



**Phylogenetische und funktionelle Diversität
von *Acidobacteria* in Wald- und Grünlandböden
unterschiedlicher Landnutzung**

Dissertation

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

dem Fachbereich Biologie/Chemie
der Universität Bremen
vorgelegt von

Astrid Näther
aus Dresden

Bremen, September 2011

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von September 2008 bis September 2011 unter der Leitung von Professor Dr. Michael W. Friedrich am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg und dem Fachbereich Biologie/Chemie der Universität Bremen durchgeführt.

Erstgutachter: Prof. Dr. Michael W. Friedrich

Zweitgutachter: Prof. Dr. Barbara Reinhold-Hurek

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

A. Näther, B. U. Foesel, V. Nägele, P. Wüst, J. Weinert, M. Bonkowski, F. Alt, Y. Oelmann, A. Polle, G. Lohaus, M. Fischer, I. Schöning, J. Nieschulze, S. Pfeiffer, D. Prati, S. Renner, K. Wells, E. K. V. Kalko, K. E. Linsenmair, E.-D. Schulze, W. W. Weisser, J. Overmann, M. W. Friedrich. **Diversity of *Acidobacteria* communities in German grassland and forest soils.** Einreichung geplant bei *Applied and Environmental Microbiology*.

B. U. Foesel, V. Nägele, A. Näther, P. Wüst, J. Weinert, M. Bonkowski, F. Alt, Y. Oelmann, A. Polle, G. Lohaus, M. Fischer, M. W. Friedrich, J. Overmann. **Determinants of *Acidobacteria* activity in German grassland and forest soils.** Einreichung geplant bei *Environmental Microbiology*.

A. Näther, C. Kirchhoff, M. W. Friedrich. **Seasonal dynamics of *Acidobacteria* communities at phylum and subgroup-level in German grassland and forest soils.** Einreichung geplant bei *Applied and Environmental Microbiology*.

A. Näther, A. Thürmer, R. Daniel, M. W. Friedrich. **Identification of soil bacteria assimilating carbon from ¹³C-labelled wheat residue by RNA-based Stable Isotope Probing.** Einreichung geplant bei *Environmental Microbiology*.

K. Birkhofer, I. Schöning, F. Alt, N. Herold, B. Klärner, S. Marhan, Y. Oelmann, T. Wubet, A. Yurkov, D. Begerow, D. Berner, M. Bonkowski, F. Buscot, A. Chatzinotas, R. Daniel, T. Diekötter, H. L. Drake, R. B. Ehnes, G. Erdmann, F. Faßhauer, M. W. Friedrich, C. Fischer, A. Focks, B. Foesel, T. Friedl, K. Glaser, J. Groh, J. Gutknecht, C. Hallmann, L. Hodac, M. A. Horn, E. Kandeler, S. Kolb, R. Koller, C. Lang, G. Lohaus, M. Maraun, M. M. Pollierer, A. Meyer, J. Charles Munch, H. Nacke, A. Näther, J. Overmann, A. Polle, S. Scheu, M. Schloter, E.-D. Schulze, W. Schulze, J. Weinert, V. Wolters, S. Wurst, P. Wüst & M. Schruppf. **General relationships between soil properties and biota across scales and land-use types.** Zur Veröffentlichung eingereicht bei *Biology Letters*.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	I
ZUSAMMENFASSUNG	III
SUMMARY	VI
EINLEITUNG	1
4.1. BIODIVERSITÄT UND LANDNUTZUNG	1
4.2. BODEN ALS MIKROBIELLER LEBENSRAUM	3
4.3. MIKROBIELLE DIVERSITÄT IM BODEN	6
4.4. DAS PHYLUM <i>ACIDOBACTERIA</i>	9
4.5. STABILE ISOTOPE UND ‚ <i>NEXT GENERATION SEQUENCING</i> ‘ IN DER MIKROBIELLEN ÖKOLOGIE.....	15
4.6. ZIELSETZUNG DER ARBEIT	18
2. MATERIAL UND METHODEN	20
2.1. CHEMIKALIEN, GASE, STERILISATIONSVERFAHREN	20
2.2. PROBENMATERIAL UND INKUBATIONSANSÄTZE	20
2.3. CHEMISCHE UND PHYSIKALISCHE ANALYSEN	24
2.3.1. Analyse von Kohlendioxid	25
2.3.2. Analyse von stabilen Kohlenstoff-Isotopenverhältnissen.....	25
2.4. MOLEKULARBIOLOGISCHE ANALYSEN	27
2.4.1. Extraktion der Nukleinsäuren	27
2.4.2. DNase-Verdau	28
2.4.3. Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	28
2.4.4. Isopyknische Auftrennung der RNA	29
2.4.5. Polymerase-Kettenreaktion.....	30
2.4.6. T-RFLP-Analyse	32
2.4.7. Vergleich Primer Ba907R und Ba907Rmod.....	33
2.4.8. Erstellung von 16S rRNA-Gen und 16S rRNA-Klonbibliotheken.....	34
2.4.9. Sequenzanalyse.....	35
2.4.10. Pyrosequenzierung.....	36
2.5. BIOINFORMATISCHE ANALYSEN	37
2.5.1. Sequenzverarbeitung	37
2.5.2. Phylogenetische Analyse von 16S rRNA-Genen	37
2.5.3. Identifizierung von chimären Sequenzen	38
2.5.4. Bioinformatische Analyse der Daten der Pyrosequenzierung	38
2.6. BERECHNUNG ÖKOLOGISCHER INDIZES UND DISTANZEN.....	39
2.6.1. Ähnlichkeit und Diversität mikrobieller Gemeinschaften	39
2.6.2. Abschätzung des Artenreichtums	40
2.6.3. Statistischer Vergleich von 16S rRNA-Gen Klonbibliotheken	40

2.7.	STATISTISCHE ANALYSEN	41
2.7.1.	Explorative Datenanalyse	41
2.7.2.	Klassische Tests.....	42
2.7.3.	Univariate Statistik	43
2.7.4.	Multivariate Statistik	44
3.	ERGEBNISSE	48
3.1.	GRÜNLAND- UND WALDBÖDEN DER EXPLORATORIEN.....	48
3.2.	DIVERSITÄT VON <i>ACIDOBACTERIA</i> IN GRÜNLAND- UND WALDBÖDEN	51
3.3.	EINFLUSSFAKTOREN AUF DIE DIVERSITÄT VON <i>ACIDOBACTERIA</i>	56
3.4.	EINFLUSSFAKTOREN AUF DIE AKTIVITÄT VON <i>ACIDOBACTERIA</i>	68
3.5.	SAISONALE VERÄNDERUNGEN AKTIVER <i>ACIDOBACTERIA</i> -GEMEINSCHAFTEN	75
3.6.	IDENTIFIZIERUNG AM ABBAU VON PFLANZENMATERIAL BETEILIGTER BAKTERIEN	93
4.	DISKUSSION.....	110
4.1.	DIVERSITÄT DER <i>ACIDOBACTERIA</i> IN GRÜNLAND- UND WALDBÖDEN	111
4.2.	EINFLUSSFAKTOREN AUF DIVERSITÄT UND AKTIVITÄT VON <i>ACIDOBACTERIA</i>	115
4.3.	VERGLEICH ABUNDANTER UND PHYSIOLOGISCH AKTIVER <i>ACIDOBACTERIA</i>	128
4.4.	SAISONALE VERÄNDERUNGEN AKTIVER <i>ACIDOBACTERIA</i> -GEMEINSCHAFTEN	131
4.5.	IDENTIFIZIERUNG AM ABBAU VON PFLANZENMATERIAL BETEILIGTER BAKTERIEN	134
4.6.	EINFLÜSSE VON BIODIVERSITÄT UND LANDNUTZUNG AUF BAKTERIELLE DIVERSITÄT.....	141
4.7.	AUSBlick	145
5.	LITERATURVERZEICHNIS.....	147
6.	ANHANG.....	167
	DANKSAGUNG.....	191
	LEBENS LAUF	192
	ERKLÄRUNG.....	193

Abkürzungsverzeichnis

16S	kleine Untereinheit prokaryotischer Ribosomen
ABC-Transporter	„ATP-binding-cassette“-Transporter
AEG	Grünlandfläche(n) im Exploratorium Schwäbische Alb
AEW	Waldfläche(n) im Exploratorium Schwäbische Alb
AIC	„Akaike Information Criterion“
AKL-Wald	Altersklassen(-Wald)
ALB	Exploratorium Schwäbische Alb
ANOSIM	„Analysis of similarities“
ATP	Adenosintriphosphat
BD	„Buoyant density“
BExIS	„Biodiversity Exploratories Information System“
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin („Bovine Serum Albumine“)
CN-Verhältnis	Kohlenstoff/Stickstoff-Verhältnis
CsTFA	Cäsiumtrifluoracetat
DCA	„Detrended Correspondence Analysis“
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DGGE	denaturierende Gradientengelelektrophorese
DNA	Desoxyribonukleinsäure
(d)dNTP	(Di-) Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
FAM	6'-Carboxyfluorescein
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
HAI	Exploratorium Hainich-Dün
HEG	Grünlandfläche(n) im Exploratorium Hainich-Dün
HEW	Waldfläche(n) im Exploratorium Hainich-Dün
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LUI	Landnutzungsintensität („Landuse intensity“)
Mb	Megabasen
MNTD	„Mean nearest taxon distance“
MPD	„Mean pairwise distance“

mWK	maximale Wasserhaltekapazität
NN	Normalnull
NRI	<i>„Net Relatedness Index“</i>
NTI	<i>„Nearest Taxon Index“</i>
NW	Naturwald
OTU	Operative taxonomische Einheit (<i>„Operational Taxonomic Unit“</i>)
PCA	Hauptkomponentenanalyse (<i>„Principal Component Analysis“</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pD	phylogenetische Diversität
RDP	<i>„Ribosomal Database Project“</i>
PAST	<i>„Palaeontological Statistics“</i> -Programm
PL-Wald	Plenterwald
PLFA	Phospholipid-Fettsäuren (<i>„Phospho-Lipid Fatty Acids“</i>)
PLSR	<i>„Partial Least Squares Regression“</i>
RDA	Redundanzanalyse
(r)RNA	(ribosomale) Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
SCH	Exploratorium Schorfheide-Chorin
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
SEG	Grünlandfläche(n) im Exploratorium Schorfheide-Chorin
SEW	Waldfläche(n) im Exploratorium Schorfheide-Chorin
SIP	Stabile Isotopenbeprobung (<i>„Stable Isotope Probing“</i>)
T-RF	terminales Restriktionsfragment
T-RFLP	terminaler Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
U	Einheit (<i>„Unit“</i>)
v/v	Volumen pro Volumen (<i>„Volume per Volume“</i>)
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>„Weight per Volume“</i>)
X-Gal	5-Brom-4-chloro-3-indoyl- β -galactopyranosid

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

Zusammenfassung

Im Boden befindet sich das größte Reservoir an Biodiversität auf der Erde, wobei die Diversität von Prokaryoten im Boden weitaus höher eingeschätzt wird als in allen anderen Ökosystemen zusammen. Vertreter des Phylums *Acidobacteria* gehören zu den zahlreichsten Bodenbakterien weltweit und kultivierungsunabhängige Analysen zeigen, dass Mitglieder der *Acidobacteria* phylogenetisch überaus divers sind. Im Allgemeinen scheinen *Acidobacteria* langsam wachsende, oligotrophe Bakterien zu sein, deren Abundanz in mikrobiellen Gemeinschaften vom pH-Wert reguliert wird. Über die Funktion der *Acidobacteria* im Boden und die Beeinflussung ihres Vorkommens durch Landnutzung ist jedoch noch fast nichts bekannt. Die Identifizierung edaphischer und biologischer Parameter, die Diversität und Aktivität von *Acidobacteria* im Boden beeinflussen, ist eine Grundvoraussetzung für das Verständnis ihrer Rolle in biogeochemischen Zyklen und deren Wechselbeziehungen in verschiedenen Landnutzungstypen.

In der vorliegenden Arbeit wurden daher Diversitätsveränderungen der *Acidobacteria* in zahlreichen Grünland- und Waldböden unterschiedlicher Landnutzung untersucht. Die Biodiversitäts-Exploratorien umfassen standardisierte Untersuchungsflächen in drei Regionen Deutschlands, die jeweils vielfältige Typen und Intensitäten der Wald- und Grünlandnutzung einschließen. Zielsetzung dieser Arbeit war die Erfassung der Zusammensetzung und Diversität der *Acidobacteria* in Abhängigkeit von Boden- und Standorteigenschaften sowie Pflanzendiversität und Landnutzung als auch die Identifizierung wichtiger funktioneller Gruppen. Durch Sequenzierung der 16S rRNA-Gene wurde zunächst ein Überblick über die Diversität der *Acidobacteria* in allen Grünland- und Waldböden der drei Untersuchungsregionen gewonnen. Von den 26 Untergruppen der *Acidobacteria* wurden 11 in den untersuchten Böden detektiert. Die Untergruppen Gp6, Gp4, Gp5, Gp3 und Gp17 waren in Grünlandböden dominierend, während in Waldböden Untergruppen Gp1, Gp6 und Gp3 die *Acidobacteria*-Gemeinschaft bestimmten. Die Abundanz der verschiedenen Untergruppen der *Acidobacteria* in den Grünland- und Waldböden der drei Untersuchungsregionen in Deutschland zeigt eine hohe Übereinstimmung mit der weltweiten Verteilung von *Acidobacteria* in Böden.

Die Diversität und Zusammensetzung der *Acidobacteria* jedes einzelnen Bodens der 27 Grünland- und 30 Waldflächen wurde über terminale Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-(T-RFLP)-Analyse erfasst. Die T-RFLP-Analyse wurde sowohl auf Basis der 16S rRNA-Gene als auch der 16S rRNA durchgeführt, um nicht nur die anwesenden, sondern auch die physiologisch aktiven *Acidobacteria* zu erfassen. Mittels statistischer Datenanalyse konnten Abhängigkeiten der Zusammensetzung und Diversität der

Acidobacteria, ihrer Untergruppen und einzelner Phylotypen von Boden- und Standorteigenschaften sowie Pflanzendiversität und Landnutzung aufgezeigt werden. So unterschied sich die Zusammensetzung der *Acidobacteria* zwischen den drei Untersuchungsregionen, den Wald- und Grünlandflächen sowie den Bodentypen und wurde neben dem pH-Wert auch von Bodenfeuchte, Kohlenstoff-, Stickstoff-, Ammonium- und Phosphatgehalt beeinflusst. Die Untergruppen der *Acidobacteria* und sogar einzelne Phylotypen der Untergruppen zeigten jedoch unterschiedliche Reaktionen auf diese Umweltvariablen. *Acidobacteria* der Untergruppe Gp1 bevorzugten Böden mit niedrigem pH-Wert, geringem Kohlenstoff- und Stickstoffgehalt sowie niedriger Bodenfeuchte, wohingegen Vertreter der Untergruppe Gp6 in Böden mit genau den gegenteiligen Eigenschaften dominierten. Diese Ergebnisse deuten an, dass nicht das gesamte Phylum *Acidobacteria* sondern nur einzelne Untergruppen, wie z.B. Gp1 unter oligotrophen Bedingungen aktiv sind, Vertreter anderer Untergruppen, wie z.B. Gp6 aber nährstoffreichere Böden bevorzugen und somit Eigenschaften copiotropher Bakterien zeigen. Erstmals konnte mit dieser Arbeit auch ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Abundanz von *Protozoa*, möglichen Prädatoren der Bakterien, und verschiedenen Untergruppen bzw. Phylotypen der *Acidobacteria* hergestellt werden. Ein Einfluss der Anzahl vaskulärer Pflanzenarten auf *Acidobacteria* der Untergruppe Gp5 konnte für zwei Phylotypen gezeigt werden. Nur durch derartig detaillierte Analysen von nahezu vollständigen 16S rRNA-Sequenzdaten bis auf die Ebene einzelner abundanter Phylotypen können einige ökophysiologischen Eigenschaften von Vertretern der *Acidobacteria* aufgedeckt werden. Da diese abundanten Phylotypen vermutlich überproportional zur Funktion biogeochemischer Zyklen im Boden beitragen, sollte deren Isolierung und Charakterisierung angestrebt werden. Mit Hilfe der vorliegenden Arbeit konnten neben dem pH-Wert weitere Umweltfaktoren aufgezeigt werden, die auf die Zusammensetzung, Diversität und Aktivität der *Acidobacteria* und ihrer Untergruppen in Böden einwirken. Die Landnutzungsintensität schien die *Acidobacteria* allerdings vor allem indirekt über Wechselwirkungen mit Bodeneigenschaften zu beeinflussen und Unterschiede der Diversität höherer Taxa, der vaskulären Pflanzen und der *Protozoa*, riefen vor allem Veränderungen einzelner Phylotypen hervor.

Zusätzlich wurde über 16S rRNA-*'fingerprinting'* auch die jahreszeitliche Veränderung der Diversität der aktiven *Acidobacteria* aufgenommen und auf Abhängigkeit von Umwelteinflüssen geprüft. Es konnten saisonale Veränderungen der Zusammensetzung der *Acidobacteria* und der Abundanz einzelner Untergruppen vor allem in Grünlandböden detektiert werden. Die Diversität der *Acidobacteria* unterschied sich auch in den Waldböden saisonal und war im August am niedrigsten und im Oktober am höchsten. Die

saisonale Variation konnte vor allem durch Veränderungen der Bodenfeuchte und Bodentemperatur erklärt werden, wohingegen der pH-Wert der Böden übers Jahr stabil blieb.

Um die Rolle der *Acidobacteria* im Boden genauer zu verstehen, wurde zudem über stabile Isotopenbeprobung (SIP) der Abbau von Weizenpflanzenmaterial in einem Grünland- und einem Waldboden verfolgt und daran beteiligte Bakterien über T-RFLP-Analyse und (Pyro)Sequenzierung der 16S rRNA identifiziert. Schon nach 24 h konnte ein Anstieg von $^{13}\text{CO}_2$ und ein Einbau von ^{13}C in RNA festgestellt werden. Die Weizenpflanzenmaterial abbauende Bakteriengemeinschaft schien im Waldboden aktiver als im Grünlandboden und Weizenwurzeln leichter abbaubar als Weizenblätter. Die aktiv Weizenmaterial abbauende mikrobielle Gemeinschaft wurde von Vertretern der *Actinobacteridae*, der α - und β -*Proteobacteria* sowie der *Bacilli* dominiert, wohingegen *Acidobacteria* beim frühen Abbau des komplexen Pflanzenmaterials keine Rolle spielten.

Summary

Soil is the biggest reservoir of biodiversity on earth and the diversity of procaryotes in soil habitats is estimated to be higher than in all other ecosystems together. Members of the phylum *Acidobacteria* are among the most abundant soil bacteria worldwide and cultivation-independent analyses suggest that *Acidobacteria* are phylogenetically diverse. In general, *Acidobacteria* seem to be slow-growing, oligotrophic bacteria, whose abundance within a community is regulated by pH. However, not much is known about the function of *Acidobacteria* in soils and influences of landuse on their abundance. The identification of edaphic and biotic parameters influencing diversity and activity of *Acidobacteria* is a prerequisite to understand their role in biogeochemical cycles and interdependences among different landuse types.

Here, *Acidobacteria* diversity changes in numerous grassland and forest soils of different landuse were assessed. The biodiversity exploratories include standardized experimental plots in three regions of Germany that represent different types and intensities of landuse. The main goals were to reveal the composition and diversity of *Acidobacteria*, the influences of soil and site characteristics as well as plant diversity and landuse and to identify important functional groups. By sequencing 16S rRNA genes of all grassland and forest soils of each of the three study regions, an overview of *Acidobacteria* diversity was gained. Eleven of the 26 subgroups of *Acidobacteria* were detected in the studied soils. Subgroups Gp6, Gp4, Gp3 and Gp17 dominated the grassland soils whereas in forest soils subgroups Gp1, Gp6 and Gp3 were most abundant. The abundances of the different *Acidobacteria* subgroups found in grassland and forest soils of the three study regions in Germany are in agreement with the distribution of *Acidobacteria* in soils worldwide.

Acidobacteria diversity and community composition of every single soil of the 27 grassland and 30 forest sites was assessed by terminal restriction-fragment-length-polymorphism (T-RFLP) analysis. T-RFLP analysis was performed based on 16S rRNA genes and 16S rRNA to detect not only numerically abundant but as well physiologically active *Acidobacteria*. Statistical analysis showed influences of soil and site characteristics as well as plant diversity and landuse on the community composition and diversity of *Acidobacteria*, their subgroups and single phylotypes. Differences in *Acidobacteria* community composition were found between the three study regions, between grassland and forest as well as between soil types and apart from soil moisture, carbon, nitrogen, ammonium and phosphorus content, *Acidobacteria* were predominantly influenced by soil pH. But *Acidobacteria* subgroups and even single phylotypes showed different reactions on soil environmental variables. *Acidobacteria* of subgroup Gp1 were most abundant in

soils with low pH, low carbon and nitrogen content as well as low soil moisture, whereas members of subgroup Gp6 dominated in soils with opposite characteristics. These results suggest that not the whole phylum of *Acidobacteria* but only single subgroups e.g. Gp1 are active under oligotrophic conditions and members of other subgroups e. g. Gp6 favor more nutrient-rich soils, thus showing characteristics of copiotrophic bacteria. Here, for the first time a distinct relationship between the abundance of *Protozoa*, potential predators of bacteria, and different subgroups or phylotypes of *Acidobacteria* could be established. An influence of vascular plant species on *Acidobacteria* subgroup Gp5 could be revealed for two phylotypes. Only such detailed analysis of nearly full-length 16S rRNA gene sequences down to abundant phylotypes can detect certain ecophysiological properties of members of the *Acidobacteria* phylum. Abundant phylotypes could disproportionately contribute to the function of soil biogeochemical cycles and therefore should be targeted for isolation and be further characterized. Here, besides pH, further influences on the composition, diversity and activity of *Acidobacteria* and their subgroups in soils could be demonstrated. Landuse intensity seemed to affect *Acidobacteria* diversity mainly indirectly by interaction with soil properties and the differences in diversities of higher taxa, vascular plants and *Protozoa* resulted in changes of only single phylotypes.

Additionally, seasonal dynamics of active *Acidobacteria* were studied by 16S rRNA fingerprinting and influences of environmental parameters analyzed. Seasonal changes of *Acidobacteria* community composition and the abundance of single subgroups were detected predominantly in grassland soils. The diversity of *Acidobacteria* differed seasonally in forest soils, too, with lowest values in August and highest diversity in October. Seasonal variation could be explained mainly by changes in soil moisture and soil temperature whereas soil pH remained stable over the year.

To get further insights into the role of *Acidobacteria* in soils, stable isotope probing was performed to follow the degradation of wheat residues in microcosms of grassland and forest soil and to identify the bacteria involved by T-RFLP analysis and (pyro)sequencing of 16S rRNA. Already after 24h an increase of $^{13}\text{CO}_2$ and incorporation of ^{13}C into RNA could be detected. The wheat residue degrading bacterial community seemed to be more active in forest compared to grassland soil microcosms and wheat roots were more easily degradable than wheat leaves. The actively wheat residue degrading microbial community was dominated by members of *Actinobacteridae*, α - and β -*Proteobacteria* as well as *Bacilli*, whereas *Acidobacteria* did not play a role in early degradation of plant residues.

Einleitung

4.1. Biodiversität und Landnutzung

Die biologische Vielfalt der Erde bildet in vielerlei Hinsicht die Lebensgrundlage der Menschheit. Im Zusammenhang mit dem anthropogenen Wandel der Biodiversität spielt dieses Thema eine zunehmend wichtige Rolle in Forschung und öffentlicher Diskussion. Die große Bedeutung von Biodiversität für die Funktionalität von Ökosystemen wurde in der Agenda 21, einem umweltpolitischen Aktionsprogramm für das 21. Jahrhundert von der Konferenz für Umwelt und Entwicklung der Vereinten Nationen 1992 bekräftigt.

Biodiversität umfasst alle Dimensionen der biologischen Organisation von genetischer und morphologischer Vielfalt über Artenvielfalt und der Diversität von Gemeinschaften bis zur Vielfalt biologischer Interaktionen zwischen Organismen und der Diversität von Ökosystemen in der Landschaft (Wilson, 2001). Ökosystemprozesse und -leistungen hängen nicht nur von der Zusammensetzung der Arten in Ökosystemen sondern auch von deren Artenreichtum ab (Balvanera *et al.*, 2006). Eine Abnahme der Biodiversität beeinflusst Ökosystemfunktionen und -leistungen (Loreau *et al.*, 2001), obwohl individuelle Ökosystemleistungen eine asymptotische Beziehung zu wachsender Biodiversität haben und somit einige Arten redundant vorkommen (Cardinale *et al.*, 2006). Allerdings müssen Ökosysteme vielfältige Funktionen erfüllen und erhalten, wodurch eine höhere Artenvielfalt erforderlich wird als die Summe aller Arten, die für alle individuellen Leistungen des Ökosystems benötigt werden (Hector und Bagchi, 2007).

Die funktionelle Biodiversitätsforschung untersucht Ursachen und funktionelle Konsequenzen von Biodiversitätsveränderungen. Die Intensivierung und Änderung der Landnutzung ist einer der wichtigsten Einflussfaktoren auf die Veränderung von Biodiversität und Ökosystemprozessen (Sala *et al.*, 2000; Paillet *et al.*, 2010; Poschlod *et al.*, 2005) auf regionalem (Lautenbach *et al.*, 2011) und globalem Niveau (Kerr *et al.*, 2007). Gegenwärtig verzeichnet die Biodiversität eine generelle Abnahme aufgrund anhaltender groß- und kleinskaliger Veränderungen in der Landnutzung (Settele *et al.*, 2010). Obwohl die Beziehungen zwischen Landnutzung und Biodiversität für einige Organismengruppen bereits gut untersucht wurden, ist wenig bekannt, wie die Diversitäten einzelner Gruppen zueinander in Bezug stehen und ob diese Gruppen und die jeweiligen genetischen Diversitäten ähnlich auf Landnutzungsänderungen reagieren (Wolters *et al.*, 2006). Der Wandel von natürlichen Ökosystemen zu landwirtschaftlich genutzten Flächen senkt sowohl die überirdische Pflanzenartenvielfalt als auch die Diversität der Bodenmakrofauna (Hooper *et al.*, 2000) und diese Biodiversitätsverluste

bewirken negative Effekte auf Ökosystemfunktion und -leistungen (Naeem *et al.*, 1994) (Hooper *et al.*, 2005; Hector und Bagchi, 2007). Obwohl Mikroorganismen einen großen Einfluss auf die Pflanzenproduktivität haben (van der Heijden *et al.*, 2008), ist bisher wenig über die Beziehung der Pflanzenartenvielfalt zur Diversität von Mikroorganismen im Boden bekannt (Wardle *et al.*, 2004). Allerdings können Landnutzungsänderungen physikalische und chemische Eigenschaften von Boden verändern. So beeinflussen Landnutzungsänderungen Kohlenstoff- und Stickstoffgehalte, die Textur und den pH-Wert des Bodens signifikant und langfristig (Post und Mann, 1990; Murty *et al.*, 2002). Diese Effekte gehen größtenteils auf Änderungen in der Zusammensetzung der Pflanzenarten und die Art der Bewirtschaftung zurück. Änderungen in der Landnutzung können einen Einfluss auf mikrobielle Gemeinschaften im Boden haben (Buckley und Schmidt, 2001; 2003; Wessen *et al.*, 2010), allerdings ist wenig bekannt, wie Landnutzung und die daraus resultierenden Änderungen der Pflanzenartenvielfalt und Bodeneigenschaften die Abundanz einzelner taxonomischer Gruppen beeinflussen. Eine umfassende Untersuchung zu Einflüssen von vielfältigen über- und unterirdischen biotischen und abiotischen Faktoren (die wiederum durch Biodiversitätsverlust und/oder Landnutzungsänderungen beeinflusst werden könnten) auf die Biodiversität einzelner Gruppen von Bodenorganismen, deren trophische Interaktionen und den zugrunde liegenden Mechanismen ist bisher nicht verfügbar.

Um Landnutzungseffekte auf die Biodiversität zu verstehen und die modifizierende Rolle von Biodiversitätsveränderungen verschiedener Taxa auf Ökosystemprozesse, einschließlich biogeochemischer Kreisläufe zu untersuchen, wurde ein großräumig und langfristiges Projekt zur funktionellen Biodiversitätsforschung angelegt. Diese Biodiversitäts-Exploratorien (<http://www.biodiversity-exploratories.de>, Fischer *et al.*, 2010) sind ein von der Deutschen Forschungsgemeinschaft finanziertes Verbundprojekt (DFG Schwerpunktprogramm 1374 - Bereich Infrastruktur) in dem drei Exploratorien als offene Forschungsplattform für Wissenschaftler aus ganz Deutschland dienen. Diese umfassen standardisierte Untersuchungsflächen in drei Regionen Deutschlands, die vielfältige Typen und Intensitäten der Wald- und Grünlandnutzung einschließen (Abb. 1). Das Exploratorium Schorfheide-Chorin liegt im Nordosten Deutschlands auf einer Höhe von 10-140 m NN und ist mit einem Jahresniederschlag von 520-600 mm und einer Jahresdurchschnittstemperatur von 8-8,4°C das trockenste und wärmste der drei Untersuchungsgebiete. Typisch für die Region ist das reiche Vorkommen von Seen, Mooren und Feuchtgebieten. Der Hainich, das größte zusammenhängende Waldgebiet Deutschlands, und das umgebende Gebiet Dün liegen auf 300-400 m NN. Dieses Exploratorium im Zentrum Deutschlands verfügt über einen Jahresniederschlag von

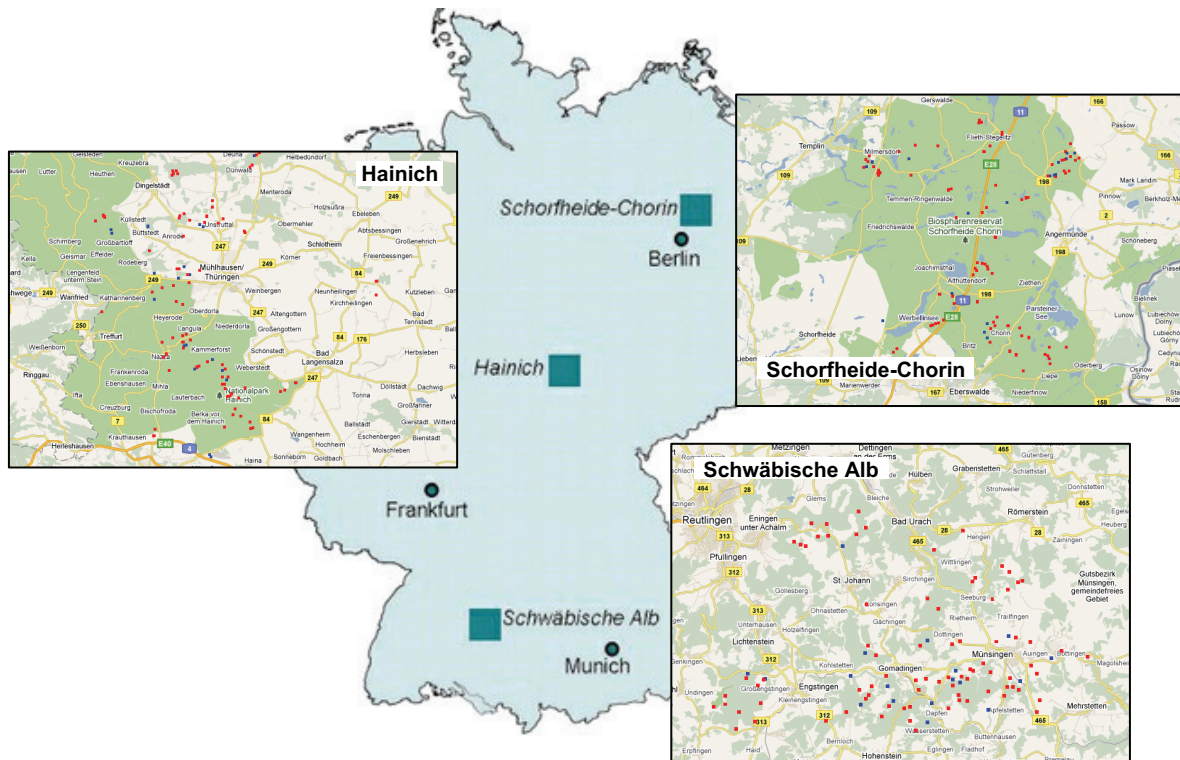


Abbildung 1. Lokalisierung der Biodiversitäts-Exploratorien in Deutschland. Rote und blaue Punkte in den Detailkarten der drei Exploratorien zeigen die Untersuchungsflächen (Quellen: Projektdatenbank BExIS, www.biodiversity-exploratories.de).

750-800 mm und eine Jahresdurchschnittstemperatur von 6-7,5°C. Im südlichsten Exploratorium Schwäbische Alb liegt der Jahresniederschlag bei 940-960 mm und die Jahresmitteltemperatur bei 6,5-8°C. Die Untersuchungsflächen befinden sich dort 460-860 m über dem Meeresspiegel. Der Ausdruck “Exploratorium” soll verdeutlichen, dass vergleichende Beobachtungen und Untersuchungen direkt im Feld durchgeführt werden. Idealerweise sollen die erhaltenen Ergebnisse interdisziplinär verglichen und miteinander korreliert werden. Die Exploratorien stellen mit ihrer wissenschaftlichen Infrastruktur den notwendigen Rahmen, um entscheidende Fragen zur Beziehung zwischen Landnutzungsintensität, Biodiversitätswandel und Ökosystemfunktionen an ausgewählten Organismengruppen zu untersuchen.

4.2. Boden als mikrobieller Lebensraum

Im Boden befindet sich das größte Reservoir an Biodiversität auf der Erde. Prokaryoten machen mehr als die Hälfte der Biodiversität weltweit aus (Dirzo und Raven, 2003) und ihre Diversität im Boden wird drei Zehnerpotenzen höher eingeschätzt als in allen anderen Ökosystemen zusammen (Curtis *et al.*, 2002). Zu den wichtigsten Ökosystemleistungen

von Boden und Bodenorganismen gehören der Abbau von organischem Material, die Erhaltung der Nährstoffkreisläufe, die Bodenbildung sowie Durchmischung des Bodens.

Boden ist ein komplexes physikalisches, chemisches und biologisches System, welches dem Einfluss von Witterung, Bodenorganismen und Vegetation ausgesetzt, aber auch durch den wirtschaftenden Mensch ständigen Veränderungen unterworfen ist. Boden wird durch die Umwandlung mineralischer und organischer Substanzen gebildet. Bei dessen Entstehung wird Gestein zunächst durch physikalische Verwitterung in seinem Gefüge gelockert und die chemische Verwitterung bewirkt den weiteren Zerfall der Minerale durch Lösungsprozesse wie Hydrolyse und Hydratation. Es kommt zur Bildung von Tonmineralien, wodurch die Ausschwemmung der freigesetzten Nährstoffe verhindert wird. Mit zunehmender Verwitterung nimmt die Tiefe des Bodens zu, Bodentiere durchmischen und belüften den Boden und über Jahrhunderte entsteht ein Bodenprofil, anhand dessen Böden klassifiziert werden können. Bodenhorizonte eines Profils sind definierte Zonen mit spezifischen Zusammensetzungen und Eigenschaften. Es wird zwischen folgenden Bodenhorizonten unterschieden: der (i) O-Horizont ist die Schicht des unzersetzten Pflanzenmaterials, der (ii) A-Horizont der oberflächliche Erdboden - reich an organischer Substanz und mit hoher mikrobieller Aktivität, der (iii) B-Horizont der Unterboden aus Mineralien und Humus mit wenig organischer Substanz und mikrobieller Aktivität und der (iiii) C-Horizont ist der Bodenuntergrund, der sich direkt aus dem darunter liegenden Gestein entwickelt (Tate, 2000).

Diese Heterogenität des Bodens führt zu vielfältigen Mikrohabitaten mit unterschiedlichen pH-Werten, Substrat-, Nährstoff- und Sauerstoffkonzentrationen sowie Wassergehalten (Hattori und Hattori, 1976). Die chemischen, physikalischen und biologischen Eigenschaften von Mikrohabitaten variieren räumlich und auch zeitlich und bilden im Boden ein dynamisches System. Im undurchwurzelt Boden bilden z.B. die Oberfläche(n) von Bodenaggregaten sowie die komplexen Porensysteme zwischen und in diesen Bodenaggregaten Mikrohabitate für Mikroorganismen (Foster, 1988; Mummey *et al.*, 2006). Zusätzlich wird die Heterogenität des Bodens durch Pflanzen beeinflusst, die unmittelbar oder durch indirekte Wechselwirkungen die Bodenstruktur ändern. Die Rhizosphäre stellt den Übergangsbereich zwischen der Wurzeloberfläche höherer Pflanzen und dem undurchwurzelt Boden dar und ist ein weiteres Mikrohabitat für Mikroorganismen (Lynch, 1990).

Pflanzen stimulieren Mikroorganismen durch Eintrag von abgestorbenem Pflanzen- und Wurzelmaterial, sowie durch Wurzelexsudate (Bardgett, 2005). Der Abbau abgestorbenen Pflanzenmaterials ist wichtig für die Erhaltung der Nährstoffkreisläufe, des organischen Materials und der Nahrungsnetze und somit ein Schlüsselprozess im Ökosystem Boden

(Umarov, 2001). Außerdem ist Pflanzenmaterial eine wichtige Quelle organischen Kohlenstoffs für Mikroorganismen im Boden (Swift *et al.*, 1979; Berg und McClaugherty, 2003). Mikrobielle Gemeinschaften bestehen aus vielfältigen Arten von Mikroorganismen mit verschiedenen metabolischen Eigenschaften und physiologischen Anforderungen, von denen jede mindestens eine der zahlreichen Reaktionen der Umwandlung von organischem Material ausführt. Daher ist eine der großen Herausforderungen der mikrobiellen Ökologie die Identifizierung der mikrobiellen Populationen und Aktivitäten des Kohlenstoffabbaus und die nachfolgende Strukturierung der mikrobiellen Gemeinschaft in Abhängigkeit der Kohlenstoffquelle. Es wird vermutet, dass vor allem Veränderungen in mikrobiellen Populationen, die makromolekularen Kohlenstoff abbauen, entscheidend für Ökosystemprozesse sind, da Arten mit diesen enzymatischen Eigenschaften ein geringes Artenreichtum haben (Schimel und Gulledge, 1998).

Der Abbau von Pflanzenmaterial wird durch dessen chemische Zusammensetzung, Umweltfaktoren und die Zusammensetzung der abbauenden Organismengemeinschaft bestimmt. Abgestorbenes Pflanzenmaterial besteht aus einer Mischung von leicht abbaubaren (z.B. einfache Zucker, Hemicellulose, Cellulose) und abbauresistenten (z.B. Lignin) Substraten und ist schon vor seiner Seneszenz mit Mikroorganismen besiedelt. Allerdings nimmt die mikrobielle Biomasse während des Abbaus zu. Die Nutzung der komplexen Bestandteile abgestorbenen Pflanzenmaterials ist mit verschiedenen Gruppen von Mikroorganismen assoziiert und resultiert in einer mikrobiellen Sukzession, die durch Änderungen in der chemikalischen Zusammensetzung des Pflanzenmaterials hervorgerufen wird (McMahon *et al.*, 2005). In den frühen Phasen des Abbaus dominieren Bakterien, wohingegen später Pilze die wichtigere Rolle spielen (Moore-Kucera und Dick, 2008; Marschner *et al.*, 2011). Wasserlösliche Substanzen des abgestorbenen Pflanzenmaterials sind verantwortlich für die hohe mikrobielle Aktivität in der Anfangsphase des Abbaus (McMahon *et al.*, 2005). Während dem Abbauprozess dominieren zunächst *r*-Strategen, solange leicht abbaubare Substanzen verfügbar sind. Diese werden in einer späteren und langsameren Phase durch *K*-Strategen ersetzt, wenn wachstums-limitierende Substratkonzentrationen erreicht sind und die Verwertung des abbauresistenten Materials einsetzt (Slater und Lovatt, 1984; Wang *et al.*, 2004). Folglich nehmen in den ersten zwei Wochen die Anteile von Zuckern und Stärke stark ab, während der Prozentsatz an Lignin zunimmt und sich abbauresistentere Verbindungen in den späteren Phasen des Abbaus von abgestorbenem Pflanzenmaterial anreichern (Aneja *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2004). Der Abbau abgestorbenen Pflanzenmaterials ist eine komplexe Abfolge biotischer Prozesse, der die Mineralisierung, Immobilisierung und Kreisläufe der Nährstoffe beeinflusst und einen der Hauptwege der Rückführung von

Nährstoffen in den Boden darstellt (Miller, 1984).

Durch Umsatz von organischem Material sind Bodenmikroorganismen für den Erhalt der natürlichen Stoffkreisläufe, wie Kohlenstoff-, Stickstoff-, Phosphor-, und Schwefel-Kreislauf (Umarov, 2001) und die Bildung von Huminstoffen verantwortlich. Nicht zuletzt finden im Boden aber zum Teil entgegengesetzte Prozesse statt: während innerhalb von Bodenpartikeln organische Substanz gebunden und über Jahrtausende stabil gespeichert wird, kann sie an der Oberfläche derselben Partikel mineralisiert und als CO₂ freigesetzt werden (Kalbitz *et al.*, 2005). Trotz einer hohen Konzentration organischen Materials in den meisten Böden steht nur ein kleiner Teil den Mikroorganismen als organischer Kohlenstoff direkt zur Verfügung. Gründe dafür sind die Umsetzung des meisten organischen Materials zu Humus durch eine Kombination mikrobieller und abiotischer Prozesse sowie die ungleiche Verteilung von Mikroorganismen und organischer Verbindungen in der Bodenmatrix (Daniel, 2005).

4.3. Mikrobielle Diversität im Boden

Seit mehr als einem Jahrhundert versuchen Mikrobiologen den Artenreichtum der Mikroorganismen im Boden zu erfassen, doch die extreme Komplexität und die teilweise unbekannt Strukturen von mikrobiellen Lebensgemeinschaften in den verschiedenen Bodenhabitaten erschweren dies. Kultivierungsabhängige Methoden lassen vermuten, dass ein Gramm Boden lediglich 100 Arten enthält (Dunbar *et al.*, 1999), allerdings ist bekannt, dass weniger als 1% aller Bodenbakterien kultivierbar sind (Amann *et al.*, 1995). Kultivierungsunabhängig kann die taxonomische Zusammensetzung von mikrobiellen Gemeinschaften in Böden über molekulare Techniken und mit Hilfe der Phylogenie der 16S rRNA ermittelt werden. Demnach enthält ein Gramm Boden ca. 10¹⁰ Bakterien und 2-5 x 10⁴ verschiedene Bakterienarten (Torsvik und Ovreas, 2002).

In einer Metaanalyse von 32 *Bacteria*-Klonbibliotheken verschiedenster Böden, waren die abundantesten Bodenbakterien Vertreter der *Proteobacteria* mit durchschnittlich 39% (10-77%), *Acidobacteria* mit 20% (5-46%), *Actinobacteria* mit 13% (0-34%), *Verrucomicrobia* mit 7% (0-21%), *Bacteroidetes* mit 5% (0-18%), *Chloroflexi* mit 3% (0-16%), *Planctomycetes*, *Gemmatimonadetes* und *Firmicutes* mit je 2% (Janssen, 2006).

Die Zahl biologischer, chemischer und physikalischer Faktoren im Boden, die die Abundanz der einzelnen Phyla beeinflussen können, ist sehr groß und führt zu der großen Varianz zwischen den 32 Böden. Außerdem unterscheidet sich die Zusammensetzung der *Bacteria*-Gemeinschaft in zahlreichen Böden Nord- und Südamerikas unabhängig von der geographischen Distanz deutlich; durchschnittlich teilten zwei Böden nur ~1% der

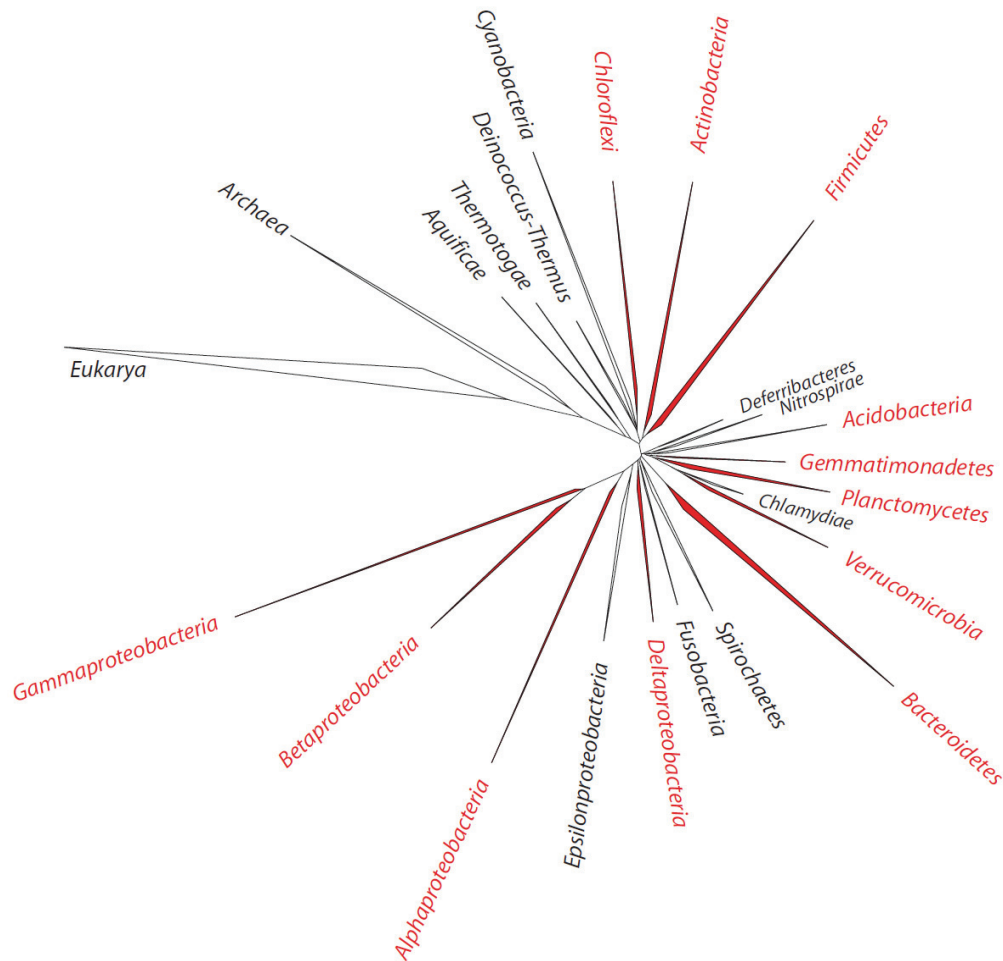


Abbildung 2. Phylogenetischer Stammbaum basierend auf der Phylogenie der 16S rRNA-Gene mit Fokus auf die *Bacteria*. Rot markiert sind die Phyla der *Bacteria*, die häufig und zahlreich in Bodenhabitaten vorkommen.

