT G-3'

### 8.3 Archivierte DNA-Sequenzen

Identifizierte Sequenzen (16S rRNA-Genfragmente von Bakterien und Sequenzen von funktionellen Genen (partiell), in der Datenbank des IMK-IFU, Garmisch-Partenkirchen archiviert) von klonierten DNA-Stücken.

#### 8.3.1 Klasse $\alpha$ -Proteobacteria

Alf WO1 (302 bp)

ACTCGCAGTTCCACTCACCTCTCCCATACTCAAGACTATCAGTATCAAAGGCAGT  
 TCTGGAGTTGAGCTCCAGGATTTACCTCTGACTTAATAACCCGCCTACGCACC  
 CTTTACGCCCAGTGATTCCGAGCAACGCTAGCCCCCTTCGTATTACCGCGGCTG  
 CTGGCACGAAGTTAGCCGGGGCTTATTCTTACGGTACCGTCATTATCTTCCCGT  
 ACAAAGAGCTTTACAACCCTAGGGCCTTCATCACTCACGCGGCATGGCTGGAT  
 CAGGCTTGCGCCCATTGTCCAATATTCCCCA

Alf WO2 (302 bp)

ACTCGCAGTTCCACTCACCTCTCCCGGACTCAAGCCTCTCAGTATCAAAGGCAG  
 TTCTGGAGTTGAGCTCCAGGATTTACCCCTGATTTAAAAAGCCGCCTACGTGC  
 GCTTTACGCCCAGTGATTCCGAGCAACGCTAGCCCCCTTCGTATTACCGCGGCT  
 GCTGGCACGAAGTTAGCCGGGGCTTCTTCTACGGGTACCGTCATTATCTTCCCC  
 GTCGAAAGGATTTTACAACCCTAAGGCCTTCATCATCCACGCGGCATGGCTGGA  
 TCAGGCTTGCGCCCATTGTCCAATATTCCCCA

Alf WO6 (303 bp)

TAGGGAATTTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGCAGG  
 ATGAATGCCTTAGGGTTGTAACTGCTTTTATTTGTGACGAATATGACGGTAGCA  
 GATGAATAAGGATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTCATACGGAGGAT  
 CCAAGCGTTATCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGTTGCGTAGGTGGCATTGTAA  
 GTAGGTAGTGAAAGCGTTCGGCTCAACCGGATAAACATTACCTAACTGCAAAG  
 CTAGAGGATGAGAGAGGTTATTGGAATTCCCAGT

### 8.3.2 Stamm Acidobacteria

Acid WO1 (443 bp)

CACGAAGTTAGCCGGGGCTTCTTCTCTCGGTACCGTCATAATCGTCCCGATCGA  
AAGGAGTTTACGTCCCAAGGGACTTCATCCTCCACGCGGCGTTGCTGCGTCAG  
GGTTTCCCCATTGCGCAAATTCCCCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGAC  
CGTGTTTCAGTTCAGTGTGTCCGTGCGCCCTCTCAGGCCGGATACAGATCACT  
GTCTTGGTGGGCCATTACCCCGCCAATACTAATCTGCCGCGACCCCCTCCTT  
AAGCGAATTGCTCCTTTGACCCGTAGGTGTTATGCGGTATTAGCCAAGGTTTCC  
CCAGGTTATCCCCACTCAAGGGTAGGTTAGTCACGTGTTACTCACCCGTGCGC  
CACTTTACTCATGGATTGCTCCACTTTCTCGTTCGACTTGCATGTGTTAGGCACG  
CCGCCAGCGTT

Acid WO4 (444 bp)

CACGAAGTTAGCCGGGGCTTCTTCTCTCGGTACCGTCATAATCGTCCCGATCGA  
AAGGAGTTTACGTCCCAAGGGACTTCATCCTCCACGCGGCGTTGCTGCGTCAG  
GGTTTCCCCATTGCGCAAATTCCCCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGAC  
CGTGTTTCAGTTCAGTGTGTCCGTGCGCCCTCTCAGGCCGGATACAGATCACT  
GTCTTGGTGGGCCATTACCCCGCCAATACTAATCTGCCGCGACCCCCTCCTT  
AAGCGAATTGCTCCTTTGACCCGTAGGTGTTATGCGGTATTAGCCAAGGTTTCC  
CCAGGTTATCCCCACTCAAGGGTAGGTTAGTCACGTGTTACTCACCCGTGCGC  
CACTTTACTCATGGATTGCTCCACTTTCTCGTTCGACTTGCATGTGTTAGGCACG  
CCGCCAGCGTT

### 8.3.3 Stamm Actinobacteria

Actino WO4 (239 bp)

CACGTAGTTGGCCGGGGCTTCTTCTGCAGGTACCGTCACAATCGTCCCTGCTG  
AAAGAGGTTTACAACCTCAGAAAGCCTTCGTCCCTCACGCGGCGTTGCTGCATCA  
GGCTTGCGCCATTGTGCAAGATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGG  
GCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCTGATCGTCCTCTCAGACCAGCTACCCGTC  
GTTGCCTTGGTGGGCCGTTACCCAC

Actino WO5 (259 bp)

CACGTAGTTAGCCGGTGCTTCTTCTGCAGGTACACTCACGCCTGTAATCAAATA  
CCGTCGCTTGGTCCCTGCTGAAAGGAGTTTACAACCAGAAGGCCGTCATCCTCC

ACGCGGCGTCGCTGCATCAGGCTTTCGCCCATTGTGCAATATTCCCCCTGCTG  
 CCTCCCGCAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTCGCCCTC  
 TCAGGCCGGCTACCCGTCACCGCCTTGGTAGGCCATCACCCAC