Phylotypen (Lauber *et al.*, 2009). Diese Unterschiede können durch den pH-Wert erklärt werden. Allerdings ist dieser wahrscheinlich nicht direkt für die Struktur der Bakteriengemeinschaften verantwortlich, sondern beeinflusst selbst andere Bodenparameter, wie z.B. Nährstoffverfügbarkeit (Fierer und Jackson, 2006; Griffiths *et al.*, 2011). So war die Verfügbarkeit von Kohlenstoff der größte Einflussfaktor auf die Abundanzen der einzelnen Phyla in 71 Böden Nordamerikas (Fierer *et al.*, 2007).

Kurze Generationszeiten, ein enormes evolutionäres Potential und ein großes Verhältnis von Oberfläche-zu-Volumen erlauben es Bodenbakterien sich schnell an wechselnde Umweltbedingungen anzupassen. Die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft im Boden hängt zum Teil von sich jahreszeitlich ändernden Pflanzeneffekten auf Umweltbedingungen ab (Bossio *et al.*, 1998; Bardgett *et al.*, 1999). Diese Studien weisen darauf hin, dass es aufgrund von saisonalen Schwankungen z.B. der Bodentemperatur, Bodenfeuchte und Verfügbarkeit von Nährstoffen, die Mikroorganismen in ihren

Mikrohabitaten erfahren, auch saisonale Veränderungen der mikrobiellen Diversität im Boden gibt. Zwar variiert auch der pH-Wert z.B. in Eichen- und Lärchenstreu monatlich, führte aber nicht zu einer Veränderung des pH-Werts im betreffenden Boden (Frankland *et al.*, 1963). Saisonabhängigkeit wird vor allem durch Veränderungen in Bodenfeuchte und -temperatur hervorgerufen - beides Kontrollfaktoren mikrobieller Gemeinschaften (Stres *et al.*, 2008). Höhere Temperaturen können unter anderem die mikrobielle Aktivität steigern, so dass sich die mikrobielle Gemeinschaft dahingehend verändert, dass Mikroorganismen, die auch bei hohen Temperaturen wachsen können und schnellere Wachstumsraten haben, begünstigt werden (Zogg *et al.*, 1997; Ehrenfeld *et al.*, 1997). Zusätzlich ändert sich die Nährstoffverfügbarkeit saisonabhängig (Farley und Fitter, 1999), ein weiterer Faktor, der Bodenmikroorganismen beeinflusst. In unkultivierten Böden gemäßiger Ökosysteme nehmen die Nährstoffe im Frühjahr generell zu, während es im Herbst oder Winter noch einen zweiten kleineren Zuwachs an Nährstoffen geben kann (Chapin, 1980). Eine hohe Bodenfeuchte erleichtert wiederum einen schnellen Nährstoffaustausch und erhöht die mikrobielle Mobilität. In einem alpinen Tundraboden wurden zwei saisonabhängige Wechsel in der mikrobiellen Zusammensetzung detektiert, der erste war mit der Schneeschmelze verbunden, während der zweite in der Vegetationsperiode auftrat (Björk *et al.*, 2008). Weiterhin hatten saisonale Veränderungen der Bodentemperatur, Bodenfeuchte und Nährstoffgehalte einen großen Einfluss auf die Diversität von nitrifizierenden und denitrifizierenden Mikroorganismen in unkultivierten und konventionell landwirtschaftlich bearbeiteten Böden (Smith *et al.*, 2010).

Die Struktur bakterieller Gemeinschaften wird nicht nur durch Bodenparameter sondern auch durch Landnutzung und Landnutzungsänderungen beeinflusst (Acosta-Martinez *et al.*, 2008; Wakelin *et al.*, 2008; Jesus *et al.*, 2009). Analysen der relativen Abundanz der 16S rRNA der häufigsten *Bacteria*-Phyla im Boden zeigte, dass die Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaften in Böden, die lange landwirtschaftlich genutzt wurden, sehr ähnlich war, obwohl es Unterschiede in der Zusammensetzung der Pflanzengemeinschaften und der Art der landwirtschaftlichen Nutzung gab (Buckley und Schmidt, 2001). Allerdings unterschieden sich die Bakteriengemeinschaften signifikant zwischen Böden, die schon lange bzw. noch nie landwirtschaftlich genutzt wurden (Buckley und Schmidt, 2001). Auch Sun *et al.* (2004) fand eine Beziehung zwischen der Zusammensetzung von Bakteriengemeinschaften im Boden und der Art der landwirtschaftlichen Nutzung. Wahrscheinlich ist jedoch die Änderung von Bodeneigenschaften durch Landnutzung und nicht die Landnutzungsänderung selbst verantwortlich für Änderungen in der Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaften im Boden (Lauber *et al.*, 2008). Die Zusammensetzung von Bakteriengemeinschaften im

Boden erwies sich allerdings gegenüber Landnutzungsänderungen stabiler als gegenüber jahreszeitlichen Variationen (Hamer *et al.*, 2008).

Mikrobielle Gemeinschaften im Boden, und die Ökosystemprozesse, zu denen sie beitragen, werden auch von Veränderungen der Pflanzenartenvielfalt beeinflusst (Zak *et al.*, 2003; Grüter *et al.*, 2006). Die Art der Pflanzen als auch der Bodentyp haben einen wesentlichen Einfluss auf die Struktur und Funktion mikrobieller Gemeinschaften im Boden (Berg und Smalla, 2009). So beeinflusste der Pflanzenbewuchs in Wald, Weideland und Flächen mit Sträuchern die Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft deutlicher als klimatische oder bodenchemische Eigenschaften (Chan *et al.*, 2008). Es ist bekannt, dass Mikroorganismen für den größten Teil des Nährstoffumsatzes in Böden verantwortlich sind und somit Pflanzendiversität und Produktivität beeinflussen. Demzufolge spielen mikrobielle Gemeinschaften eine wichtige Rolle in der Landwirtschaft (van der Heijden *et al.*, 2008) und die Analyse ihrer Zusammensetzung ist nicht nur von wissenschaftlichem sondern auch von agronomischem Interesse.

4.4. Das Phylum *Acidobacteria*

Der erste Vertreter der *Acidobacteria*, *Acidobacterium capsulatum*, wurde bereits 1991 beschrieben (Kishimoto *et al.*, 1991). Allerdings wurde erst 1997 festgestellt, dass *Acidobacteria* weit verbreitet und im Boden sehr häufig sind (Ludwig *et al.*, 1997; Kuske *et al.*, 1997). Über das Phylum *Acidobacteria* ist insgesamt nur wenig bekannt, da seine Vertreter bisher selten erfolgreich kultiviert werden konnten. Durch zahlreiche 16S rRNA-Gen-basierte Untersuchungen konnte jedoch gezeigt werden, dass *Acidobacteria* abundant und ubiquitär vorkommen (Hugenholtz *et al.*, 1998a). So wurden *Acidobacteria* in den verschiedensten Habitaten nachgewiesen, z.B. im Boden (Barns *et al.*, 1999; Janssen, 2006), in heißen Quellen (Hugenholtz *et al.*, 1998b; Barns *et al.*, 1999; Bryant *et al.*, 2007), im Moor (Dedysh *et al.*, 2006), in sauren Seen von Abraumhalden (Kleinstaub *et al.*, 2008), im Plankton des Mittelmeers (Quaiser *et al.*, 2008) und in Höhlen (Zimmermann *et al.*, 2005; Meisinger *et al.*, 2007). Die phylogenetische Diversität der *Acidobacteria* ist vergleichbar mit der des Phylums *Proteobacteria* (Hugenholtz *et al.*, 1998a) und erst kürzlich wurde die Anzahl der Untergruppen von 8 (Hugenholtz *et al.*, 1998a), über 11 (Zimmermann *et al.*, 2005) auf 26 (Barns *et al.*, 2007) erweitert. Trotzdem gibt es bisher nur 134 Isolate gegenüber 41.000 16S rRNA-Gensequenzen, die den *Acidobacteria* zugeordnet werden können („*Ribosomal Database Project*“ (RDP); <http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>, Cole *et al.*, 2009). Vorrangig gehören diese Isolate zur Untergruppe Gp1, aber auch den Untergruppen Gp2, Gp3, Gp4, Gp6 und Gp8 konnten

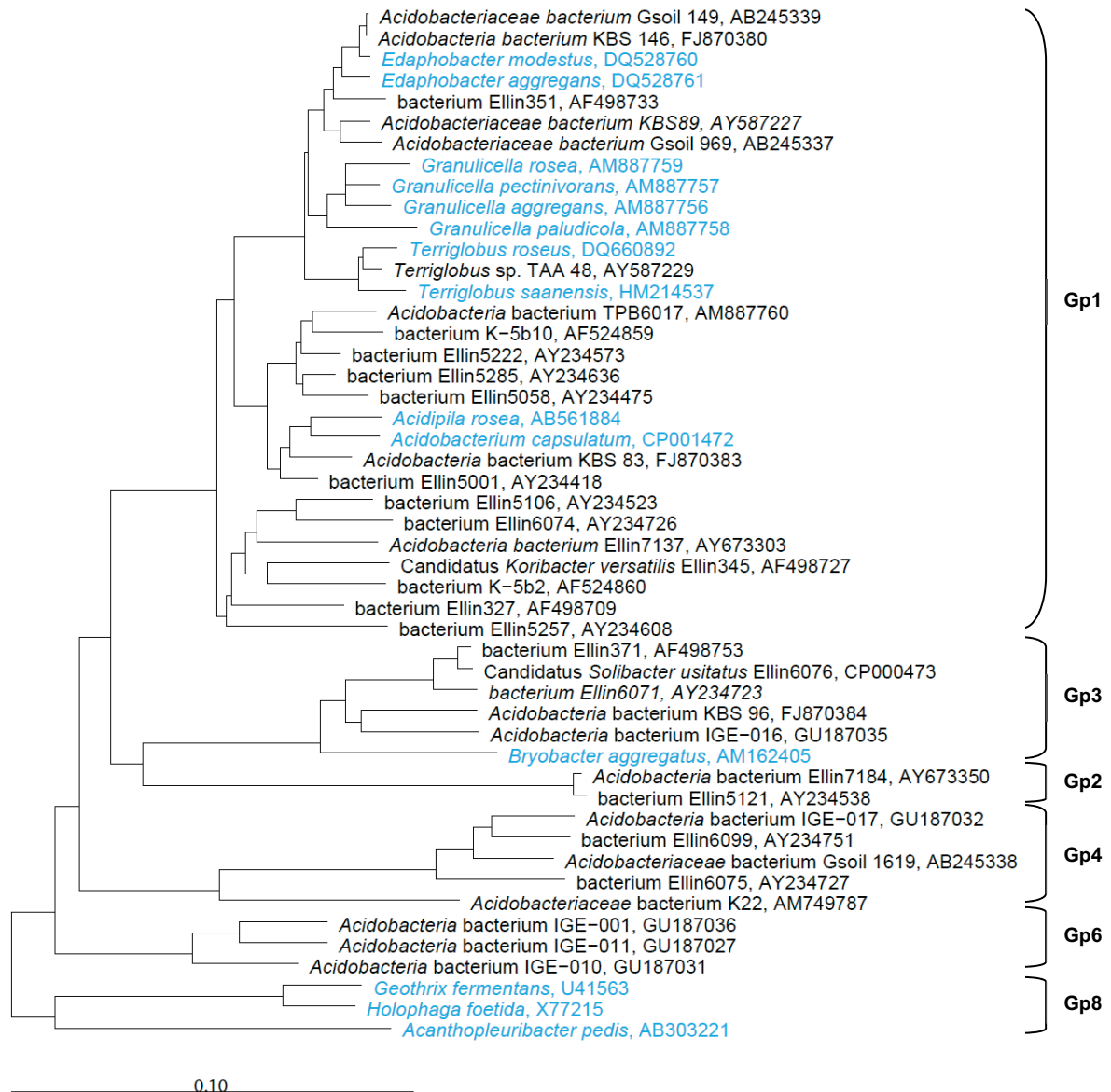


Abbildung 3. 16S rRNA-Phylogenie isolierter und/oder beschriebener *Acidobacteria*. Blau markiert sind 14 beschriebene Vertreter, alle übrigen sind eine Auswahl isolierter *Acidobacteria* aus verschiedensten Bodenhabitaten. Bisher konnten nur *Acidobacteria* der Untergruppen Gp1-Gp4, Gp6, und Gp8 erfolgreich kultiviert werden. Der Maßstab entspricht 10% Sequenzunterschied.

kultivierte Vertreter zugeordnet werden (Janssen *et al.*, 2002; Sait *et al.*, 2002; 2006; Joseph *et al.*, 2003; Stevenson *et al.*, 2004b). Medien mit niedrigem pH-Wert (pH 5,5, Sait *et al.*, 2006), erhöhten CO₂-Konzentrationen in der Gasphase (Stevenson *et al.*, 2004b), vielfältigen Substratzusätzen (Pankratov *et al.*, 2008) und eine lange Inkubationszeit (Davis *et al.*, 2005; 2011) sind Kultivierungsmethoden, die zur Isolierung von *Acidobacteria* geführt haben. Zuerst wurde *Acidobacterium capsulatum* isoliert und beschrieben (Kishimoto *et al.*, 1991), ein Vertreter der Untergruppe Gp1, so wie zwei *Terriglobus*-Spezies (Eichorst *et al.*, 2007; Mannistö *et al.*, 2010), zwei *Edaphobacter*-

Spezies (Koch *et al.*, 2008), drei *Granulicella*-Spezies (Pankratov und Dedysh, 2010), *Acidipila rosea* (Okamura *et al.*, 2011), *Bryocella elongata* (Dedysh *et al.*, 2011) und *Telmatobacter bradus* (Pankratov *et al.*, 2011). *Bryobacter aggregatus* ist der erste taxonomisch beschriebene Vertreter der Untergruppe Gp3 (Kulichevskaya *et al.*, 2010). *Acanthopleuribacter pedis* (Fukunaga *et al.*, 2008), isoliert aus einer Käferschnecke, *Holophaga foetida*, ein homoacetogenes Bakterium, welches methoxylierte Aromaten abbauen kann (Liesack *et al.*, 1994) und *Geothrix fermentans*, ein eisenreduzierendes, chemoorganotrophes Bakterium (Coates *et al.*, 1999) sind die einzigen beschriebenen Vertreter der Untergruppe Gp8 (Abb. 2). Zwei aus australischem Boden isolierte *Acidobacteria*, Candidatus *Koribacter versatilis* (Gp1) und Candidatus *Solibacter usitatus* (Gp3) sind zwar noch nicht vollständig beschrieben, aber ihre Genomsequenzen sind bekannt (Ward *et al.*, 2009). Candidatus *Chloracidobacterium thermophilum* wurde aus heißen Quellen isoliert und ist ein aerobes, Bacteriochlorophyll synthetisierendes, phototrophes *Acidobacterium* der Untergruppe Gp1 (Bryant *et al.*, 2007). Alle beschriebenen Vertreter der *Acidobacteria* sind gram-negativ, die meisten leben aerob und zumindest die Vertreter der Untergruppe Gp1 bevorzugen einen eher sauren pH-Wert. Diese kultivierten und taxonomisch beschriebenen Isolate spiegeln aber bei Weitem nicht die Diversität der *Acidobacteria* wieder und limitieren die Kenntnisse über deren Physiologie und Ökologie (Tab. 1).

In einer Studie von Ward *et al.* (2009) wurden die Genome von *Acidobacterium capsulatum* und zwei aus Boden isolierten *Acidobacteria*, Candidatus *Koribacter versatilis* (Gp1) und Candidatus *Solibacter usitatus* (Gp3), untereinander verglichen. Die daraus resultierenden Hinweise zur Physiologie der *Acidobacteria* legen nahe, dass alle drei Arten vielseitig heterotroph sind und Kohlenstoffquellen wie einfache Zucker, Aminosäuren, einige organische Säuren, aber auch komplexere Substrate wie Pektin, Stärke, Cellulose und Chitin nutzen können. Die Genome codieren unspezifische Membranproteine der Major-Facilitator-Superfamilie und hochaffine ABC-Transporter - eine gute Anpassung an nährstoffarme Bedingungen. Die untersuchten *Acidobacteria* sind ebenfalls in der Lage Nitrat und Nitrit zu reduzieren, aber nicht zur Stickstofffixierung oder Denitrifikation befähigt. Die Existenz von Cellulose-Synthese-Genen und hochmolekularen Exkretions-Proteinen lässt auf eine Trockenresistenz oder Bildung von Biofilmen schließen. Diese genomischen Eigenschaften deuten auf langlebige, sich langsam teilende Organismen hin, die unter nährstoffarmen Bedingungen einen langsamen Metabolismus zeigen und an Fluktuationen der Bodenfeuchtigkeit angepasst sind (Ward *et al.*, 2009). Weitere Aufschlüsse über die Physiologie der *Acidobacteria* lieferte eine Studie von Pankratov *et al.* (2008), in der *Acidobacteria* aus Moorboden

Tabelle 1. Phänotypische Charakteristika taxonomisch beschriebener Acidobacteria

	<i>Acidobacterium capsulatum</i> ¹	<i>Terriglobus sp.</i> ²	<i>Edaphobacter sp.</i> ³	<i>Acidipila rosea</i> ⁴	<i>Granulicella sp.</i> ⁵	<i>Bryocella elongata</i> ⁶	<i>Telmatobacter bradus</i> ⁷	<i>Bryobacter aggregatus</i> ⁸	<i>Acanthopleuri-bacter pedis</i> ⁹	<i>Geothrix fermentans</i> ¹⁰	<i>Holophaga foetida</i> ¹¹
Herkunft	<i>acidic mine drainage</i>	Boden	Boden	Boden	Moorboden	Moorboden	Moorboden	Moorboden	Käferschnecke	Grundwasser-Sediment	Süßwasser
Untergruppe	Gp1	Gp1	Gp1	Gp1	Gp1	Gp1	Gp1	Gp3	Gp8	Gp8	Gp8
Zellform	Stäbchen	Stäbchen	Stäbchen	Kokken	Stäbchen	Stäbchen	Stäbchen	Kokken	Stäbchen	Stäbchen	Stäbchen
Gram-Färbung	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Kapsel	-	-	-	+	-	NA	NA	+	NA	NA	NA
Pigmentierung	orange	pink	beige	pink	rot/pink	pink	-	-	gelb	weiß	beige
G+C-Gehalt	60,8	57,3 - 59,8	55,8-56,9	59,5	57,3-59,3	60,7	57,6	55,6	56,7	NA	62,5
Katalase	+	+	+	NA	+	+	+	+	+	+	NA
Oxidase	-	-	+/-	NA	+/-	-	-	-	+	+	NA
Beweglichkeit	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-
pH (Optimum)	3-6 (5)	4,5-7 (6)	4,0-7 (5,5)	3-6 (4,5)	3-7,5 (3,8-4,5)	3,2-6,6 (4,7-5,2)	3-7,5 (4,5-5)	4,5-7,2 (5,5-6,5)	5-9 (7-8)	NA	5,5-8 (6,8-7,5)
Temperatur (Optimum)	25-37 (30)	4-30 (25)	15-37 (30)	22-37 (30)	2-33 (15-22)	6-32 (20-24)	4-35 (20-28)	6-33 (22-28)	15-30 (30)	26-40 (35)	10-35 (28-32)
Häufigste Fettsäuren	C _{15:0} iso C _{18:1} ω9c	C _{16:0} C _{15:0} iso C _{16:1} ω7c/ C _{15:0} iso 2-OH	C _{15:0} iso oder C _{16:0} iso, C _{16:1} ω7c/ C _{16:1} ω7c C _{15:0} iso 2-OH oder C _{17:1} ω8c	C _{16:0} C _{15:0} iso C _{16:1} ω7c	C _{16:0} C _{15:0} iso C _{16:1} ω7c/ C _{15:0} iso 2-OH	C _{15:0} iso C _{16:1} ω7c	C _{15:0} iso C _{16:1} ω9c	C _{16:0} C _{15:0} iso C _{16:1} ω7c/ iso 2-OH	C _{16:0} C _{15:0} iso C _{17:0} iso C _{20:5} ω3c	NA	NA
Menachinon	MK-8	NA	NA	MK-8	MK-8	MK-8	MK-8	MK-9, 10	MK-6, 7	NA	NA
aerob	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
anaerob	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
Org. Säuren	NA	-	-	-	+	NA	NA	-	-	+	+
Aromaten	NA	NA	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	-	+
Glucose	+	+	+	+	+	NA	NA	+	+	-	-
Fructose	+	+	+/-	+	+	NA	NA	+	-	NA	NA
Arabinose	+	+	+/-	+	-	NA	NA	+	NA	NA	NA
Xylose	+	+	+/-	+	+/-	NA	NA	+	NA	NA	NA
Galactose	+	+	-	+	+/-	NA	NA	+	NA	NA	NA
Mannose	-	+	-	+	+/-	NA	NA	+	NA	NA	NA
Glycerin	-	NA	NA	+	NA	NA	NA	+	NA	NA	NA
Methanol	-	NA	-	-	-	NA	NA	-	NA	-	-
Ethanol	-	NA	-	-	-	NA	NA	-	NA	-	-
Sorbitol	-	+/-	+/-	-	+/-	NA	NA	+	NA	NA	NA
Lactose	NA	+	+	+	+/-	NA	NA	+	NA	NA	NA
Maltose	+	+	-	+	+/-	NA	NA	+	NA	NA	NA
Cellobiose	+	+	-	+	+/-	NA	NA	+	NA	NA	NA
Stärke	+	+	NA	NA	+	NA	NA	+	NA	NA	NA
Pektin	NA	+	NA	NA	+	+	NA	+	NA	NA	NA
Cellulose	NA	+	NA	NA	-	+	+	+	NA	NA	NA

1 (Kishimoto et al., 1991), 2 (Eichorst et al., 2007; Mannisto et al., 2010), 3 (Koch et al., 2008), 4 (Okamura et al., 2011), 5 (Pankratov und Dedysh, 2010), 6 (Dedysh et al., 2011), 7 (Pankratov et al., 2011), 8 (Kulichevskaya et al., 2010), 9 (Fukunaga et al., 2008), 10 (Coates et al., 1999), 11 (Liesack et al., 1994)

durch Zugabe von Glucose, Pektin, Xylan, Stärke, Ethanol und Methanol stimuliert werden konnten und Isolate auch bei niedrigen Temperaturen noch aktiv wuchsen. Auch die Verwendung von Pflanzenpolymeren zur Isolierung erhöhte die Diversität von kultivierbaren *Acidobacteria*, verringerte aber ihre Abundanz im Vergleich zur Verwendung von leicht oxidierbarem Kohlenstoff (Eichorst *et al.*, 2011). Ebenso fanden sich in einem tropischen Waldboden neben *Actinobacteria*, *Firmicutes* und *Proteobacteria* auch *Acidobacteria* unter Lignin-abbauenden Bakterien (Deangelis *et al.*, 2011). Des Weiteren nahmen die Abundanz und/oder Diversität von *Acidobacteria* in 2,4,6-Trinitrotoluol- (George *et al.*, 2009) oder Phenylharnstoff-Herbizid (El Fantroussi *et al.*, 1999) kontaminierten Böden ab, wohingegen sie in mit polychlorierten Biphenylen verseuchtem Boden zunahm (Nogales *et al.*, 1999). Folglich scheinen einige *Acidobacteria* in der Lage zu sein hochmolekulare Pflanzenpolymere oder auch spezifische Bodenschadstoffe abzubauen. Erst kürzlich konnte durch Hydrolyse des kompletten Zellmaterials von 13 Vertretern der *Acidobacteria* der Untergruppen Gp1 und Gp3 das Vorhandensein eines ungewöhnlichen Membranlipids (*iso-diabolic acid*, 22-43 % aller Fettsäuren) gezeigt werden (Sinninghe Damste *et al.*, 2011). *Acidobacteria* könnten außerdem eine Quelle neuartiger Polyketide mit antibiotischer Wirkung sein (Parsley *et al.*, 2011).

Die phylogenetische Diversität, Ubiquität und Abundanz der *Acidobacteria*, vor allem in Bodenhabitaten legt eine wichtige Rolle des Phylums bei biogeochemischen Prozessen sowie vielfältige Stoffwechseleigenschaften nahe. In Analysen von 16S rRNA-Gen Klonbibliotheken stellen *Acidobacteria* durchschnittlich 20% der typischen Bodenbakteriengemeinschaft dar (Janssen, 2006). Neben Klonbibliotheken zeigte auch die Pyrosequenzierung von 16S rRNA-Genen aus vielfältigen Böden, dass die *Acidobacteria*-Untergruppen Gp1, Gp2, Gp3, Gp4 und Gp6 im Boden dominieren (Jones *et al.*, 2009). Diese Studie verdeutlichte auch, dass die Abundanz der Untergruppen Gp1, Gp2, Gp3, Gp4, Gp5, Gp6, Gp7 und Gp16 zwischen den 87 untersuchten Böden stark variierte. Generell wurde die höchste Abundanz von *Acidobacteria* in Böden mit dem niedrigsten pH-Wert festgestellt, wobei die Untergruppen Gp1 und Gp3 eine starke negative Korrelation, die Untergruppen Gp4, Gp6, Gp7 und Gp16 eine positive Korrelation und die Untergruppe Gp5 keine Korrelation mit dem pH-Wert aufzeigten. Andere Umweltparameter wie Jahresniederschlag, organischer Kohlenstoff und CN-Verhältnis korrelierten schwächer aber positiv mit der Abundanz der *Acidobacteria* in den Untersuchungsflächen (Jones *et al.*, 2009). Eine qPCR-basierte Studie von 71 Böden zeigte jedoch eine negative Korrelation der relativen Abundanz der *Acidobacteria* zur Verfügbarkeit von Kohlenstoff im Boden (Fierer *et al.*, 2007). Weitere Studien fanden eine

hohe *Acidobacteria*-Abundanz in älteren und nährstoffärmeren im Vergleich zu jüngeren und nährstoffreicheren Böden (Nemergut *et al.*, 2007; Tarlera *et al.*, 2008; Kuramae *et al.*, 2010). In einer Studie zur Bodenhorizont-spezifischen Verteilung von *Bacteria* waren *Acidobacteria* im B-Horizont doppelt so zahlreich wie im A-Horizont, wobei Untergruppe Gp6 im A-Horizont und Untergruppe Gp4 im B-Horizont dominierte (Will *et al.*, 2010). Die Variation in der Verteilung der *Acidobacteria* und ihrer Untergruppen geht wahrscheinlich mit den unterschiedlichen Bodeneigenschaften und Nährstoffbedingungen der Bodenhorizonte einher. Die Diversität und Aktivität von Bakterien ist des Weiteren stark abhängig von der Wasserverfügbarkeit im Boden. *Acidobacteria* waren in einigen Studien in trockenen Böden abundanter als in feuchten (Diallo *et al.*, 2004; Castro *et al.*, 2010), in anderen Studien verhielt es sich umgekehrt (Rasche *et al.*, 2010). In dem Birkenwaldboden nahm die Abundanz der *Acidobacteria* saisonal bedingt auch mit höheren Bodentemperaturen ab (Rasche *et al.*, 2010). Die genannten Studien unterstützen die Annahme, dass *Acidobacteria* langsam wachsende, oligotrophe Bakterien sind, deren Abundanz in einer Gemeinschaft vom pH-Wert reguliert wird.

Aufgrund der hohen Abundanz und metabolischen Aktivität in der Rhizosphäre spielen *Acidobacteria* wahrscheinlich eine Rolle für die ablaufenden biogeochemischen Prozesse in diesem Habitat (Lee *et al.*, 2008). *Holophagae* bevorzugten sogar die Rhizosphäre gegenüber undurchwurzeltem Boden (da Rocha *et al.*, 2010), wohingegen Kielak *et al.* (2008) eine höhere Diversität und Abundanz von *Acidobacteria* in undurchwurzeltem Boden fand. Die überirdische Pflanzendiversität scheint keinen direkten Einfluss auf die Gemeinschaft der *Acidobacteria* im Boden zu haben (Zul *et al.*, 2007). Die Abundanz der Untergruppe Gp1 verdoppelte sich in einem Grünlandboden wenn alle Pflanzen entfernt wurden, wahrscheinlich begründet durch die geringere Verfügbarkeit von organischem Kohlenstoff und Stickstoff bei fehlendem Eintrag von organischem Material durch Pflanzen (Thomson *et al.*, 2010).

Der Einfluss von Landnutzungsänderungen auf Bakteriengemeinschaften im Boden bzw. ob Landnutzung zu wieder erkennbaren Mustern in der Zusammensetzung von Bakteriengemeinschaften führt, wurde bisher wenig untersucht. In einer Studie zur Zusammensetzung bakterieller Gemeinschaften in Böden verschiedener Landnutzungstypen (Laubholz-, Kieferwald, Ackerland, Viehweide) war die Abundanz der *Acidobacteria* im Wald signifikant höher als in landwirtschaftlich genutzten Böden (Lauer *et al.*, 2008). Ebenso dominierten *Acidobacteria* im Boden von Laubwäldern und zeigten geringere Abundanzen in Flächen mit Sträuchern und Weideland (Chan *et al.*, 2008). In einer anderen Studie dominierten *Acidobacteria* zwar die bakterielle Gemeinschaft in unterschiedlich bewirtschafteten Grünländern und Wäldern, zeigten aber im Gegensatz zu

anderen Phyla keine Unterschiede in der Abundanz des gesamten Phylums sondern nur für einzelne Untergruppen zwischen diesen Landnutzungsformen (Nacke *et al.*, 2011a). In reinen Weizenfeldern waren einige Cluster der *Acidobacteria*-Untergruppe Gp1 häufiger zu finden als in Feldern mit Weizen-Sojabohnen-Fruchtfolge, wo Vertreter der Untergruppe Gp4 zahlreicher waren, während Vertreter der Untergruppe Gp2 in nicht landwirtschaftlich bearbeitetem Boden am häufigsten auftraten (Yin *et al.*, 2010). Landwirtschaftliche Nutzung ist die menschliche Aktivität, die physikalische, chemische und biologische Bodeneigenschaften und -prozesse am stärksten verändert. So beeinflusst Landwirtschaft auch die Diversität und Struktur mikrobieller Gemeinschaften im Boden, allerdings sind die spezifischen Veränderungen verschiedener Bakterienpopulationen hinsichtlich Landnutzungsänderungen bisher wenig untersucht.

4.5. Stabile Isotope und ‚next generation sequencing‘ in der mikrobiellen Ökologie

Welche Funktionen Mikroorganismen in natürlichen Habitaten erfüllen, bleibt eine der wichtigsten Fragen der mikrobiellen Ökologie. Lange versuchte man diese über die Isolierung und Identifizierung von Mikroorganismen sowie deren physiologische, biochemische und genetische Charakterisierung zu beantworten. Von diesen metabolischen und phänotypischen Eigenschaften der Isolate ließen sich dann ihre potentiellen Funktionen und nahen Verwandten in der natürlichen Umgebung ableiten. Abhängig vom Habitat können gegenwärtig allerdings maximal 15% der Mikroorganismen, die in einem natürlichen Ökosystem vorkommen, mit den bekannten Methoden kultiviert werden (Amann *et al.*, 1995). Demzufolge ist die Kultivierung für repräsentative Aussagen über Identität und Funktion der vorhandenen Mikroorganismen in einem Ökosystem ungeeignet. Erst die Entwicklung von molekularbiologischen Methoden, wie z.B. der vergleichenden Sequenzanalyse des 16S rRNA-Gens als phylogenetischer Marker (Olsen *et al.*, 1986; Pace *et al.*, 1986; Woese, 1987; 2000), führten zur Entdeckung unkultivierter Mikroorganismen sowie neuer taxonomischer Gruppen (Rappe und Giovannoni, 2003) und werden seither vielfältig zur Beschreibung der phylogenetischen Diversität mikrobieller Gemeinschaften angewendet.

DNA-basierte Analysen geben lediglich einen Aufschluß über das genetische Potenzial eines Habitats, da DNA auch in ruhenden, sterbenden, oder toten Zellen überdauern oder als extrazelluläre DNA vorkommen kann (Coolen und Overmann, 1998). Im Gegensatz dazu ist RNA sehr instabil, und der Gehalt ribosomaler RNA in einer Zelle abhängig von ihrem physiologischen Zustand. Mit Hilfe von 16S rRNA-basierten Analysen erhält man

einen Überblick über die metabolisch aktiven Mitglieder in einer komplexen mikrobiellen Gemeinschaft (Mannistö *et al.*, 2009). Einen schnellen Vergleich der Diversität und Zusammensetzung von komplexen mikrobiellen Gemeinschaften bei gleichzeitig hohem Probendurchsatz bieten so genannte molekulare Fingerabdruckmethoden (*„fingerprinting“*), wie die denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE, Muyzer *et al.*, 1993) und der terminale Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (T-RFLP, Liu *et al.*, 1997). Wie die Sequenzanalyse basieren diese Methoden ebenfalls auf Untersuchungen der 16S rRNA-Gene oder der revers transkribierten 16S rRNA. Allerdings kann man auch darüber kaum Rückschlüsse auf die Physiologie und die damit verbundene Funktion der Mikroorganismen in ihrem natürlichen Habitat ziehen (Liesack *et al.*, 1997).

Zur Verknüpfung von Identität und Funktion mikrobieller Gemeinschaften werden z.B. stabile Isotope von Atomen, die in biologischen Molekülen vorkommen, verwendet. Diese so genannte stabile Isotopenbeprobung (*„Stable Isotope Probing“*; SIP) basiert auf dem Einbau des stabilen Isotops in die Biomoleküle von Mikroorganismen, die aktiv an der Umsetzung des z.B. ^{13}C -markierten Substrats beteiligt waren (Radajewski *et al.*, 2000). Der Einbau des Isotops in die mikrobielle Biomasse spiegelt die substratspezifische metabolische Aktivität der Gemeinschaft wieder. Die Verfolgung des Flusses eines ^{13}C -markierten Substrats durch die mikrobielle Gemeinschaft und die anschließende isotopische Analyse von Biomarkern, wie Phospholipid-Fettsäuren (PLFA; Boschker *et al.*, 1998), DNA (Radajewski *et al.*, 2000), RNA (Manefield *et al.*, 2002a) und Proteinen (Jehmlich *et al.*, 2008a; 2008b) erlaubt daher die Identifizierung der aktiv an der Umsetzung des Substrats beteiligten Mikroorganismen. Aufgrund der Massendifferenz können ^{13}C -markierte ‚schwere‘ Nukleinsäuren von nicht markierten (^{12}C) ‚leichten‘ Nukleinsäuren mittels Dichtegradientenzentrifugation getrennt werden. Anhand der ^{13}C -markierten Nukleinsäuren können die aktiven Mikroorganismen direkt über *„fingerprinting“*-Analysen, und anschließende Sequenzierung der 16S rRNA-Gene identifiziert werden. DNA-SIP ermöglicht eine hohe phylogenetische Auflösung der an der Umsetzung des ^{13}C -markierten Substrats beteiligten mikrobiellen Gemeinschaft (Dumont und Murrell, 2005; Friedrich, 2006), allerdings sind hohe Konzentrationen an markiertem Substrat und lange Inkubationszeiten erforderlich. Eine Weiterentwicklung der SIP-Methode ist die Verwendung des 16S rRNA-Moleküls selbst als Biomarker (RNA-SIP; Lueders *et al.*, 2004a; 2004b; Manefield *et al.*, 2002b). Die RNA-Syntheserate ist durch eine höhere Kopienzahl und Unabhängigkeit von der Zellreplikation größer als die der DNA. RNA-SIP ist daher wesentlich sensitiver und kombiniert die phylogenetische Auflösung mit den Vorteilen eines Biomarkers, dessen Gehalt in der Zelle deren Aktivität widerspiegelt

(Manefield *et al.*, 2002a). Eine ausreichend hohe Anreicherung des Isotops in den Nukleinsäuren, die durch den Stoffwechselweg, das verwendete Substrat, die Dauer der Inkubation, das Vorkommen von unmarkiertem Substrat und die Rate der Nukleinsäuresynthese beeinflusst wird, gewährleistet den Erfolg des SIP-Experimentes (Lueders *et al.*, 2004a). Zur effektiven Trennung von markierten und unmarkierten Nukleinsäuren müssen etwa 20% der Markierung in die Nukleinsäuren eingebaut werden (Radajewski *et al.*, 2000). Ein weiteres Problem bei der Trennung stellen rRNA-Spezies verschiedener Dichte da, weshalb sich auch in der ‚schweren‘ Fraktion unmarkierte RNAs befinden können (Manefield *et al.*, 2002b). Ein anderer Faktor, der die Identifizierung der aktiven mikrobiellen Gemeinschaft beeinflussen kann, ist die Möglichkeit von ‚*crossfeeding*‘. Hierbei metabolisieren Mikroorganismen das markierte Substrat und bilden markierte Abbauprodukte, die wiederum von anderen Mikroorganismen verwertet werden können. Auf diese Weise können mikrobielle Populationen markiert werden, die an dem Abbau des ursprünglichen Substrats nicht direkt beteiligt sind. Durch die Analyse des Einbaus von ^{13}C über den zeitlichen Verlauf der Inkubation können solche Nahrungsketten aufgeklärt werden (Lueders *et al.*, 2004c). DNA- und RNA-SIP wurden bisher vor allem genutzt um den Abbau von einfachen Substraten wie CO_2 (Whitby *et al.*, 2001), CH_4 (Morris *et al.*, 2002), Glucose (Padmanabhan *et al.*, 2003), Methanol (Radajewski *et al.*, 2002) und Propionat (Lueders *et al.*, 2004b), aber auch den von komplexeren Substraten wie Cellulose (Bastias *et al.*, 2009; Haichar *et al.*, 2007) und Pflanzenmaterial (Bernard *et al.*, 2007) zu verfolgen. Die stabile Isotopenbeobachtung von Nukleinsäuren stellt somit eine geeignete Methode dar, um die Struktur und *in situ* Funktion von bisher unkultivierten Mikroorganismen in ihrem natürlichen Habitat zu charakterisieren.

Durch Klonierung und Sequenzierung von 16S rRNA-Genen erhält man normalerweise Informationen über ein paar hundert Klone, wohingegen man durch die neuartigen so genannten ‚*next-generation-sequencing*‘-Techniken (wie z.B. Pyrosequenzierung) ein Vielfaches an Sequenzen erhalten kann (Roesch *et al.*, 2007; Acosta-Martinez *et al.*, 2008). Die Pyrosequenzierung ist u. a. durch Amplifikation und Analyse der 16S rRNA-Gene geeignet für die phylogenetische Analyse von mikrobiellen Gemeinschaften in ihrer natürlichen Umgebung. Mit Hilfe von probenspezifischen Schlüsselsequenzen, so genannten ‚*barcodes*‘ oder ‚*tags*‘ bestehend aus kurzen Nukleotidsequenzen, kann eine große Anzahl von Proben zur gleichen Zeit analysiert werden, was die Kosten reduziert und die vergleichende Analyse erleichtert (Roh *et al.*, 2010). Bei der Verwendung des 454-GenomeSequencer (Roche Applied Science) können bis zu 400 Mb Sequenzdaten mit einer durchschnittlichen Leselänge von 400 bp erhalten werden (Ansorge, 2009). Bei

der Pyrosequenzierung synthetisiert eine DNA-Polymerase den komplementären Strang zur einzelsträngigen Matrizen-DNA und jedes Mal, wenn ein Nukleotid eingebaut wird, wird ein anorganisches Pyrophosphat abgegeben. Das Pyrophosphat wird durch die ATP-Sulfurylase zu ATP umgesetzt, welches die Luciferasereaktion antreibt und Licht wird abgestrahlt. Dieser Einbau eines spezifischen Nukleotids wird mit Hilfe einer Kamera detektiert und die Intensität des Lichts ist dabei proportional zur Zahl der eingebauten Nukleotide (Ronaghi, 2001; Margulies *et al.*, 2005). Die Methode der Pyrosequenzierung wurde schon in zahlreichen Studien zur Analyse mikrobieller Gemeinschaften in verschiedensten Habitaten wie z.B. Meerwasser (Sogin *et al.*, 2006; Kirchman *et al.*, 2010), Gletschereis (Simon *et al.*, 2009), Kläranlagen (Lee *et al.*, 2010), heißen Quellen (Miller *et al.*, 2009) und verschiedensten Böden (Roesch *et al.*, 2007; Acosta-Martinez *et al.*, 2008; Lauber *et al.*, 2009; Rousk *et al.*, 2010) angewendet. In den meisten Diversitätsstudien wurden zur Pyrosequenzierung die variablen Bereiche des 16S rRNA-Gens (Neefs *et al.*, 1990) amplifiziert. Die Sequenzen umfassten z.B. die Regionen V1-V2 (Jones *et al.*, 2009; Lauber *et al.*, 2009; Rousk *et al.*, 2010), V3 (Miller *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010) oder V6 (Sogin *et al.*, 2006; Kirchman *et al.*, 2010). Um eine einheitliche, schnelle und akkurate Auswertung der Daten und taxonomische Einordnung der partiellen 16S rRNA-Sequenzen zu erreichen, sind automatisierte bioinformatische Programme und Analysen notwendig (Liu *et al.*, 2008).

4.6. Zielsetzung der Arbeit

Acidobacteria machen in Böden weltweit durchschnittlich 20% der Bakterien aus. Die phylogenetische Diversität, weite Verbreitung und hohe Abundanz dieses Phylums deuten auf eine wichtige Rolle bei biogeochemischen Prozessen und vielfältige Stoffwechseleigenschaften hin. Über die Funktion der *Acidobacteria* im Boden und den Zusammenhang zur Landnutzung ist jedoch nur wenig bekannt.

In der vorliegenden Arbeit sollte daher die funktionelle Relevanz von Diversitätsveränderungen in zahlreichen Grünland- und Waldböden unterschiedlicher Landnutzung untersucht werden. Zielsetzungen waren die Erfassung der Zusammensetzung und Diversität der *Acidobacteria* in Abhängigkeit von Boden- und Standorteigenschaften sowie Pflanzendiversität als auch die Identifizierung wichtiger funktioneller Gruppen. Mittels molekularbiologischer Methoden basierend auf der Phylogenie der 16S rRNA und stabiler Isotopenbeobachtung wurden im Verlauf dieser Arbeit folgende Fragestellungen untersucht:

- Welche Rolle spielen Boden- und Standorteigenschaften, Pflanzendiversität und Landnutzung für die Diversität und Aktivität der *Acidobacteria*?

- Gibt es jahreszeitliche Veränderungen der Zusammensetzung und Diversität der aktiven *Acidobacteria* im Boden?
- Sind *Acidobacteria* am Abbau von Pflanzenmaterial in Wald- und Grünlandböden beteiligt?

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien, Gase, Sterilisationsverfahren

Alle verwendeten Chemikalien wurden, soweit im Text nicht gesondert aufgeführt, im Reinheitsgrad „zur Analyse“ oder in vergleichbaren Reinheitsgraden von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Taufkirchen) und Bio-Rad Laboratories (München) bezogen. Enzyme und molekularbiologische Reagenzien wurden von den Firmen GE Healthcare (München), Applied Biosystems (Darmstadt), Eurogentec Deutschland GmbH (Köln), Promega (Mannheim), Roche Diagnostics (Mannheim) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) geliefert. Oligonukleotide wurden bei Eurofins MWG Operon (Ebersberg) synthetisiert. Alle verwendeten Gase wurden von Air Liquid (Krefeld) und Messer-Griesheim (Darmstadt) bezogen. Die verwendeten Lösungen, Puffer und Medien wurden, wenn nicht anders beschrieben, mit bidestilliertem Wasser angesetzt und durch Autoklavieren bei 121°C für 20 min sterilisiert. Nicht autoklavierbare Substanzen wurden sterilfiltriert (Sterilfilter mit 0,2 µm Porengröße, Nr. FP 30/0,2 CA-S, Schleicher und Schuell GmbH, Dassel). Glasmaterialien wurden bei 180°C für 3 h sterilisiert.

2.2. Probenmaterial und Inkubationsansätze

Diese Arbeit ist Teil des Biodiversitäts-Exploratorien-Projektes (<http://www.biodiversity-exploratories.de>, Fischer *et al.*, 2010). Der verwendete Boden wurde von 27 Grünland- und 30 Waldflächen der Biodiversitäts-Exploratorien Schorfheide-Chorin in Brandenburg (SCH), Hainich-Dün in Thüringen (HAI) und Schwäbische Alb in Baden-Württemberg (ALB) entnommen. Alle Flächen repräsentieren einen Gradienten der Landnutzungsintensität von weitgehend ungenutzten bis zu stark genutzten Ökosystemen. Grünlandflächen können in Wiesen, Mähweiden und Weiden unterteilt werden, die sich in Düngung, Beweidung und Anzahl der Schnitte pro Jahr unterscheiden. Waldflächen lassen sich in Altersklassen-Nadel- und Buchenwälder sowie natürliche Buchenwälder gliedern. Jeder Landnutzungstyp ist in jedem der drei Exploratorien auf je drei Flächen zu finden; im Exploratorium Hainich-Dün sind zusätzlich drei Flächen mit Buchen-Plenterwald vertreten. Neben dieser Einteilung der Flächen in kategorische Landnutzungstypen, wurde ebenfalls ein kontinuierlicher und dimensionsloser Landnutzungsindex nach (Herzog *et al.*, 2006) für alle Grünlandflächen berechnet (Blüthgen *et al.*, 2011). Dieser Index der Landnutzungsintensität beinhaltet die gleichwertigen Variablen Düngung (D), Mahd (M) und Beweidung (W). Für jede Untersuchungsfläche i ,

wurde die Landnutzungsintensität $L[i]$ definiert als die Summe jeder dieser Variablen geteilt durch ihren Mittelwert über alle Untersuchungsflächen eines Exploratoriums:

$$L[i] = D[i] / D[\text{MW}, E] + M[i] / M[\text{MW}, E] + B[i] / B[\text{MW}, E]$$

wobei $D[i]$ die Düngemenge ($\text{kg Stickstoff ha}^{-1} \text{ Jahr}^{-1}$), $M[i]$ die Häufigkeit des Mähens pro Jahr und $B[i]$ die Beweidung ($\text{Viehbestand Tag}^{-1} \text{ ha}^{-1} \text{ Jahr}^{-1}$) auf jeder Untersuchungsfläche i , und $D[\text{MW}, E]$, $M[\text{MW}, E]$ und $B[\text{MW}, E]$ die entsprechenden Mittelwerte jedes Exploratoriums darstellen. Die notwendigen Informationen zur Landnutzung stammen aus Interviews mit Bauern und Landbesitzern der Jahre 2006-2008. Ein Landnutzungs- und Störungsindex für alle Waldflächen wurde von Hessenmoeller *et al.* (2010) berechnet.

Die Untersuchungsflächen wurden mit einer Buchstabenkombination benannt; der erste Buchstabe steht für das Exploratorium (A – ALB, H – HAI, S - SCH), der zweite (E) für *experimental plot* und der dritte für Grünland (G) oder Wald (W). Genaue Angaben zu Lokalisierung, Boden- und Landnutzungscharakteristika aller Untersuchungsflächen sind in Tabelle 2 wiedergegeben.

Bodenproben wurden im April 2008 sowie April, Juni, August und Oktober 2009 (in Zeitabständen von je 8 Wochen) von Grünland- und Waldflächen entnommen. Im April 2008 wurde eine A-Horizont-Mischprobe aus je einem Bohrkern (Durchmesser 8,5 cm) in jeder Ecke und der Mitte einer 20 x 20 m - Fläche sowie 4 dazwischen liegenden Spatenstichen genommen. Zu den vier verschiedenen Zeitpunkten im Jahr 2009 wurde der A-Horizont der 20 x 20 m - Fläche mit je fünf Bohrkernen (Durchmesser 5 cm) in jeder Ecke und der Mitte beprobt. Der Boden wurde grob von Steinen, Stroh- und Wurzelresten befreit, auf eine Korngröße von $\leq 2 \text{ mm}$ gesiebt und bei -80°C gelagert. Vor der weiteren Verwendung zu molekularbiologischen Analysen wurden die fünf Bodenproben einer Fläche und eines Probenahmezeitpunktes 2009 zu gleichen Anteilen gemischt.

Die nachfolgend aufgeführten Daten zu Boden- und Standorteigenschaften aller Untersuchungsflächen wurden von Mitarbeitern des Biodiversitäts-Exploratorien-Projektes im Jahr 2008 erhoben. Der pH-Wert der Böden wurde in destilliertem Wasser und einer 10 mM CaCl_2 -Lösung im Verhältnis Boden zu Lösung von 1:2,5 bestimmt (Verena Nägele, Ludwig-Maximilians-Universität München). Der Gehalt an organischem Kohlenstoff (C, $[\text{g kg}^{-1}]$) und Gesamtstickstoff (N, $[\text{g kg}^{-1}]$) wurde durch Verbrennungsanalyse (Vario Max, Elementar Analysensysteme GmbH, Hanau) analysiert und das CN-Verhältnis berechnet (Nadine Herold, Max-Planck-Institut für Biogeochemie,

Tabelle 2. Lokalisierung, Boden- und Landnutzungscharakteristika aller Untersuchungsflächen (Quellen: Projektdatenbank BEXIS, Fischer *et al.*, 2010)

Exploratorium	Plot	Bodentyp	Landnutzung	Beweidung	Mahd	Düngung	N-Breite	O- Länge
Schwäbische Alb (ALB)	AEG1	Leptosol	Wiese	-	2	ja	48° 23' 52,8"	9° 20' 31,2"
	AEG2	Leptosol	Wiese	-	3	ja	48° 22' 36,7"	9° 28' 22,0"
	AEG3	Leptosol	Wiese	-	2	ja	48° 24' 32,0"	9° 31' 56,6"
	AEG4	Leptosol	Mähweide	Rind	1	ja	48° 22' 51,2"	9° 25' 8,0"
	AEG5	Leptosol	Mähweide	Rind/Pferd	1	ja	48° 23' 45,2"	9° 26' 21,1"
	AEG6	Leptosol	Mähweide	Rind/Pferd	1	ja	48° 24' 4,5"	9° 26' 30,0"
	AEG7	Leptosol	Weide	Schaf	-	nein	48° 23' 29,1"	9° 22' 36,6"
	AEG8	Leptosol	Weide	Schaf	-	nein	48° 25' 21,5"	9° 29' 31,6"
	AEG9	Leptosol	Weide	Schaf	-	nein	48° 23' 40,8"	9° 30' 10,1"
	AEW1	Cambisol	AKL Fichte	-	-	-	48° 28' 41,1"	9° 20' 3,9"
	AEW2	Leptosol	AKL Fichte	-	-	-	48° 22' 48,0"	9° 21' 5,2"
	AEW3	Cambisol	AKL Fichte	-	-	-	48° 24' 44,1"	9° 21' 20,1"
	AEW4	Cambisol	AKL Buche	-	-	-	48° 23' 56,8"	9° 14' 41,4"
	AEW5	Cambisol	AKL Buche	-	-	-	48° 25' 10,6"	9° 24' 52,9"
	AEW6	Cambisol	AKL Buche	-	-	-	48° 23' 38,6"	9° 26' 45,4"
	AEW7	Leptosol	NW Buche	-	-	-	48° 23' 46,5"	9° 15' 40,9"
AEW8	Cambisol	NW Buche	-	-	-	48° 22' 57,3"	9° 22' 56,6"	
AEW9	Leptosol	NW Buche	-	-	-	48° 22' 9,6"	9° 24' 54,8"	
Hainich-Dün (HAI)	HEG1	Cambisol	Wiese	-	2	ja	50° 58' 17,9"	10° 24' 19,3"
	HEG2	Vertisol	Wiese	-	3	ja	51° 0' 2,7"	10° 25' 48,0"
	HEG3	Vertisol	Wiese	-	3	ja	50° 59' 53,1"	10° 25' 58,6"
	HEG4	Stagnosol	Mähweide	Rind	1	ja	51° 6' 47,5"	10° 26' 10,3"
	HEG5	Stagnosol	Mähweide	Rind	2	ja	51° 12' 57,2"	10° 19' 21,1"
	HEG6	Stagnosol	Mähweide	Rind	1	ja	51° 12' 54,2"	10° 23' 28,4"
	HEG7	Stagnosol	Weide	Rind	-	nein	51° 16' 25,6"	10° 24' 38,5"
	HEG8	Stagnosol	Weide	Rind	-	nein	51° 16' 16,2"	10° 25' 4,6"
	HEG9	Stagnosol	Weide	Rind	-	nein	51° 13' 26,1"	10° 22' 51,3"
	HEW1	Stagnosol	AKL Fichte	-	-	-	51° 11' 7,3"	10° 19' 25,0"
	HEW2	Stagnosol	AKL Fichte	-	-	-	51° 12' 37,0"	10° 22' 11,8"
	HEW3	Luvisol	AKL Fichte	-	-	-	51° 16' 17,3"	10° 18' 37,7"
	HEW4	Luvisol	AKL Buche	-	-	-	51° 22' 11,1"	10° 32' 1,5"
	HEW5	Luvisol	AKL Buche	-	-	-	51° 15' 50,9"	10° 14' 25,9"
	HEW6	Luvisol	AKL Buche	-	-	-	51° 16' 3,8"	10° 14' 20,2"
	HEW7	Luvisol	PW Buche	-	-	-	51° 7' 51,9"	10° 23' 7,6"
HEW8	Luvisol	PW Buche	-	-	-	51° 21' 21,8"	10° 31' 1,1"	
HEW9	Luvisol	PW Buche	-	-	-	51° 7' 48,9"	10° 22' 52,1"	
HEW10	Stagnosol	NW Buche	-	-	-	51° 5' 24,6"	10° 27' 45,8"	
HEW11	Luvisol	NW Buche	-	-	-	51° 6' 10,2"	10° 24' 3,1"	
HEW12	Luvisol	NW Buche	-	-	-	51° 6' 3,1"	10° 27' 18,6"	
Schorfheide-Chorin (SCH)	SEG1	Histosol	Wiese	-	3	ja	53° 5' 14,7"	13° 58' 10,7"
	SEG2	Histosol	Wiese	-	2	ja	53° 5' 21,5"	13° 58' 48,2"
	SEG3	Histosol	Wiese	-	2	ja	53° 6' 10,2"	13° 59' 8,5"
	SEG4	Histosol	Mähweide	Rind	1	nein	53° 6' 49,5"	14° 0' 6,7"
	SEG5	Gleysol	Mähweide	Rind	1	nein	53° 6' 26,8"	14° 0' 1,9"
	SEG6	Histosol	Mähweide	Rind	1	nein	53° 6' 13,2"	13° 37' 22,2"
	SEG7	Histosol	Weide	Rind	-	nein	53° 5' 18,2"	13° 58' 37,4"
	SEG8	Gleysol	Weide	Rind	-	nein	53° 6' 50,0"	14° 1' 0,5"
	SEG9	Histosol	Weide	Rind	-	nein	53° 5' 53,5"	13° 36' 45,2"
	SEW1	Cambisol	AKL Kiefer	-	-	-	52° 54' 3,4"	13° 50' 46,9"
	SEW2	Cambisol	AKL Kiefer	-	-	-	52° 57' 6,2"	13° 46' 40,9"
	SEW3	Cambisol	AKL Kiefer	-	-	-	52° 55' 14,6"	13° 38' 36,4"
	SEW4	Cambisol	AKL Buche	-	-	-	52° 55' 2,4"	13° 50' 50,3"
	SEW5	Cambisol	AKL Buche	-	-	-	53° 3' 25,3"	13° 53' 7,3"
	SEW6	Cambisol	AKL Buche	-	-	-	52° 54' 26,8"	13° 50' 30,1"
	SEW7	Cambisol	NW Buche	-	-	-	53° 6' 25,8"	13° 41' 39,9"
SEW8	Albeluvisol	NW Buche	-	-	-	53° 11' 30,5"	13° 55' 49,2"	
SEW9	Cambisol	NW Buche	-	-	-	53° 2' 40,3"	13° 48' 37,2"	

AKL: Altersklassenwald
 PL: Plenterwald
 NW: Naturwald

Jena). Die Konzentration von Phosphor im Boden (P, [mg kg⁻¹]) wurde durch sequenzielle Extraktion (Hedley *et al.*, 1982; Kuo, 1996) colorimetrisch (Murphy und Riley, 1962) bestimmt (Fabian Alt, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, Alt *et al.*, 2011). Bodentemperatur [°C] und Bodenfeuchte [% vol] wurden in 5-10 cm bzw. 0-8 cm Bodentiefe vor der Probennahme gemessen (Fernando Moyano, Max-Planck-Institut für Biogeochemie, Jena). Zur Bestimmung von löslichem Ammonium [μmol] und Nitrat [μmol] wurde Boden mit 1 mM CaCl₂-Lösung ausgeschüttelt, die Lösung anschließend filtriert, sterilfiltriert, gefriergetrocknet und in Wasser mittels HPLC analysiert (Christa Lang, Georg-August-Universität Göttingen). Die Bodenrespiration [μmol CO₂ m⁻² s⁻¹] wurde nach dem Entfernen der überirdischen Vegetation mit einer Licor 6400 Bodenrespirationskammer gemessen (Fernando Moyano, Max-Planck-Institut für Biogeochemie, Jena). Die Abundanz von Amöben, Flagellaten und Ciliaten wurde als Zahl der Individuen pro Gramm Boden nach Bonkowski *et al.* (2000) bestimmt (Jan Weinert, Universität Köln) und die Anzahl der vaskulären Pflanzenarten wurde im Jahr 2008 für alle Grünland- und im Jahr 2009 für alle Waldflächen aufgenommen (Stephanie Socher, Steffen Boch und Jörg Müller, Universität Bern).

Für Bodenproben des Jahres 2009 wurden ausschließlich der pH-Wert, die Bodentemperatur und Bodenfeuchte aufgenommen. Der pH-Wert der Böden wurde in einer 10 mM CaCl₂-Lösung im Verhältnis Boden zu Lösung von 1:1 mit einer Glaselektrode (SenTix Mic, WTW, Weilheim) und einem pH-Meter (pH 526, WTW) bestimmt. Die *in situ* Bodentemperatur [°C] und -feuchte [%vol] wurde auf der Mehrzahl der Untersuchungsflächen automatisiert stündlich in 5-10 cm Bodentiefe gemessen und der Mittelwert der entsprechenden Woche der Probennahme berechnet.

Der Boden für Inkubationsansätze stammte von einer Grünland- (HEG4) und einer Waldfläche (HEW11) der Probenahme im Oktober 2009 im Hainich und wurde bis zur Verwendung bei 4°C gelagert. Anschließend wurde der Boden 40 Tage bei 20°C im Dunkeln vorinkubiert um im Boden vorhandene Nährstoffe so weit wie möglich abzubauen. Nach der Vorinkubation wurden je 3 g (Trockengewicht) Boden in 100 ml Serumflaschen eingewogen, mit sterilem Wasser auf ca. 80% der maximalen Wasserhaltekapazität gebracht und die Flaschen mit einem Butyl-Stopfen verschlossen. Dieser Versuchsaufbau wurde gewählt, um die Entwicklung von CO₂ in der Gasphase verfolgen zu können, aber dennoch über den Zeitraum der Inkubation weder Austrocknung noch Sauerstofflimitierung zu erreichen. Die maximale Wasserhaltekapazität (mWK) wurde in drei Parallelen bestimmt, indem ein offener Zylinder unten mit Filterpapier verschlossen und max. $\frac{3}{4}$ mit getrocknetem Boden gefüllt wurde. Anschließend wurde dieser zur Wassersättigung für 1 h bis zur Bodenfüllhöhe in Wasser

gestellt, nachfolgend 3 h auf Sand equilibriert, das Feuchtgewicht bestimmt und der Boden bis zur Gewichtskonstanz bei 105°C getrocknet und gewogen. Nach der Formel $mWK [\% H_2O g^{-1}] = (\text{Feuchtgewicht} - \text{Trockengewicht}) / (\text{Trockengewicht}) \times 100$ wurde die maximale Wasserhaltekapazität berechnet. Das Experiment wurde durch Zugabe von 5 mg zerkleinerten (ca. 1-2 mm) und getrockneten ^{13}C -markierten Weizenblättern oder -wurzeln (13 Wochen alte Pflanzen, 97 atom% ^{13}C , IsoLife B.V., Wageningen, Niederlande) pro g Boden (Trockengewicht) gestartet. Zur Kontrolle wurde der Boden wie oben beschrieben mit ^{12}C -markierten Weizenblättern oder -wurzeln (1,1 atom% ^{13}C , IsoLife B.V.) oder ohne zusätzliches Pflanzenmaterial inkubiert. Die Inkubation der Mikrokosmen erfolgte statisch bei 20°C im Dunkeln über einen Zeitraum von 168 h. Zu verschiedenen Zeitpunkten der Inkubation (nach 0, 24, 48, 72, 96 und 168 h) wurden von drei parallelen Mikrokosmen die Konzentration von CO_2 sowie seine stabile Isotopensignatur in der Gasphase gemessen und der Boden anschließend für molekularbiologischen Analysen bei -80 °C aufbewahrt.

Tabelle 3. Übersicht über durchgeführte Analysen

Analysen	AEG1-9	AEW1-9	HEG1-9	HEW1-12	SEG1-9	SEW1-9
16S rRNA-Gen-Klonbibliotheken ³	+ ¹	+ ²	+ ¹	+ ²	+ ^{1,2}	+ ²
16S rRNA-Gen-T-RFLP-Analysen (2008)	+ ²	+ ²	+ ²	+ ²	+ ²	+ ²
16S rRNA-T-RFLP-Analysen (2008)	+ ²	+ ²	+ ²	+ ²	+ ²	+ ²
16S rRNA-T-RFLP-Analysen (4 x 2009)	+ ²	+ ²	+ ²	+ ²	+ ²	+ ²
Stabile Isotopenbeprobung	-	-	HEG4 ²	HEW11 ²	-	-

¹ erstellt von B. Fösel, P. Wüst, S. Mayer, F. Seiffert (Arbeitsgruppe Prof. Overmann, DSMZ Braunschweig)

² erstellt von A. Näther

³ Analysen durch A. Näther, B. Fösel, P. Wüst

2.3. Chemische und physikalische Analysen

Um in Inkubationsansätzen ablaufende biogeochemische Prozesse verfolgen zu können, wurde die Bildung von Stoffwechselprodukten mittels analytischer Methoden bestimmt. Vor jeder Gasanalyse wurden die Inkubationsflaschen kurz von Hand geschüttelt, um ein Gleichgewicht zwischen fester und gasförmiger Phase herzustellen. Die Gasproben wurden mit einer gasdichten Spritze (0,25 ml, SGE GmbH, Darmstadt) unmittelbar vor der Analyse entnommen und analysiert. Das Probenvolumen betrug 0,1 ml.

2.3.1. Analyse von Kohlendioxid

Die Bestimmung von CO₂ erfolgte an einem GC-8A Gaschromatographen (Shimadzu, Japan) mit Flammenionisationsdetektor (FID; Roy *et al.*, 1997) und wurde nach Reduktion im Methanisator als CH₄ detektiert. Einpunkt-Eichungen wurden mit Hilfe eines Gasgemisches aus jeweils 1000 ppmv CO₂ und CH₄ in N₂ durchgeführt.

Injektor:	Betriebstemperatur: 120°C
Trägergas:	Wasserstoff 5.0
Säule:	Edelstahlsäule, 2 m Länge, Durchmesser 1/8 Zoll, Trägermaterial: Hayesep Q 80/100 mesh Betriebstemperatur: 80°C
Methanisator:	Eigenbau, Edelstahlsäule, 20 cm Länge, Durchmesser 1/8 Zoll, NiCr-Ni-Katalysator (Chromopack, Middelburg, Niederlande) Betriebstemperatur: 350°C
Detektor:	Flammenionisationsdetektor (FID) Brenngas: Wasserstoff und FID-Gas Quenchgas: Stickstoff 5.0 Betriebstemperatur: 160°C
Nachweisgrenze:	1 ppmv CH ₄
Auswertung:	Peak Simple (SRI Instruments, Kalifornien, USA)

Zur Berechnung der freigesetzten Kohlendioxidmengen wurden die gemessenen Konzentrationen [ppmv] in Stoffmengen [mol] umgerechnet:

$$n = (M_v \times 10^{-6} \text{ bar} \times V_g) / (R \times T)$$

n: Stoffmenge [mol]

M_v: Mischungsverhältnis [ppmv]

V_g: Volumen der Gasphase [l]

R: allgemeine Gaskonstante [0,083144 l bar K⁻¹ mol⁻¹]

T: Temperatur [K]

2.3.2. Analyse von stabilen Kohlenstoff-Isotopenverhältnissen

Stabile Isotopenhäufigkeiten werden in dieser Arbeit in der üblichen δ-Notierung dargestellt. Hierbei wird der relative Unterschied des Isotopenverhältnisses (¹³C/¹²C) der Probe zu einem internationalen Standard in ‰ ausgedrückt. Der Standard für Kohlenstoff-Isotopenverhältnismessungen ist gemäß internationaler Übereinkunft der Vienna Pee Dee

Belemnite (V-PDB) mit $R_{St} = 11180,2 \times 10^{-6} \pm 2,8 \times 10^{-6}$. Die stabile Isotopensignatur von CO_2 wurde mit einem Gaschromatographen mit Verbrennungs-Isotopenverhältnis-Massenspektrometer (GC-c-IRMS, Thermo Electron, Bremen) bestimmt. Das Prinzip dieser Methode wurde von Brand (1996) beschrieben.

GC:	Hewlett Packard 6890 (Waldbronn)
Injektor:	Splitverhältnis 1:10 Betriebstemperatur: 150°C
Trägergas:	Helium 5.0; Flussrate 2,6 ml min ⁻¹
Säule:	Edelstahlsäule, 27,5 m Länge, Durchmesser 0,32 mm; Filmdicke 10 µm (Crompack, Frankfurt) Trägermaterial: Pora Plot Q Betriebstemperatur: 30°C
GC/C-Interface:	Standard GC Combustion Interface III (Thermo Electron, Bremen) Oxidationsreaktor: 940°C Reduktionsreaktor: 650°C
Detektor:	IRMS: Finnigan MAT delta plus (Thermo Electron)
Auswertung:	ISODAT™ NT 2.0 (Thermo Electron)
Referenzgas:	CO ₂ 4.8 (Reinheitsgrad 99,998%; Messer-Griessheim, Düsseldorf)

Das Referenzgas wurde mit dem Arbeitsstandard Methylstearat (Merck) kalibriert. Methylstearat wurde am Max-Planck-Institut für Biogeochemie (Jena) gegen die internationalen Standardmaterialien NBS22 und USGS24 geeicht. Das ermittelte Isotopenverhältnis wurde als $\delta^{13}C$ -Wert und als Atomprozent [atom%] dargestellt:

$$\delta^{13}C = ((R_{Probe}/R_{St}) - 1) \times 10^3$$

$$\text{atom\%} = (100 \times R_{St} \times (\delta_{Probe}/(1000+1)))/((1 + R_{St}) \times (\delta_{Probe}/(1000+1)))$$

$\delta^{13}C$: stabiles Kohlenstoffisotopenverhältnis relativ zum internationalen Standard [‰]

R_{Probe} : Verhältnis der Isotopenhäufigkeit der Probe [¹³C/¹²C]

R_{St} : Verhältnis der Isotopenhäufigkeit des Standards (¹³C/¹²C)

atom%: Atomprozent [atom%]

2.4. Molekularbiologische Analysen

Alle Lösungen und Puffer für die im Folgenden beschriebenen molekularbiologischen Methoden wurden mit Diethylpyrocarbonat-(DEPC)-behandeltem Wasser hergestellt und wie unter 2.1. beschrieben sterilisiert. Durch die Behandlung mit DEPC werden DNA- und RNA-degradierende Enzyme (DNasen bzw. RNasen) inaktiviert und damit ein Abbau der Nukleinsäuren verhindert (Sambrook und Russell, 2001).

2.4.1. Extraktion der Nukleinsäuren

Die Extraktion der Nukleinsäuren aus Boden erfolgte mittels einer direkten Lyse-Technik, die auf dem mechanischen Aufschluss von Zellen unter Zugabe von denaturierenden Reagenzien basiert (modifiziert nach Lueders *et al.*, 2004a). Bis zu 0,6 g Probenmaterial wurden zusammen mit 0,7 g sterilen Zirkonium-Kugeln (\varnothing 0,1 mm; Roth), 750 μ l Natrium-Phosphatpuffer (120 mM, pH 8,0) und 250 μ l TNS-Lösung (0,5 M Tris-HCl, pH 8,0; 0,1 M NaCl, 10% SDS,) in ein 2-ml Reaktionsgefäß mit Schraubdeckel überführt und homogenisiert. Die Lyse der Zellen erfolgte in einer Zelmühle (FP120 FastPrep™, BIO 101 Savant Instruments Inc., New York, USA) für 45 s bei einer maximalen Beschleunigung von 6,5 m s⁻¹. Um die Zirkonium-Kugeln von dem lysierten Zellmaterial zu trennen, wurde das Homogenat zentrifugiert (20 min, 21.000 g, 4°C), der Überstand abgenommen und in ein 2-ml Phase Lock Gel Heavy-Gefäß (VWR, Darmstadt) überführt. Proteine, Zellbestandteile und anderen Verunreinigungen wurden mit je einem Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1; v/v/v) und Chloroform-Isoamylalkohol (24:1; v/v) aus dem Überstand gefällt. Zur Phasentrennung wurde zwischen beiden Schritten zentrifugiert (5 min, 21.000 g, 4°C). Die Verwendung von 2-ml Phase Lock Gel Heavy-Gefäßen ermöglichte dabei eine optimale Phasentrennung und somit eine erhöhte Ausbeute an Nukleinsäuren. Der gereinigte wässrige Überstand wurde mit zwei Volumen Polyethylenglykol-Lösung (30% (w/v) Polyethylenglykol 6000 in 1,6 M NaCl) gemischt und die Nukleinsäuren durch anschließende Zentrifugation (90 min, 21.000 g, 4°C) gefällt. Das Nukleinsäurepellet wurde mit 500 μ l 70%igem Ethanol (4°C) gewaschen und erneut abzentrifugiert (30 min, 21.000 g, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das gereinigte Pellet in 50 μ l Elutionspuffer (EB-Puffer, 10 mM Tris-HCl, pH 8,5; Qiagen, Hilden) aufgenommen. Der Erfolg der Extraktion wurde durch Agarosegelelektrophorese von 5 μ l Nukleinsäureextrakt in einem 1%igen TAE- (40 mM Tris-Acetat, 2 mM EDTA, pH 8,5) Agarosegel (Biozym LE Agarose, Biozym, Hessisch Oldendorf) und anschließender Ethidiumbromidfärbung kontrolliert. Als Längenstandard wurde „Smart-Ladder“ (Eurogentec, Köln), mit DNA-Fragmenten definierter Größe (200-10.000 bp), aufgetragen. Der Nukleinsäureextrakt wurde bei -20°C aufbewahrt.

2.4.2. DNase-Verdau

Zur Gewinnung reiner RNA wurde die in den Nukleinsäureextrakten enthaltene, co-extrahierte DNA mittels DNase-Behandlung verdaut. Hierfür wurden ca. 70 µl Nukleinsäureextrakt mit 40 µl 10 x DNase-Puffer (Promega), 15 U RQ1 RNase-freie DNase (Promega) und RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 400 µl aufgefüllt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die RNA mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1; v/v/v) und Chloroform-Isoamylalkohol (24:1; v/v) wie unter 2.4.1. beschrieben extrahiert. Der wässrige Überstand wurde mit 2,5 Volumen 100%igem Ethanol und 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat versetzt und die RNA über Nacht bei -20°C gefällt. Am folgenden Tag wurde die RNA pelletiert (60 min, 21.000 g, 4°C) und mit 70%igem Ethanol (4°C) gewaschen (30 min, 21.000 g, 4°C). Das Ethanol wurde entfernt, das RNA-Pellet in 50 µl EB-Puffer resuspendiert und bei -80°C eingefroren. Der vollständige Verdau der DNA wurde durch Agarosegelelektrophorese (siehe Kapitel 2.4.1.) und PCR (siehe Kapitel 2.4.5.) überprüft.

2.4.3. Quantifizierung von Nukleinsäuren

2.4.3.1. Photometrische Quantifizierung

Die photometrische Messung von DNA- und RNA-Extrakten sowie aufgereinigten PCR-Produkten erfolgte mit einem Spektralphotometer (ND-1000, NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, Delaware, USA). Hierzu wurden 1,5 µl der zu bestimmenden Probe auf die Messzelle pipettiert und die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Die Konzentration doppelsträngiger DNA bzw. einzelsträngiger RNA ergibt sich aus folgenden Formeln (Sambrook und Russell, 2001):

$$\text{DNA: } c = 50 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times A_{260 \text{ nm}}$$

$$\text{RNA: } c = 40 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times A_{260 \text{ nm}}$$

c : Konzentration von DNA bzw. RNA [$\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$]

$A_{260\text{nm}}$: Absorption bei 260 nm

2.4.3.2. Fluorimetrische Quantifizierung von RNA

Zur exakten Bestimmung von RNA-Konzentrationen in den Ausgangsproben, z.B. für das Ansetzen der Dichtegradienten, wurde die RNA spezifisch mit dem Fluoreszenzfarbstoff RiboGreen (Quant-iT RiboGreen RNA Assay Kit, Invitrogen GmbH, Karlsruhe) quantifiziert. Diese fluorimetrische Methode hat den Vorteil, dass ausschließlich Nukleinsäuren angefärbt und detektiert werden und Kontaminationen mit Proteinen und Huminsäuren aus dem Boden die eigentliche Messung nicht beeinflussen. Allerdings ist

zu beachten, dass RiboGreen auch an DNA bindet, weshalb die DNA zuvor durch einen DNase Verdau (siehe Kapitel 2.4.2.) vollständig entfernt werden muss. Für jede Messung wurde eine Verdünnungsreihe mit dem quantitativen Standard des Kits (Ribosomal RNA Standard, 16S rRNA und 23S rRNA von *E. coli*, 100 ng μl^{-1}) von 0-100 ng μl^{-1} in einer Mikrotiterplatte (Sarstedt Inc., Newton, New York, USA) angesetzt. Die zu bestimmenden Proben wurden nach vorheriger photometrischer Messung so verdünnt, dass sie innerhalb der Konzentration des mitgeführten Standards lagen. Es wurde jeweils eine Dreifach-Bestimmung durchgeführt. Anschließend wurde jede Standardverdünnung und jede Probe mit der RiboGreen-Lösung (1:360-Verdünnung) im Verhältnis 1:10 verdünnt. Für jede Verdünnung wurde 1x TE-Puffer (200 mM Tris-HCl, pH 7,5; 200 mM EDTA) verwendet. Die fluorimetrische Messung erfolgte an einem Fluorimeter (Fluoroskan Ascent FL, Thermo Scientific, Bremen) bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emission von 520 nm. Die Fluoreszenzwerte des RNA-Standards wurden gegen ihre jeweilige Konzentration [ng μl^{-1}] aufgetragen und durch lineare Regression interpoliert. Anhand der resultierenden Geradengleichung konnte aus den Fluoreszenzwerten der unbekanntenen Proben die RNA-Konzentration berechnet werden.

2.4.4. Isopyknische Auftrennung der RNA

Die Trennung von ‚schwerer‘ ^{13}C -markierter und ‚leichter‘ unmarkierter RNA erfolgte durch isopyknische Dichtegradientenzentrifugation mit einem Cäsiumtrifluoracetat (CsTFA) enthaltendem Gradientenmedium (Lueders *et al.*, 2004a). Hierfür wurden 4,5 ml CsTFA ($2,0 \pm 0,05 \text{ g ml}^{-1}$, GE Healthcare) mit 175 μl deionisiertem Formamid gemischt. Anschließend wurden 500 ng RNA mit Gradientenpuffer (0,1 M Tris-HCl, pH 8,0; 0,1 M KCl, 1 mM EDTA) auf ein Volumen von 850 μl aufgefüllt und hinzugegeben. Nach gutem Durchmischen wurde der Brechungsindex durch Messung eines 65 μl Aliquots mit einem Refraktometer (Reichert GmbH, Seefeld) bestimmt. Der bei der Geräteeinstellung nD-TC, 20°C gemessene Brechungsindex des Gradientenmediums sollte bei $1,3725 \pm 0,0002$ liegen. Dies entspricht einer CsTFA-Konzentration von $\sim 1,79 \text{ g ml}^{-1}$, bei der eine optimale Auftrennung der RNA erzielt wird. Falls notwendig, wurde der Brechungsindex durch weitere Zugabe von CsTFA oder Gradientenpuffer korrigiert. Das Gemisch wurde anschließend in ein 6,3-ml Polyallomer Quick-Seal Gefäß (Beckmann Coulter, Krefeld) überführt und verschlossen. Die Zentrifugation erfolgte für 70 h bei 39.000 rpm (130.000 g) und 21°C in einer Ultrazentrifuge (Beckmann Coulter, Optima™ LE-80K Ultrazentrifuge, VTi 65.1 Rotor). Langsames Ausrotieren der Zentrifugation ermöglichte eine Umorientierung der schweren und leichten RNA von einer vertikalen in eine horizontale Schichtung. Die Fraktionierung der Gradienten wurde mit einer peristaltischen Pumpe (Aladdin AL-1000, World Precision Instruments, Sarasota, Florida, USA)

durchgeführt. Über eine an die Pumpe angeschlossene sterile Kanüle (\varnothing 0,4 mm) wurde das Gradientenmedium von oben durch DEPC-behandeltes Wasser ersetzt (Flussrate $0,75 \text{ ml min}^{-1}$). Durch einen Einstich an der Unterseite des Gradientenröhrchens wurden pro Gradient 14 Fraktionen zu je ca. $375 \mu\text{l}$ gesammelt. Von jeder Fraktion wurde der Brechungsindex bestimmt (siehe oben) und anhand von folgender Gleichung in die entsprechende Dichte umgerechnet:

$$\rho = 257,77x^2 - 683,57x + 454,42$$

ρ : Dichte [g ml^{-1}]

x: Brechungsindex der Probe

Die Fällung der RNA erfolgte durch Zugabe von einem Volumen Isopropanol und 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat über Nacht bei 4°C . Am folgenden Tag wurde die RNA pelletiert (60 min, 21.000 g , 4°C), mit 70%igem Ethanol (4°C) gewaschen (30 min, 21.000 g , 4°C) und das RNA-Pellet in $30 \mu\text{l}$ EB-Puffer eluiert.

2.4.5. Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde zur spezifischen Vervielfältigung von bakteriellen und acidobakteriellen 16S rRNA-Genen (phylogenetisches Markergen) aus Nukleinsäureextrakten angewandt. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden entweder für die T-RFLP- oder die vergleichende Sequenzanalyse (siehe Kapitel 2.4.6. und 2.4.8.) verwendet. Die in dieser Arbeit verwendeten Primerkombinationen sind in Tabelle 4 aufgeführt. Für die Definition von Primersequenzen gilt die nach IUBMB (*International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) international gültige Nomenklatur für so genannte ‚Wobble‘-Positionen: R: G/A, M: A/C, W: A/T, S: G/C, Y: C/T, K: G/T, V: A/G/C, H: A/C/T, D: A/G/T, B: G/C/T, N: A/G/C/T. Dabei handelt es sich um Positionen, an denen zwei, drei oder sogar vier verschiedene Basen in die Nukleotidsequenz eingebaut werden können. Nach der PCR-Reaktion wurde eine Aliquot von $5 \mu\text{l}$ des erhaltenen Amplifikats durch Agarosegelelektrophorese (siehe Kapitel 2.4.1.) und Ethidiumbromidfärbung auf die korrekte Länge überprüft. Die PCR-Produkte wurden mit dem MinElute Purification Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt, um überschüssige Primer, Enzyme, Salze und nicht eingebaute Nukleotide zu entfernen. Die Aufreinigung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die PCR-Produkte wurden in $10 \mu\text{l}$ EB-Puffer eluiert und bis zur weiteren Bearbeitung bei 4°C gelagert.

Tabelle 4. Verwendete Primerkombinationen für die spezifische Amplifikation bakterieller 16S rRNA-Genabschnitte aus Umweltproben sowie klonierter rcDNA-Fragmente aus dem pGEM-T-Vektor.

Primer	Sequenz 5' → 3'	Zielgruppe	Referenz
Ba27F*	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	<i>Bacteria</i>	Edwards <i>et al.</i> , 1989
Acido31F*	GAT CCT GGC TCA GAA TC	<i>Acidobacteria</i>	Barns <i>et al.</i> , 1999
Ba518R	ATT ACC GCG GCT GCT GG	<i>Bacteria</i>	Muyzer <i>et al.</i> , 1993
Ba907R	CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT	<i>Bacteria</i>	Muyzer <i>et al.</i> , 1995
Ba907Rmod	CCA TCA ATT CCT TTR AGT TT	<i>Bacteria</i>	nach Muyzer <i>et al.</i> , 1995
Ba1492R	GGT TAC CTT GTT ACG ACT T	<i>Bacteria</i>	Lane, 1991
M13F	GTA AAA CGA CGG CCA G	Insertion	Promega
M13R	CAG GAA ACA GCT ATG AC	Insertion	Promega

F = Vorwärtsprimer, R = Rückwärtsprimer

* Diese Primer wurden fluoreszenzmarkiert in der T-RFLP-Analyse eingesetzt.

2.4.5.1. PCR bakterieller 16S rDNA aus Umweltproben und Klonierungsvektoren

Alle Reaktionen zur Amplifikation acidobakterieller 16S rRNA-Gene aus DNA-Extrakten von Bodenproben (Primerkombination Acido31F/Ba907R) sowie bakterieller oder acidobakterieller 16S rRNA-Gene aus Klonierungsvektoren (Primerkombination M13F/M13R) wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt. Das Reaktionsgemisch setzte sich aus 1x PCR-Puffer (Applied Biosystems), 1,5 mM MgCl₂ (Applied Biosystems), 50 µM jedes Desoxynukleosidtriphosphats (GE Healthcare), 0,5 µM beider Primer, 1 U AmpliTaq DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Applied Biosystems) und 1-2 µl Matrizen-DNA zusammen. Diese wurde meist verdünnt in einer Konzentration von ca. 20–100 ng eingesetzt. Zur Vermeidung von Inhibierungseffekten bei der Amplifikation z.B. durch Huminstoffe, die bei der Nukleinsäureextraktion nicht vollständig entfernt werden konnten, wurde den PCR-Ansätzen 0,2 mg ml⁻¹ Bovine Serum Albumin (BSA, Roche) zugesetzt (Kreader, 1996). Die Konzentrationsangaben der einzelnen Komponenten beziehen sich auf die Endkonzentration im Reaktionsansatz. Bei jeder Amplifikation wurde eine Negativkontrolle ohne Matrizen-DNA mitgeführt, die zur Reinheitskontrolle der eingesetzten Reagenzien und dem Ausschluss von möglichen Kontaminationen diente. Als Positivkontrolle wurden DNA-Extrakte von Referenzorganismen oder Klonen verwendet. Zur Vermeidung von unspezifischen Amplifikationen wurden alle PCR-Reaktionen bei 4°C angesetzt und umgehend in den auf 94°C vorgeheizten Thermocycler-Block gestellt („*semi hot-start*“). Die PCR-Reaktionen wurden in einem GeneAmp 9700 Thermocycler (Applied Biosystems) mit folgendem Temperaturprofil durchgeführt: 3 min initiale Denaturierung bei 94°C, 30-35 Zyklen bestehend aus jeweils 30 s Denaturierung (94°C), 45 s Primeranlagerung (52-55°C) sowie 60 s Elongation (72°C) und 7 min abschließende Elongation bei 72°C.

2.4.5.2. RT-PCR bakterieller 16S rRNA aus Umweltproben

Die reverse Transkription (RT) von 16S rRNA-Genen der *Acidobacteria* aus RNA-Extrakten von Bodenproben (Primerkombination Acido31F/Ba907R bzw. Ba907Rmod) oder bakterieller 16S rRNA-Gene aus RNA der Gradientenfractionen (Primerkombination Ba27F/Ba907R) und die anschließende Amplifikation der ribosomalen 16S copy DNA (16S rcDNA) erfolgte mit dem ‚One-step‘ Access RT-PCR-System (Promega). Der Ansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 50 µl 1 x AMV/*Tfl* Reaktionspuffer, 1 mM MgSO₄, 100 µM jedes Desoxynukleosidtriphosphats, 0,5 µM beider Primer, 0,2 mg ml⁻¹ BSA (Roche), 4 U AMV reverse Transkriptase (aus dem Avian Myeloblastis Virus) und 4 U DNA-Polymerase *Tfl* (aus *Thermus flavus*). Bei jeder RT-PCR wurden eine Negativ- und eine Positivkontrolle mitgeführt (siehe Kapitel 2.4.5.1.). Die reverse Transkription wurde 45 min bei 48°C durchgeführt. Anschließend folgten eine initiale Denaturierung der rcDNA für 2 min bei 94°C und 25 Zyklen, bestehend aus Denaturierung (30 s, 94°C), Primeranlagerung (30 s, 52-55°C) und Elongation (1 min, 68°C). Die abschließende Elongation erfolgte für 10 min bei 68°C.

2.4.6. T-RFLP-Analyse

Die terminale Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-(T-RFLP)-Analyse ist eine einfache und schnelle Methode, um die Diversität und Komplexität mikrobieller Gemeinschaften zu erfassen (Liu *et al.*, 1997). Sie ermöglicht das Erstellen von genetischen Fingerabdrücken (*fingerprints*), wodurch man eine Auskunft über die Zusammensetzung sowie über die relative Häufigkeit von Genen in einer Umweltprobe erhält. Die Methode basiert auf der Analyse von PCR-Produkten, die an einem Ende mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert sind und mit einem spezifischen Restriktionsenzym fragmentiert werden. Dadurch wird nicht das gesamte Fragmentmuster, sondern nur das terminale Restriktionsfragment (T-RF) detektiert. Mit Hilfe von Klonbibliotheken und Sequenzanalysen können die Fragmente bestimmten phylogenetischen Gruppen zugeordnet werden. Die T-RFLP-Analyse bakterieller und acidobakterieller 16S rRNA oder 16S rRNA-Gene wurde mit FAM-(6-Carboxyfluorescein) markierten PCR-Produkten durchgeführt, die mit einem 5'-FAM-markierten Vorwärtsprimer nach einem Standard-PCR-Protokoll erzeugt wurden (Tab. 4). Die gereinigten Amplifikate wurden einem Restriktionsverdau unterzogen, der in einem Gesamtvolumen von 10 µl 120 ng aufgereinigtes PCR-Produkt, 1 µl 10 x Reaktionspuffer (Promega), 2,5 U Restriktionsenzym (Promega) und 1 µg acetyliertes BSA (Promega) enthielt. Bakterielle und acidobakterielle 16S rcDNA und 16S rRNA-Genamplifikate wurden mit *MspI* (Schnittstelle 5'-C▼CGG-3'; Promega) verdaut. Nach einer Inkubation von 3 h bei 37°C im Dunkeln wurde der Ansatz über SigmaSpin Post-Reaction Purification

Columns (Sigma-Aldrich) gemäß den Herstellerangaben aufgereinigt und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert. Genau 3 µl des Verdau wurden mit 15 µl einer 1:50-Verdünnung des internen Längenstandards (X-Rhodamine MapMarker, BioVentures, Murfreesboro, Tennessee, USA) in deionisiertem Formamid (Hidi; Applera Deutschland GmbH, Darmstadt) gemischt und 5 min bei 95°C denaturiert. Die T-RFLP-Analyse wurde auf einem ABI 3130 Genetic Analyzer (Applera Deutschland GmbH) durchgeführt. Nach kapillarelektrophoretischer Auftrennung wurde die Länge und relative Häufigkeit FAM-markierter terminaler Restriktionsfragmente (T-RFs) durch Detektion der Fluoreszenz mit einem Argonlaser ermittelt. Die Elektropherogramme wurden mit Hilfe der GENESCAN Analysis Software 4.0 (Applied Biosystems) ausgewertet. Fragmente mit einer Länge ≤ 50 bp wurden von der Analyse ausgeschlossen, um vorhandene Primer-Dimere auszuschließen. Fragmente mit einer Länge > 600 bp wurden vor der weiteren Datenanalyse entfernt um unvollständig verdaute Amplifikate auszuschließen. Die in dieser Arbeit angegebenen Längen der terminalen Restriktionsfragmente sind Näherungswerte. Die tatsächlichen Längen können aufgrund von unterschiedlichem Migrationsverhalten der Fragmente und verschiedenen Puringehalten um bis zu 8 bp abweichen (Kaplan und Kitts, 2003).

Um die relativen Häufigkeiten detektierter T-RFs in verschiedenen T-RFLP-Profilen mittels statistischer Methoden miteinander vergleichen zu können, wurden die T-RFLP-Daten mit Hilfe von *T-REX - Software for the processing and analysis of T-RFLP data*' (<http://trex.biohpc.org>, Culman *et al.*, 2009) gefiltert und auf die gleiche Gesamt-Peakfläche normalisiert. *T-REX* benutzt die Methode von Abdo *et al.* (2006) um „echte“ Peaks zu bestimmen und das Hintergrundrauschen der Fluoreszenz zu eliminieren. „Echte“ Peaks sind solche, deren Fläche größer ist als die Standardabweichung über alle Peaks (multipliziert mit einem frei wählbaren Faktor). Um T-RF-Abweichungen von bis zu 1,5 bp auszugleichen, wurden Peaks unterschiedlicher Proben nach einer Methode von Smith *et al.* (2005) aneinander angeglichen. Dabei wird wiederholt ein Peak aller Proben identifiziert und mit allen Peaks innerhalb des (frei wählbaren) Schwellenwertes in ein T-RF gruppiert. Die Peakfläche jedes T-RFs der Profile wurde als Maß für die Abundanz der Arten gewählt und in prozentuale Anteile an der gesamten mikrobiellen Gemeinschaft umgerechnet.

2.4.7. Vergleich Primer Ba907R und Ba907Rmod

Für einen Teil der PCR-basierten Analysen (16S rRNA-T-RFLP-Analysen 2009 zur jahreszeitlichen Variation der *Acidobacteria*) wurde der Rückwärtsprimer Ba907Rmod (Tab. 4) verwendet. Der Primer Ba907Rmod unterscheidet sich von Ba907R durch einen

Basenaustausch von G zu A an der dritten Stelle ausgehend vom 5'-Ende. Laut ‚*Ribosomal Database Project*‘ (RDP, September 2011, Cole *et al.*, 2009) führt dieser Basenaustausch *in silico* dazu, dass nur noch ~800 statt ~1 Mio. von ~1,8 Mio. bakteriellen 16S rRNA-Genen an diesem Primer binden können. Jedoch wurde bei der Verwendung von Ba907Rmod in Kombination sowohl mit dem *Acidobacteria*-spezifischen Acido31F-Primer als auch dem universellen *Bacteria*-Primer Ba27F ein deutliches PCR-Produkt erhalten, das in der T-RFLP-Analyse zum 907R-Primer vergleichbare Ergebnisse lieferte (Abb. 4). Effekte von Primer-Matrize-Fehlpaarungen durch einen einzigen Basenaustausch in Primer (oder Matrize) auf die PCR-Amplifikation von 16S rRNA-Genen wurden bereits untersucht: Fehlpaarungen nahe dem 5'-Ende des Primers führten (im Gegensatz zu denen am 3'-Ende) nicht zu einer nennenswerten Herabsetzung der Effizienz der PCR-Amplifikation der Zielsequenzen (Bru *et al.*, 2008).