### 8.3.4 Gruppe der autotrophen Ammonium-Oxidierer (Gattungen *Nitrosomonas* und *Nitrospira*)

AmOx KO3 (116 bp)

GGAGGAAAGTAGGGGATCGTAAGACCTTGCCTGATGGATGAGCCGAAGTCGG  
 ATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCT  
 GAGAGGACG

AmOx KO4 (116 bp)

GGAGGAAAGTAGGGGATCGTAAGACCTTGCCTCAATGGATGAGCCGAAGTCGG  
 ATTAGCTAGTTGGTAGGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCT  
 GAGAGGACG

AmOx WO2 (116 bp)

GGAGGAAAGTAGGGGATCGTAGGACCTCGCGCCATTGGATGAGCCGAAGCCG  
 GATTAGCTAGTTGGTAGGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGT  
 CTGAGAGGACG

### 8.3.5 Stamm Firmicutes

Lgc WO2 (121 bp)

CAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGTGGGATGAAGGCTCTAG  
 GGTTGTAAACCACTGTCGGAGGAGACGATCGTGACGGTACCCTCCAAGAAAGC  
 CCCGGCTAACTACGTG

Lgc WO3 (146 bp)

CACGTAGTTAGCCGGGGCTTTCTTCTCAGGTACCGTCACGCTAAGAGCAGTTAC  
 TCTCCTAGCTGTTCTTCCCTGGCAACAGAGCTTTACGATCCGAGAACCTTCATCA  
 CTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTG

### 8.3.6 Gattung *Nitrobacter*

Nit KO5 (350 bp)

GGAGGAAAGTAGGGGATCGTAGGACCTCGCGCCATTGGATGAGCCGAAGCCG  
 GATTAGCTAGTTGGTAGGGTAACGGCCTTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGT  
 CTGAGAGGACG



Nit WO4 (350 bp)

GGAGGAAAGTAGGGGATCGTAGGACCTCGCGCCATTGGATGAGCCGAAGCCG  
GATTAGCTAGTTGGTAGGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGT  
CTGAGAGGACG

### 8.3.7 *NosZ-Gen (partiell)*

NosZ2.2 (267 bp)

CATGTGCATGGCGTGGCAGAACCATGAACAGTAGAACCAGTAGACGCCGGCTT  
TATCCGCCGAGAACGACACCGAGGCCGTGGCCATCGGCGCGACTTCCATCTGA  
ATGCCATAATTTGTAATCGCGAAGCCGTGGGTCAGATCCTCGACCGCGTCGATG  
TTGGTGACGTAGACCGTTACCTGATCTCCCTGCTTGACCTGGAATTGCTCAAGC  
CCGAACTGGGGCGCGGTTGAGGTCATGTAGACGCTGACCTTGTTGCCGTTGCG

NosZ2.3 (266 bp)

CATGTGCATGGCGTGGCAGAACCATGAGCAGTAGAACCAGTAGACGCCGGCTT  
TATCCGCCGAGAACGACACCGAGGCCGTGGCCATCGGCGCGACTTCCATCTGA  
ATGCCATAATTTGTAATCGCGAAGCCGTGGGTCAGATCCTCGACCGCGTCGATG  
TTGGTGACGTAGACCGTTACCTGATCTCCCTGCTTGACCTGAAATTGCTCGAGC  
CCGAACTGGGGCGCGGTTGAGGTCATGTAGACGCTCACCTTCTGCCGTCGCG

Diese Diplomarbeit entstand am Institut für Meteorologie und Klimaforschung des Forschungszentrums Karlsruhe – Bereich Atmosphärische Umweltforschung (IMK-IFU) in Garmisch-Partenkirchen in der Arbeitsgruppe "Biologische Prozesse" unter der Leitung von Prof. Dr. Jörg-Peter Schnitzler.

### **Für die Unterstützung bei meiner Diplomarbeit danke ich...**

... Herrn Prof. Dr. Hans Peter Schmid für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes zur Durchführung meiner Diplomarbeit.

... Herrn Prof. Dr. Jörg-Peter Schnitzler für die Vergabe und Betreuung der Diplomarbeit. Die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe „Biologische Prozesse“ sorgte vom ersten Tag an für ein angenehmes Arbeitsklima. Sein gleichbleibender Optimismus sowie diverse hilfreiche Ratschläge bei den unterschiedlichsten Problemen ermöglichten die erfolgreiche Fertigstellung dieser Diplomarbeit. Ich danke auch für die sowohl konstruktive wie auch produktive Kritik während der Ausarbeitung.

... Herrn Prof. Dr. Ernst E. Hildebrand (Institut für Bodenkunde und Waldernährungslehre der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg) für die Übernahme des Koreferats.

... ganz besonders Frau Dr. Sandrine Louis. Ohne ihre umfassende Einführung in die Welt der Molekularbiologie wäre es mir nicht möglich gewesen, die Diplomarbeit in dieser Art und Weise abzuschließen. Sämtliche Versuche im Vorfeld dieser Diplomarbeit wurden von ihr durchgeführt. Ihrer Einweisung in die verschiedenen molekularbiologischen Analysemethoden sowie ihrer unzähligen praktischen Tipps bei der Anwendung und Auswertung der Techniken verdanke ich die gelungene Vollendung dieser Arbeit.

... Andrea, Andreas, Ina, Katja und Martina für die sehr nette Zusammenarbeit und große Hilfsbereitschaft während meiner Zeit in Garmisch.

... last but not least Sebastian, der mich in der stressigen Endphase ertragen und unterstützt hat.