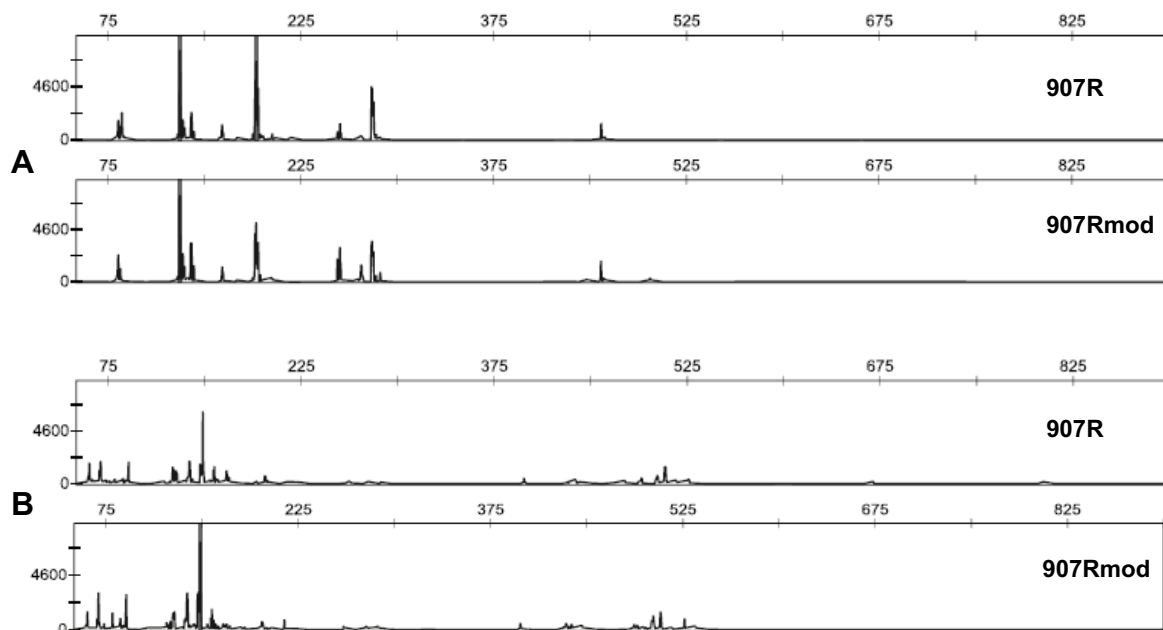


Abbildung 4. Vergleich von 16S rRNA *Acidobacteria*- (A) und *Bacteria*- (B) T-RFLP-Profilen erstellt mit den Primern Acido31F (A) und Ba27F (B) in Kombination mit Ba907R bzw. Ba907Rmod aus Boden.

2.4.8. Erstellung von 16S rRNA-Gen und 16S rRNA-Klonbibliotheken

Zur Erstellung von 16S rRNA-Gen Klonbibliotheken der *Acidobacteria* wurde DNA mit dem PowerSoil DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories, Solana Beach, Kanada) nach den Empfehlungen des Herstellers extrahiert. Die 16S rRNA-Gene wurden nahezu in ihrer vollen Länge von jeder der 57 Proben unter Verwendung des *Acidobacteria*-spezifischen Vorwärtsprimers Acido31F und des universellen Rückwärtsprimers Ba1492R amplifiziert. Für alle Proben aus Hainich-Dün und der Schwäbischen Alb, sowie alle Waldböden aus

der Schorfheide-Chorin enthielt der 50 µl-PCR-Ansatz 1 x PCR-Puffer mit 1,5 mM MgCl₂ (Qiagen), 200 µM dNTP-Mix, 20 µg Bovine Serum Albumin (Sigma-Aldrich), 0,2 µM jedes Primers, 1 Unit *Taq*-Polymerase (Qiagen) und 1-2 µl Matrizen-DNA (20-100 ng). Die 16S rRNA-Gene einiger Proben konnten nur erfolgreich amplifiziert werden, wenn die MgCl₂-Konzentration auf bis zu 3,5 mM erhöht wurde. Das Temperaturprofil der PCR beinhaltete einen Denaturierungsschritt bei 95 °C für 2 min, 8 Zyklen aus Denaturierung bei 95 °C für 30 s, Primeranlagerung für 30 s bei einer anfänglichen Temperatur von 60 °C, die mit jedem Zyklus um 0,5 °C herabgesetzt wurde und Extension bei 72 °C für 60 s, gefolgt von 27 oder 32 weiteren Zyklen mit einer Primeranlagerung bei 56 °C und einer abschließenden Elongation bei 72 °C für 7 min. Zur Amplifikation der 16S rRNA-Gene aus allen 9 Grünlandflächen der Schorfheide-Chorin wurden die Matrizen-DNA und die PCR-Bedingungen wie unter 2.4.1. und 2.4.5.1. beschrieben, verwendet. Gleiche Anteile der aufgereinigten PCR-Produkte aller Grünland- (9 Proben) bzw. aller Waldflächen (9 bzw. 12 Proben im Hainich-Dün) eines Exploratoriums wurden vereinigt und so 6 verschiedene vereinigte Proben zur Erstellung von 16S rRNA-Gen Klonbibliotheken erhalten – eine Grünland- und eine Waldprobe für jedes der drei Exploratorien.

Die einzeln amplifizierten und anschließend vereinigten *Acidobacteria* 16S rRNA-Genfragmente der Wald- und Grünlandflächen der drei Exploratorien oder aus Gradientenfraktionen amplifizierte bakterielle 16S rDNA-Fragmente wurden über Klonierung vereinzelt, um ihre Sequenzierung und phylogenetische Einordnung zu ermöglichen. Für die Klonierung wurde das pGEM-T Vektor System II (Promega) verwendet. Hierzu wurden die aufgereinigten Amplifikate gemäß den Angaben des Herstellers in den pGEM-T Vektor (Promega) ligiert und anschließend über hochkompetente *E. coli* JM109 Zellen (Promega) kloniert. Die transformierten Zellen wurden auf LB/Ampicillin/IPTG/XGal-Nährböden angezogen und über „Blau-Weiß-Kontrolle“ selektiert. Durch Aufkochen (10 min, 100°C) wurde die DNA aus den transformierten Zellen gewonnen. Anschließend wurden die klonierten DNA-Inserts über PCR mit Vektor-gerichteten Primern (Tab. 4) amplifiziert und deren korrekte Länge mittels Agarosegelelektrophorese überprüft.

2.4.9. Sequenzanalyse

Die Sequenzierung der klonierten PCR-Amplifikate wurde nach dem Prinzip des Kettenabbruchs (Sanger *et al.*, 1977) durchgeführt. Die in dem Reaktionsansatz enthaltenen 5'-fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs) bewirken den Abbruch der Polymeraseaktivität während der Doppelstrangsynthese. Nach Abschluss der Sequenzierreaktion erhält man ein Gemisch aus DNA-Fragmenten

unterschiedlicher Länge, die am 3'-Ende fluoreszenzmarkiert sind. Nach kapillarelektrophoretischer Auftrennung des Gemischs lässt sich die Basensequenz der DNA-Matrize anhand der Fluoreszenzsignale ablesen. Von jedem M13-Amplifikat wurden Vorwärts- und Rückwärtsstrang sequenziert. Hierzu wurden die unaufgereinigten M13-Amplifikate der Klone in Mikrotiterplatten versendet. Die Sequenzierreaktionen wurden durch den Sequenzierservice der Firma Qiagen (Hilden) oder des Genomics Service Unit im Department Biologie I der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

2.4.10. Pyrosequenzierung

Die 16S rRNA aus schweren und leichten Gradientenfraktionen wurde zusätzlich mittels 454-Pyrosequenzierung analysiert. Die reverse Transkription von 16S rRNA-Genen aus RNA von Gradientenfraktionen und die anschließende Amplifikation der ribosomalen 16S rcDNA erfolgte in Duplikaten unter Verwendung des ‚One-step‘ Access™ RT-PCR-System (siehe Kapitel 2.4.5.2.). Für die PCR wurden die Primer Ba27F und Ba518R (Tab. 4) mit 10 verschiedenen Barcodes am Vorwärtsprimer verwendet, um die Pyrosequenzierung-Daten den 10 einzelnen Proben zuordnen zu können. Die Primer enthielten außerdem Roche 454 Pyrosequenzierung-Adapter (Tab. 5). Die PCR-Produkte wurden aufgereinigt (siehe Kapitel 2.4.5.) und mittels Quant-iT dsDNA BR-Kit und Qubit-Fluorometer (Invitrogen, Karlsruhe) exakt quantifiziert und zu gleichen Anteilen gemischt. Die Analyse der partiellen 16S rRNA-Gene wurde durch das Göttingen Genomics Laboratory (Georg-August-Universität Göttingen) auf einem Roche GS-FLX 454 Pyrosequenzierer (Roche, Mannheim) nach den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt.

Tabelle 5. Verwendete Primerkombinationen für die spezifische Amplifikation bakterieller 16S rRNA-Genabschnitte für die Pyrosequenzierung

Primer	Sequenz 5' → 3' *
Pyro27F_1	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG <u>ACGAGT</u> GCCTAGAGTTTGATCCTGGCTCAG
Pyro27F_2	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG <u>ACGCTCGACA</u> AAGAGTTTGATCCTGGCTCAG
Pyro27F_3	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG <u>AGACGCACTC</u> AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
Pyro27F_4	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG <u>AGCACTGT</u> AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
Pyro27F_5	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG <u>ATCAGACACG</u> AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
Pyro27F_6	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG <u>ATATCGCG</u> AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
Pyro27F_7	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG <u>CGTGTCTCTA</u> AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
Pyro27F_8	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG <u>CTCGCGTGT</u> CAGAGTTTGATCCTGGCTCAG
Pyro27F_9	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG <u>TAGTATCAGC</u> AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
Pyro27F_10	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG <u>TCTCTATGCG</u> AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
Pyro518R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCGTATTACCGCGGCTGCTGG

F = Vorwärtsprimer, R = Rückwärtsprimer

* normal = Roche 454 Adapter, unterstrichen = Barcode, kursiv = Primer

2.5. Bioinformatische Analysen

2.5.1. Sequenzverarbeitung

Die 16S rRNA-Rohsequenzdaten wurden als Elektropherogramme mit dem Programm Seqman II (DNASTAR, Madison, USA) einer Qualitätskontrolle unterzogen und editiert. Überhänge aus Vektorsequenzen wurden entfernt, Teilsequenzen und komplementäre Sequenzen wurden zu Gesamtsequenzen vereinigt und die überlappenden Sequenzbereiche auf Basenunterschiede kontrolliert. Gegebenenfalls wurden falsch identifizierte Basen manuell korrigiert. Die so erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe des SINA-Webaligners (<http://www.arb-silva.de/aligner>, Pruesse *et al.*, 2007) in ein Alignment gebracht und in eine eigene 16S rRNA-Gendatenbank importiert.

2.5.2. Phylogenetische Analyse von 16S rRNA-Genen

Die phylogenetische Einordnung, Verrechnung und Darstellung von 16S rRNA Sequenzdaten erfolgte mit Hilfe der Software ARB (Datenbank-Version SSUref_104, erschienen Oktober 2010; erhältlich unter <http://www.arb-home.de>; Ludwig *et al.*, 2004). Neu importierte Sequenzen wurden mit dem automatischen FAST ALIGNER mit bereits vorhandenen, nahe verwandten Sequenzen in ein Alignment gebracht. Die jeweils homologen Nukleotidpositionen wurden so auch in den hypervariablen Regionen der 16S rRNA (Gutell *et al.*, 1994) untereinander in Spalten angeordnet. Anschließend wurde das Alignment überprüft und gegebenenfalls manuell korrigiert. Die neuen Sequenzen wurden dann mit der Maximum-Parsimony-Methode (Fitch, 1971) des ARB-Programms unter Anwendung eines geeigneten Basenfrequenz-Filters für die jeweils bearbeitete phylogenetische Gruppe in den „Gesamtbaum“ der Datenbank eingefügt. Durch die Verwendung dieser Filter werden nur diejenigen Nukleotidpositionen in die Berechnungen miteinbezogen, die bei einem definierten Prozentsatz (z.B. 50%) der Sequenzen konserviert sind. Hochvariable Regionen der 16S rRNA, deren phylogenetischer Informationsgehalt aufgrund hoher Mutationsraten anzuzweifeln ist, werden somit aus den Berechnungen ausgeschlossen. Dieser vorläufige Baum diente als Grundlage für weitergehende phylogenetische Berechnungen. Die im Rahmen dieser Arbeit rekonstruierten phylogenetischen Bäume wurden anschließend auf der Grundlage von geeigneten Referenzsequenzen von Reinkulturen und Umweltklonen und einer von der ARB-Software berechneten und korrigierten Distanzmatrix erstellt. Dabei werden Sequenzdifferenzen aus dem Alignment paarweise in eine Distanzmatrix umgerechnet, die dann nach verschiedenen Evolutionsmodellen (z.B. Felsenstein, 1981) in phylogenetische Distanzen umgerechnet wird. Die Distanzwerte wurden danach mit der Neighbor-Joining-Methode (Saitou und Nei, 1987) in Dendrogrammen dargestellt. Kürzere

Sequenzen wurden unter Anwendung des Maximum-Parsimony-Tools nachträglich in den Baum eingeordnet, ohne die Topologie des zugrunde liegenden Baumes zu verändern (Ludwig *et al.*, 1998). Mit Hilfe des *in silico* ‚*T-RF-Cut-Tool*‘ (Ricke *et al.*, 2005) wurde von allen erzeugten Klonsequenzen und ausgewählten Referenzsequenzen die Restriktionsschnittstelle für *Bacteria* bzw. *Acidobacteria* bestimmt. Auf diese Weise konnten die mittels TRFLP-Analyse (siehe Kapitel 2.4.6.) detektierten T-RFs in den Umweltproben und Gradientenfraktionen phylogenetischen Gruppen zugeordnet werden. Das ‚*T-RF-Cut-Tool*‘ ist in der ARB-Software implementiert und kann bei allen Sequenzen angewendet werden, die zuvor in ein Alignment gebracht wurden. Bei der Berechnung der Schnittstelle werden die Primerposition, die Primerlänge und das Restriktionsenzym berücksichtigt.

2.5.3. Identifizierung von chimären Sequenzen

Alle in dieser Arbeit erzeugten Klonsequenzen wurden mit dem Softwareprogramm Mallard (Ashelford *et al.*, 2006) und dem Bellerophon-Server (<http://foo.maths.uq.edu.au/~huber/bellerophon.pl>; Huber *et al.*, 2004) auf chimäre Sequenzen, d.h. auf Mischprodukte aus Sequenzen phylogenetisch verschiedener Organismen, die als Artefakte während der PCR entstehen können, überprüft. Die von diesen Programmen als potentielle Chimären identifizierten Sequenzen wurden einem so genannten ‚*fractional treeing*‘ unterzogen (Ludwig *et al.*, 1997). Ergab sich unter Berücksichtigung der vorderen Hälfte einer Sequenz eine signifikant andere phylogenetische Einordnung als unter Berücksichtigung der zweiten Hälfte, so deutete dies auf eine chimäre Sequenz hin. Diese wurde aus der Datenbank entfernt und von weiteren Analysen ausgeschlossen.

2.5.4. Bioinformatische Analyse der Daten der Pyrosequenzierung

Die Rohsequenzen wurden entsprechend publizierter Empfehlungen (Huse *et al.*, 2007) einer Qualitätsüberprüfung mittels der RDP ‚*Pyrosequencing Pipeline*‘ des ‚*Ribosomal Database Project*‘ (<http://rdp.cme.msu.edu>, Cole *et al.*, 2009) nach folgenden Kriterien unterzogen: i) Übereinstimmung der Primersequenzen; ii) ausschließlich eindeutige Basen; iii) Mindestsequenzlänge von 150 bp. Für eine taxonomisch basierte Analyse der Sequenzen wurde der ‚*Naïve Bayesian rRNA Classifier*‘ (Wang *et al.*, 2007) des ‚*Ribosomal Database Project*‘ benutzt. So wurde eine schnelle taxonomische Zuordnung der zahlreichen partiellen 16S rRNA-Gensequenzen nach ‚*Bergey’s Bacteria Taxonomy*‘ möglich. Da die durchschnittliche Leselänge über 250 bp lag, wurde ein Bootstrap von 80% gewählt. Die relative Abundanz der Sequenzen wurde auf Phylum- und Genus-Ebene zwischen den leichten und schweren Gradientenfraktionen verglichen. Die Sequenzen wurden mit Hilfe des Infernal-Aligners, der auch Sekundärstrukturen

berücksichtigt, in ein Alignment gebracht (Nawrocki *et al.*, 2009; Nawrocki und Eddy, 2007). Durch die Benutzung des ‚*Complete Linkage Clustering*‘ der ‚*RDP Pyrosequencing Pipeline*‘ konnten die Sequenzen Phylotypen mit 97, 95 und 90% Ähnlichkeit zugeordnet werden. Basierend auf diesen Phylotypen konnten ‚*rarefaction*‘-Analysen (Colwell und Coddington, 1994), Shannon-Indices (Gotelli, 2002) und Chao1 (Chao und Bunge, 2002) berechnet werden.

2.6. Berechnung ökologischer Indizes und Distanzen

2.6.1. Ähnlichkeit und Diversität mikrobieller Gemeinschaften

Mikrobielle Gemeinschaften können untereinander z.B. anhand ihrer T-RFLP-Profile mit Hilfe von ökologischen Indizes (Übersicht bei Hill *et al.* (2003)) verglichen werden, wenn man die einzelnen T-RFs als Arten und ihre relative Fläche (bezogen auf die Gesamt-Peakfläche eines Profils) als ein Maß für deren Häufigkeit interpretiert. Zum Vergleich der Diversität verschiedener Profile wurde der Shannon-Index verwendet, ein Diversitätsindex, der die Häufigkeit der Individuen einer Art und die Anzahl der Arten berücksichtigt. Der Shannon-Index reicht von 0 für mikrobielle Gemeinschaften, die nur eine Art enthalten bis zu hohen Werten für Gemeinschaften, die viele Arten mit wenigen Individuen umfassen. Für die Berechnungen des Index wurde die PAST-Software (‚*PAlaeontological Statistics*‘, ver. 1.79; <http://folk.uio.no/ohammer/past>; Hammer *et al.*, 2001) verwendet.

$$H = - \sum (n_i/n) \ln(n_i/n)$$

H : Shannon-Index

n: Zahl der Individuen

n_i : Zahl der Individuen der Art i

Bei der Analyse von ‚*fingerprinting*‘-Daten (z.B. T-RFLP-Profilen) mittels Distanzmaßen muss zum einen beachtet werden, ob die Abundanz oder nur die Anwesenheit oder Abwesenheit eines Peaks in das Distanzmaß eingehen soll. Zum anderen muss entschieden werden, ob die Abwesenheit eines Peaks in zwei Proben als Ähnlichkeit betrachtet werden oder keinen Einfluss auf das Distanzmaß haben soll. Schütte *et al.* (2008) empfehlen die Nutzung von Distanzmaßen, bei der die Abwesenheit eines Peaks in einem von zwei Profilen das Distanzmaß nicht beeinflusst wie z.B. Bray-Curtis (Bray und Curtis, 1957). In der vorliegenden Arbeit wurden die T-RFLP-Profile der einzelnen Proben für statistische Analysen wie ANOSIM (siehe Kapitel 2.7.4.1.) mittels des Bray-Curtis-Distanzmaßes (berechnet mit Hilfe der PAST-Software) verglichen.

2.6.2. Abschätzung des Artenreichtums

Für die Abschätzung des Artenreichtums einer mikrobiellen Gemeinschaft wurden die Sequenzinformationen aller Klone einer Klonbibliothek in Form einer Ähnlichkeitsmatrix (PHYLIP Distance-Matrix) aus der ARB-Datenbank exportiert und mit Hilfe des Programms DOTUR ausgewertet (Schloss und Handelsman, 2005). Als Arten, Gattungen und Familien wurden dazu Klongruppen definiert, deren 16S rRNA-Gene eine Sequenzidentität von mindestens 97%, 95% bzw. 90% aufwiesen (Stackebrandt und Goebel, 1994). Anschließend wurde in einem Diagramm die Anzahl an beobachteten ‚Operational Taxonomic Units‘ (OTUs, 97% Sequenzidentität) über die Anzahl der beprobten Sequenzen aufgetragen. Die Steilheit der Kurve zeigte an, ob die Menge an analysierten Klonen zur Abdeckung der zu Grunde liegenden Diversität ausreichend war. Basierend auf diesen OTUs konnten außerdem Diversitätsindices wie z.B. der Shannon-Index berechnet werden. Zusätzlich wurde für jede Klonbibliothek die Abdeckung („Coverage“) mit folgender Gleichung berechnet (Wagner *et al.*, 2002):

$$C = (1 - (n_1 \times N^{-1})) \times 100$$

C: Coverage [%]

n_1 : Anzahl an OTUs, die nur eine Sequenz enthalten

N: Gesamtzahl der 16S rRNA-Sequenzen in der analysierten Klonbibliothek

Die Einschätzung des Artenreichtums der mikrobiellen Gemeinschaft gibt Aufschluss darüber, inwieweit die Anzahl der untersuchten Klone die Diversität im untersuchten Habitat erfasst hat. Die ‚Coverage‘ hat einen Wert zwischen 0 und 100, wobei 100% bedeutet, dass die Diversität im System mit der Anzahl der analysierten Klone komplett abgedeckt wurde.

2.6.3. Statistischer Vergleich von 16S rRNA-Gen Klonbibliotheken

Um die Struktur und Zusammensetzung mikrobieller Gemeinschaften zu beschreiben und zu vergleichen, wurden verschiedene statistische Methoden angewendet. LIBSHUFF (<http://libshuff.mib.uga.edu/>, Singleton *et al.*, 2001) beruht auf der Berechnung von Unterschieden zwischen homologen (CX(D)) und heterologen (CXY(D)) Coverage-Kurven, die mit einem Monte-Carlo-Test verglichen werden, um signifikante Unterschiede in 16S rRNA-Gen Klonbibliotheken zu finden. Für den UniFrac-Algorithmus (Lozupone *et al.*, 2006) wird ein phylogenetischer Baum, in dem jeder OTU (97% Sequenzidentität) ein Habitat zugewiesen wurde, in das Online-Werkzeug von UniFrac (<http://bmf2.colorado.edu/unifrac/index.psp>) im NEWICK-Format eingerechnet. UniFrac

vergleicht Häufigkeit und Astlänge aller Sequenzen und erstellt einen gewichteten Baum. Dieser wird mit 1000 zufällig erstellten Bäumen verglichen, um signifikante Unterschiede zwischen den Habitaten zu ermitteln. PHYLOCOM 4.1 (Webb *et al.*, 2008) erlaubt Berechnungen zu phylogenetischen Beziehungen zwischen Arten und zur Struktur und Zusammensetzung der Gemeinschaft eines Habitats. Die phylogenetische Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft der verschiedenen Habitate wurde mittels mehrerer Indizes und Distanzen verglichen:

- Faith's Index der phylogenetischen Diversität: je positiver der Index, desto diverser die Gemeinschaft (Faith, 1992)
- *Mean pairwise distance* (MPD): mittlere paarweise Distanz zwischen allen Arten/OTUs einer Gemeinschaft
- *Mean nearest taxon distance* (MNTD): mittlere Distanz jeder Art/OTU zum nächsten Verwandten
- *Net Relatedness Index* (NRI) und *Nearest Taxon Index* (NTI): Maße der phylogenetischen Struktur einer Gemeinschaft
- Simpson's Diversität: Wahrscheinlichkeit, dass zwei Sequenzen einer Gemeinschaft unterschiedlichen OTUs angehören
- Phylogenetische Diversität (pD): erwartete phylogenetische Distanz zwischen zwei zufällig ausgewählten Sequenzen einer Gemeinschaft

2.7. Statistische Analysen

Alle statistischen Analysen wurden in R 2.8.0 (*The R Project for Statistical Computing*, <http://www.r-project.org/>, R Development Core Team, 2011) oder mit Hilfe der PAST-Software durchgeführt.

2.7.1. Explorative Datenanalyse

Ziel der explorativen Datenanalyse ist das Erkennen von Mustern und möglichen Zusammenhängen aber auch Ausreißern in Daten. Eine gute Übersicht findet man bei Zuur *et al.* (2010). Eine numerische Zusammenfassung einer Variablen y_1 beinhaltet den Mittelwert, die Standardabweichung, den Median, die Minimal- und Maximalwerte, sowie häufig die Quantilen 1 und 3 (in R: `> summary(y1)`). Es gibt drei häufige Formen der Visualisierung einer Variable y_1 : Histogramme, Boxplots und QQ-Plots. Ein Histogramm stellt dar, wieviele Werte pro Werteklasse vorhanden sind (in R: `> hist(y1)`), Boxplots stellen Median und Quantilen 1 und 3 als Box, sowie Minimum und Maximum als Fehlerbalken dar (in R: `> boxplot(y1)`) und in einem QQ-Plot werden die Quantilen der

gefundenen Daten mit normalverteilten verglichen, wobei eine Linie die erwartete Verteilung angibt (in R: `> qqnorm(y1)` und `> qqline(y1)`). Ein Test auf Normalverteilung ist der Kolmogorov-Smirnov-Test. Dabei werden die Werte der zu testenden Variablen ihrer Größe nach sortiert und ihre kumulative Summe wird mit der einer spezifizierten kumulativen Normalverteilung verglichen. Der maximale Unterschied zwischen einem Summenwert und der Normalverteilung darf dabei einen bestimmten Schwellenwert nicht übersteigen (in R: `> ks.test(y1, "pnorm", mean(y1), sd(y1))`). Ein anderer Test auf Normalverteilung ist der Shapiro-Wilk-Test (in R: `> shapiro.test(y1)`) (Dormann und Kühn, 2011).

2.7.2. Klassische Tests

Es können parametrische und nicht-parametrische Tests unterschieden werden. Daten, die erhoben wurden, sollten unter voller Berücksichtigung der Werte analysiert werden. Dies wird allerdings gelegentlich durch Ausreißer oder schiefe Verteilungen erschwert. Durch Datentransformation oder das Nutzen nicht-normaler Fehlerverteilungen können die Originaldaten analysierbar gemacht werden oder aber auch Informationen geopfert werden, um die Datenanalyse einfach zu halten. Geopfert wird der absolute Wert der Beobachtung, während der relative Wert (der Rang im Vergleich zu den anderen Datenpunkten) erhalten bleibt. Der Verlust an Information ist dabei gering und für viele Tests ist die nicht-parametrische Option zu erwägen (Dormann und Kühn, 2011).

2.7.2.1. Kovarianz und Korrelation

Die Beziehung zweier kontinuierlicher Datensätze y_1 und y_2 wird durch die Kovarianz, die parametrische Korrelation oder die nicht-parametrische Korrelation numerisch zusammengefasst. Kovarianz beschreibt, wie stark zwei Variablen y_1 und y_2 in die gleiche Richtung variieren. Eine Möglichkeit ist, die Kovarianz durch die Standardabweichungen der beiden Variablen y_1 und y_2 zu teilen, so dass das sich ergebende Maß zwischen -1 und 1 liegt (Pearson-Korrelation). Wenn die zwei Datensätze in die gleiche Richtung gehen, so sind sie positiv korreliert, sind sie gegenläufig so sind sie negativ korreliert. Der Stärke der Korrelation kann auch ein Signifikanzwert zugeordnet werden, wenn die Daten normalverteilt sind. Dieser Test ist ein t -test, der die Korrelation mit ihrem Standardfehler vergleicht. Bei der Pearson-Korrelation gehen die Werte der Variablen in die Berechnung der Korrelation ein. Da aber der t -test eine Normalverteilung der Daten voraussetzt, können nur entsprechende Daten auf Korrelation getestet werden. Nicht-parametrische Korrelation hingegen ersetzt die absoluten Werte durch den Rang innerhalb des Datensatzes, und korreliert dann die Ränge (Spearman's Rank-Korrelation). Generell sind die nicht-parametrischen Methoden etwas weniger sensibel als parametrische, d.h. ein

möglicher Zusammenhang wird eher übersehen. Andererseits sind sie deutlich robuster hinsichtlich der Datenverteilung und besser geeignet für nicht exakt lineare Beziehungen (Dormann und Kühn, 2011). Die Spearman's Rank-Korrelation wurde in R (`> cor.test(y1, y2, method = "spearman")`) z.B. für Abundanzen von einzelnen T-RFs oder OTUs und Umweltfaktoren berechnet.

2.7.3. Univariate Statistik

Univariate statistische Modelle beschäftigen sich mit nur einer einzigen abhängigen Variablen unabhängig von der Anzahl erklärender Variablen.

2.7.3.1. Lineare Regression

Bei der Regression wird eine Variable als in ihren Werten von der anderen Variable abhängig angenommen. Es gibt eine unabhängige oder erklärende Variable (x) und eine abhängige oder Antwortvariable (y). Als lineare Regression bezeichnet man ein statistisches Modell, dessen erklärende Variable(n) linear kombiniert werden, um die abhängige Variable vorherzusagen.

2.7.3.2. Multiple lineare Regression

Im allgemeinen linearen Modell gibt es statt einer erklärenden Variablen mehrere. Eine Antwortvariable y soll durch mehrere Variablen $x_i = x_1, x_2, \dots, x_n$ erklärt werden und übrig bleibt ein Fehlerterm der durch die Variablen x nicht erklärbar ist (in R: `> summary(lm(y ~ x1 + x2 + ... + xn))`). Die erklärenden Variablen können nicht nur linear, sondern auch nicht-linear mit der Antwortvariablen zusammenhängen. Durch die Hinzunahme der zweiten, dritten, usw. Ordnung des Effektes kann diese Nicht-Linearität analysiert werden. Weiterhin kann zusätzlich zu den Haupteffekten d.h. den erklärenden Variablen, auch ihre Interaktionen mit ins Modell genommen werden. Dies führt dazu, dass das Erklärungsmodell theoretisch unglaublich kompliziert werden kann und mehr erklärende Faktoren als Datenpunkte vorhanden sind, was eine Analyse unmöglich macht. Eine Modellvereinfachung und Variablenauswahl kann z.B. anhand bestimmter Hypothesen, durch Dimensionsreduktion mit Hilfe einer Hauptkomponentenanalyse oder aber auch automatisiert über das ‚Akaike Information Criterion‘ (AIC, Akaike, 1974) durchgeführt werden. AIC ist ein Informationskriterium zur Auswahl eines Modells in der angewandten Statistik. Dabei gehen die Anpassungsgüte des Modells an die Daten und die Komplexität des Modells, gemessen an der Anzahl der Parameter, in die Beurteilung ein. Mehrere konkurrierende Modelle wurden entsprechend ihres AIC eingeordnet und das Modell mit dem niedrigsten AIC-Wert zur weiteren Analyse ausgewählt (in R:

`step((lm (y ~ 1), scope = ~ x1 + x2 + ... + xn))` (Dormann und Kühn, 2011).

Die Qualität einer Regression zeigt sich daran, wie gut die beobachteten Daten durch die Regression angenähert werden. Für jeden beobachteten Punkt kann mittels der Regressionsgeradengleichung ein Vorhersagewert berechnet werden und diese können mittels Korrelation verglichen werden. Pearson's r (als Maß für die Stärke der Korrelation) wird quadriert als Maß für die Güte der Regression genommen. R^2 nimmt Werte zwischen 0 und 1 an, die den Anteil der durch die Regression erklärten Variabilität angibt (Dormann und Kühn, 2011).

Nach dem Berechnen eines Modells muss überprüft werden, ob die der Methode zugrunde liegenden Annahmen erfüllt sind. Dies ist bei der Regression vor allem eine Untersuchung der Residuen auf Normalverteilung (siehe 2.7.1.). Neben der Normalverteilung der Residuen muss auch das Phänomen der Varianzhomogenität untersucht werden. Wenn die gemessenen Werte bei hohen Werten stärker von den vorhergesagten abweichen als bei niedrigen Werten, so bedeutet dies, dass die Varianz der Daten mit ihren Werten zunimmt. Dies ist allerdings ein Verstoß gegen die Annahmen der Regression und eine Transformation der Daten wäre notwendig (diagnostischer Standardplot für lineare Modelle in R: `> plot((lm (y ~ x1 + x2 + ... + xn)), which = 1:4)`) (Dormann und Kühn, 2011).

Wenn eine Variable mehrere Kategorien hat, weiß man nach der Modellberechnung noch nicht, welche dieser verschiedenen Kategorien voneinander verschieden sind, wenn die Variable selbst signifikant ist. In *post-hoc*-Vergleichen werden die Werte der verschiedenen Kategorien miteinander verglichen. Der Inflation der Fehler 1. Ordnung kann man z.B. mit einer Bonferroni-Korrektur oder konservativen *post-hoc*-Testverfahren entgegentreten (Dormann und Kühn, 2011; Holm, 1979) (in R: `> pairwise.t.test (y, x1, p.adj = "holm")`). Zum Beispiel wurden der Shannon-Diversitätsindex oder die Abundanzen einzelner T-RFs mit Hilfe von multipler linearer Regression mit Umweltvariablen der Flächen in Beziehung gebracht.

2.7.4. Multivariate Statistik

Multivariate Daten enthalten mehr als nur eine abhängige Variable unabhängig von der Anzahl erklärender Variablen. Ebenso wie parametrische Statistikverfahren eine Normalverteilung voraussetzen ist dies für daraus abgeleitete multivariate Verfahren notwendig (multinormale Verteilung). Einzelne Variablen sollten normal verteilt sein und auch zwischen den Variablen muss überprüft werden, ob es Ausreißer gibt, bzw. einzelne Variablen das Ergebnis überproportional beeinflussen.

2.7.4.1. ANOSIM

„*Analysis of Similarity*“ (ANOSIM) ist ein nicht-parametrischer Test auf signifikante Unterschiede zwischen zwei oder mehr Gruppen basierend auf einem beliebigen Distanzmaß (Clarke, 1993). Die Teststatistik berechnet die Ränge der Distanzen zwischen verschiedenen sowie innerhalb dieser Gruppen und die Mittelwerte dieser zwei Rangtypen werden verglichen. Das Testen der Nullhypothese erfolgt über Permutationstests. Die daraus resultierende Teststatistik gibt an, ob signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen auftreten ($R=1$) oder nicht ($R=0$). R -Werte > 0.75 gelten als sehr unterschiedlich, R -Werte > 0.5 als unterschiedlich und R -Werte < 0.25 als kaum unterscheidbar (Clarke und Gorley, 2001). Anwendung fand diese Methode in der mikrobiellen Ökologie z.B. bei Kent *et al.* (2007), wo analysiert wurde, ob bakterielle Gemeinschaften eines Sees ähnlicher zueinander sind als die bakteriellen Gemeinschaften unterschiedlicher Seen. In der vorliegenden Arbeit wurde ANOSIM mit dem Bray-Curtis-Distanzmaß verwendet, um Unterschiede in T-RFLP-Profilen der Untersuchungsflächen im Hinblick auf Exploratorium, Wald- oder Grünland, Boden- und Landnutzungstyp bzw. Düngung zu analysieren. ANOSIM wurde mit Hilfe der PAST-Software durchgeführt.

2.7.4.2. Ordinationstechniken

Durch Ordinationstechniken können komplexe multivariate Datensätze vereinfacht abgebildet werden. Die gebräuchlichsten Ordinationsverfahren lassen sich in direkte oder indirekte Gradientenanalyse mit linearer oder unimodaler Beziehung gliedern. Lineare Gradientenanalysen gehen von einer linearen Reaktion der betrachteten Variable auf einen zu Grunde liegenden Gradienten aus während unimodale Gradientenanalysen von einer nicht-linearen Reaktion der betrachteten Variable auf den Gradienten ausgehen (Ramette, 2007). Die Entscheidung für lineare oder unimodale Beziehungen ist abhängig von der Gradientenlänge. Die Gradientenlänge wird dazu in Standardabweichungen entlang der ersten Ordinations-Achse einer „*detrended*“ Korrespondenzanalyse („*Detrended Correspondence Analysis*“, DCA) gemessen (in R: `> decorana (Datenmatrix)`). Es wird empfohlen, bei Gradientenlängen von < 3 Standardabweichungen lineare und bei Gradientenlängen von > 4 Standardabweichungen unimodale Methoden anzuwenden (ter Braak und Smilauer, 2011).

Hauptkomponentenanalyse – Principal Component Analysis (PCA)

Hauptkomponentenanalysen können als Erweiterung der Regression aufgefasst werden. Während bei einer (multiplen) Regression die unabhängigen Variablen vorgegeben werden, sind diese in einer PCA hypothetischer Natur und müssen aus den Daten abgeleitet werden. Die PCA kann zur Dimensionsreduktion genutzt werden, wobei die

Variablen durch lineare Kombinationen zu den so genannten Hauptkomponenten zusammengefasst werden, die die größtmögliche Varianz in den Originaldaten wiedergeben (Hotelling, 1933). Die Koordinaten der einzelnen Proben oder Flächen auf den Hauptkomponenten-Achsen können mit Hilfe univariater statistischer Methoden (z.B. Regressionsanalysen) mit Umweltvariablen der Proben/Flächen in Beziehung gebracht werden. Die Hauptkomponentenanalyse wurde in der mikrobiellen Ökologie schon zahlreich verwendet, z.B. zur Identifizierung von Veränderungen mikrobieller Gemeinschaften über Jahreszeiten oder geographische Regionen (Merrill und Halverson, 2002). In dieser Arbeit wurden Hauptkomponentenanalysen von T-RFLP-Profilen mit Hilfe der PAST-Software durchgeführt.

Redundanzanalyse (RDA)

Die Redundanzanalyse wird angewendet, wenn es eine lineare Beziehung der Variablen untereinander gibt und abhängige Variablen (Art-Abundanzen) mit unabhängigen Variablen (Umweltfaktoren) in Beziehung gesetzt werden sollen. Die Redundanzanalyse ist eine Erweiterung der PCA, in der die Hauptkomponenten abhängig sind von linearen Kombinationen der Umweltvariablen (Rao, 1964). Dabei bilden die Art-Abundanzen (Y) die abhängigen und die Umweltfaktoren die unabhängigen (X) Variablen. Multiple lineare Regression erklärt die Varianz zwischen diesen unabhängigen und abhängigen Variablen. Der Vorteil dieser Methode ist, dass nicht nur die Varianz in den Art-Abundanzen soweit sie durch die Umweltfaktoren erklärt werden kann, dargestellt wird, sondern auch Korrelationen zwischen allen Arten und allen Umweltfaktoren aufgezeigt werden (Ramette, 2007). In der mikrobiellen Ökologie wurde RDA z.B. angewendet um zu analysieren, welche Umweltfaktoren die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft in einem Acker und einem ungestörten Grasland beeinflussen (McKinley *et al.*, 2005). In der vorliegenden Arbeit wurden Redundanzanalysen für T-RFLP-Profilen und Umweltfaktoren in R berechnet (`> summary(rda(Y, X))` und `plot(rda(Y, X), type = c("text"))`).

Partial Least Squares Regression (PLSR)

Die Methode der ‚*Partial Least Squares Regression*‘ (PLSR) wurde durch Wold (1966) in den späten 1960ern für die Ökonometrie entwickelt, seit den frühen 1980ern zahlreich in der analytischen Chemie verwendet, aber bisher nur wenig für die Auswertung ökologischer Daten genutzt. PLSR ist eine Erweiterung der multiplen Regressionsanalyse, in der die Effekte von linearen Kombinationen mehrerer unabhängiger Variablen (X) auf eine oder mehrere abhängige Variablen (Y) untersucht werden. Verbindungen werden über so genannte latente Faktoren, die aus den unabhängigen Variablen extrahiert

werden so hergestellt, dass die erklärbare Varianz in den abhängigen Variablen maximiert wird. Latente Faktoren (oder PLSR-Komponenten) sind definiert als zwischen unabhängigen und abhängigen Variablen erstellte lineare Kombinationen, die die ursprüngliche Multidimensionalität auf eine kleinere Anzahl von orthogonalen Faktoren reduzieren und so einen Aufschluss über die Struktur in den Beziehungen zwischen den unabhängigen Variablen sowie zwischen den latenten Faktoren und den abhängigen Variablen ermöglichen (Carrascal *et al.*, 2009). Es handelt sich bei PLSR um eine bilineare Methode der Modellierung, bei der Informationen der ursprünglichen abhängigen Variablen (z. B. Zusammensetzung einer mikrobiellen Gemeinschaft) auf eine kleine Anzahl zugrundeliegender Variablen, die PLSR-Komponenten, projiziert werden. Die unabhängigen Variablen (z.B. Umweltfaktoren) werden zur Schätzung der PLSR-Komponenten genutzt um sicherzustellen, dass die ersten Komponenten auch die relevantesten für die daraus abgeleiteten Vorhersagen der abhängigen Variablen sind (Rudi *et al.*, 2007). PLSR ist für Datensätze mit nahezu gleicher oder höherer Anzahl unabhängiger Variablen wie Beobachtungen sowie für Daten mit stark korrelierten unabhängigen Variablen (Kollinearität) besonders geeignet. In der mikrobiellen Ökologie wurde PLSR z.B. bereits zur Analyse von T-RFLP-Profilen einer Untersuchung zu jahreszeitlicher und räumlicher Variation in der Zusammensetzung von Bakterioplankton angewendet (Stepanuskas *et al.*, 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde PLSR zur Analyse von Beziehungen zwischen T-RFLP-Profilen und Umweltfaktoren genutzt (in R: `> plsr(X ~ Y, data = data, validation = "LOO")`).

3. Ergebnisse

Die phylogenetische Diversität, weite Verbreitung und hohe Abundanz der *Acidobacteria* im Boden lassen eine wichtige Rolle bei biogeochemischen Prozessen und große metabolische Vielseitigkeit vermuten. Über die Funktion der *Acidobacteria* im Boden und die Beeinflussung ihrer Zusammensetzung und Diversität durch Landnutzung ist jedoch sehr wenig bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurden daher Diversitätsveränderungen der *Acidobacteria* in zahlreichen Grünland- und Waldböden unterschiedlicher Landnutzung untersucht. Zielsetzung war die Erfassung der Zusammensetzung und Diversität der *Acidobacteria* in Abhängigkeit von Boden- und Standorteigenschaften sowie Pflanzendiversität als auch die Identifizierung wichtiger funktioneller Gruppen. Mittels molekularbiologischer Methoden wurde im Verlauf dieser Arbeit zunächst durch nahezu vollständige Sequenzierung der 16S rRNA-Gene ein Überblick über die Diversität der *Acidobacteria* in allen Grünland- und Waldböden der drei Untersuchungsregionen gewonnen (siehe Kapitel 3.2.). Die Diversität und Zusammensetzung der *Acidobacteria* jedes einzelnen Bodens der 57 Untersuchungsflächen wurde über so genannte ‚*fingerprinting*‘-Analysen (terminaler Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus, T-RFLP) erfasst. Die T-RFLP-Analyse wurde sowohl auf Basis der 16S rRNA-Gene (siehe Kapitel 3.3.) als auch der 16S rRNA (siehe Kapitel 3.4.) durchgeführt, um nicht nur die anwesenden sondern auch die physiologisch aktiven *Acidobacteria* zu erfassen. Zusätzlich wurde über 16S rRNA-‚*fingerprinting*‘ auch die jahreszeitliche Veränderung der Diversität der aktiven *Acidobacteria* aufgenommen und auf Abhängigkeit von Umwelteinflüssen geprüft (siehe Kapitel 3.5.). Mittels statistischer Datenanalyse konnten Abhängigkeiten der Zusammensetzung und Diversität der *Acidobacteria* und ihrer Untergruppen von Boden- und Standorteigenschaften sowie Landnutzung sowohl für ‚*fingerprinting*‘- als auch vergleichende Sequenzanalysen aufgezeigt werden. Um die Rolle der *Acidobacteria* im Boden genauer zu verstehen, wurde zudem über stabile Isotopenbeprobung (SIP) der Abbau von Pflanzenmaterial exemplarisch in einem Grünland- und einem Waldboden verfolgt und die daran beteiligten Bakterien über T-RFLP-Analyse und (Pyro)Sequenzierung der 16S rRNA identifiziert (siehe Kapitel 3.6.).

3.1. Grünland- und Waldböden der Exploratorien

Um Landnutzungseffekte auf Biodiversität zu verstehen und die modifizierende Rolle von Biodiversitätsveränderungen verschiedener Taxa auf Ökosystemprozesse, einschließlich biogeochemischer Kreisläufe, zu untersuchen, wurde ein großskaliges und langfristiges

Projekt zur funktionellen Biodiversitätsforschung ins Leben gerufen. Die so genannten Biodiversitäts-Exploratorien umfassen standardisierte Untersuchungsflächen in drei Regionen Deutschlands, die jeweils vielfältige Typen und Intensitäten der Wald- und Grünlandnutzung einschließen. Die Exploratorien Schorfheide-Chorin (SCH), Hainich-Dün (HAI) und Schwäbische Alb (ALB) unterscheiden sich unter anderem in der Lage innerhalb Deutschlands (Nordosten, Mitte, Südwesten), der Höhe über dem Meeresspiegel (10-860 m), der mittleren Jahrestemperatur (6-8,4°C) und dem Jahresniederschlag (520-960 mm). Im Gebiet der Schwäbischen Alb sind im Grünland Leptosol- und im Wald Cambisol-Böden vorherrschend, im Hainich die Bodentypen Stagnosol und Luvisol und in der Region Schorfheide Histosol- und Cambisol-Böden. Die Grünland- und Waldböden der drei Untersuchungsregionen unterschieden sich zum Teil auch sehr stark in Bodenparametern (Tab. 6). So zeigten Grünland- im Vergleich zu Waldböden höhere Werte für pH, Bodentemperatur, Bodenatmung, Abundanz der Amöben, Nitrat- und Phosphatgehalt aber ein kleineres Kohlenstoff/Stickstoff(CN)-Verhältnis und einen niedrigeren Ammoniumgehalt. Die Böden der Schwäbischen Alb und des Hainich erwiesen sich in den meisten Umweltvariablen als vergleichbar, wohingegen die Schorfheide-Böden am stärksten unterschiedlich von allen anderen Böden hinsichtlich fast aller analysierten Parameter waren. So wiesen die Schorfheide-Grünlandböden im Vergleich zu denen der beiden anderen Exploratorien u. a. einen dreifach erhöhten Gehalt an organischem Kohlenstoff aber auch mehr Stickstoff, eine um mindestens 4°C höhere Bodentemperatur und eine gesteigerte Bodenatmungsrate auf. In den Schorfheide-Waldböden hingegen war nur etwa halb so viel organischer Kohlenstoff, Nitrat oder auch Phosphor zu finden dafür aber eine gesteigerte Menge an Ammonium. Allgemein wuchs auf Böden der Schorfheide auch eine geringere Anzahl vaskulärer Pflanzenarten im Vergleich zur Schwäbischen Alb und dem Hainich (Tab. 6). Einige Boden- und Standortparameter der Untersuchungsflächen bedingen allerdings einander und sind infolgedessen korreliert, z.B. ist das CN-Verhältnis umso größer je niedriger der pH-Wert oder auch der Phosphorgehalt im Boden ist, eine höhere Bodentemperatur führt zu einer erhöhten Bodenatmungsrate und ein hoher Gehalt an organischen Kohlenstoff korreliert mit einem hohen Stickstoffanteil im Boden (Anhang Tab. 2).

Aufgrund der genannten großen Verschiedenheiten in Boden- und Standorteigenschaften, wurden auch unterschiedliche *Acidobacteria*-Gemeinschaften in den 57 Böden vermutet, assoziiert mit veränderlichen Lebensweisen und Rollen in biogeochemischen Prozessen sowie Anpassungen an den jeweiligen Standort.

Tabelle 6. Lokalisierung und Charakteristika der drei Exploratorien sowie Mittelwert (\pm Standardabweichung) der Boden- und Standorteigenschaften aller Untersuchungsflächen getrennt nach Wald (W) und Grünland (G) je Exploratorium. Fehlende Messwerte einzelner Flächen wurden durch angemessene Mittelwerte (aller Grünland- bzw. Waldflächen des entsprechenden Exploratoriums) ersetzt.

	ALB		HAI		SCH	
	AEG	AEW	HEG	HEW	SEG	SEW
Nördliche Breite	48° 20' 60.0" – 48° 32' 3.7" N		50° 56' 14.5" – 51° 22' 43.4" N		52° 47' 24.8" – 53° 13' 26.0" N	
Östliche Länge	9° 12' 13.0" – 9° 34' 48.9" E		10° 10' 24.0" – 10° 46' 45.0" E		13° 23' 27" – 14° 8' 52.7" E	
Höhe [m über NN]	460 - 860		300 - 400		10 - 140	
Jahresmitteltemperatur [°C]	6.5 - 8.0		6.0 - 7.5		8.0 - 8.4	
Jahresniederschlag [mm]	940 - 960		750 - 800		520 - 600	
Bodentyp	Leptosol, Cambisol		Stagnosol, Luvisol		Histosol, Cambisol	
pH	6,49 ($\pm 0,48$)	4,96 ($\pm 0,74$)	7,01 ($\pm 0,18$)	5,15 ($\pm 1,12$)	6,85 ($\pm 0,58$)	3,56 ($\pm 0,13$)
org. Kohlenstoff [C, g kg ⁻¹]	67 (± 15)	69 (± 18)	50 (± 22)	53 (± 15)	150 (± 71)	25 (± 6)
Stickstoff [N, g kg ⁻¹]	6,30 ($\pm 1,40$)	4,87 ($\pm 1,11$)	4,73 ($\pm 1,83$)	3,76 ($\pm 1,27$)	14,02 ($\pm 5,39$)	1,42 ($\pm 0,32$)
Kohlenstoff/Stickstoff-(CN)-Verhältnis	10,59 ($\pm 0,67$)	14,12 ($\pm 1,30$)	10,36 ($\pm 1,01$)	14,35 ($\pm 1,29$)	10,48 ($\pm 0,95$)	17,72 ($\pm 1,47$)
Bodenfeuchte [% vol]	52 (± 3)	47 (± 4)	45 (± 5)	44 (± 4)	44 (± 19)	30 (± 3)
Bodentemperatur [°C]	6,87 ($\pm 0,82$)	4,53 ($\pm 0,45$)	9,51 ($\pm 2,99$)	6,16 ($\pm 1,54$)	14,05 ($\pm 0,64$)	7,15 ($\pm 0,76$)
Bodenatmung [$\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$]	3,86 ($\pm 0,95$)	1,44 ($\pm 0,15$)	5,53 ($\pm 2,98$)	1,65 ($\pm 0,32$)	12,11 ($\pm 3,12$)	1,93 ($\pm 0,61$)
Amöben [10 ⁴ g ⁻¹]	23 (± 22)	5,53 ($\pm 5,07$)	47 (± 57)	0,91 ($\pm 0,50$)	10 (± 15)	0,59 ($\pm 0,41$)
Flagellaten [10 ⁴ g ⁻¹]	2,22 ($\pm 2,16$)	5,51 ($\pm 2,54$)	3,34 ($\pm 1,46$)	1,43 ($\pm 0,78$)	2,16 ($\pm 2,33$)	1,62 ($\pm 0,50$)
Ciliaten [10 ² g ⁻¹]	1,97 ($\pm 3,01$)	0,23 ($\pm 0,29$)	0,54 ($\pm 0,75$)	0,40 ($\pm 0,41$)	5,12 ($\pm 0,78$)	0,44 ($\pm 1,68$)
Anzahl vaskulärer Pflanzenarten	32 (± 13)	34 (± 19)	20 (± 9)	32 (± 15)	16 (± 3)	14 (± 10)
Landnutzungsintensität (LUI)	2,64 ($\pm 1,96$)	40 (± 17)	3,67 ($\pm 1,58$)	42 (± 20)	2,70 ($\pm 2,16$)	42 (± 17)
Ammonium [μmol]	7,92 ($\pm 6,22$)	65 (± 39)	8,88 ($\pm 3,91$)	33 (± 21)	9,44 ($\pm 7,38$)	154 (± 131)
Nitrat [μmol]	637 (± 549)	421 (± 271)	595 (± 241)	558 (± 344)	807 (± 374)	276 (± 206)
Phosphor [mg kg ⁻¹]	1158 (± 391)	687 (± 229)	1113 (± 395)	553 (± 201)	1046 (± 427)	252 (± 93)

3.2. Diversität von *Acidobacteria* in Grünland- und Waldböden

Zielsetzung des folgenden Abschnitts war die Erfassung der Zusammensetzung und Diversität der *Acidobacteria* als auch die Identifizierung wichtiger funktioneller Gruppen. Durch nahezu vollständige Sequenzierung der 16S rRNA-Gene wurde ein Überblick über die Diversität der *Acidobacteria* in allen Grünland- und Waldböden der drei Untersuchungsregionen gewonnen. Dazu wurden die 16S rRNA-Gene aus allen 57 Bodenproben unter Verwendung eines *Acidobacteria*-spezifischen Primers vervielfältigt. Gleiche Anteile der aufgereinigten PCR-Produkte aller Grünland- bzw. aller Waldflächen eines Exploratoriums wurden vereinigt und so sechs Proben zur Erstellung von 16S rRNA-Gen Klonbibliotheken erhalten - eine Grünland- (AEG, HEG, SEG) und eine Waldprobe (AEW, HEW, SEW) für jedes der drei Exploratorien (ALB-A, HAI-H, SCH-S). Die acidobakteriellen 16S rRNA-Gene wurden über Klonierung vereinzelt um ihre Sequenzierung und phylogenetische Einordnung zu ermöglichen (siehe Kapitel 2.4.8.)

Nach dem Entfernen chimärer Sequenzen konnten insgesamt 2031 Sequenzen vergleichend analysiert werden, 320-355 pro Klonbibliothek. Die Abdeckung der Diversität („Coverage“) mit 3% Sequenzunterschied als Abgrenzung zwischen Arten (Stackebrandt und Goebel, 1994) lag bei durchschnittlich 85% (67-94%, Tab. 7). Die Analyse von weiteren Klonen wäre erforderlich um die zum Teil sehr hohe *Acidobacteria*-Diversität der Böden besser abdecken zu können. Von den 26 Untergruppen der *Acidobacteria* (Barns *et al.*, 2007) wurden 11 in den untersuchten Böden detektiert: Gp1 (25%), Gp3 (8%), Gp4 (8%), Gp5 (9%), Gp6 (44%), Gp9 (0,1%), Gp11 (1%), Gp13 (1%), Gp15 (0,3%), Gp17 (3%) und Gp18 (0,2%) (Abb. 5, 6; Tab. 7). Die Verteilung und Abundanz der einzelnen Untergruppen variierte jedoch zwischen Grünland- und Waldböden der drei Untersuchungsregionen. Grünlandböden wurden von Untergruppe Gp6 (59-62%) dominiert, gefolgt von Gp4 (8-20%), Gp5 (3-17%), Gp3 (2-14%) und Gp17 (3-7%). Alle anderen Untergruppen waren mit nur 0-5% aller Sequenzen vertreten (Abb. 5, Tab. 7). In Waldböden dagegen bestimmten die Untergruppen Gp1 (26-85%) und Gp6 (1-41%) die Gemeinschaft, allerdings waren viele Sequenzen auch Gp5 (0-13%), Gp3 (7-11%) und Gp4 (0-6%) zuzuordnen. Alle anderen Untergruppen waren nur mit 0-2% aller Sequenzen in Waldböden vertreten (Abb. 5, Tab. 7). Die drei Grünland-Klonbibliotheken waren auf den ersten Blick sehr ähnlich zueinander. Bei den Wald-Klonbibliotheken fiel SEW mit ca. dreimal so vielen Gp1-Sequenzen wie AEW und HEW, aber auch dem Fehlen von Gp4 und Gp5 auf (Abb. 5). Dennoch war gemäß LIBSHUFF- und UniFrac-Analysen die Zusammensetzung der *Acidobacteria* in allen sechs Klonbibliotheken signifikant unterschiedlich voneinander ($p < 0,001$), ausgenommen AEW und HEW (LIBSHUFF und UniFrac) sowie AEG und HEG (UniFrac).

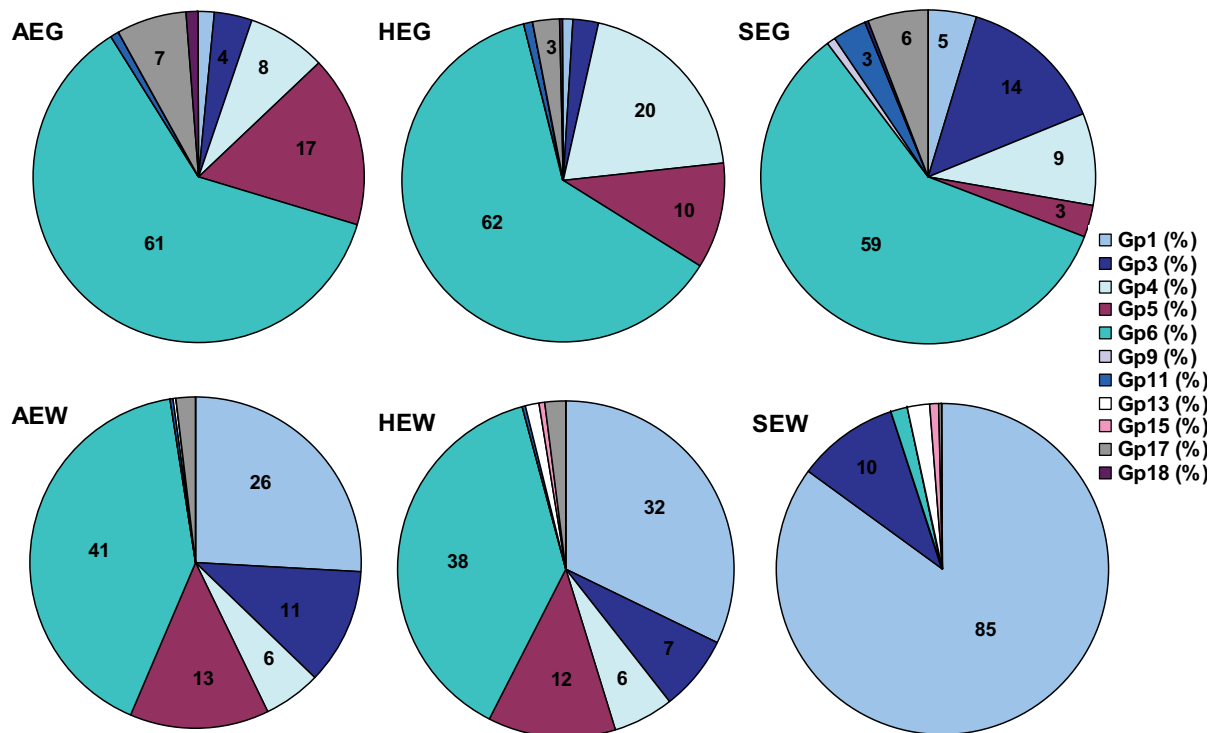


Abbildung 5. Zuordnung der 16S rRNA-Gen-Sequenzen der Klonbibliotheken AEG, HEG, SEG, AEW, HEW und SEW zu den verschiedenen Untergruppen der *Acidobacteria*.

Phylogenetische Bäume auf der Grundlage von geeigneten Referenzsequenzen von Reinkulturen und Umweltklonen sowie Klonsequenzen dieser Arbeit (Abb. 6, Anhang Abb. 1-9) erlaubten eine differenzielle vergleichende Sequenzanalyse. Die Verfügbarkeit der nahezu kompletten 16S rRNA-Gen-Sequenzen machte eine detaillierte phylogenetische Analyse möglich. Die phylogenetische Divergenz, der Bereich der Sequenzidentität der Klone untereinander, war in der Untergruppe Gp4 (82-100%) am stärksten ausgeprägt, gefolgt von Gp3 (84-100%), Gp6 (85-100%) und Gp1 (86-100%). Die Klone der Untergruppe Gp5 waren am wenigsten divergent (90-100%). Da es nur wenige beschriebene und kultivierte Vertreter der *Acidobacteria* gibt, konnten den meisten Klonsequenzen dieser Arbeit als nächste Verwandte nur Sequenzen von unkultivierten Umweltklonen zugeordnet werden. Teilweise waren die Klone jedoch sehr nahe verwandt mit beschriebenen Vertretern der *Acidobacteria*. Einige Klone teilten bis zu 99% der Sequenz mit den aus Boden isolierten *Edaphobacter modestus* und *E. aggregans* (Gp1), andere mit *Candidatus Solibacter usitatus* (Gp3). Unter den 2031 Klonen zeigten die nächsten Verwandten von *Acidobacterium capsulatum* (Gp1), *Terriglobus roseus* (Gp1), *Acidipila rosea* (Gp1) und *Candidatus Koribacter versatilis* (Gp1) je 96% Sequenzidentität.

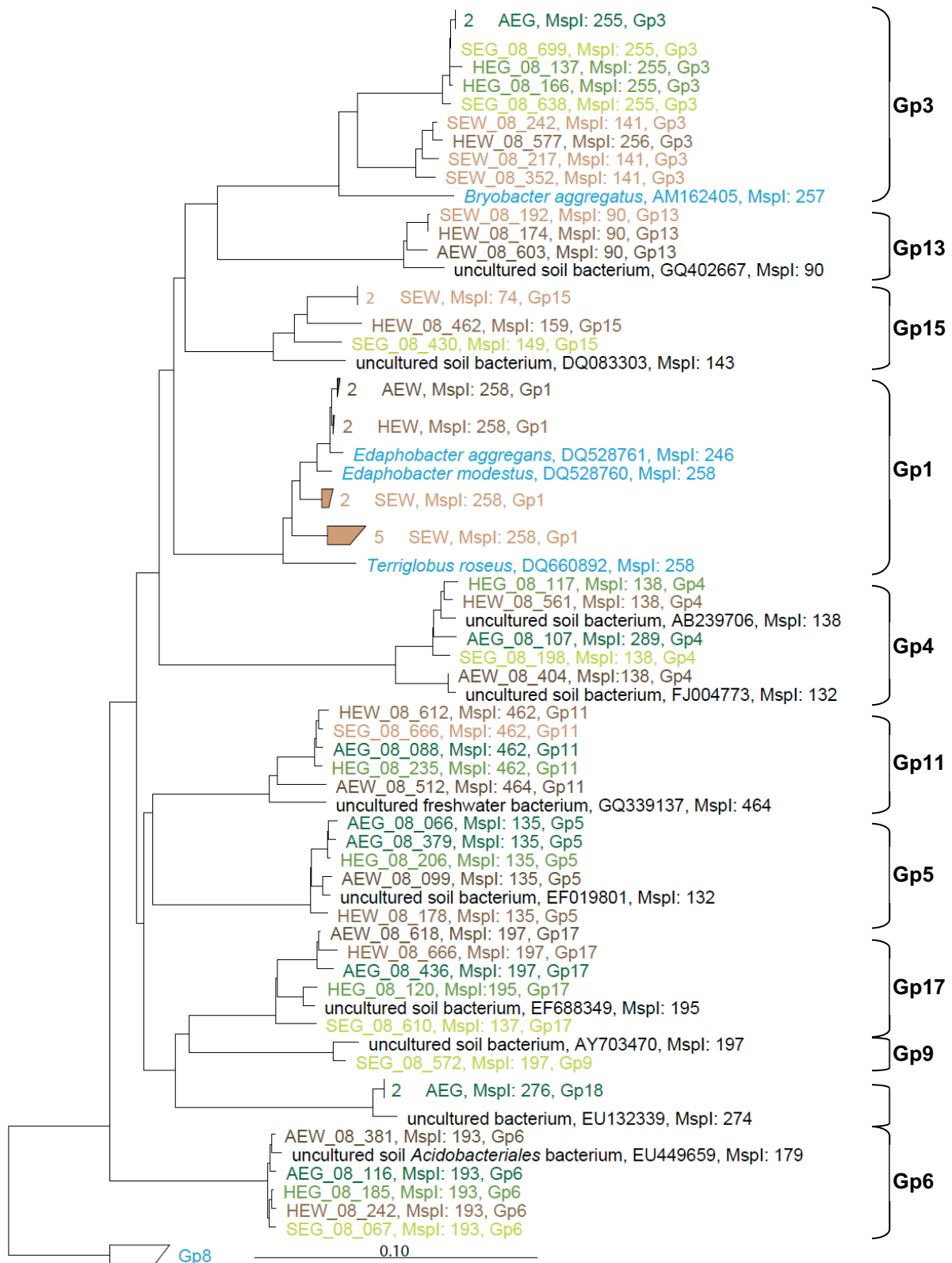


Abbildung 6. Neighbour-Joining-Baum von ausgewählten 16S rRNA-Gen-Sequenzen der Klonbibliotheken der verschiedenen detektierten Untergruppen und nah verwandten bzw. beschriebenen Vertretern der *Acidobacteria*. T-RF-Längen (bp) wurden mittels *in silico*-Verdau der 16S rRNA-Sequenzen mit dem Restriktionsenzym *MspI* bestimmt. Der Maßstab stellt 10% Sequenzunterschied dar, GenBank ‚accession numbers‘ der Referenzsequenzen sind angegeben.

Unter den Klonen aus den SEW-Böden waren auch nächste Verwandte zu den vier beschriebenen *Granulicella*-Spezies (Gp1, 97-98% Sequenzidentität). Dagegen wies *Bryobacter aggregatus* (Gp3) unter den Klonen als nächsten Verwandten einen SEG-Klon mit nur 92% Sequenzidentität auf. Einige AEG- und HEG-Klone teilten aber auch 97% der 16S rRNA-Sequenz mit einem Isolat der Untergruppe Gp6 aus Böden in Belgien (IGE-011, GU187027) und AEG- und AEW-Klone 98-99% mit einem Boden-Isolat der Untergruppe Gp4 (Ellin6099, AY234751). Die Klonsequenzen einer der sechs Klonbibliotheken waren meist auch mit den Sequenzen der anderen Klonbibliotheken nah verwandt und bildeten nur selten und wenn, dann eher kleine eigene Cluster. Allerdings waren z.B. Sequenzen der Untergruppe Gp3 in kleinere Cluster mit Klonen aus Grünlandböden und größere Cluster mit Klonen aus Waldböden getrennt. Die Untergruppe Gp1 war fast ausschließlich in Waldproben vertreten und SEW-Sequenzen bildeten häufig eigene Gp1-Cluster (Abb. 6, Anhang Abb. 1-9).

Tabelle 7. Anzahl der Klone (OTUs), Coverage und Diversitätsindices der Klonbibliotheken (97% Sequenzidentität).

	AEG	HEG	SEG	AEW	HEW	SEW	Total
Klone	355 (126)	334 (121)	345 (192)	320 (124)	330 (142)	347 (75)	2031 (414)
Gp1	6 (4)	4 (3)	16 (10)	83 (34)	106 (34)	295(48)	510 (66)
Gp3	13 (7)	8 (5)	49 (35)	36 (17)	24 (14)	35 (16)	165 (66)
Gp4	27 (13)	66 (27)	31 (20)	18 (8)	19 (12)	-	161 (49)
Gp5	60 (8)	35 (7)	10 (6)	43 (7)	41 (10)	-	189 (16)
Gp6	217 (82)	208 (70)	204 (99)	132 (51)	126 (60)	5 (5)	892 (172)
Gp9	-	-	2 (1)	-	-	-	2 (1)
Gp11	3 (2)	3 (2)	12 (6)	1 (1)	1 (1)	-	20 (8)
Gp13	-	-	-	1 (1)	5 (4)	8 (3)	14 (6)
Gp15	-	-	1 (1)	-	2 (2)	3 (2)	6 (4)
Gp17	25 (9)	9 (6)	20 (14)	6 (5)	6 (5)	1 (1)	67 (25)
Gp18	4 (1)	1 (1)	-	-	-	-	5 (1)
Coverage (%)	90,1	88,0	67,2	87,2	85,2	94,2	
Shannon-Index	4,3	4,3	4,85	4,2	4,4	3,6	
Faith's PD¹	2,95	2,85	4,78	3,07	3,48	1,86	
MPD²	0,119	0,123	0,122	0,128	0,129	0,086	
MNTD³	0,030	0,029	0,033	0,032	0,031	0,028	
NRI⁴	2,53	2,74	4,50	1,59	1,91	5,66	
NTI⁴	3,78	4,99	2,84	3,36	3,91	3,98	
Simpson⁵	0,98	0,98	0,99	0,98	0,98	0,96	
pD⁶	0,059	0,061	0,061	0,064	0,064	0,043	

¹ Faith's-Index der phylogenetischen Diversität

² Mittlere paarweise Distanz zwischen allen Arten/OTUs einer Gemeinschaft

³ Mittlerer Distanzen zum nächsten Verwandten der Gemeinschaft

⁴ *Net Relatedness Index/Nearest Taxon Index* – Maße der phylogenetischen Gemeinschaftsstruktur

⁵ Simpson's Diversität – Wahrscheinlichkeit, dass zwei Individuen unterschiedlichen Arten/OTUs angehören

⁶ Phylogenetische Diversität – phylogenetische Distanz zwischen zwei zufällig ausgewählten Individuen der Gemeinschaft

Für die Berechnung von Diversitäts-Indices mit PHYLOCOM aber auch den Vergleich der *Acidobacteria*-Gemeinschaften über UniFrac wurden alle 2031 Klone in insgesamt 414 ‚Operational Taxonomic Units‘ (OTUs) basierend auf 97% Sequenzunterschied eingeteilt. Die Anzahl der OTUs in AEG, AEW, HEG und HEW (121-142) veranschaulicht eine ähnliche Diversität in diesen vier Böden, wohingegen die *Acidobacteria*-Diversität in SEG-Böden (192) eine deutlich höhere und in SEW-Böden (75) eine niedrige Diversität erwarten lässt (Tab. 7). Verschiedene Diversitäts-Indices (z.B. Shannon-Index, Faith's PD) zeigten, dass die Diversität in AEG, HEG, AEW und HEW in etwa vergleichbar ist, in SEG deutlich am höchsten und in SEW mit Abstand am niedrigsten (Tab. 7). Entsprechend sind auch die mittlere paarweise Distanz (MPD), mittlere Distanz zum nächsten Verwandten (MNTD) und erwartete phylogenetische Distanz zwischen zwei zufällig ausgewählten Sequenzen für SEW am kleinsten. Der ‚Net Relatedness Index‘ (NRI), ein Maß der phylogenetischen Struktur der Gemeinschaft, ist für SEW und SEG am höchsten und zeigt an, dass in diesen beiden Proben die phylogenetische Clusterbildung

Tabelle 8. Anzahl der Klone in OTUs mit mehr als 20 Sequenzen. Die Untergruppe (Gp) der *Acidobacteria* jedes OTUs und der prozentuale Anteil an der entsprechenden Klonbibliothek sind angegeben.

OTU	Gp	AEG	HEG	SEG	AEW	HEW	SEW	Total
OTU3	5	23 (6,5%)	9 (2,7%)	1 (0,3%)	23 (7,2%)	16 (4,8%)		72 (3,5%)
OTU7	1			6 (1,7%)	13 (4,1%)	19 (5,8%)	24 (6,9%)	62 (3,1%)
OTU31	5	15 (4,2%)	19 (5,7%)	4 (1,2%)	6 (1,9%)	6 (1,8%)		50 (2,5%)
OTU114	1				1 (0,3%)		41 (11,8%)	42 (2,1%)
OTU9	6	9 (2,5%)			16 (4,1%)	12 (3,6%)	1 (0,3%)	38 (1,9%)
OTU115	6	9 (2,5%)	16 (4,8%)	9 (2,6%)	1 (0,3)	1 (0,3%)		36 (1,8%)
OTU6	6	16 (4,5%)	5 (1,5%)	1 (0,3%)	6 (1,9%)	4 (1,2%)		32 (1,6%)
OTU94	1				2 (0,6%)	4 (1,2%)	25 (7,2%)	31 (1,5%)
OTU32	1				3 (0,9%)	5 (1,5%)	19 (5,5%)	27 (1,3%)
OTU119	1				1 (0,3%)	7 (2,1%)	18 (5,2%)	26 (1,3%)
OTU92	6	7 (2,0%)	7 (2,1%)	7 (2,0%)	3 (0,9%)	2 (0,6%)		26 (1,3%)
OTU2	1			2 (0,6%)	6 (1,9%)	4 (1,2%)	11 (3,2%)	23 (1,1%)
OTU15	5	7 (2,0%)			9 (2,8%)	7 (2,1%)		23 (1,1%)
OTU45	6	4 (1,1%)	8 (2,4%)	7 (2,0%)	3 (0,9%)			22 (1,1%)
OTU99	6	7 (2,0%)	2 (0,6%)	10 (2,9%)	1 (0,3%)	2 (0,6%)		22 (1,1%)

der Sequenzen häufiger vorkommt, als bei AEG, HEG, AEW und HEW. Alle Böden haben laut Simpson-Index eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass zwei Sequenzen der Gemeinschaft unterschiedlichen Arten bzw. OTUs angehören (Tab. 7).

In allen sechs Klonbibliotheken wurden 414 ‚Operational Taxonomic Units‘ (OTUs) mit 3% Sequenzunterschied detektiert. Nur zwei der OTUs kamen in allen sechs Klonbibliotheken vor, 15 OTUs in fünf, wobei AEG, HEG, SEG, AEW und HEW 14 OTUs gemeinsam haben. Vierundzwanzig OTUs kommen in vier der Klonbibliotheken, 72 OTUs in drei, 84 OTUs in zwei und 217 OTUs in je nur einer der Klonbibliotheken vor (Anhang Tab. 3). Die Untergruppe Gp5 zeigte die geringste phylogenetische Divergenz - die 189 Klone konnten nur 16 OTUs zugeordnet werden. Die 165 Klone der Untergruppe Gp3 hingegen wurden in 66 OTUs zusammengefasst (Tab. 7). In 15 OTUs der Untergruppen Gp1, Gp5 und Gp6 kamen mehr als 20 Klonsequenzen vor, die eingehender analysiert wurden (Tab. 8). Die OTU3 der Untergruppe Gp5 war der häufigste Phylotyp, beinhaltet 72 Sequenzen und stellt damit 3,5% aller Klone und bis zu 7% der Klone eines Bodens (AEG, AEW). Alle 15 häufigsten OTUs zusammen umfassen 40% aller SEW-Klone, OTU114 (Gp1) allein sogar 12%. Dagegen stellen die OTUs mit mehr als 20 Klonsequenzen nur 14% aller Sequenzen in SEG-Böden, alle anderen vier Böden liegen bei 20-28%. AEW-Sequenzen kommen sogar in allen 15 häufigsten OTUs vor (Tab. 8).

Die Sequenzierung der 16S rRNA-Gene zahlreicher Klone erlaubte somit eine detaillierte Analyse der Sequenzdaten der Grünland- und Waldböden der drei Regionen nicht nur auf Ebene der *Acidobacteria*-Untergruppen sondern auch einzelner OTUs.

3.3. Einflussfaktoren auf die Diversität von *Acidobacteria*

Mittels molekularbiologischer Methoden wurde zunächst durch nahezu vollständige Sequenzierung der 16S rRNA-Gene ein Überblick über die Diversität der *Acidobacteria* in allen Grünland- und Waldböden der drei Untersuchungsregionen gewonnen. Die Diversität und Zusammensetzung der *Acidobacteria* jedes einzelnen Bodens der 57 Untersuchungsflächen wurde über ‚fingerprinting‘-Analysen (terminale Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-(T-RFLP)-Analyse) erfasst (siehe Kapitel 2.4.6.).

Nach der Standardisierung der insgesamt 27 Grünland- und 30 Waldboden-Profile der acidobakteriellen 16S rRNA-Gene wurden 98 terminale Restriktionsfragmente (T-RFs) zur weiteren Analyse verwendet. Die Peakfläche jedes T-RFs der Profile wurde als Maß für die Abundanz gewählt und in prozentuale Anteile an der gesamten acidobakteriellen Gemeinschaft umgerechnet. Durch Ordinationstechniken können komplexe multivariate Datensätze wie z.B. T-RFLP-Profile verschiedener Proben vereinfacht abgebildet und

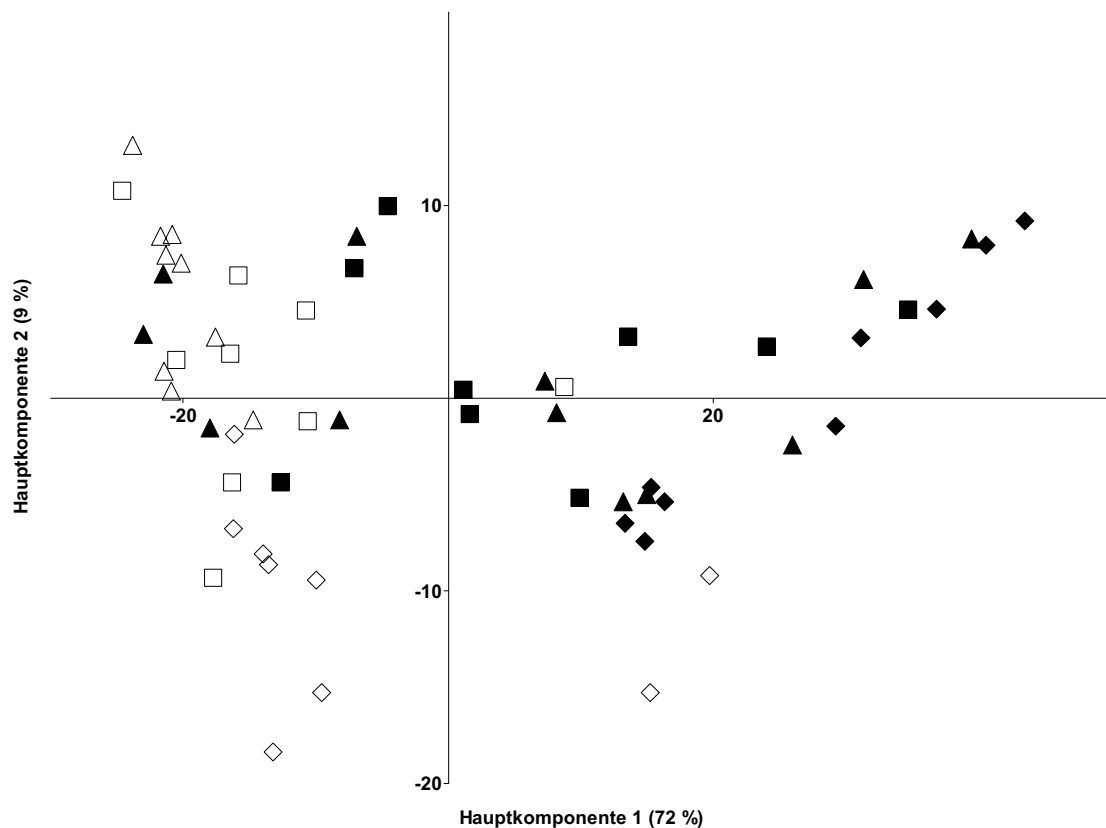


Abbildung 7. Hauptkomponentenanalyse der 16S rRNA-Gen T-RFLP-Profile der *Acidobacteria* im Boden der 57 Untersuchungsflächen. ■ AEW, □ AEG, ▲ HEW, △ HEG, ◆ SEW, ◇ SEG

verglichen werden. Die Entscheidung für lineare oder unimodale Modelle ist abhängig von der zugrunde liegenden Gradientenlänge. Die Gradientenlänge wird dazu in Standardabweichungen entlang der ersten Ordinations-Achse einer ‚detrended‘ Korrespondenzanalyse (‚*Detrended Correspondence Analysis*‘, DCA) gemessen. Es wird empfohlen, bei Gradientenlängen von < 3 Standardabweichungen lineare und bei Gradientenlängen von > 4 Standardabweichungen unimodale Methoden anzuwenden (ter Braak und Smilauer, 2011). Die DCA-Gradientenlänge der 57 T-RFLP-Profile betrug < 3 Standardabweichungen und folglich wurden in der nachfolgenden statistischen Analyse vor allem lineare Modelle, wie z.B. eine Hauptkomponentenanalyse (‚*Principal Component Analysis*‘, PCA) verwendet (siehe Kapitel 2.7.4.2.). Die Hauptkomponentenanalyse der 16S rRNA-Gen T-RFLP-Profile zeigte, dass die *Acidobacteria*-Gemeinschaft in Grünlandböden ähnlicher zueinander war als in Waldböden, die eine größere Variation in der Zusammensetzung der Gemeinschaft aufwiesen. T-RFLP-Profile aller Grünland- und aller Waldböden eines Exploratoriums waren hingegen relativ ähnlich, vor allem in den Grünlandböden der Schwäbischen Alb (Abb. 7).

Tabelle 9. Vergleich der paarweisen Bray-Curtis-Distanzen zwischen 16S rRNA-Gen T-RFLP-Profilen durch ANOSIM. Je höher der R-Wert ($0 < R < 1$), desto größer der Unterschied zwischen den analysierten Gruppen. Die Signifikanz wurde über Permutation mit 10.000 Wiederholungen berechnet. Signifikante R-Werte $> 0,15$ sind fett dargestellt. Signifikanzniveau: * < 0.05 , ** < 0.01 , *** < 0.001

	R
Exploratorium	0,1577 ***
Bodentyp	0,2373 ***
Grünland/Wald	0,3532 ***
Exploratorium Grünland	0,3557 ***
Exploratorium Wald	0,3361 ***
Bodentyp Grünland	0,2003 *
Bodentyp Wald	0,1156
Landnutzungstyp Grünland	0,0091
Landnutzungstyp Wald	-0,0442
Düngung	0,0443

Außerdem wurde eine ‚*Analysis of Similarity*‘ (ANOSIM) mit dem Bray-Curtis-Distanzmaß (siehe Kapitel 2.7.4.1.) verwendet, um Unterschiede in T-RFLP-Profilen der Untersuchungsflächen im Hinblick auf Exploratorium, Wald- oder Grünland, Boden- und Landnutzungstyp bzw. Düngung zu analysieren (Tab. 9). ANOSIM ist ein nicht-parametrischer Test auf signifikante Unterschiede zwischen zwei oder mehr Gruppen und berechnet die Ränge der Distanzen zwischen und innerhalb dieser Gruppen, wobei die Mittelwerte dieser zwei Rangtypen verglichen werden. Die daraus resultierende Teststatistik gibt an, ob signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen auftreten ($R=1$) oder nicht ($R=0$). R-Werte > 0.75 gelten als sehr unterschiedlich, R-Werte > 0.5 als unterschiedlich und R-Werte < 0.25 als kaum unterscheidbar (Clarke und Gorley, 2001). ANOSIM verdeutlichte, dass sich die *Acidobacteria*-Gemeinschaften in Grünland- und Waldböden ($R=0,35$) unterscheiden. Unterschiede zwischen den Exploratorien ($R=0,16$) wurden größer, wenn die Exploratorien nach Grünland- ($R=0,36$) und Waldböden ($R=0,34$) getrennt verglichen wurden. Außerdem beeinflussten die acht verschiedenen Bodentypen der 57 Untersuchungsflächen die Zusammensetzung der *Acidobacteria*-Gemeinschaften ($R=0,24$), wobei deren Einfluss im Grünland von größerer Bedeutung war ($R=0,20$) als im Wald ($R=0,12$). Jedoch zeigten weder die unterschiedlichen Landnutzungstypen der Grünland- und Waldflächen, noch die Düngung einiger Grünlandflächen einen Effekt auf die Zusammensetzung der *Acidobacteria*-Gemeinschaften (Tab. 9).

Sowohl die Hauptkomponentenanalyse als auch ANOSIM ließen Unterschiede in der Zusammensetzung der *Acidobacteria* zwischen Grünland- und Waldböden als auch zwischen den drei Untersuchungsregionen erkennen.

Tabelle 10. ‚Partial Least Squares Regression‘-Analyse (PLSR) über die 16S rRNA-Gen T-RFLP-Profile und den gewichteten Anteil jeder Variable zur erklärbaren Varianz der ersten Komponente um signifikante (> 0.10 fett, > 0.05 grau und fett) und nicht-signifikante (< 0.05) Variablen zu berechnen.

	alle N=57	Grünland N=27	Wald N=30
erklärbare Varianz in T-RFLP-Profilen	72,1%	58,0%	70,4%
erklärbare Varianz der Komponente durch Variablen	19,5%	14,4%	20,2%
GEWICHTETE ANTEILE DER VARIABLEN			
pH	0,270	0,073	0,226
org. Kohlenstoff [C, g kg ⁻¹]	0,019	0,186	0,122
Stickstoff [N, g kg ⁻¹]	0,037	0,188	0,148
CN-Verhältnis	0,203	0,014	0,131
Bodenfeuchte [% vol]	0,030	0,055	0,114
Bodentemperatur [°C]	0,030	0,100	0,008
Bodenatmung [$\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$]	0,042	0,067	0,025
Amöben [10^4 g^{-1}]	0,039	0,020	0,001
Flagellaten [10^4 g^{-1}]	0,000	0,004	0,002
Ciliaten [10^2 g^{-1}]	0,017	0,087	0,003
Anzahl vaskulärer Pflanzenarten	0,001	0,003	0,001
Landnutzungsintensität (LUI)		0,047	0,009
Ammonium [μmol]	0,100	0,062	0,041
Nitrat [μmol]	0,035	0	0,027
Phosphor [mg kg ⁻¹]	0,176	0,094	0,142

Um auch die Abhängigkeit der Zusammensetzung und Diversität der *Acidobacteria* von Boden- und Standorteigenschaften sowie Landnutzungsintensität, Pflanzendiversität und *Protozoa* zu erfassen, wurden weitere multivariate Verfahren zur Analyse der T-RFLP-Profile des 16S rRNA-Gens durchgeführt. ‚Partial Least Squares Regression‘ (PLSR, siehe Kapitel 2.7.4.2.) ist eine bilineare Methode der Modellierung, bei der Informationen der ursprünglichen abhängigen Variablen (z.B. Zusammensetzung einer mikrobiellen Gemeinschaft) auf eine kleine Anzahl zugrundeliegender Variablen, die PLSR-Komponenten, projiziert werden. Die unabhängigen Variablen (z.B. Umweltfaktoren) werden zur Schätzung der PLSR-Komponenten genutzt um sicherzustellen, dass die ersten Komponenten auch die relevantesten für die daraus abgeleiteten Vorhersagen der abhängigen Variablen sind (Rudi *et al.*, 2007). PLSR ist für Datensätze mit nahezu gleicher oder höherer Anzahl unabhängiger Variablen wie Beobachtungen/Proben sowie für Daten mit stark korrelierten unabhängigen Variablen (Kollinearität) besonders geeignet. Da die Landnutzungsintensität für Grünland- und Waldflächen von ganz unterschiedlichen Faktoren abhängt und dementsprechend nach verschiedenen Formeln berechnet wird, kann die Landnutzungsintensität als Variable nur in Analysen

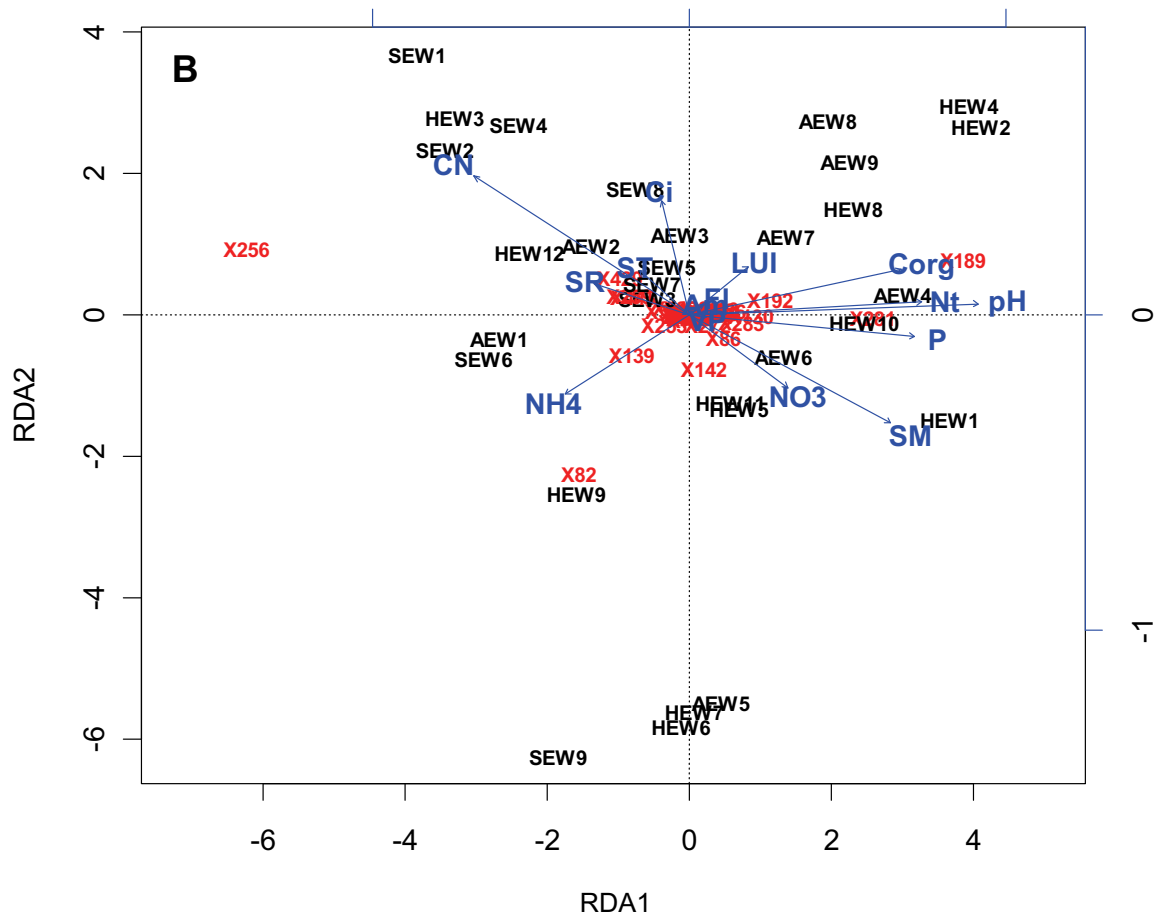
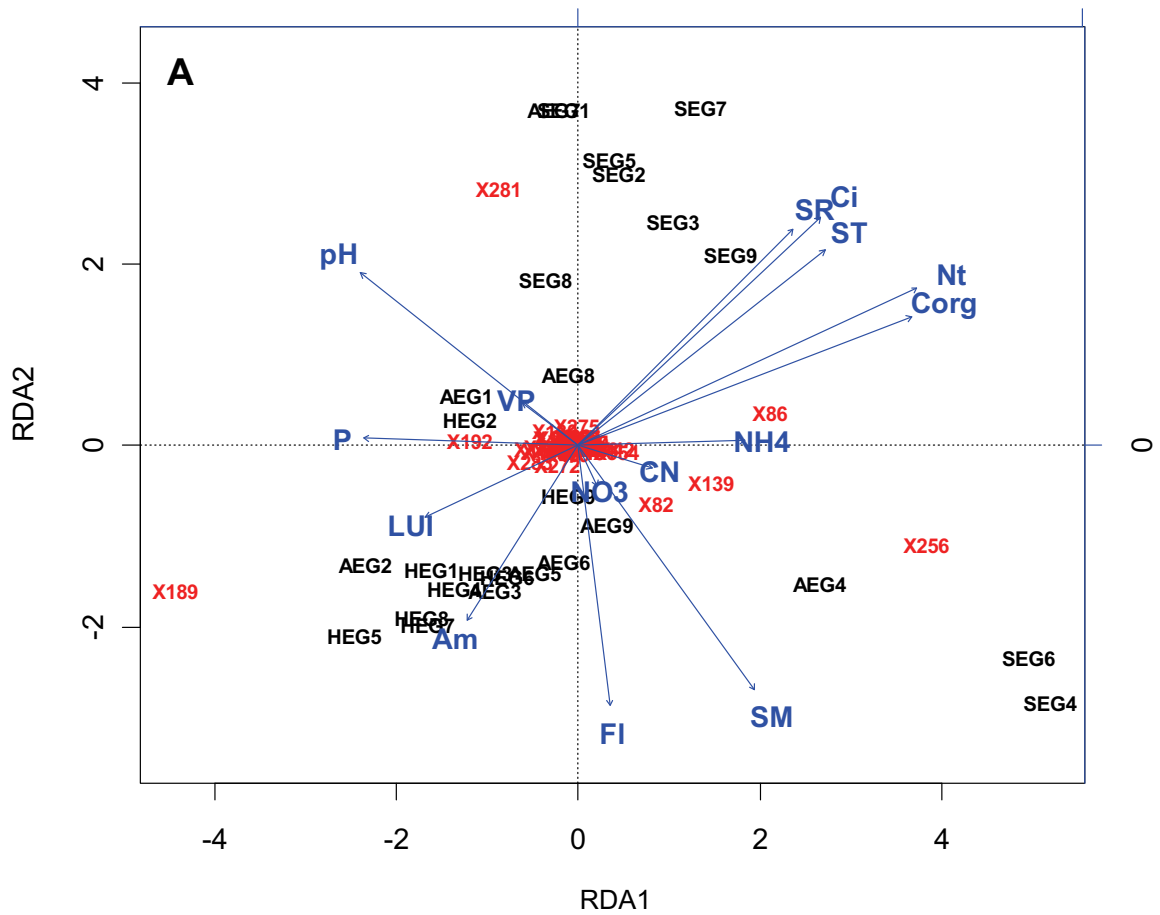


Abbildung 8. Redundanzanalyse der 16S rRNA-Gen T-RFLP-Profile (T-RFs in rot) der einzelnen Böden (schwarz) mit 15 Umweltparametern (blau). **A:** T-RFLP Grünland, N=27, RDA1=54%, RDA2=15 %, 81% der Gesamtvariation der Daten konnte durch die Umweltparameter erklärt werden. **B:** T-RFLP Wald, N=30, RDA1=57%, RDA2=7%, 71% der Gesamtvariation der Daten konnte durch die Umweltparameter erklärt werden. Abkürzungen: pH – pH, Corg – organischer Kohlenstoff [g kg⁻¹], Nt – Stickstoff [g kg⁻¹], CN – Kohlenstoff/Stickstoffverhältnis, SM – Bodenfeuchte [% vol], ST – Bodentemperatur [°C], SR – Bodenatmung [μmol CO₂ m⁻² s⁻¹], Am – Abundanz der Amöben [10⁴ g⁻¹], FI – Abundanz der Flagellaten [10⁴ g⁻¹], Ci – Abundanz der Ciliaten [10² g⁻¹], VP- Anzahl vaskulären Pflanzenarten, LUI – Landnutzungsintensität, NH4 – Ammonium [μmol], NO3 – Nitrat [μmol], P – Phosphor [mg kg⁻¹].

einfließen, die für Grünland- und Waldböden getrennt durchgeführt werden. Durch die erste PLSR-Komponente konnten in allen Böden zusammen 72%, im Grünland 58% und im Wald 70% der Varianz in 16S rRNA-Gen T-RFLP-Profilen erklärt werden, wobei bis zu 20% davon wiederum durch die 15 Umweltfaktoren erklärt werden konnten. Wenn alle Böden gemeinsam analysiert wurden, hatten pH-Wert, CN-Verhältnis, Phosphor- und Ammoniumgehalt den größten Einfluss auf die Zusammensetzung der *Acidobacteria*-Gemeinschaft. In Grünlandböden allein waren allerdings Stickstoff, Kohlenstoff und die Bodentemperatur von größerer Bedeutung. In Wäldern hingegen hatte die Bodenfeuchte noch einen zusätzlichen Effekt auf die Zusammensetzung der *Acidobacteria* im Boden (Tab. 10).

Tabelle 11. Spearman's Rank-Korrelation der relativen T-RF-Abundanzen der acidobakteriellen 16S rRNA-Gene mit Boden- und Standortparametern über alle Grünlandböden. Signifikant korrelierte ($p > 0.001$) Parameter mit Spearman's Rank-Korrelationskoeffizient $Rho > 0.6$ und > -0.6 sind fett hervorgehoben. Falls möglich wurden den T-RFs die entsprechenden *Acidobacteria*-Untergruppen zugeordnet.

N=27	T-RF 90 Gp 1	T-RF 134 Gp 5	T-RF 142 Gp 3	T-RF 272 Gp 18	T-RF 460 Gp 11	T-RF 554
Mittlere Abundanz des T-RFs [%]	0,42	1,93	0,89	0,97	0,83	0,59
pH	0,650	-0,048	-0,369	-0,110	-0,106	-0,019
org. Kohlenstoff [C, g kg ⁻¹]	0,112	-0,742	0,558	-0,551	-0,590	0,556
Stickstoff [N, g kg ⁻¹]	0,137	-0,789	0,592	-0,593	-0,564	0,587
CN-Verhältnis	-0,255	-0,017	-0,031	0,149	-0,234	-0,071
Bodenfeuchte [% vol]	-0,631	-0,200	0,539	-0,194	-0,073	0,262
Bodentemperatur [°C]	0,425	-0,572	0,226	-0,441	-0,694	0,449
Bodenatmung [μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹]	0,447	-0,668	0,332	-0,490	-0,666	0,524
Amöben [10 ⁴ g ⁻¹]	-0,202	-0,164	-0,183	0,152	0,099	-0,165
Flagellaten [10 ⁴ g ⁻¹]	-0,074	-0,176	-0,240	0,289	-0,141	-0,003
Ciliaten [10 ² g ⁻¹]	0,150	-0,744	0,626	-0,660	-0,489	0,622
Anzahl vaskulärer Pflanzenarten	-0,144	0,373	-0,042	0,415	0,109	-0,226
Landnutzungsintensität (LUI)	0,086	-0,131	-0,094	-0,144	0,089	-0,155
Ammonium [μmol]	-0,212	0,235	-0,078	0,232	-0,071	-0,155
Nitrat [μmol]	-0,091	-0,391	0,122	-0,159	-0,216	0,092
Phosphor [mg kg ⁻¹]	0,231	-0,109	-0,194	0,036	0,233	-0,108

Die Einflüsse dieser Umweltfaktoren auf die Zusammensetzung der *Acidobacteria* konnten auch durch Redundanzanalysen (RDA, siehe Kapitel 2.7.4.2.) bestätigt werden (Abb. 4). Die Redundanzanalyse ist eine Erweiterung der PCA, in der die Hauptkomponenten abhängig von linearen Kombinationen der Umweltvariablen sind. Im Grünland konnten 81% der Variation in den T-RFLP-Profilen durch die Umweltparameter erklärt werden: die Zusammensetzung der *Acidobacteria* korrelierte mit dem Gehalt an organischen Kohlenstoff und Stickstoff. In Waldböden wurden 71% der Variation in den T-RFLP-Profilen der *Acidobacteria* vor allem durch den pH-Wert, Stickstoff-, Phosphor- und Kohlenstoffgehalt sowie CN-Verhältnis und Bodenfeuchte erklärt (Abb. 8).

Die Redundanzanalyse erlaubt nicht nur die Darstellung der Varianz in den T-RF-Abundanzen soweit sie durch die Umweltfaktoren erklärt werden kann, sondern zeigt auch Korrelationen zwischen T-RFs und Umweltfaktoren auf. Abundante T-RFs, die große Anteile der Variation zwischen den T-RFLP-Profilen der Grünland- und Waldböden begründen, sind solche, die weit vom RDA-Ursprung liegen (Abb. 8). Entsprechend wurden die Einflüsse von Umweltfaktoren auf die nachfolgenden T-RFs (in bp) detaillierter untersucht: 82, 86, 90, 130, 139, 142, 163, 189, 192, 253, 256, 272, 281, 283, 429, 460, 554. Diese *in vivo* T-RFs konnten mit Hilfe eines *in silico* *MspI*-Verdaus der Klonsequenzen der Grünland- und Waldböden aller drei Untersuchungsregionen teilweise *Acidobacteria*-Untergruppen zugeordnet werden (Anhang Tab. 4). Das *in silico* T-RF jeder Sequenz ist auch in den phylogenetischen Stammbäumen (Abb. 6, Anhang Abb. 1-9) angezeigt.

Die Spearman's Rank-Korrelationen der relativen T-RF-Abundanzen mit Boden- und Standorteigenschaften aller Grünlandflächen sind in Tabelle 11 dargestellt. Es sind nur die T-RFs angegeben deren Abundanz signifikant von mindestens einer Umweltvariablen beeinflusst wurde. Die Häufigkeit des 90-bp-T-RF, welches der Untergruppe Gp1 zugeordnet werden kann, nahm in Böden mit neutralem pH-Wert und geringerer Bodenfeuchte zu, T-RF 134 bp (Gp5) war hingegen in Böden mit geringem Kohlen- und Stickstoffgehalt abundanter. Die Abundanz von vier T-RFs war negativ (T-RF 134 bp [Gp5] und T-RF 272 bp [Gp18]) oder positiv (T-RF 142 bp [Gp3] und T-RF 554 bp) mit der Anzahl der Ciliaten im Boden korreliert. Ein T-RF der Untergruppe Gp11 war in Flächen mit geringer Bodentemperatur und -respiration häufiger zu finden (Tab. 11). Auffällig ist, dass in Grünländern vor allem T-RFs, die nur einen geringen Anteil an den T-RFLP-Profilen haben, von Umweltfaktoren signifikant beeinflusst wurden.

In Waldböden zeigten Boden- und Standorteigenschaften Einflüsse auf andere T-RFs als in Grünlandböden oder aber andere Umweltparameter beeinflussten dieselben T-RFs. Die Spearman's Rank-Korrelationen der relativen T-RF-Abundanzen mit Boden- und Standort-

Tabelle 12. Spearman's Rank-Korrelation der relativen T-RF-Abundanzen der acidobakteriellen 16S rRNA-Gene mit Boden- und Standortparametern über alle Waldböden. Signifikant korrelierte ($p > 0.001$) Parameter mit Spearman's Rank-Korrelationskoeffizient $Rho > 0.6$ und > -0.6 sind fett hervorgehoben. Falls möglich wurden den T-RFs die entsprechenden *Acidobacteria*-Untergruppen zugeordnet.

N=30	T-RF 130	T-RF 134	T-RF 142	T-RF 163	T-RF 189	T-RF 192	T-RF 256	T-RF 281	T-RF 283	T-RF 429	T-RF 554
	Gp 17	Gp 5	Gp 3	Gp 6	Gp 6	Gp 6	Gp 1	Gp 6	Gp 6	T-RF 429	T-RF 554
Mittlere Abundanz des T-RFs [%]	4,08	1,10	2,75	0,60	8,05	2,58	26,14	6,53	2,50	2,12	1,23
pH	0.827	0.867	0.421	0.731	0.875	0.832	-0.668	0.854	0.754	-0.887	-0.765
org. Kohlenstoff [C, g kg ⁻¹]	0.716	0.705	0.310	0.563	0.745	0.741	-0.499	0.793	0.584	-0.703	-0.607
Stickstoff [N, g kg ⁻¹]	0.733	0.737	0.379	0.596	0.786	0.778	-0.564	0.841	0.668	-0.757	-0.634
CN-Verhältnis	-0.696	-0.661	-0.685	-0.494	-0.702	-0.697	0.573	-0.808	-0.771	0.847	0.581
Bodenfeuchte [% vol]	0.666	0.581	0.586	0.408	0.671	0.610	-0.514	0.621	0.705	-0.724	-0.566
Bodentemperatur [°C]	-0.260	-0.261	-0.315	-0.144	-0.309	-0.213	0.113	-0.326	-0.288	0.292	0.286
Bodenatmung [$\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$]	-0.256	-0.239	-0.394	-0.216	-0.280	-0.232	0.184	-0.274	-0.423	0.323	0.161
Amöben [10^4 g^{-1}]	0.467	0.338	0.322	0.266	0.443	0.419	-0.312	0.444	0.427	-0.353	-0.509
Flagellaten [10^4 g^{-1}]	0.340	0.418	0.220	0.160	0.265	0.379	-0.154	0.311	0.340	-0.303	-0.331
Ciliaten [10^2 g^{-1}]	-0.162	-0.023	-0.213	-0.075	-0.078	-0.146	0.154	-0.087	-0.292	0.141	0.061
Anzahl vaskulärer Pflanzenarten	0.220	0.297	0.189	0.193	0.270	0.154	-0.049	0.255	0.112	-0.292	-0.382
Landnutzungsintensität (LUI)	-0.062	0.096	-0.081	0.059	0.059	0.083	0.022	0.032	0.067	-0.056	-0.166
Ammonium [μmol]	-0.449	-0.510	-0.152	-0.466	-0.452	-0.410	0.429	-0.414	-0.332	0.437	0.338
Nitrat [μmol]	0.261	0.176	0.457	0.164	0.376	0.360	-0.273	0.387	0.538	-0.354	-0.118
Phosphor [mg kg^{-1}]	0.721	0.710	0.396	0.480	0.679	0.722	-0.529	0.793	0.599	-0.715	-0.565

eigenschaften aller Waldflächen sind in Tabelle 12 dargestellt. Die Abundanz des T-RF 256 bp, das in die *Acidobacteria*-Untergruppe Gp1 eingeordnet werden kann, war in Böden mit saurem pH am größten. Im Gegensatz dazu zeigten die Untergruppen Gp5 (T-RF 134 bp), Gp6 (T-RFs 163, 189, 191, 281, 283 bp) und Gp17 (T-RF 130 bp) eine höhere Abundanz in Böden mit eher neutralem pH-Wert, hohem Kohlenstoff-, Stickstoff- und Phosphorgehalt sowie hoher Bodenfeuchte und einem niedrigen CN-Verhältnis. Außerdem korrelierte die Abundanz des T-RFs 142 bp der Untergruppe Gp3 negativ mit dem CN-Verhältnis wohingegen ein abundantes T-RF der Untergruppe Gp4 (T-RF 139 bp) nicht von Boden- und Standortfaktoren beeinflusst wurde (Tab. 12).

Ausgehend von den *Acidobacteria*-Sequenzen aller sechs Klonbibliotheken wurden 414 OTUs mit 3% Sequenzunterschied definiert. Der Einfluss von Boden- und Standorteigenschaften auf die verschiedenen Untergruppen der *Acidobacteria* wurden nicht nur für T-RFs, die diesen zugeordnet werden konnten, sondern auch über alle OTUs einer Untergruppe analysiert (Tab. 13). Dabei ist zu beachten, dass in die Spearman's Rank-Analysen (Tab. 11, 12) die jeweiligen T-RF-Abundanzen aller 27 Grünland- bzw. 30 Waldböden eingeflossen sind, wohingegen für die multivariate Analyse über alle OTUs einer Untergruppe nur die sechs Klonbibliotheken AEG, HEG, SEG, AEW, HEW und SEW zur Verfügung standen. Deshalb wurde in der PLSR-Analyse (siehe Kapitel 2.7.4.2.), die für Datensätze mit höherer Anzahl unabhängiger Variablen als Beobachtungen besonders geeignet ist, nicht in Grünland- und Waldböden unterteilt. Außerdem konnten nur Untergruppen mit mehr als einer OTU in die Analyse einbezogen werden.

Die erklärbare Varianz der ersten PLSR-Komponente schwankte zwischen 36 und 86% für Gp1, Gp3, Gp4, Gp5, Gp6, Gp11, Gp13, Gp15 und Gp17 wobei 24-55% dieser Komponente durch die Umweltfaktoren erklärt werden konnten (Tab. 13). Der pH-Wert des Bodens beeinflusste die Zusammensetzung der OTUs der Untergruppen Gp1, Gp3, Gp4, Gp6, Gp13, Gp15 und Gp17. Der organische Kohlenstoff und Stickstoffgehalt hingegen hatte ausschließlich Effekte auf die Untergruppe Gp11, die vor allem in den Grünlandböden der Schorfheide stark vertreten war. Gp11 war jedoch die einzige der Untergruppen, deren Vorkommen nicht vom CN-Verhältnis abhing. Die Bodenfeuchte beeinflusste die Untergruppen Gp1, Gp5, Gp13, Gp15 und Gp17, Bodentemperatur und Bodenatmung aber wiederum nur Gp11. *Protozoa* zeigten Einflüsse auf die Untergruppen Gp4, Gp5 und Gp11; die Untergruppen Gp1, Gp3, Gp4, Gp5, Gp13 und Gp15 wurden auch durch den Ammoniumgehalt des Bodens beeinflusst. Die OTU-Zusammensetzung der Untergruppen Gp1, Gp3, Gp11, Gp15 und Gp17 war außerdem abhängig von der Menge an Nitrat im Boden. Der Phosphor im Boden wirkte sich auf die Zusammensetzung aller Untergruppen bis auf Gp11 aus (Tab. 13).

Tabelle 13. ‚Partial Least Squares Regression-Analyse‘ (PLSR) über die erklärable Varianz aller OTUs einer Untergruppe und den gewichteten Anteil jeder Variable zur erklärbaren Varianz der ersten Komponente um signifikante (> 0.10 in fett) und nicht-signifikante (< 0.05) Variablen zu berechnen.

	Gp1	Gp3	Gp4	Gp5	Gp6	Gp11	Gp13	Gp15	Gp17
erklärable Varianz in OTUs der Untergruppen	85,8%	36,2%	47,4%	57,8%	37,9%	86,4%	83,7%	68,2%	55,5%
erklärable Varianz der Komponente durch Variablen	46,6%	54,1%	29,5%	25,4%	47,6%	50,4%	54,8%	39,4%	26,6%
GEWICHTETE ANTEILE DER VARIABLEN									
pH	0,123	0,127	0,162	0,096	0,134	0,064	0,109	0,112	0,114
org. Kohlenstoff [C, g kg ⁻¹]	0,046	0,054	0,001	0,007	0,033	0,119	0,046	0,054	0,034
Stickstoff [N, g kg ⁻¹]	0,051	0,068	0,009	0,002	0,052	0,130	0,052	0,054	0,056
CN-Verhältnis	0,129	0,122	0,149	0,111	0,131	0,059	0,115	0,118	0,136
Bodenfeuchte [% vol]	0,131	0,061	0,049	0,188	0,044	0,007	0,106	0,150	0,103
Bodentemperatur [°C]	0,011	0,054	0,035	0,022	0,064	0,121	0,014	0,005	0,023
Bodenatmung [$\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$]	0,029	0,068	0,033	0,008	0,073	0,135	0,033	0,021	0,043
Amöben [10^4 g^{-1}]	0,047	0,051	0,231	0,138	0,099	0,002	0,044	0,027	0,049
Flagellaten [10^4 g^{-1}]	0,016	0,000	0,001	0,030	0,000	0,009	0,018	0,023	0,011
Ciliaten [10^2 g^{-1}]	0,021	0,048	0,003	0,016	0,045	0,133	0,024	0,017	0,072
Anzahl vaskulärer Pflanzenarten	0,030	0,000	0,003	0,106	0,005	0,023	0,017	0,054	0,005
Ammonium [μmol]	0,144	0,119	0,110	0,122	0,092	0,044	0,116	0,156	0,094
Nitrat [μmol]	0,100	0,119	0,064	0,023	0,094	0,107	0,086	0,104	0,101
Phosphor [mg kg^{-1}]	0,122	0,109	0,151	0,132	0,132	0,047	0,112	0,105	0,159

Im Allgemeinen konnten die Korrelationen der Umweltfaktoren mit der Abundanz der *Acidobacteria*-Untergruppen, wie sie durch die Analyse relativer Häufigkeiten einzelner T-RFs für alle Grünland- oder Waldböden gezeigt wurden durch die Analyse über alle OTUs einer Untergruppe bestätigt werden. Ein Einfluss der Anzahl der vaskulären Pflanzen auf die Zusammensetzung der *Acidobacteria*-Untergruppe Gp5 konnte jedoch nur durch diese detaillierte Analyse der 16S rRNA-Gensequenzdaten der Grünland- und Waldböden aller drei Untersuchungsregionen bis auf Ebene einzelner Phylotypen aufgedeckt werden.

Die nahezu vollständige Sequenzierung der 16S rRNA-Gene zahlreicher Klone erlaubte eine Analyse des Einflusses von Boden- und Standorteigenschaften auf die Sequenzdaten der Grünland- und Waldböden der drei Regionen nicht nur auf der Ebene der *Acidobacteria*-Untergruppen sondern auch einzelner abundanter OTUs (Tab. 14). Fünfzehn OTUs der Untergruppen Gp1, Gp5 und Gp6 wurden detaillierter analysiert. In diesen OTUs kamen mehr als 20 Klonsequenzen mit einem Anteil von bis zu 3,5% der gesamten Klone und bis zu 12% einer Klonbibliothek vor (Tab. 8).

Die OTUs der Untergruppe Gp1 (OTU7, OTU114, OTU94, OTU32, OTU119 und OTU2) waren in Böden mit niedrigem pH-Wert, hohem CN-Verhältnis, geringer Anzahl an Amöben, hohem Ammonium- und niedrigem Nitrat- und Phosphorgehalt häufiger zu finden (Tab. 14). Für die Untergruppe Gp5 konnte durch zwei OTUs (OTU3 und OTU15) der Einfluss der Anzahl der vaskulären Pflanzen auf die Zusammensetzung dieser *Acidobacteria*-Untergruppe bekräftigt werden. OTUs der Untergruppe Gp6 hingegen zeigten kein einheitliches Muster in der Abhängigkeit von Umweltfaktoren. OTU9 war zum Beispiel in Böden mit geringer Temperatur und Atmungsrate abundanter, OTU6 dagegen zog feuchte Böden mit hoher Diversität vaskulärer Pflanzen vor. OTU115, OTU92 und OTU45 wurden von ähnlichen Umweltfaktoren beeinflusst. Alle drei waren in Böden mit eher neutralem pH-Wert sowie niedrigem CN-Verhältnis häufiger und ihre Abundanz korrelierte mit der Anzahl der Amöben im Boden (Tab. 14).

Im Großen und Ganzen konnten die wichtigsten Korrelationen der Boden- und Standorteigenschaften mit der Abundanz der *Acidobacteria*-Untergruppen, wie sie durch die Analyse relativer Häufigkeiten einzelner T-RFs für alle Grünland- oder Waldböden und durch die Analyse über alle OTUs einer Untergruppe gezeigt wurden durch die Analyse der abundantesten OTUs bestätigt werden. Nur durch diese präzise Analyse der 16S rRNA-Gensequenzdaten der Grünland- und Waldböden aller drei Untersuchungsregionen bis auf die Ebene einzelner Phylotypen, konnte ein Einfluss der Anzahl der vaskulären Pflanzen auf die Zusammensetzung der *Acidobacteria*-Untergruppe Gp5 und ihrer abundanten OTUs festgestellt werden.

Tabelle 14. Spearman's Rank-Korrelation der OTUs mit mehr als 20 Sequenzen mit Boden- und Standortparametern. Signifikante Spearman's Rank-Korrelationskoeffizienten Rho (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001) mit Bodenparametern sind fett hervorgehoben. Die Anzahl der Sequenzen, die entsprechende Acidobacteria-Untergruppe der OTUs und das dominierende T-RF wurden aufgeführt.

Untergruppe	OTU7	OTU114	OTU94	OTU32	OTU119	OTU2	OTU3	OTU31	OTU15
	Gp1	Gp1	Gp1	Gp1	Gp1	Gp1	Gp5	Gp5	Gp5
<i>in silico</i> T-RF (bp)	88	258/260	88	258	258	143	135	135	137
Anzahl der Sequenzen	62	42	31	27	26	23	72	50	23
pH	-0,841 *	-0,845 *	-0,880 *	-0,880 *	-0,880 *	-0,898 *	0,029	0,638	-0,370
org. Kohlenstoff [C, g kg ⁻¹]	-0,319	-0,338	-0,516	-0,516	-0,516	-0,203	0,406	-0,029	0,370
Stickstoff [N, g kg ⁻¹]	-0,667	-0,507	-0,820 *	-0,820 *	-0,820 *	-0,551	0,348	0,203	0,123
CN-Verhältnis	0,899 *	0,676	0,941 **	0,941 **	0,941 **	0,841 *	-0,116	-0,638	0,278
Bodenfeuchte [% vol]	-0,735	-0,343	-0,616	-0,616	-0,616	-0,588	0,882 *	0,75	0,611
Bodentemperatur [°C]	-0,319	-0,304	-0,455	-0,455	-0,455	-0,377	-0,725	-0,116	-0,926 **
Bodenatmung [$\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$]	-0,580	-0,541	-0,698	-0,698	-0,698	-0,638	-0,464	0,116	-0,772
Amöben [10^4 g^{-1}]	-0,986 ***	-0,676	-0,941 **	-0,941 **	-0,941 **	-0,928 **	0,319	0,812 *	-0,123
Flagellaten [10^4 g^{-1}]	-0,580	0,067	-0,516	-0,516	-0,516	-0,290	0,493	0,522	0,309
Ciliaten [10^2 g^{-1}]	-0,580	-0,541	-0,698	-0,698	-0,698	-0,318	0,058	0,058	-0,617
Anzahl vaskulärer Pflanzenarten	-0,221	-0,171	-0,123	-0,123	-0,123	-0,132	0,956 **	0,515	0,939 **
Ammonium [μmol]	0,928 **	0,845 *	0,880 *	0,880 *	0,880 *	0,986 ***	-0,377	-0,754	0,062
Nitrat [μmol]	-0,754	-0,845 *	-0,880 *	-0,880 *	-0,880 *	-0,812 *	0,116	0,348	-0,216
Phosphor [mg kg^{-1}]	-0,986 ***	-0,676	-0,941 **	-0,941 **	-0,941 **	-0,927 **	0,464	0,754	0,031

Untergruppe	OTU9	OTU115	OTU6	OTU92	OTU45	OTU99
	Gp6	Gp6	Gp6	Gp6	Gp6	Gp6
<i>in silico</i> T-RF (bp)	194	193	167, 194	194	285	210
Anzahl der Sequenzen	38	36	32	26	22	22
pH	-0,638	0,971 *	0,257	0,880 *	0,899 *	0,754
org. Kohlenstoff [C, g kg ⁻¹]	0,145	0,265	0,314	0,516	0,319	0,638
Stickstoff [N, g kg ⁻¹]	-0,174	0,588	0,429	0,820 *	0,638	0,812 *
CN-Verhältnis	0,580	-0,971 **	-0,371	-0,941 **	-0,986 ***	-0,667
Bodenfeuchte [% vol]	0,338	0,508	0,986 ***	0,616	0,426	0,309
Bodentemperatur [°C]	-0,986 ***	0,500	-0,485	0,455	0,609	0,464
Bodenatmung [$\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$]	-0,927 **	0,706	-0,2	0,698	0,754	0,696
Amöben [10^4 g^{-1}]	-0,435	0,971 *	0,6	0,941 **	0,928 **	0,609
Flagellaten [10^4 g^{-1}]	0,087	0,441	0,657	0,516	0,580	-0,029
Ciliaten [10^2 g^{-1}]	-0,783	0,618	-0,086	0,698	0,638	0,783
Anzahl vaskulärer Pflanzenarten	0,794	0,060	0,812 *	0,123	-0,074	0,015
Ammonium [μmol]	0,348	-0,883 *	-0,6	-0,880 *	-0,725	-0,783
Nitrat [μmol]	-0,493	0,794	0,257	0,880 *	0,725	0,986 ***
Phosphor [mg kg^{-1}]	-0,290	0,883 *	0,714	0,941 **	0,812 *	0,696

3.4. Einflussfaktoren auf die Aktivität von *Acidobacteria*

Die Diversität und Zusammensetzung der *Acidobacteria* jedes einzelnen Bodens wurde über ‚fingerprinting‘-Analysen erfasst. Die T-RFLP-Analyse wurde sowohl auf Basis der 16S rRNA-Gene (siehe Kapitel 3.3.) als auch der 16S rRNA durchgeführt, um nicht nur die anwesenden sondern auch die Diversität der physiologisch aktiven *Acidobacteria* zu erfassen.

Nach der Standardisierung der insgesamt 27 Grünland- und 30 Waldboden-Profile der acidobakteriellen 16S rRNA wurden 95 terminale Restriktionsfragmente (T-RFs) zur weiteren Analyse verwendet. Die Peakfläche jedes T-RFs der Profile wurde als Maß für ihre Abundanz gewählt und in prozentuale Anteile an der gesamten acidobakteriellen Gemeinschaft umgerechnet. Durch Ordinationstechniken konnten die komplexen multivariaten T-RFLP-Datensätze verschiedener Proben vereinfacht abgebildet werden. Die DCA-Gradientenlänge der 57 16S rRNA T-RFLP-Profile betrug zwei Standardabweichungen und folglich wurden in der nachfolgenden statistischen Analyse vor allem lineare Modelle, wie z.B. eine Hauptkomponentenanalyse verwendet.

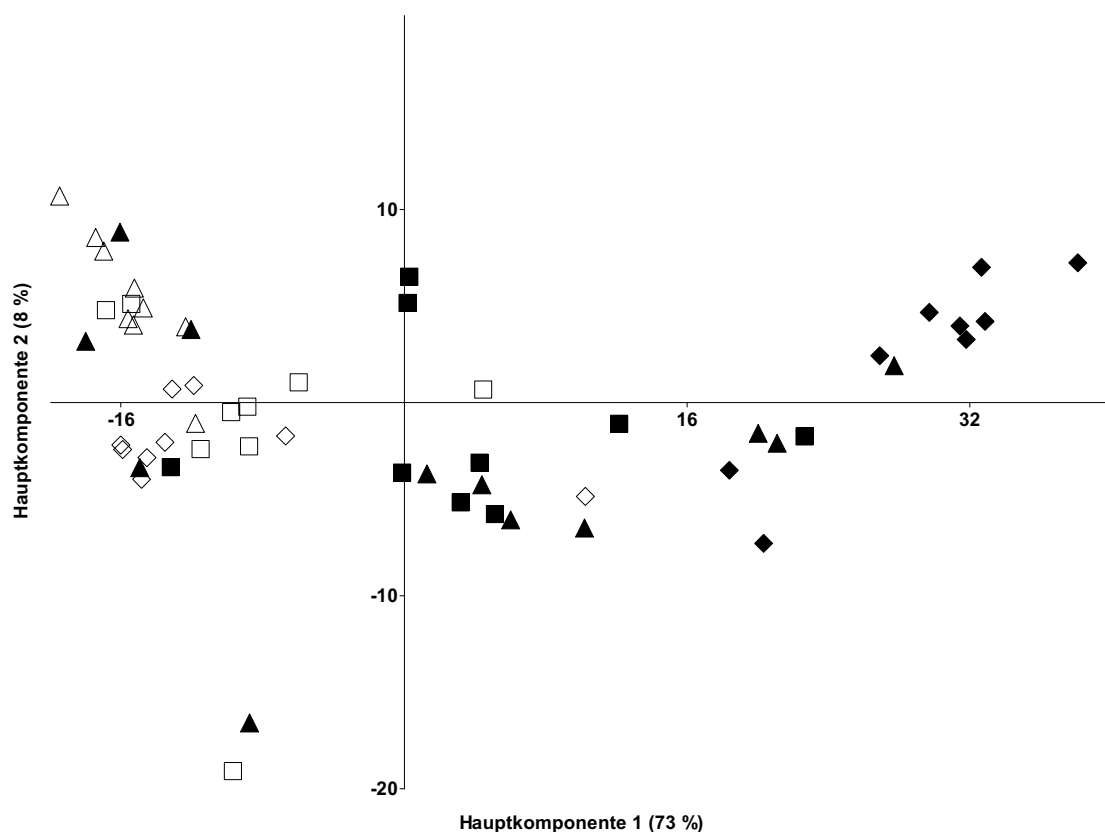


Abbildung 9. Hauptkomponentenanalyse der 16S rRNA T-RFLP-Profile der *Acidobacteria* im Boden der 57 Untersuchungsflächen. ■ AEW, □ AEG, ▲ HEW, △ HEG, ◆ SEW, ◇ SEG

Die Hauptkomponentenanalyse der 16S rRNA T-RFLP-Profile zeigte deutlich, dass die aktive *Acidobacteria*-Gemeinschaft in Grünlandböden ähnlicher zueinander war als in Waldböden, die eine größere Variation in der Zusammensetzung der Gemeinschaft aufwiesen. T-RFLP-Profile aller Grünland- und aller Waldböden eines Exploratoriums waren hingegen relativ ähnlich zueinander, vor allem in den Grünlandböden des Hainich aber auch den Waldböden der Schorfheide (Abb. 9).

Tabelle 15. Vergleich der paarweisen Bray-Curtis-Distanzen zwischen 16S rRNA T-RFLP-Profilen durch ANOSIM. Je höher der R-Wert ($0 < R < 1$), desto größer der Unterschied zwischen den analysierten Gruppen. Die Signifikanz wurde über Permutation mit 10.000 Wiederholungen berechnet. Signifikante R-Werte $> 0,15$ sind fett dargestellt. Signifikanzniveau: * $< 0,05$, ** $< 0,01$, *** $< 0,001$

	R
Exploratorium	0,1809 ***
Bodentyp	0,2368 ***
Grünland/Wald	0,3494 ***
Exploratorium Grünland	0,2788 ***
Exploratorium Wald	0,5279 ***
Bodentyp Grünland	0,127
Bodentyp Wald	0,1531 *
Landnutzungstyp Grünland	-0,0091
Landnutzungstyp Wald	-0,0545
Düngung	-0,0428

Um Unterschiede in T-RFLP-Profilen der Untersuchungsflächen im Hinblick auf Exploratorium, Wald- oder Grünland, Boden- und Landnutzungstyp bzw. Düngung zu analysieren, wurde eine ‚*Analysis of Similarity*‘ (ANOSIM) mit dem Bray-Curtis-Distanzmaß durchgeführt (Tab. 15). Diese verdeutlichte, dass sich die aktiven *Acidobacteria*-Gemeinschaften in Grünland- und Waldböden ($R=0,35$) unterscheiden. Unterschiede zwischen den Exploratorien ($R=0,18$) wurden größer, wenn die Exploratorien nach Grünland- ($R = 0,28$) und Waldböden ($R=0,53$) getrennt verglichen wurden. Außerdem beeinflussten die acht verschiedenen Bodentypen der 57 Untersuchungsflächen die Zusammensetzung der *Acidobacteria*-Gemeinschaften ($R=0,24$), wobei deren Einfluss in Wäldern von größerer Bedeutung war ($R=0,15$) als in Grünländern ($R=0,13$). Jedoch zeigten weder die unterschiedlichen Landnutzungstypen der Grünland- und Waldflächen, noch die Düngung einiger Grünlandflächen einen Effekt auf die Zusammensetzung der *Acidobacteria*-Gemeinschaften (Tab.15).

Sowohl die Hauptkomponentenanalyse als auch ANOSIM ließen Unterschiede in der Zusammensetzung der aktiven *Acidobacteria* zwischen Grünland- und Waldböden als auch zwischen den drei Untersuchungsregionen erkennen. Um auch die Abhängigkeit der

Tabelle 16. ‚Partial Least Squares Regression‘-Analyse (PLSR) über die erklärable Varianz der 16S rRNA T-RFLP-Profilen und den gewichteten Anteil jeder Variable zur erklärbaren Varianz der ersten Komponente um signifikante (> 0.10 in fett, > 0.05 in grau und fett) und nicht-signifikante (< 0.05) Variablen zu berechnen.

	alle N=57	Grünland N=27	Wald N=30
erklärbare Varianz in T-RFLP-Profilen	72,9%	32,1%	76,1%
erklärbare Varianz der Komponente durch Variablen	25,4%	12,6%	28,3%
GEWICHTETE ANTEILE DER VARIABLEN			
pH	0,247	0,209	0,196
org. Kohlenstoff [C, g kg ⁻¹]	0,032	0,074	0,118
Stickstoff [N, g kg ⁻¹]	0,053	0,052	0,143
CN-Verhältnis	0,194	0,089	0,133
Bodenfeuchte [% vol]	0,035	0,185	0,124
Bodentemperatur [°C]	0,038	0,001	0,013
Bodenatmung [$\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$]	0,055	0,003	0,024
Amöben [10^4 g^{-1}]	0,024	0,006	0,005
Flagellaten [10^4 g^{-1}]	0,000	0,029	0,008
Ciliaten [10^2 g^{-1}]	0,026	0,005	0,001
Anzahl vaskulärer Pflanzenarten	0	0,066	0,013
Landnutzungsintensität (LUI)		0,060	0,007
Ammonium [μmol]	0,110	0,074	0,058
Nitrat [μmol]	0,039	0,021	0,026
Phosphor [mg kg ⁻¹]	0,146	0,128	0,131

Zusammensetzung der aktiven *Acidobacteria* von Boden- und Standorteigenschaften sowie Landnutzungsintensität, Pflanzendiversität und *Protozoa* zu erfassen, wurde die ‚Partial Least Squares Regression-Analyse‘ (PLSR) angewendet. Durch die erste PLSR-Komponente konnten in allen Böden zusammen 73%, im Grünland nur 32% und im Wald 76% der Varianz in 16S rRNA T-RFLP-Profilen erklärt werden, wobei bis zu 28% davon wiederum durch die 15 Umweltfaktoren erklärt werden konnten (Tab. 16). Wenn alle Böden gemeinsam analysiert wurden, hatten pH-Wert, CN-Verhältnis, Phosphor- und Ammoniumgehalt den größten Einfluss auf die Zusammensetzung der aktiven *Acidobacteria*-Gemeinschaft. In Grünland- und Waldböden allein hatte die Bodenfeuchte zusätzlich einen großen Effekt auf die aktiven *Acidobacteria*. In Wäldern war außerdem ein starker Effekt von Kohlen- und Stickstoffgehalt sowie dem CN-Verhältnis zu verzeichnen, der in den Grünlandböden schwächer ausgeprägt war. In Grünlandböden hingegen wurde die Zusammensetzung der aktiven *Acidobacteria*, wenn auch nur geringfügig, von der Anzahl der vaskulären Pflanzenarten und der Landnutzungsintensität beeinflusst (Tab. 16).

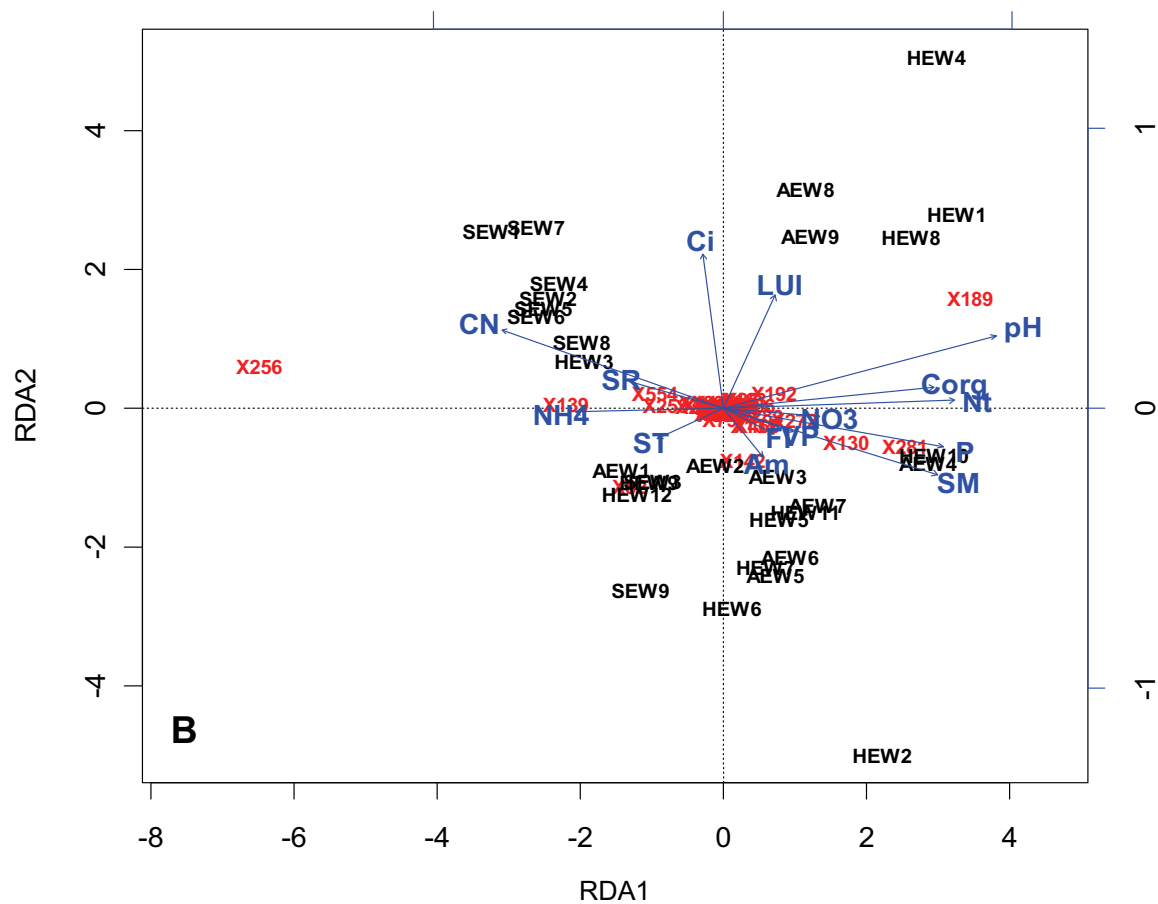
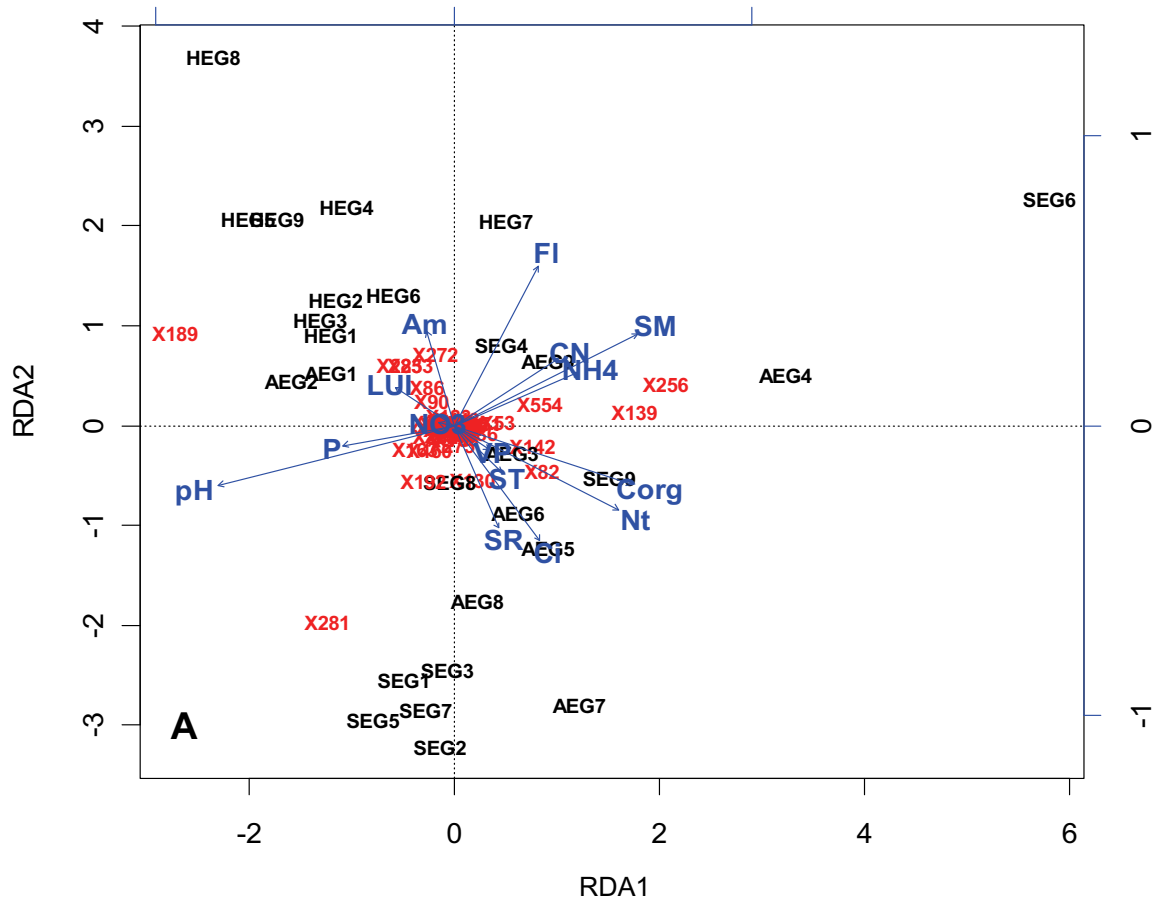


Abbildung 10. Redundanzanalyse der 16S rRNA T-RFLP-Profile (T-RFs in rot) der einzelnen Böden (schwarz) mit 15 Umweltparametern (blau). **A:** T-RFLP Grünland, N=27, RDA1=30%, RDA2=12 %, 68% der Gesamtvariation der Daten konnte durch die Umweltparameter erklärt werden. **B:** T-RFLP Wald, N=30, RDA1=71%, RDA2=5%, 85% der Gesamtvariation der Daten konnte durch die Umweltparameter erklärt werden. Abkürzungen: pH – pH, Corg – organischer Kohlenstoff [g kg^{-1}], Nt – Stickstoff [g kg^{-1}], CN – Kohlenstoff/Stickstoffverhältnis, SM – Bodenfeuchte [% vol], ST – Bodentemperatur [$^{\circ}\text{C}$], SR – Bodenatmung [$\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$], Am – Abundanz der Amöben [10^4 g^{-1}], FI – Abundanz der Flagellaten [10^4 g^{-1}], Ci – Abundanz der Ciliaten [10^2 g^{-1}], VP- Anzahl vaskulären Pflanzenarten, LUI – Landnutzungsintensität, NH4 – Ammonium [μmol], NO3 – Nitrat [μmol], P – Phosphor [mg kg^{-1}].

Die Einflüsse dieser Umweltfaktoren auf die Zusammensetzung aktiver *Acidobacteria* konnten auch durch Redundanzanalysen (RDA) bestätigt werden (Abb. 10). Die RDA als Erweiterung der PCA, in der die Hauptkomponenten abhängig von linearen Kombinationen der Umweltvariablen sind, konnte im Grünland 68% der Variation der 16S rRNA T-RFLP-Profile durch die Umweltparameter erklären. Die Zusammensetzung der aktiven *Acidobacteria* in Grünlandböden korrelierte am stärksten mit dem pH-Wert des Bodens und der Bodenfeuchte. In Waldböden wurden 85% der Variation in den T-RFLP-Profilen der aktiven *Acidobacteria* vor allem durch den pH-Wert, Stickstoff-, Phosphor- und Kohlenstoffgehalt sowie CN-Verhältnis und Bodenfeuchte erklärt (Abb. 10).

Die Redundanzanalyse erlaubt nicht nur die Darstellung der Varianz in T-RFLP-Profilen soweit sie durch die Umweltfaktoren erklärt werden kann, sondern zeigt auch Korrelationen zwischen einzelnen T-RFs und Umweltfaktoren auf. Abundante T-RFs, die große Anteile der Variation zwischen den T-RFLP-Profilen der Grünland- und Waldböden begründen, sind die, die weit vom RDA-Ursprung liegen (Abb. 10). Entsprechend wurden die Einflüsse von Umweltfaktoren auf die nachfolgenden T-RFs (bp) detaillierter untersucht: 82, 86, 90, 130, 139, 142, 163, 189, 192, 253, 256, 272, 281, 283, 429, 460, 554. Diese *in vivo* T-RFs konnten mit Hilfe eines *in silico* MspI-Verdauers der Klonsequenzen der Grünland- und Waldböden aller drei Untersuchungsregionen teilweise *Acidobacteria*-Untergruppen zugeordnet werden (Anhang Tab. 4).

Die Spearman's Rank-Korrelationen der relativen T-RF-Abundanzen mit Boden- und Standorteigenschaften aller Grünlandflächen sind in Tabelle 17 dargestellt. Nur T-RFs, deren Abundanz signifikant von mindestens einer Umweltvariablen beeinflusst wurde, sind angegeben. Die Häufigkeit von T-RFs, welche der Untergruppe Gp1 zugeordnet werden, nahmen in Böden mit niedrigem pH-Wert (T-RF 256 bp) oder hoher Bodentemperatur (T-RF 86 bp) zu. T-RF 142 bp (Gp3) war hingegen in Böden mit hohem Ciliatenanteil abundant. Die Abundanz eines T-RFs der Untergruppe Gp6 (T-RF 283 bp) war wiederum in Böden mit niedrigem Ciliatenanteil, geringer Bodenatmung und -temperatur sowie geringer Kohlenstoff- und Stickstoffverfügbarkeit groß. Ein T-RF, das zwar durchschnittlich 5% der 16S rRNA T-RFLP-Profile ausmachte, konnte anhand der beinahe vollständigen

Tabelle 17. Spearman's Rank-Korrelation der relativen T-RF-Abundanzen der acidobakteriellen 16S rRNA mit Boden- und Standortparametern über alle Grünlandböden. Signifikant korrelierte ($p > 0.001$) Parameter mit Spearman's Rank-Korrelationskoeffizient $Rho > 0.6$ und > -0.6 sind fett hervorgehoben. Falls möglich wurden den T-RFs die entsprechenden *Acidobacteria*-Untergruppen zugeordnet.

N=27	T-RF 82	T-RF 86 Gp 1	T-RF 142 Gp 3	T-RF 256 Gp 1	T-RF 283 Gp 6
Mittlere Abundanz des T-RFs [%]	3,97	5,02	2,16	5,01	2,16
pH	-0,649	0,492	-0,348	-0,626	-0,213
org. Kohlenstoff [C, g kg ⁻¹]	0,167	0,085	0,554	-0,018	-0,818
Stickstoff [N, g kg ⁻¹]	0,159	0,078	0,593	-0,004	-0,803
CN-Verhältnis	0,301	-0,283	-0,043	0,181	-0,132
Bodenfeuchte [% vol]	0,752	-0,223	0,491	0,504	0,026
Bodentemperatur [°C]	-0,265	0,654	0,237	-0,269	-0,613
Bodenatmung [$\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$]	-0,233	0,498	0,421	-0,265	-0,726
Amöben [10^4 g^{-1}]	0,026	0,027	-0,165	0,103	0,372
Flagellaten [10^4 g^{-1}]	0,019	0,102	-0,207	0,008	0,277
Ciliaten [10^2 g^{-1}]	0,146	0,175	0,615	0,034	-0,669
Anzahl vaskulärer Pflanzenarten	0,326	-0,433	-0,016	0,075	0,070
Landnutzungsintensität (LUI)	-0,232	0,123	-0,023	-0,240	0,109
Ammonium [μmol]	-0,010	0,015	-0,178	0,059	0,137
Nitrat [μmol]	0,072	0,024	0,068	-0,088	-0,257
Phosphor [mg kg ⁻¹]	-0,260	0,022	-0,253	-0,169	0,002

Acidobacteria-Sequenzen der Grünland- und Waldböden der drei Exploratorien keiner *Acidobacteria*-Untergruppe eindeutig zugeordnet werden. Dieses 82-bp-T-RF war in eher sauren und feuchten Böden am abundantesten (Tab. 17).

In Waldböden zeigten Boden- und Standorteigenschaften Einflüsse auf andere und zahlreichere T-RFs als in Grünlandböden oder aber andere Umweltparameter beeinflussten dieselben T-RFs. Dies kann durch die größere Variation in der Zusammensetzung der aktiven *Acidobacteria* in Waldböden erklärt werden (Abb. 9). Die Spearman's Rank-Korrelationen der relativen T-RF-Abundanzen mit Boden- und Standorteigenschaften aller Waldflächen sind in Tabelle 18 dargestellt. Physiologisch aktive Vertreter der Untergruppe Gp1 (253 und 256 bp) waren in Waldböden mit niedrigem pH-Wert sowie Kohlenstoff-, Stickstoff- und Phosphorgehalt häufiger zu finden, *Acidobacteria* der Untergruppe Gp3 bevorzugten ein niedriges CN-Verhältnis. Die aktiven Gp4-*Acidobacteria* (T-RF 139 bp) verhielten sich gegenüber Umwelt- und Standorteinflüssen ganz ähnlich wie die Untergruppe Gp1. Für Gp4 (T-RF 139) wurde allerdings der negative Effekt einer hohen Bodenfeuchte auf dessen Abundanz deutlicher. Die aktiven Vertreter der *Acidobacteria*-Untergruppen Gp6 (T-RFs 163, 189, 192, 281 und 283 bp), Gp11 (T-RF 460 bp), Gp17 (T-RF130) und Gp18 (T-RF 272 bp) folgten dem umgekehrten Trend. Diese vier Untergruppen waren im Waldböden umso abundanter je neutraler der pH-Wert, feuchter der Boden sowie je höher die Verfügbarkeit von Kohlenstoff, Stickstoff und

Tabelle 18. Spearman's Rank-Korrelation der relativen T-RF-Abundanzen der acidobakteriellen 16S rRNA mit Boden- und Standortparametern über alle Waldböden. Signifikant korrelierte ($p > 0.001$) Parameter mit Spearman's Rank-Korrelationskoeffizient $Rho > 0.6$ und > -0.6 sind fett hervorgehoben. Falls möglich wurden den T-RFs die entsprechenden *Acidobacteria*-Untergruppen zugeordnet.

N=30	T-RF 82	T-RF 130	T-RF 139	T-RF 142	T-RF 163	T-RF 189	T-RF 192	T-RF 253	T-RF 256	T-RF 272
	Gp 17	Gp 4	Gp 3	Gp 6	Gp 6	Gp 6	Gp 6	Gp 1	Gp 1	Gp 18
Mittlere Abundanz des T-RFs [%]	8,47	12,96	4,27	0,72	6,74	1,69	3,47	22,66	3,28	3,28
pH	-0,765	0,768	-0,891	0,631	0,919	0,798	-0,666	-0,800	0,658	0,658
org. Kohlenstoff [C, g kg ⁻¹]	-0,620	0,686	-0,773	0,519	0,797	0,689	-0,458	-0,685	0,546	0,546
Stickstoff [N, g kg ⁻¹]	-0,659	0,723	-0,794	0,561	0,841	0,727	-0,511	-0,728	0,613	0,613
CN-Verhältnis	0,572	-0,800	-0,613	-0,376	-0,673	0,604	0,604	0,709	-0,695	-0,695
Bodenfeuchte [% vol]	-0,579	0,652	0,518	0,181	0,679	0,707	-0,457	-0,589	0,558	0,558
Bodentemperatur [°C]	0,328	-0,380	0,301	0,020	-0,346	-0,307	0,187	0,171	-0,334	-0,334
Bodenatmung [$\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$]	0,279	-0,417	-0,391	-0,062	-0,256	-0,212	0,291	0,177	-0,315	-0,315
Amöben [10^4 g^{-1}]	-0,253	0,435	-0,400	0,118	0,426	0,289	-0,325	-0,320	0,376	0,376
Flagellaten [10^4 g^{-1}]	-0,379	0,373	-0,272	0,146	0,255	0,214	-0,228	-0,197	0,312	0,312
Ciliaten [10^2 g^{-1}]	-0,133	0,010	-0,276	0,055	-0,066	0,037	0,042	0,175	-0,245	-0,245
Anzahl vaskulärer Pflanzenarten	-0,011	0,283	0,162	-0,163	0,289	0,323	-0,260	-0,160	0,103	0,103
Landnutzungsintensität (LUI)	-0,112	0,133	-0,072	0,165	0,138	0,033	0,028	-0,025	0,107	0,107
Ammonium [μmol]	0,429	-0,547	0,565	-0,384	-0,470	-0,402	0,409	0,505	-0,297	-0,297
Nitrat [μmol]	-0,333	0,468	-0,349	0,410	0,460	0,595	-0,306	-0,277	0,228	0,228
Phosphor [mg kg^{-1}]	-0,552	0,692	-0,719	0,309	0,684	0,579	-0,561	-0,688	0,579	0,579

N=30	T-RF 281	T-RF 283	T-RF 429	T-RF 460	T-RF 554
	Gp 6	Gp 6	Gp 11	Gp 11	Gp 11
Mittlere Abundanz des T-RFs [%]	7,27	1,60	0,56	1,00	2,35
pH	0,773	0,766	-0,767	0,802	-0,858
org. Kohlenstoff [C, g kg ⁻¹]	0,699	0,601	-0,593	0,680	-0,681
Stickstoff [N, g kg ⁻¹]	0,744	0,668	-0,633	0,713	-0,732
CN-Verhältnis	-0,785	-0,810	0,725	-0,660	0,759
Bodenfeuchte [% vol]	0,694	0,818	-0,641	0,650	-0,633
Bodentemperatur [°C]	-0,330	-0,351	0,184	-0,157	0,242
Bodenatmung [$\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$]	-0,235	-0,434	0,270	-0,116	0,293
Amöben [10^4 g^{-1}]	0,438	0,368	-0,122	0,252	-0,398
Flagellaten [10^4 g^{-1}]	0,323	0,353	-0,147	0,198	-0,347
Ciliaten [10^2 g^{-1}]	-0,222	-0,235	0,281	-0,219	0,163
Anzahl vaskulärer Pflanzenarten	0,392	0,206	-0,182	0,265	-0,251
Landnutzungsintensität (LUI)	-0,144	0,021	-0,044	-0,075	-0,246
Ammonium [μmol]	-0,305	-0,356	0,436	-0,391	0,478
Nitrat [μmol]	0,375	0,516	-0,382	0,266	-0,324
Phosphor [mg kg^{-1}]	0,785	0,593	-0,582	0,690	-0,634

Phosphor. Aktive *Acidobacteria*, deren T-RFs keiner Untergruppe zugeordnet werden konnten (T-RFs 82, 429, 554 bp), entsprachen in ihrer Beeinflussung durch Umweltfaktoren wiederum eher dem Muster der Untergruppen Gp1 und Gp4 (Tab.18).

3.5. Saisonale Veränderungen aktiver *Acidobacteria*-Gemeinschaften

Bodenmikroorganismen besitzen die metabolischen und genetischen Voraussetzungen um sich zum Beispiel an saisonal wechselnde Umweltbedingungen in kurzen Zeiträumen anzupassen. Über 16S rRNA-*fingerprinting* wurde diese jahreszeitliche Veränderung der Zusammensetzung und Diversität der aktiven *Acidobacteria* beobachtet. Von 26 Grünland- (ohne SEG9) und 30 Waldböden wurden in 8-Wochen-Intervallen von Ende April bis Ende Oktober 2009 Bodenproben genommen, automatisiert die Bodenfeuchte und -temperatur bestimmt und der pH-Wert im Labor gemessen. Ausgehend von der 16S rRNA wurden von jeder Probe T-RFLP-Profile der aktiven *Acidobacteria*-Gemeinschaft erstellt und deren Zusammensetzung und Diversität auf Phylum- und Untergruppenebene auf Abhängigkeiten von Umweltvariablen geprüft.

Insgesamt konnten nur 216 statt 224 Böden (56 Flächen x 4 Probenahmezeitpunkte in 2009) analysiert werden, da nicht von allen Flächen zu jedem Zeitpunkt eine Bodenprobe verfügbar war. Die automatisierte Messung von Bodentemperatur- und feuchte fand ebenfalls nur auf ausgewählten Flächen und nicht auf jeder Fläche zu jedem Probenahmezeitpunkt statt (163 und 127 von 216 Messungen). Die *in situ* Bodenfeuchte unterschied sich signifikant zwischen dem eher trockenen August und feuchten Oktober (Abb. 11 A), aber auch zwischen den Bodentypen und Exploratorien. Die Böden der

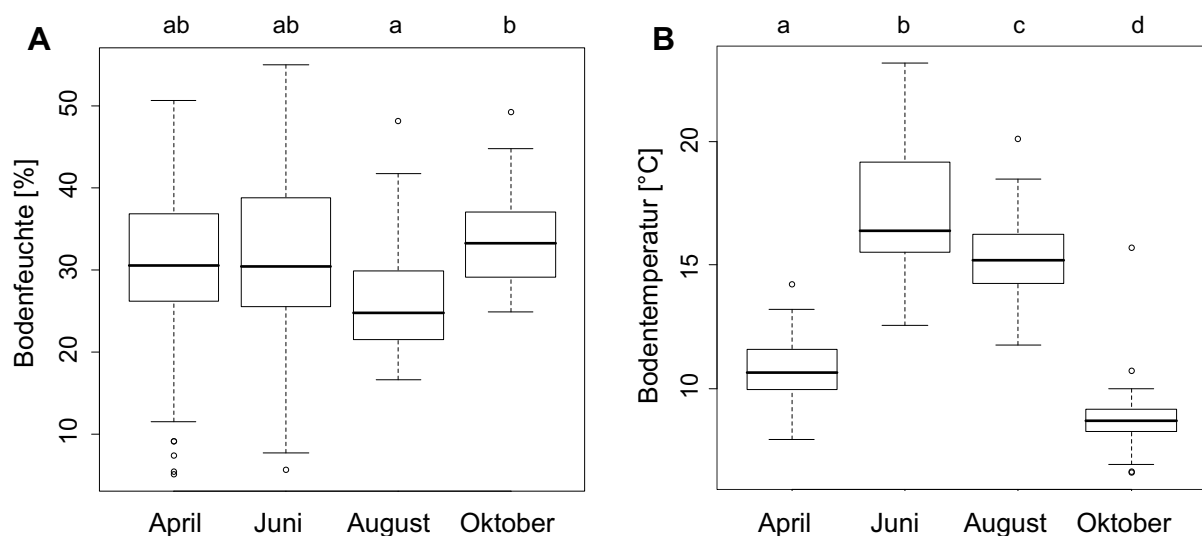


Abbildung 11. Bodenfeuchte (A) und Bodentemperatur (B) aller Böden der Untersuchungsflächen zum Zeitpunkt der Probenahme. Verschiedene Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Jahreszeiten entsprechend einem *t*-Test.

Schorfheide waren signifikant trockener (~20 %vol) als die der Schwäbischen Alb (~35 %vol) und im Hainich (~30 %vol). Außerdem waren Waldböden (~26 %vol) weniger feucht als Grünlandböden (~34 %vol). Die *in situ* Bodentemperatur unterschied sich signifikant zwischen allen Probenahmezeitpunkten mit höchsten Werten im Juni und niedrigsten Temperaturen im Oktober (Abb. 11 B). Die Bodentemperatur war zwischen den Exploratorien nicht signifikant unterschiedlich, im Grünland jedoch höher als im Wald. Der pH-Wert des Bodens variierte nicht signifikant zwischen den vier Probenahmezeitpunkten und bewegte sich im Rahmen der Werte von April 2008.

Tabelle 19. Vergleich der paarweisen Bray-Curtis-Distanzen zwischen 16S rRNA T-RFLP-Profilen durch ANOSIM. Je höher der R-Wert ($0 < R < 1$), desto größer der Unterschied zwischen den analysierten Gruppen. Die Signifikanz wurde über Permutation mit 10.000 Wiederholungen berechnet. Signifikante R-Werte $> 0,15$ sind fett dargestellt. Signifikanzniveau: * $< 0,05$, ** $< 0,01$, *** $< 0,001$

	R
Exploratorium	0,198 ***
Bodentyp	0,288 ***
Jahreszeit	0,027**
Grünland/Wald	0,503 ***
Exploratorium Grünland	0,400 ***
Exploratorium Wald	0,474 ***
Bodentyp Grünland	0,345 ***
Bodentyp Wald	0,096 ***
Jahreszeit Grünland	0,153 ***
Jahreszeit Wald	0,013
Landnutzungstyp Grünland	0,045 **
Landnutzungstyp Wald	0,049 *
Düngung	0,031

Nach der Standardisierung der insgesamt 216 T-RFLP-Profile der acidobakteriellen 16S rRNA wurden 125 terminale Restriktionsfragmente (T-RFs) zur weiteren Analyse verwendet. Die Peakfläche jedes T-RFs der Profile wurde als Maß für die Abundanz der Arten gewählt und in prozentuale Anteile an der gesamten acidobakteriellen Gemeinschaft umgerechnet. Um Unterschiede in T-RFLP-Profilen der Untersuchungsflächen im Hinblick auf Jahreszeit, Exploratorium, Wald- oder Grünland, Boden- und Landnutzungstyp bzw. Düngung zu analysieren, wurde eine ‚*Analysis of Similarity*‘ (ANOSIM) mit dem Bray-Curtis-Distanzmaß verwendet (Tab. 19). Die Teststatistik gibt an, ob signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen auftreten ($R=1$) oder nicht ($R=0$). R-Werte $> 0,75$ gelten als sehr unterschiedlich, R-Werte $> 0,5$ als unterschiedlich und R-Werte $< 0,25$ als kaum unterscheidbar. Der Unterschied in der Zusammensetzung der *Acidobacteria*-Gemeinschaft war zwischen Wald und Grünland am größten, jedoch waren

auch Veränderungen in der *Acidobacteria*-Gemeinschaft zwischen den acht verschiedenen Bodentypen und den drei Exploratorien auszumachen. Wegen des großen Unterschieds zwischen Grünland- und Waldböden wurden die weiteren Umwelteinflüsse und Standorteigenschaften auf die entsprechenden *Acidobacteria*-Gemeinschaften auch für beide Habitats getrennt betrachtet. Der Unterschied zwischen den Exploratorien verdoppelte sich dadurch für Grünland- und Waldflächen. Außerdem wurde deutlich, dass vor allem die *Acidobacteria*-Gemeinschaft im Grünland von Bodentyp und Jahreszeit beeinflusst wurde. Landnutzungstyp und Düngung zeigten mit ANOSIM keinen Einfluss auf die Zusammensetzung der *Acidobacteria* (Tab. 19).

Tabelle 20. ‚Partial Least Squares Regression‘-Analyse (PLSR) über die erklärable Varianz der 16S rRNA T-RFLP-Profile und den gewichteten Anteil jeder Variable zur erklärbaren Varianz der ersten und zweiten Komponente um signifikante (> 0.5 in fett, > 0.1 in grau und fett) und nicht-signifikante (< 0.05) Variablen zu berechnen.

	alle N=56		Grünland N=26		Wald N=30	
	1	2	1	2	1	2
erklärable Varianz in T-RFLP-Profilen	72,9%	10,0%	39,7%	20,0%	75,2%	8,7%
erklärable Varianz durch Variablen	38,8%	8,8%	11,6%	5,3%	33,0%	6,2%
GEWICHTETE ANTEILE DER VARIABLEN						
pH	0,686	0,151	0,093	0,002	0,580	0,096
Bodenfeuchte [% vol]	0,304	0,642	0,620	0,062	0,346	0,434
Bodentemperatur [°C]	0,010	0,207	0,020	0,333	0,027	0,077
Landnutzungsintensität (LUI)			0,236	0,591	0,047	0,393
Düngung			0,030	0,012		

Um den Effekt von numerischen Umweltvariablen wie pH-Wert, Bodenfeuchte, Bodentemperatur und Landnutzungsintensität auf die Zusammensetzung der *Acidobacteria* zu analysieren, wurde ‚Partial Least Squares Regression‘ (PLSR) angewendet. Die ersten zwei PLSR-Komponenten konnten den größten Teil der Varianz in den T-RFLP-Profilen der *Acidobacteria* über die Jahreszeiten in allen 56 Böden als auch in den nach Grünland und Wald getrennten Analysen erklären (Tab. 20). Der Anteil der erklärbaren Varianz in den T-RFLP-Profilen der *Acidobacteria* war in Grünlandböden am niedrigsten (alle: 73 und 10%, Grünland: 40 und 20%, Wald: 75 und 9%), ebenso die erklärable Varianz der entsprechenden PLSR-Komponenten durch die Umweltvariablen (alle: 39 und 9%, Grünland: 12 und 5%, Wald: 33 und 6%). Die Summe der gewichteten Anteile aller Umweltvariablen einer Komponente bildet 1, so dass der Beitrag einer Variable zur Bedeutung einer Komponente beurteilt werden kann. Folglich beeinflusste in erster Linie der pH-Wert die Zusammensetzung der *Acidobacteria* über die Jahreszeiten

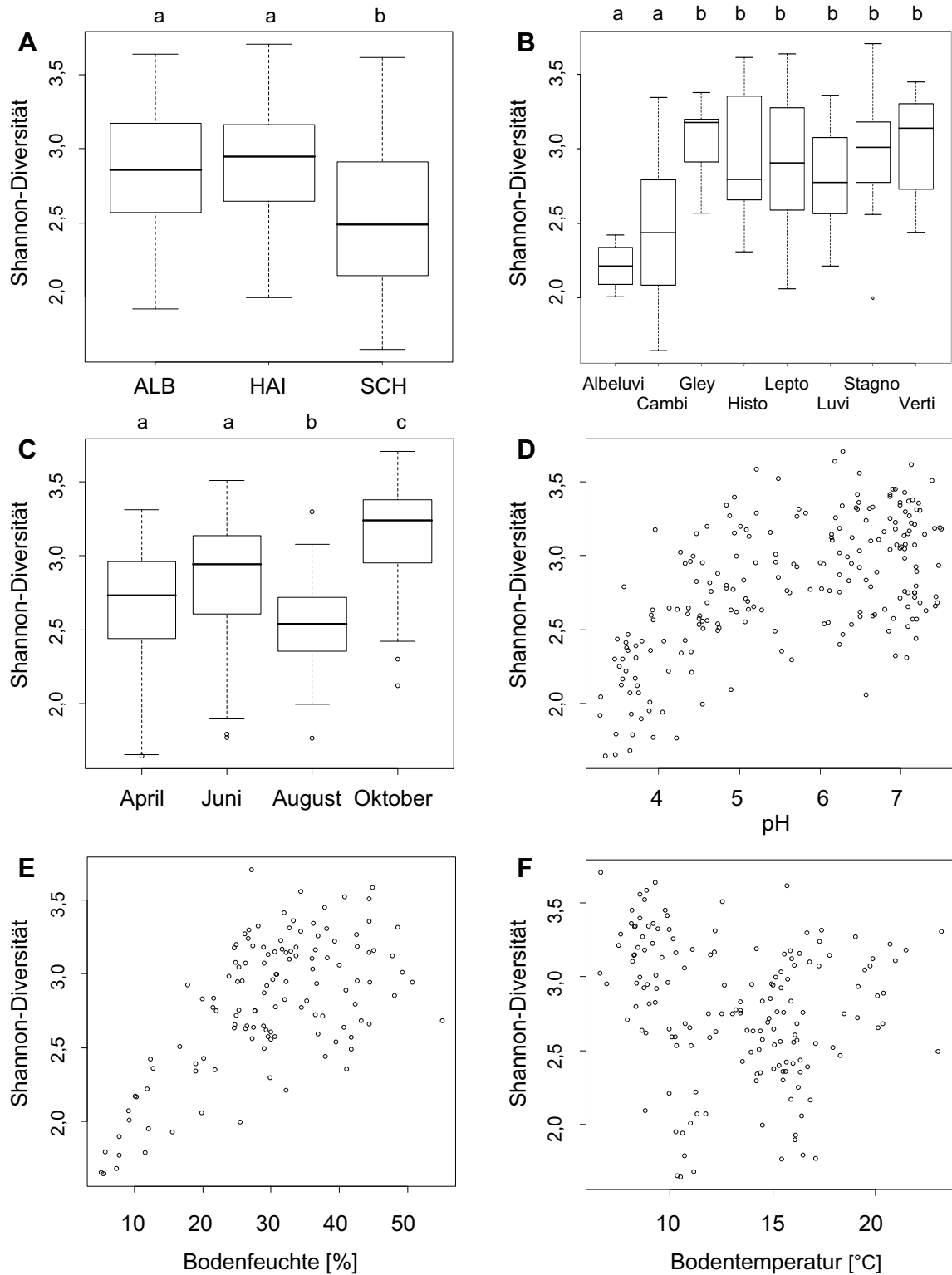


Abbildung 12. Einfluss der Variablen Exploratorium (A), Bodentyp (B), Jahreszeit (C), pH-Wert (D), Bodenfeuchte (E) und Bodentemperatur (F) auf die Shannon-Diversität (berechnet ausgehend von 16S rRNA-T-RFLP-Profilen, signifikante Effekte der linearen Regressionsanalyse in Anhang Tab. 5). Verschiedene Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen entsprechend einem *t*-Test mit Bonferroni-Korrektur.

in allen Flächen, aber vor allem in Waldböden. Außerdem schien die Bodenfeuchte ein wichtiger Umweltfaktor für *Acidobacteria*-Gemeinschaften zu sein, wohingegen die Bodentemperatur nur einen kleinen Einfluss, vor allem im Grünland, hatte. Weiterhin hatte im Grünland auch die Landnutzungsintensität (in die Düngemenge, Häufigkeit der Mahd und Beweidung einfließen) Auswirkungen auf die Zusammensetzung der *Acidobacteria* im Boden (Tab. 20).

Mittels multipler linearer Regressionsanalyse (siehe Kapitel 2.7.3.2.) konnten Abhängigkeiten der Diversität der *Acidobacteria* und der relativen Abundanz einzelner Untergruppen von Jahreszeit, Boden- und Standorteigenschaften sowie Landnutzung für die T-RFLP-Profile der 16S rRNA aufgezeigt werden. Für die Analyse der Diversität der *Acidobacteria* wurde der Shannon-Diversitätsindex ausgehend von den 16S rRNA T-RFLP-Profilen berechnet. Die multiple lineare Regressionsanalyse des Shannon-Diversitätsindex und der erklärenden Variablen Exploratorium, Grünland oder Wald, Bodentyp, Jahreszeit, pH-Wert, Landnutzungstyp, Landnutzungsintensität und Düngung wurde basierend auf einer Modellauswahl mit Hilfe des AIC (siehe Kapitel 2.7.2.3) durchgeführt. Nur signifikante Effekte, die auch in einen *post-hoc*-Test mit Bonferroni-Korrektur signifikante Unterschiede zwischen mindestens zwei Kategorien des Effektes zeigten, wurden im Folgenden dargestellt. Die multiple lineare Regressionsanalyse der *Acidobacteria*-Diversität über alle Jahreszeiten und Böden lässt signifikante Abhängigkeiten vom untersuchten Exploratorium, Bodentyp, der Jahreszeit und dem pH-Wert erkennen (Anhang Tab. 5). Zusammen erklären diese vier Variablen 58% der Variation der *Acidobacteria*-Diversität. Im Grünland hingegen spielte nur die Jahreszeit eine Rolle für die Diversität der *Acidobacteria*, im Wald zusätzlich das Exploratorium (Anhang Tab. 5). Die Abbildung 12 gibt diese Einflüsse auf die Diversität für die einzelnen Kategorien wieder. So war die *Acidobacteria*-Gemeinschaft in Böden der Schwäbischen Alb und im Hainich signifikant diverser als in Schorfheide-Böden. Ferner waren Albeluvisol- und Cambisol-Böden weniger divers als die restlichen sechs Bodentypen. Außer im April und Juni war die *Acidobacteria*-Diversität zwischen allen Jahreszeiten signifikant unterschiedlich mit der niedrigsten Diversität im August und der höchsten in kühlen und feuchten Oktoberböden. Weiterhin wurde die höchste Diversität der *Acidobacteria* in Böden mit neutralem pH-Wert detektiert (Abb. 12). Da nur 115 (von 216) Böden Daten zur Bodentemperatur als auch -feuchte aufwiesen, konnten diese Umweltbedingungen nicht in die multiple lineare Regressionsanalyse der *Acidobacteria*-Diversität bzw. der relativen Abundanz einzelner T-RFs einfließen. Dennoch schien die *Acidobacteria*-Diversität in Böden hoher Feuchte anzusteigen, wohingegen die Bodentemperatur in den untersuchten Böden nicht mit der Diversität der *Acidobacteria* korrelierte (Abb. 12).

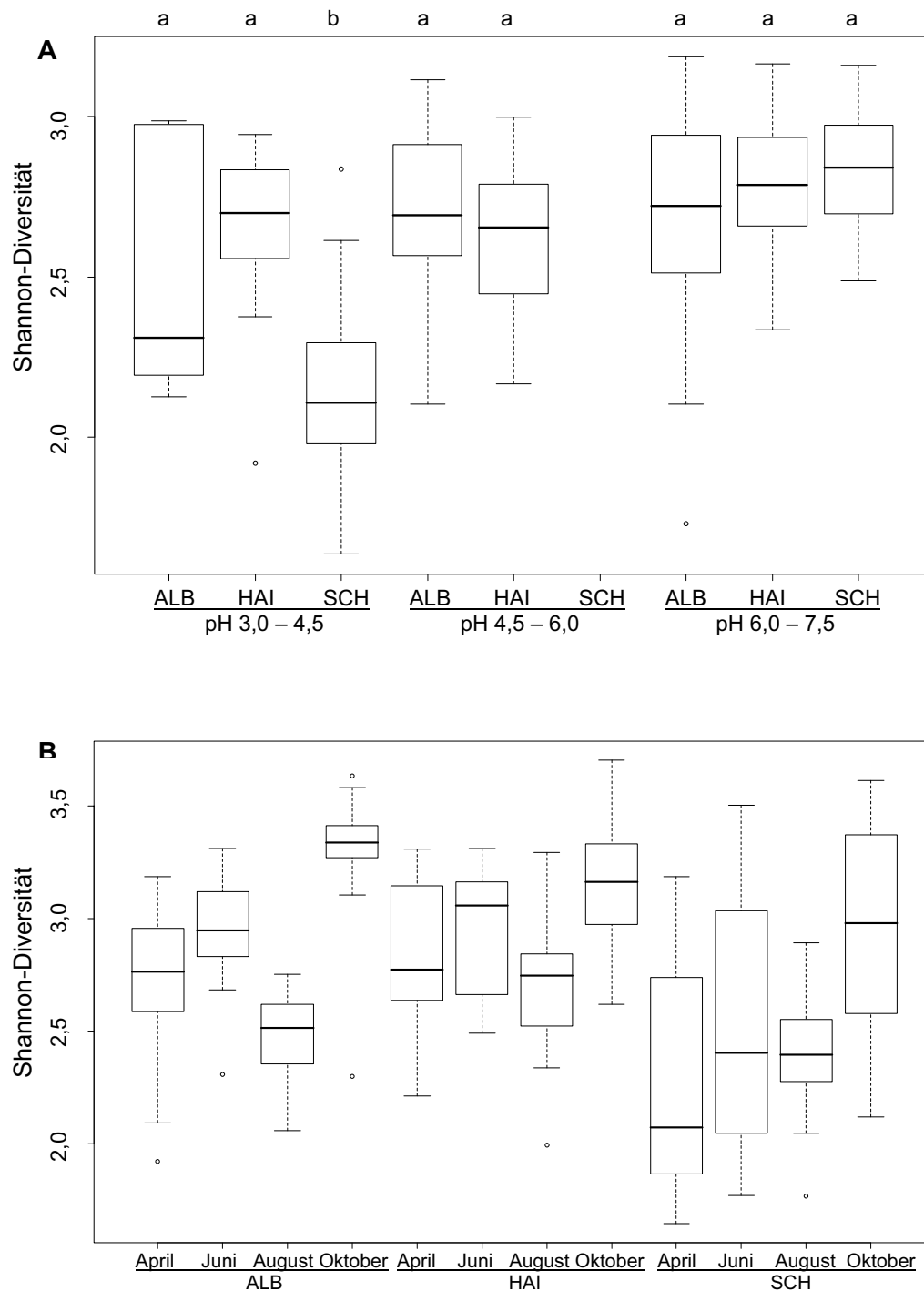


Abbildung 13. Einfluss der Interaktion von Exploratorium und pH-Wert (A) als auch Exploratorium und Jahreszeit (B) auf die Shannon-Diversität (berechnet ausgehend von 16S rRNA-T-RFLP-Profilen, signifikante Effekte der linearen Regressionsanalyse in Anhang Tab. 6). Verschiedene Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen entsprechend einem *t*-Test mit Bonferroni-Korrektur.

Zusätzlich zu den einzelnen erklärenden Variablen kann auch ihre Interaktionen im Regressionsmodell berücksichtigt werden. Die multiple lineare Regressionsanalyse des Shannon-Diversitätsindex einschließlich möglicher Interaktionen konnte vor allem in den Waldböden einen zusätzlichen Anteil der Variation der *Acidobacteria*-Diversität erklären (Anhang Tab. 6). Der pH-Wert in Abhängigkeit vom Exploratorium und die Jahreszeit in

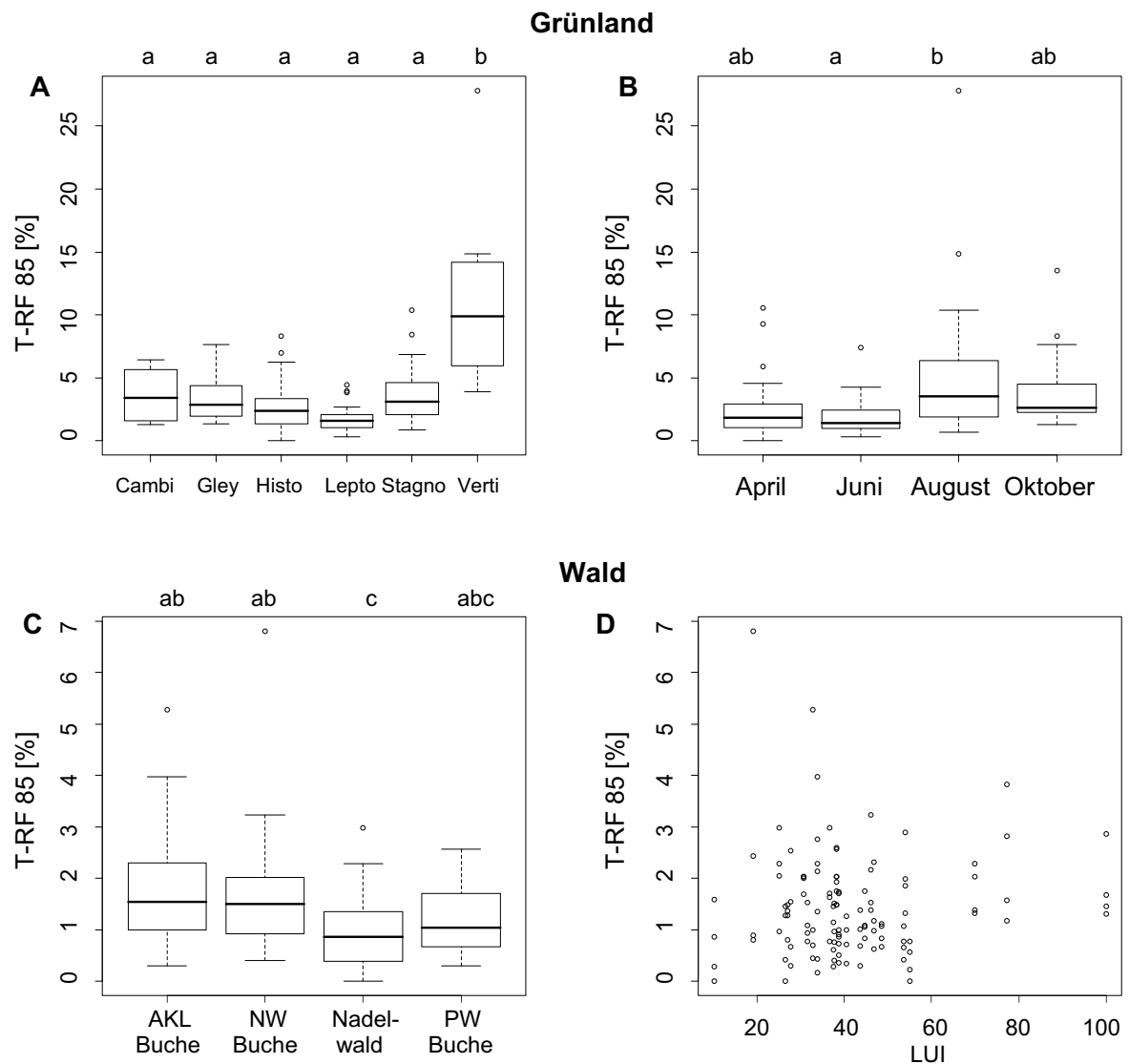


Abbildung 14. Einfluss der Variablen Bodentyp (A) und Jahreszeit (B) in Grünland- sowie des Landnutzungstyp (C) und Landnutzungsintensität (LUI, D) in Waldböden auf die relative Abundanz des T-RF 85 bp (Gp1, signifikante Effekte der linearen Regressionsanalyse im Anhang Tab. 7). Verschiedene Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen entsprechend einem *t*-Test mit Bonferroni-Korrektur, AKL – Altersklassenwald, NW – Naturwald, PW – Plenterwald.

Abhängigkeit vom Exploratorium hatten signifikante Einflüsse auf die *Acidobacteria*-Diversität in allen untersuchten Böden. In den sauren Böden der Schorfheide (pH 3-4,5) war die *Acidobacteria*-Diversität signifikant niedriger als in allen anderen Böden. Über alle drei Exploratorien wies der August eine signifikant niedrigere *Acidobacteria*-Diversität auf als der Oktober, wobei in den Schorfheide-Böden im April und Juni eine zum Teil noch niedrigere *Acidobacteria*-Diversität vorlag (Abb. 13).

Nicht nur die Diversität der *Acidobacteria* wurde mittels multipler linearer Regression auf Abhängigkeiten von Jahreszeit, Boden- und Standorteigenschaften sowie Landnutzung analysiert, sondern auch die Abundanz einzelner Untergruppen der *Acidobacteria*

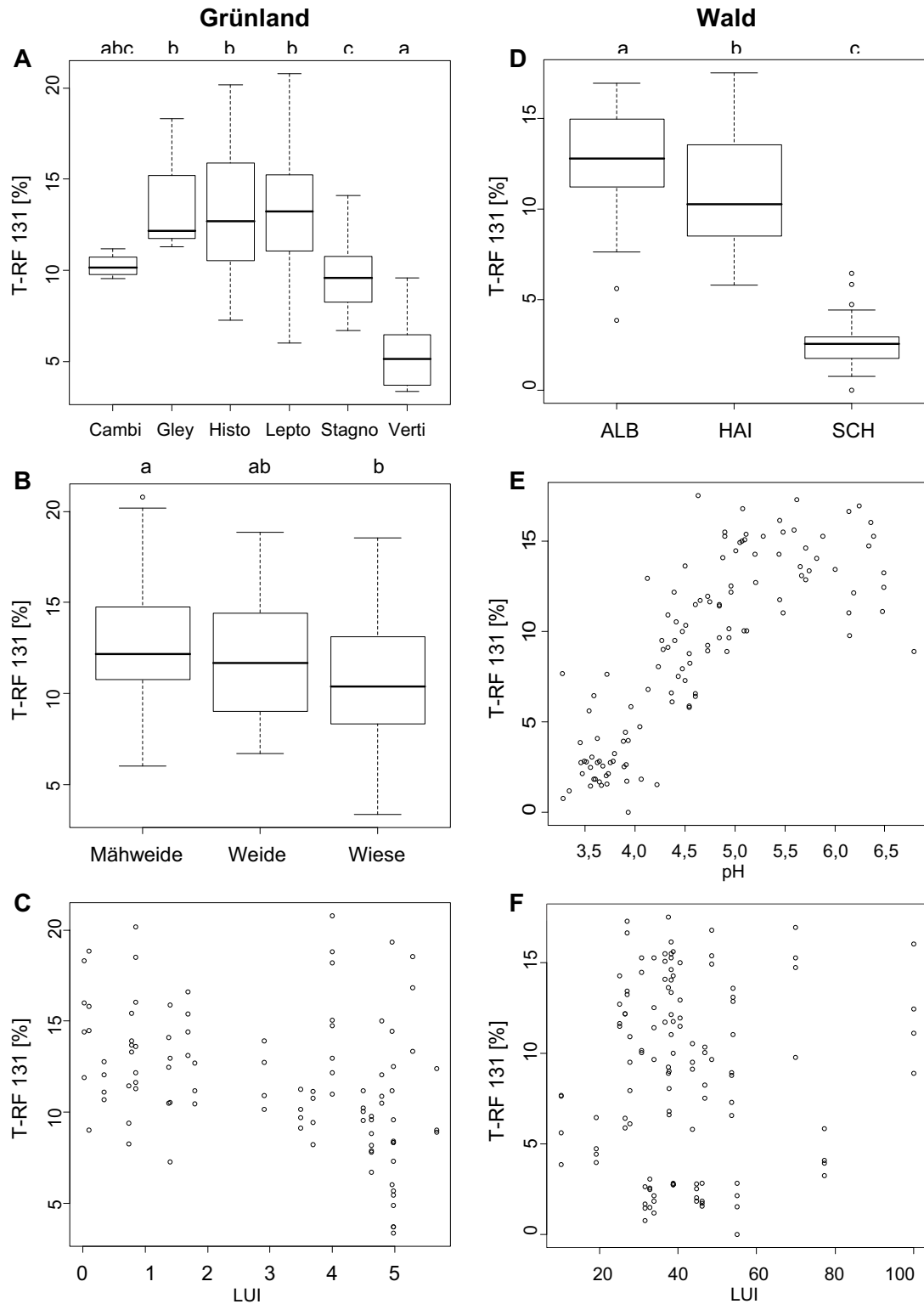


Abbildung 15. Einfluss der Variablen Bodentyp (A), Landnutzungstyp (B) und Landnutzungsintensität (LUI, C) in Grünland- sowie Exploratorium (C), pH-Wert (D) und Landnutzungsintensität (LUI, E) in Waldböden auf die relative Abundanz des T-RF 131 bp (Gp17, signifikante Effekte der linearen Regressionsanalyse im Anhang Tab. 7). Verschiedene Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen entsprechend einem *t*-Test mit Bonferroni-Korrektur.

(Anhang Tab. 7). Die in den 16S rRNA-T-RFLP-Profilen detektierten abundanten T-RFs konnten über nahezu vollständige 16S rRNA-Gensequenzen der *Acidobacteria* aller Grünland- und Waldböden der drei Untersuchungsregionen mit Hilfe einer *in silico* T-RFLP-Analyse Untergruppen zugeordnet werden (Anhang Tab. 4). Die relative Abundanz von 7 von 19 T-RFs mit einem mittleren prozentualen Anteil von > 1% über alle Jahreszeiten variierte signifikant zwischen den Jahreszeiten und diese T-RFs wurden für eine detaillierte Analyse der saisonalen Dynamik abundanter Untergruppen ausgewählt. Zu Vergleichszwecken wurden zusätzlich zwei zwar abundante, aber sich in ihrer Häufigkeit nicht signifikant saisonal verändernde T-RFs (131 bp [Gp17] und 256 bp [Gp1]) auf die gleiche Weise analysiert (Anhang Tab. 7).

Die multiple lineare Regressionsanalyse der relativen Abundanz des T-RF 85 bp, welches der Untergruppe Gp1 zugeordnet werden kann, zeigte Einflüsse von Jahreszeit, Bodentyp und unterschied sich signifikant zwischen Grünland- und Waldböden (Anhang Tab. 7, Abb. 14). Deswegen wurde die Regressionsanalyse auch für Grünland- und Waldböden getrennt durchgeführt. Vor allem im Grünland konnte durch das Regressionsmodell ein großer Teil der Variation in der relativen Häufigkeit erklärt werden. Im Grünland war das T-RF 85 bp häufiger in Vertisol-Böden als in allen anderen Bodentypen zu finden. Außerdem war es signifikant abundanter in den trockenen August- als in den Juni-Böden. In Waldböden dagegen gab es zwar keinen saisonalen Einfluss auf die Peakhöhe des T-RF 85 bp, aber einen Landnutzungseffekt. Die Abundanz war in Nadelwäldern signifikant niedriger als in Altersklassen- oder unbewirtschafteten Wäldern aus Buche (Anhang Tab. 7, Abb. 14).

Das T-RF 131 bp, das *Acidobacteria* der Untergruppe Gp17 wiedergibt, zeigte zwar eine Beeinflussung durch die Jahreszeiten sowohl in allen Böden als auch im Grünland und Wald, über einen *post-hoc*-Test konnten aber keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Probenahmezeitpunkten festgestellt werden (Anhang Tab. 7, Abb. 15). Allerdings gab es in Grünlandböden signifikante Unterschiede zwischen dem Bodentyp und der Landnutzung: Gp17 war häufiger in Mähweiden als in Wiesen zu finden. In Waldböden war T-RF 131 bp in der Schwäbischen Alb am stärksten vertreten, gefolgt vom Hainich und wenig abundant in den Böden der Schorfheide. Weiterhin stieg die Abundanz des T-RFs mit eher neutralem pH-Wert des Bodens und wurde auch durch die Landnutzungs- und Störungsintensität beeinflusst (Anhang Tab. 7, Abb. 15).

Die Regressionsanalyse der Abundanz des T-RF 188 bp, welches der Untergruppe Gp6 zugeordnet werden kann, zeigte Abhängigkeiten von Bodentyp und pH-Wert in allen Böden (Anhang Tab. 7, Abb. 16). In Grünlandböden konnte der Hauptteil der Variation

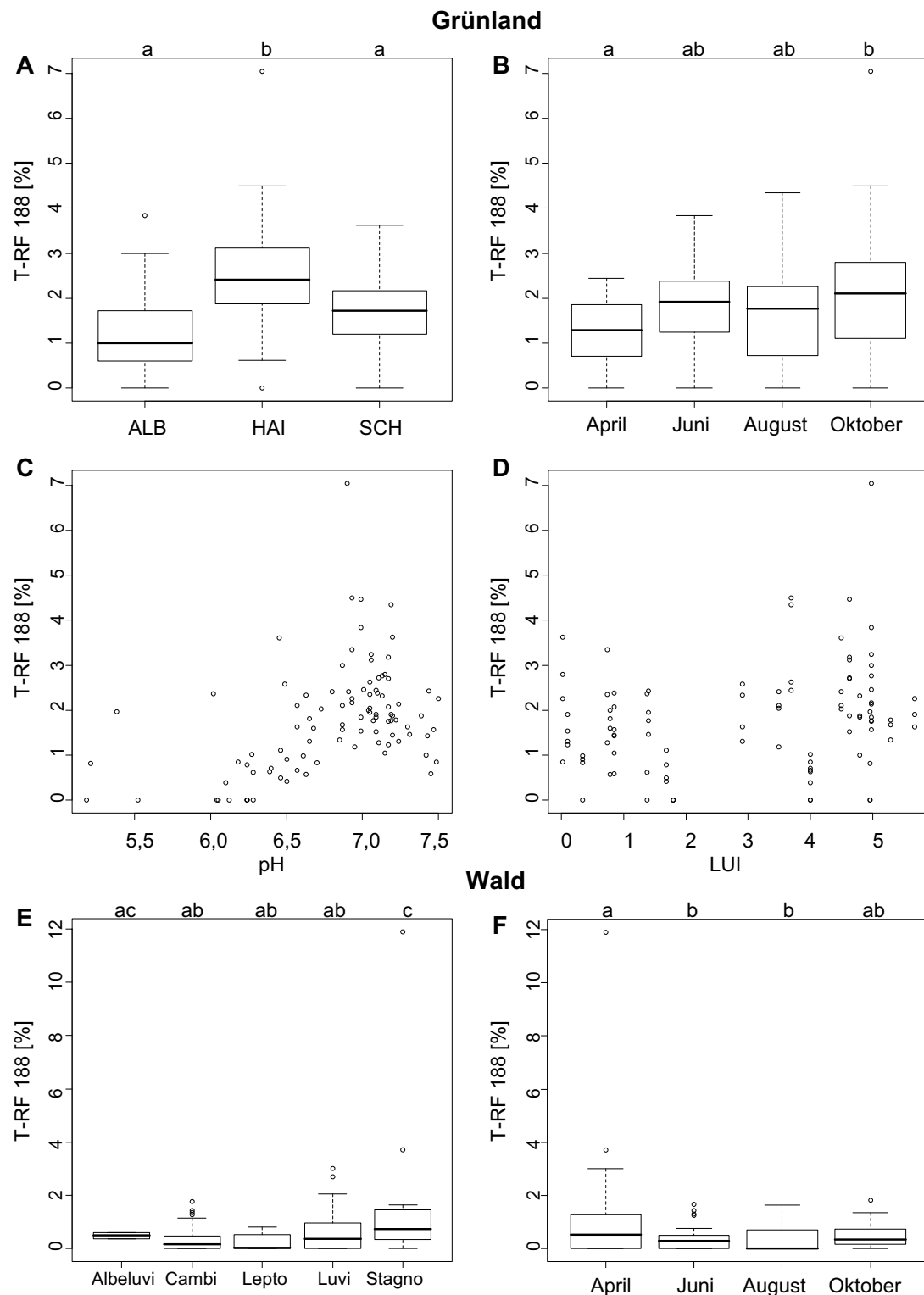


Abbildung 16. Einfluss der Variablen Exploratorium (A), Jahreszeit (B), pH-Wert (C) und Landnutzungsintensität (LUI, D) in Grünland- sowie Bodentyp (E) und Jahreszeit (F) in Waldböden auf die relative Abundanz des T-RF 188 bp (Gp6, signifikante Effekte der linearen Regressionsanalyse im Anhang Tab. 7). Verschiedene Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen entsprechend einem *t*-Test mit Bonferroni-Korrektur.

dieses T-RFs durch die drei Exploratorien, die unterschiedlichen Probenahmezeitpunkte, differierende pH-Werte und die Landnutzungsintensität erklärt werden, wohingegen im Wald nur Bodentyp und Jahreszeit etwa ein Viertel der Variation erklären konnten. Im Grünlandboden war dieser Teil der *Acidobacteria*-Untergruppe Gp6 im Hainich signifikant häufiger zu finden als in den beiden anderen Exploratorien und auch in Böden neutralen pH-Werts abundanter. Die April-Böden zeigten eine signifikant geringere Häufigkeit des T-RFs 188 bp als die Bodenproben vom Oktober. In Waldböden, unterschied sich die Abundanz dieses T-RFs auf relativ geringem Niveau signifikant zwischen den fünf Bodentypen sowie zwischen April (hohe Abundanz) und Juni bzw. August (niedrige Abundanz). T-RF 188 bp zeigte sowohl in Grünland- als auch in Waldböden signifikante saisonale Effekte, wenn auch im Grünland stärker (Anhang Tab. 7, Abb. 16).

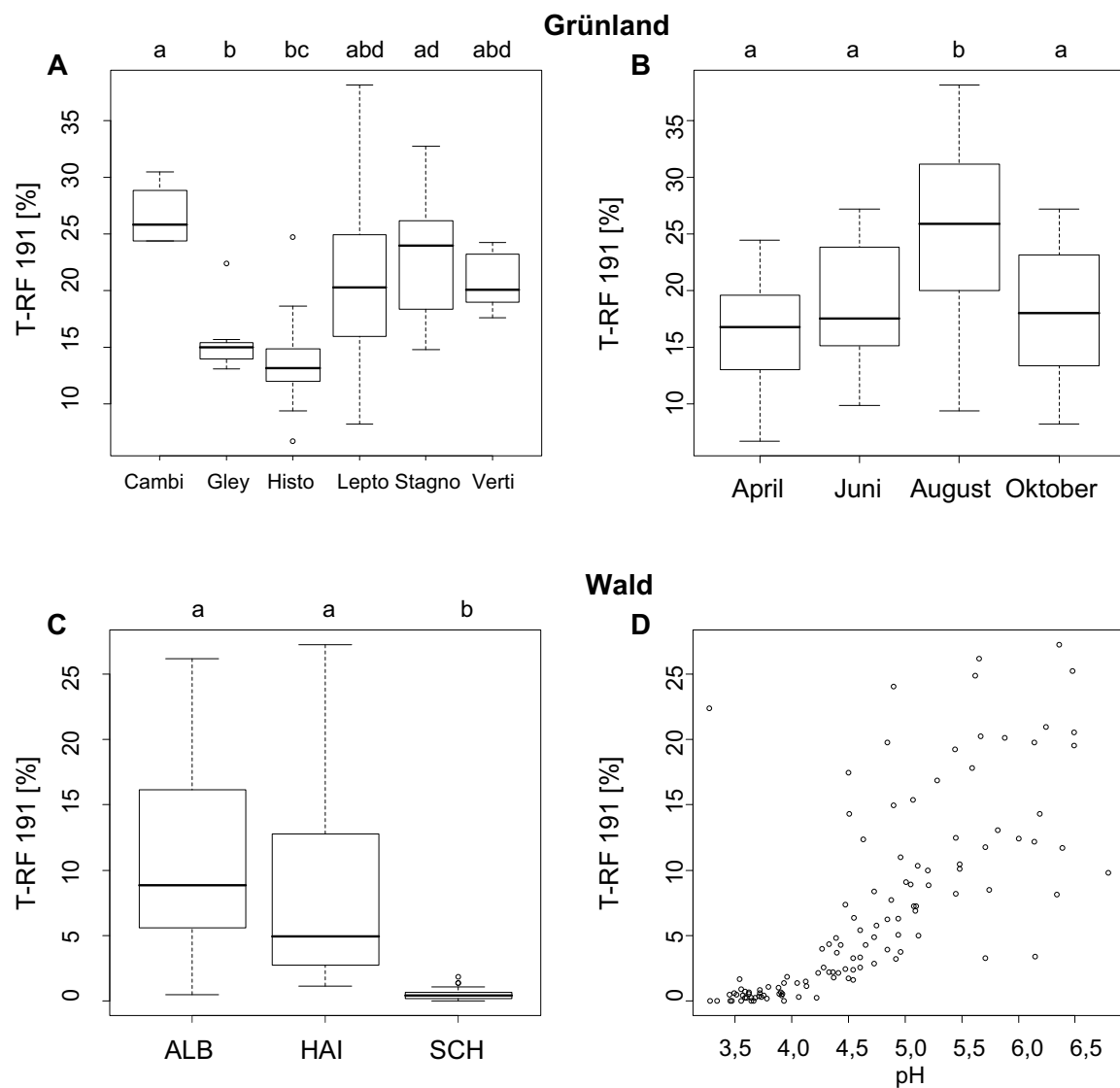
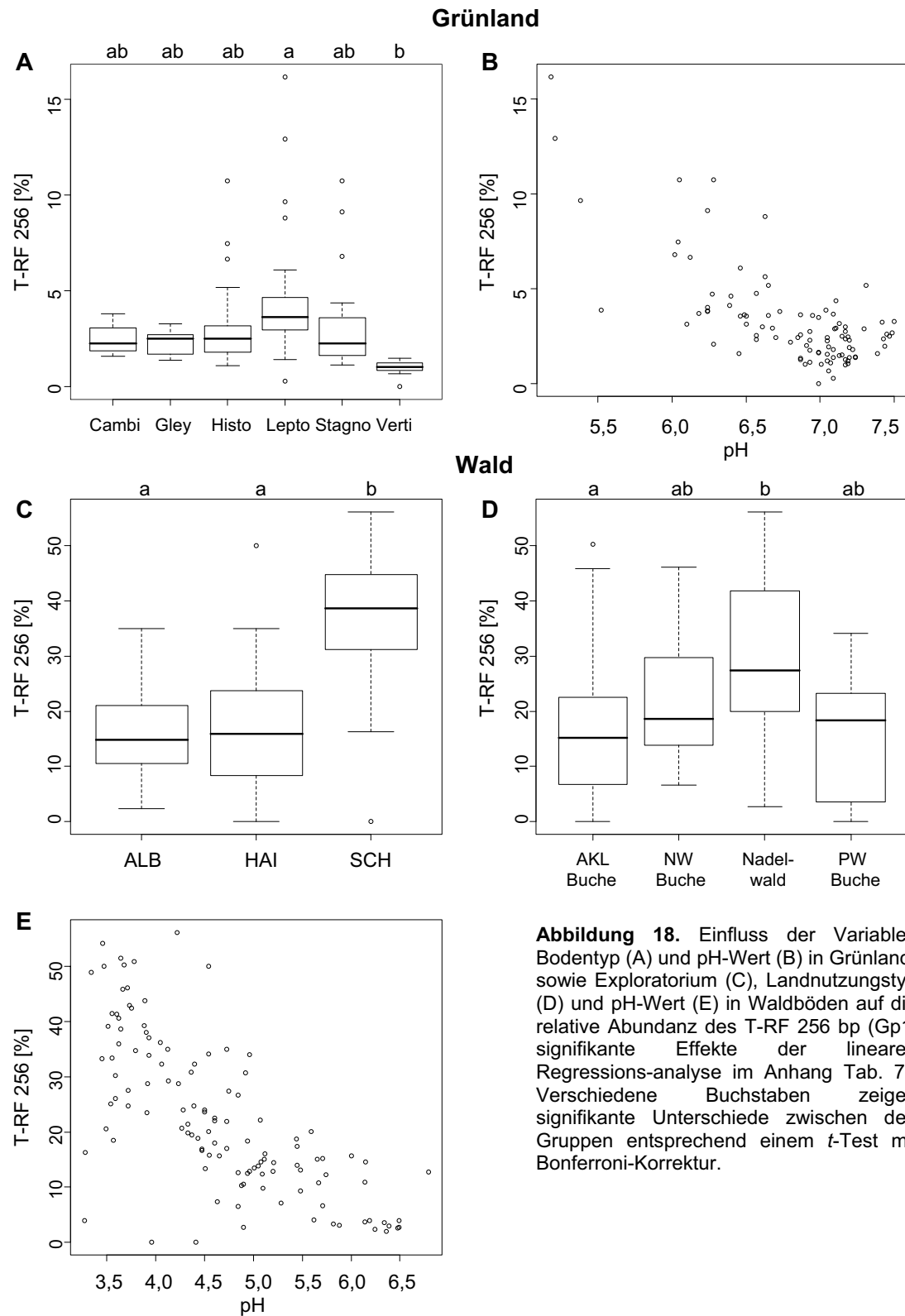


Abbildung 17. Einfluss der Variablen Bodentyp (A) und Jahreszeit (B) in Grünland- sowie Exploratorium (C) und pH-Wert (D) in Waldböden auf die relative Abundanz des T-RF 191 bp (Gp6, signifikante Effekte der linearen Regressionsanalyse im Anhang Tab. 7). Verschiedene Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen entsprechend einem *t*-Test mit Bonferroni-Korrektur.

Die Abundanz des T-RF 191 bp, das ebenfalls der Untergruppe Gp6 zuzuordnen ist, wurde von Jahreszeit, Bodentyp, pH-Wert und Exploratorium beeinflusst und war in Grünlandböden signifikant höher als in Waldböden (Anhang Tab. 7, Abb. 17). Deswegen wurde die Regressionsanalyse auch für Grünland- und Waldböden getrennt durchgeführt. Vor allem im Grünland aber auch in den Waldflächen konnte durch das Regressionsmodell ein großer Teil der Variation in der relativen Häufigkeit erklärt werden. Im Grünland war das T-RF 191 bp signifikant häufiger in Cambisol- und Stagnosol-Böden als in Gleysol- und Histosol-Böden zu finden. Die saisonalen Effekte zeigten sich in einem signifikant höheren Anteil des T-RFs im August verglichen mit allen anderen Probenahmezeitpunkten. In Waldböden der Schorfheide war T-RF 191 bp sehr selten, im Hainich und der Schwäbischen Alb hingegen machte es bis zu 25% aus. Wie bei anderen T-RFs der Untergruppe Gp6 zeigte sich auch hier eine starke positive Korrelation der Abundanz des T-RFs 191 bp mit dem pH-Wert: T-RF 191 bp war umso abundanter desto neutraler der pH-Wert des Waldbodens (Anhang Tab. 7, Abb. 17).

Das vor allem in Waldböden abundante T-RF 256 bp, das wiederum einen Teil der *Acidobacteria* der Untergruppe Gp1 wiedergibt, zeigte zwar eine Beeinflussung durch die Jahreszeiten sowohl in allen Böden als auch im Grünland, über einen *post-hoc*-Test konnten aber keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Probenahmezeitpunkten festgestellt werden (Anhang Tab. 7, Abb. 18). Allerdings gab es in Grünlandböden signifikante Unterschiede zwischen den Bodentypen: das T-RF 256 bp war in Leptosol-Böden signifikant abundanter als in Vertisol-Böden. Sowohl im Grünland als auch im Wald war das T-RF am stärksten in eher sauren Böden vertreten. In den sauren Waldböden der Schorfheide zeigte T-RF 256 bp demnach mit Abstand die größte Abundanz (~40%), verglichen mit dem Hainich und der Schwäbischen Alb (~15%). Das T-RF wurde auch von der Waldnutzungsart beeinflusst, wobei es in Nadelwäldern signifikant höhere Häufigkeiten zeigte als in Altersklassen-Buchenwäldern (Anhang Tab. 7, Abb. 18).

Das Vorkommen von Vertretern der *Acidobacteria*-Untergruppe Gp18 (T-RF 273 bp) war in den drei Exploratorien und den Jahreszeiten unterschiedlich sowie abhängig vom pH-Wert in allen Böden (Anhang Tab. 7, Abb. 19). Im Grünland als auch im Wald konnten signifikante saisonale Effekte auf die Abundanz dieses T-RFs festgestellt werden, mit niedrigsten Werten im trockenen August und höchsten im Juni und Oktober (Grünland) oder April und Oktober (Wald). Weiterhin gab es in Grünlandböden signifikante Unterschiede zwischen den Bodentypen, aber auch zwischen den Landnutzungsformen: T-RF 273 bp war in Weiden weniger abundant vertreten als in Mähweiden oder Wiesen. In Wäldern waren diese Mitglieder der Untergruppe Gp18 selten in der Schorfheide zu finden und ihre Abundanz stieg mit dem pH-Wert des Bodens an (Anhang Tab. 7, Abb. 19).



Das T-RF 281 bp repräsentiert ebenfalls *Acidobacteria* der Untergruppe Gp6, wurde von Bodentyp, pH-Wert und Exploratorium beeinflusst und war in Grünlandböden signifikant häufiger als in Waldböden (Anhang Tab. 7, Abb. 20). Deswegen wurde die Regressions-analyse auch für Grünland- und Waldböden getrennt durchgeführt. Vor allem im Wald aber auch in den Grünlandflächen konnte durch das Regressionsmodell ein

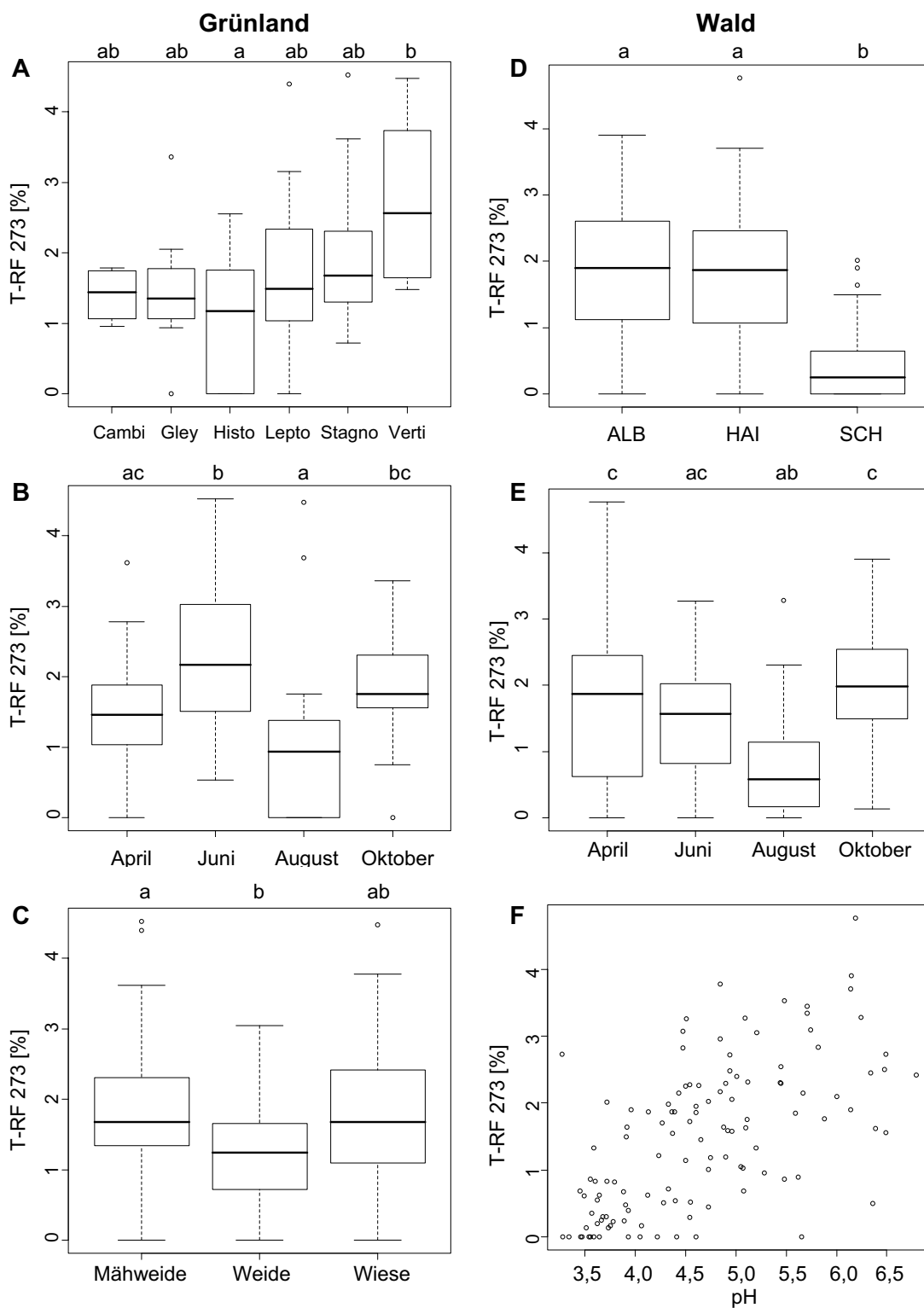


Abbildung 19. Einfluss der Variablen Bodentyp (A), Jahreszeit (B) und Landnutzungstyp (C) in Grünland- sowie Exploratorium (D), Jahreszeit (E) und pH-Wert (F) in Waldböden auf die relative Abundanz des T-RF 273 bp (Gp18, signifikante Effekte der linearen Regressionsanalyse im Anhang Tab. 7). Verschiedene Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen entsprechend einem *t*-Test mit Bonferroni-Korrektur.

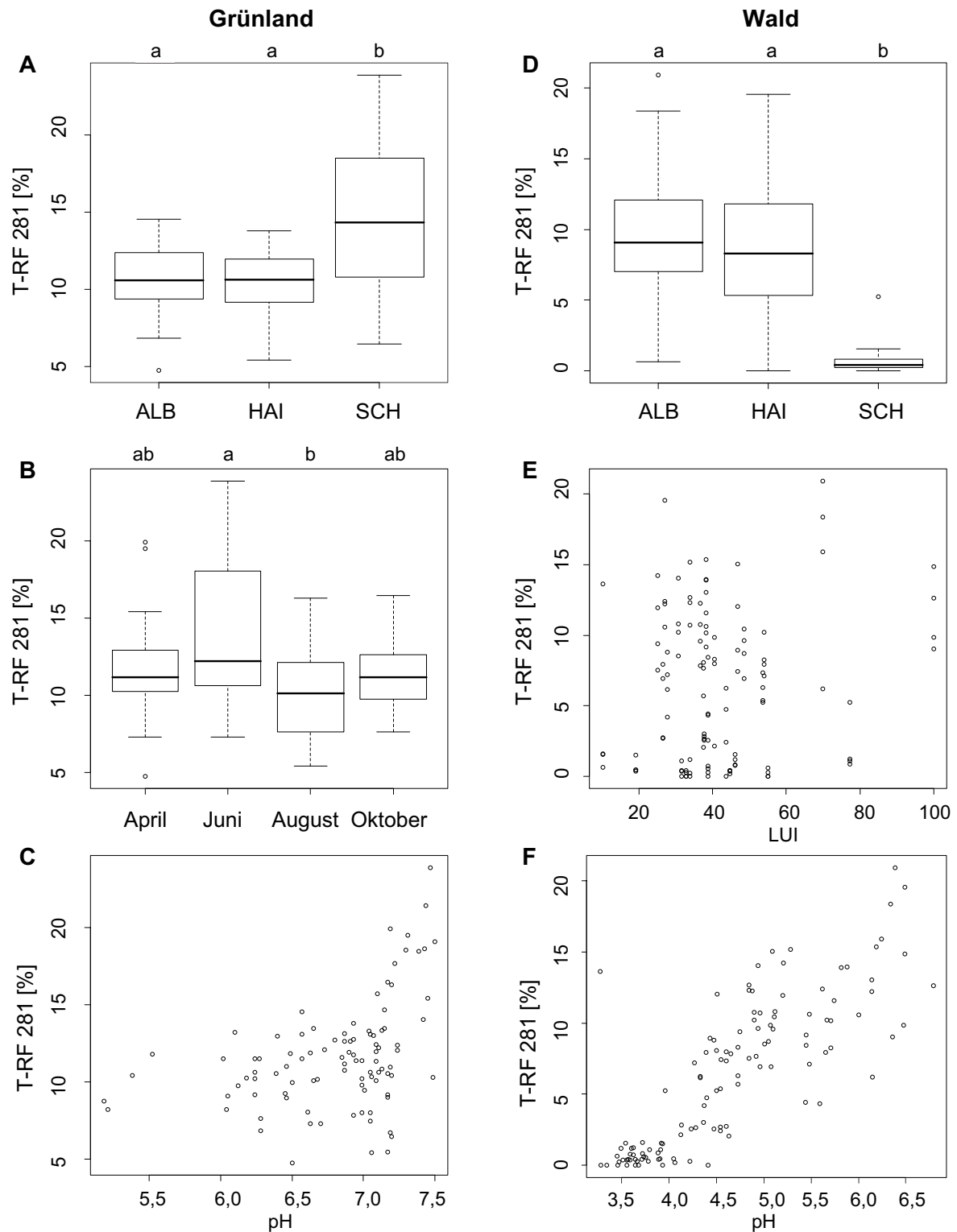


Abbildung 20. Einfluss der Variablen Exploratorium (A), Jahreszeit (B) und pH-Wert (C) in Grünland- sowie Exploratorium (D), Landnutzungsintensität (LUI, E) und pH-Wert (F) in Waldböden auf die relative Abundanz der T-RFs 281 bp (Gp6, signifikante Effekte der linearen Regressionsanalyse im Anhang Tab. 7). Verschiedene Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen entsprechend einem *t*-Test mit Bonferroni-Korrektur.

großer Teil der Variation in der relativen Häufigkeit des T-RFs 281 bp erklärt werden. Im Grünland war das T-RF in Schorfheide-Böden signifikant abundanter als im Hainich und der Schwäbischen Alb, in Waldböden hingegen verhielt es sich genau andersherum. Diese *Acidobacteria* der Untergruppe Gp6 waren außerdem im Juni signifikant abundanter in Grünlandböden vertreten als im August. In Waldböden gab es dagegen keine saisonalen Effekte, aber Einflüsse der Landnutzungs- und Störungsintensität. Ferner bevorzugten *Acidobacteria* des T-RF 281 bp Böden mit neutralem pH-Wert im Grünland und Wald (Anhang Tab. 7, Abb. 20).

Das T-RF 283 bp, welches wie die T-RFs 188, 191 und 281 bp *Acidobacteria* der Untergruppe Gp6 darstellt, wurde in seiner Abundanz durch Exploratorium, Jahreszeit und den pH-Wert in allen Böden beeinflusst (Anhang Tab. 7, Abb.21). Vor allem in Grünland- aber auch in Waldflächen konnte durch das Regressionsmodell ein großer Teil der Variation in der relativen Häufigkeit des T-RFs 283 bp erklärt werden. In Grünlandböden zeigte sich eine Abhängigkeit von Exploratorium, Jahreszeit, pH-Wert und Landnutzung. So war das T-RF im Grünland im Hainich signifikant abundanter als in den anderen beiden Exploratorien, im April häufiger als zu allen anderen Probenahme-zeitpunkten und in Wiesen stärker vertreten als in Mähweiden. Sowohl im Grünland als auch im Wald zeigte sich, wie schon bei den drei anderen T-RFs, die der *Acidobacteria*-Untergruppe Gp6 zugeordnet werden können, eine positive Korrelation der Abundanz mit dem pH-Wert des Bodens. Im Wald hatte wiederum auch die Landnutzungs- und Störungsintensität einen Einfluss auf das T-RF 283 bp (Anhang Tab. 7, Abb.21).

Die Regressionsanalyse des T-RF 461 bp, das der *Acidobacteria*-Untergruppe Gp11 zugeordnet werden kann, zeigte Einflüsse der drei Exploratorien, der jahreszeitlichen Probenahmen und des pH-Wertes des Bodens auf dessen Abundanz (Anhang Tab. 7, Abb. 22). In den Grünlandböden der Schwäbischen Alb traten diese Vertreter der Untergruppe Gp11 häufiger auf als in den beiden anderen Regionen. Das T-RF 461 bp war im Grünland im April am stärksten und im August am wenigsten abundant. Im Wald war dieses T-RF in der Schorfheide fast nicht zu finden und in der Schwäbischen Alb signifikant häufiger als im Hainich. Die steigende Häufigkeit der Untergruppe Gp11 mit dem pH-Wert war in Waldböden deutlich und im Grünland kaum zu erkennen (Anhang Tab. 7, Abb. 22).

Die Diversität der *Acidobacteria* wurde sowohl in Grünland, als auch in Waldböden signifikant durch die Jahreszeiten beeinflusst. Die höchste Diversität wurde im eher kühlen Oktober- und die niedrigste im trockenen August-Boden detektiert. Auf die Abundanz einzelner T-RFs hingegen zeigten sich saisonale Einflüsse vor allem in Grünlandböden, im Wald waren diese entweder schwächer ausgeprägt oder nicht vorhanden. Nur für eines der beiden T-RFs der Untergruppe Gp1 konnte ein jahreszeitlicher Einfluss

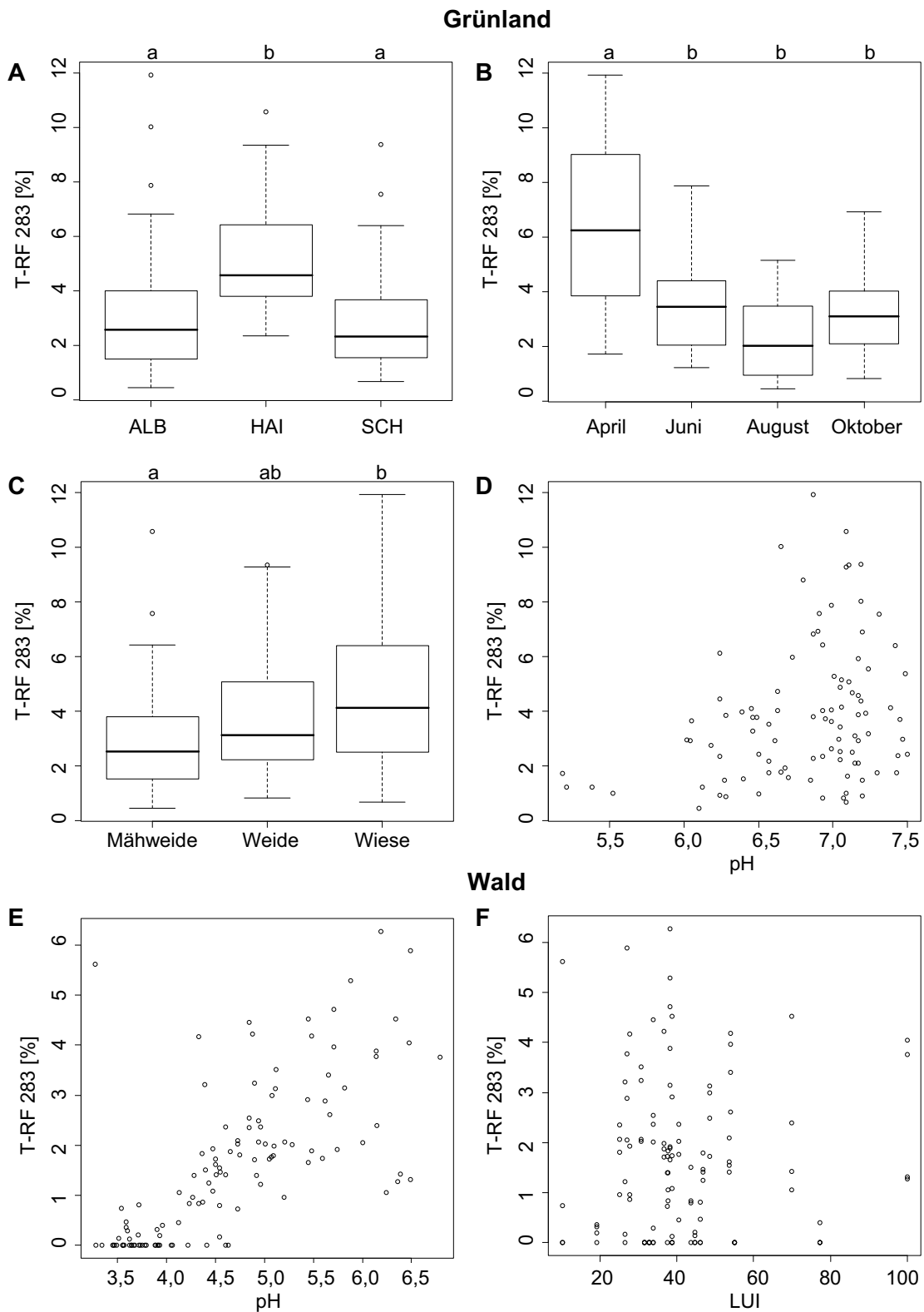


Abbildung 21. Einfluss der Variablen Exploratorium (A), Jahreszeit (B), Landnutzungstyp (C) und pH-Wert (D) in Grünland- sowie pH-Wert (E) und Landnutzungsintensität (LUI, F) in Waldböden auf die relative Abundanz des T-RF 283 bp (Gp6, signifikante Effekte der linearen Regressionsanalyse im Anhang Tab. 7). Verschiedene Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen entsprechend einem *t*-Test mit Bonferroni-Korrektur.

gefunden werden. Auch im Hinblick auf andere Variablen zeigten die beiden T-RFs kein einheitliches Muster. T-RFs von *Acidobacteria* der Untergruppe Gp6 hingegen zeigten alle eine höhere Abundanz bei neutralerem pH-Wert des Bodens. Aufgrund der hohen Probenzahl konnte für die Abundanz einiger Untergruppen gezeigt werden, dass unterschiedliche Landnutzungsformen signifikante Unterschiede hervorrufen können.

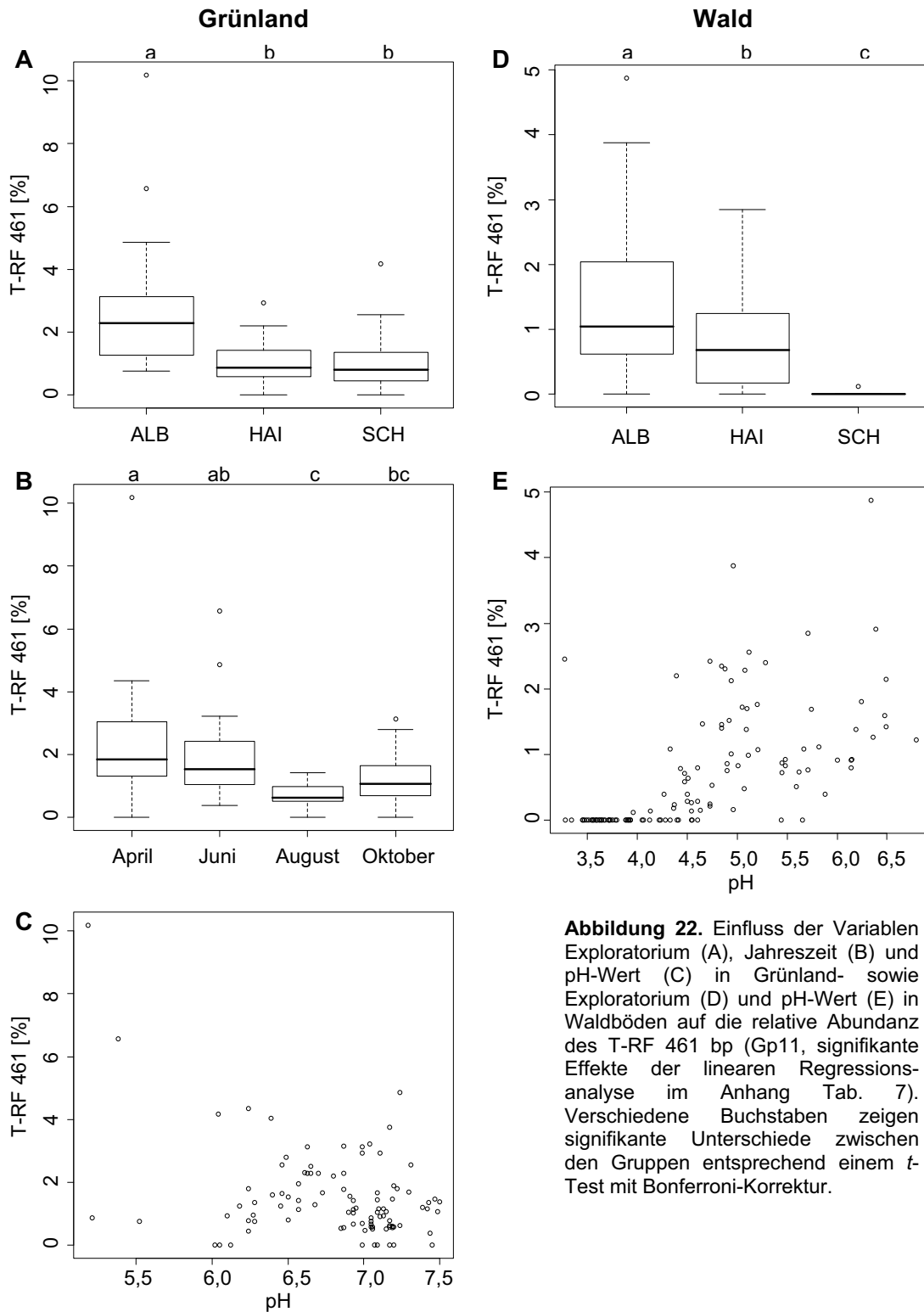


Abbildung 22. Einfluss der Variablen Exploratorium (A), Jahreszeit (B) und pH-Wert (C) in Grünland- sowie Exploratorium (D) und pH-Wert (E) in Waldböden auf die relative Abundanz des T-RF 461 bp (Gp11, signifikante Effekte der linearen Regressionsanalyse im Anhang Tab. 7). Verschiedene Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen entsprechend einem *t*-Test mit Bonferroni-Korrektur.

3.6. Identifizierung am Abbau von Pflanzenmaterial beteiligter Bakterien

Eine Aufgabe der mikrobiellen Ökologie ist die Identifizierung von mikrobiellen Populationen und Aktivitäten, die am Abbau von Kohlenstoff in der Umwelt beteiligt sind. In Boden stellt abgestorbenes Pflanzenmaterial eine der Hauptquellen für Kohlenstoff und organisches Material dar. Um am Abbau von Pflanzenmaterial beteiligte Bakterien zu identifizieren und die funktionelle Rolle der *Acidobacteria* im Boden genauer zu verstehen, wurde über stabile Isotopenbeprobung (SIP) der Abbau von Weizenblättern und -wurzeln exemplarisch in einem Grünland- und einem Waldboden über sieben Tage verfolgt (siehe Kapitel 2.2.). Die daran beteiligten Bakterien wurden über T-RFLP-Analysen und (Pyro)Sequenzierung der 16S rRNA identifiziert.

Der Boden für die Inkubationsansätze stammte von einer Grünland- (HEG4) sowie einer Waldfläche (HEW11) der Probenahme im Oktober 2009 im Hainich und wurde 40 Tage bei 20 °C im Dunkeln vorinkubiert um im Boden vorhandene Nährstoffe abzubauen. Das Experiment wurde durch Zugabe von 15 mg ¹³C-markierten Weizenblättern oder -wurzeln zu je 3 g Grünland- oder Waldboden gestartet. Zur Kontrolle wurde der Boden auch mit unmarkierten Weizenblättern oder -wurzeln oder ohne zusätzliches Pflanzenmaterial inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten der 7-tägigen Inkubation wurden von drei parallelen Mikrokosmen die Konzentration von CO₂ sowie seine stabile Isotopensignatur in der Gasphase gemessen (siehe Kapitel 2.3.) und Bodenproben für molekularbiologische Analysen genommen.

Über den gesamten Zeitverlauf der Inkubation assimilierte die mikrobielle Gemeinschaft in allen Mikrokosmen aktiv Kohlenstoff, was durch die ansteigende CO₂-Konzentration gezeigt werden konnte. Aber in Mikrokosmen mit Weizenmaterial war die Produktionsrate an CO₂ höher als in Kontrollmikrokosmen nur mit Boden (Abb. 23A). Im Waldboden führte die Zugabe von Weizen zu einer mehr als zweifachen Erhöhung der CO₂-Produktion (von 6 auf ~14 μmol CO₂ g⁻¹) während der Inkubation, im Grünlandboden war der Anstieg fast dreifach höher (von 7 auf ~20 μmol CO₂ g⁻¹). Weiterhin führte die Zugabe von Wurzeln zu einer niedrigeren CO₂-Freisetzung verglichen mit Blättern (~15 und ~19 μmol CO₂ g⁻¹, Abb. 20A). In den Inkubationen mit ¹³C-Weizenstroh waren schon nach 24 h 20-38% des Gesamt-CO₂ ¹³C-markiert. Allerdings schien die Weizenblätter und -wurzeln abbauende Gemeinschaft nach 24 h im Waldboden (0,72 und 1,71 μmol ¹³CO₂ g⁻¹) sehr aktiv im Vergleich zum Grünlandboden (0,27 und 0,9 μmol ¹³CO₂ g⁻¹). Außerdem kann vermutet werden, dass Weizenwurzeln (29 und 38% ¹³CO₂) leichter abbaubar waren als Weizenblätter (20 und 30% ¹³CO₂). Nach 48 h erreichte der Anteil von ¹³CO₂ am Gesamt-CO₂ bereits in den Inkubationen von Grünlandboden mit Weizenwurzeln, Waldboden mit Weizenblättern sowie Waldboden mit Weizenwurzeln das Maximum von 34, 36 und 48%.

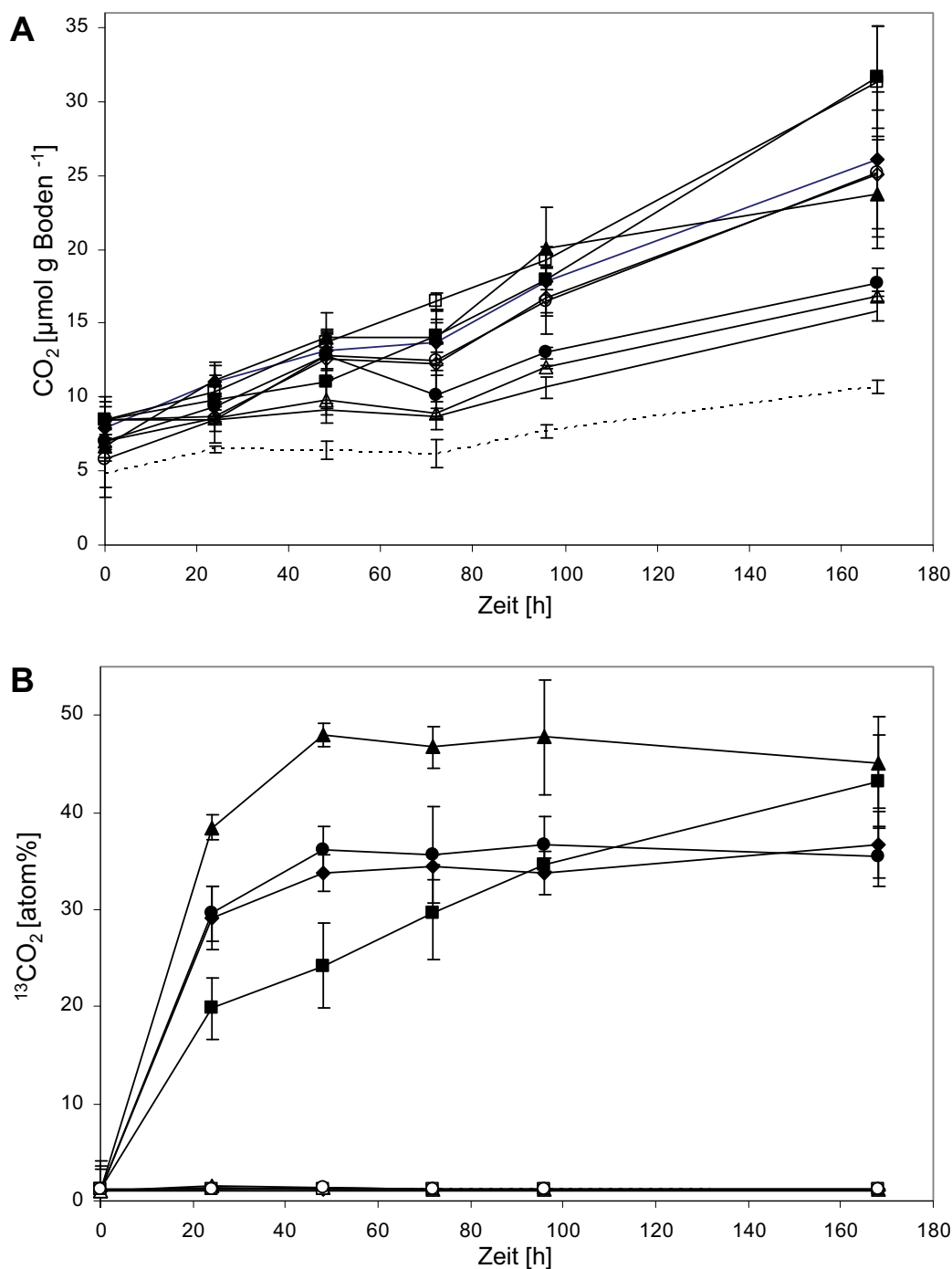
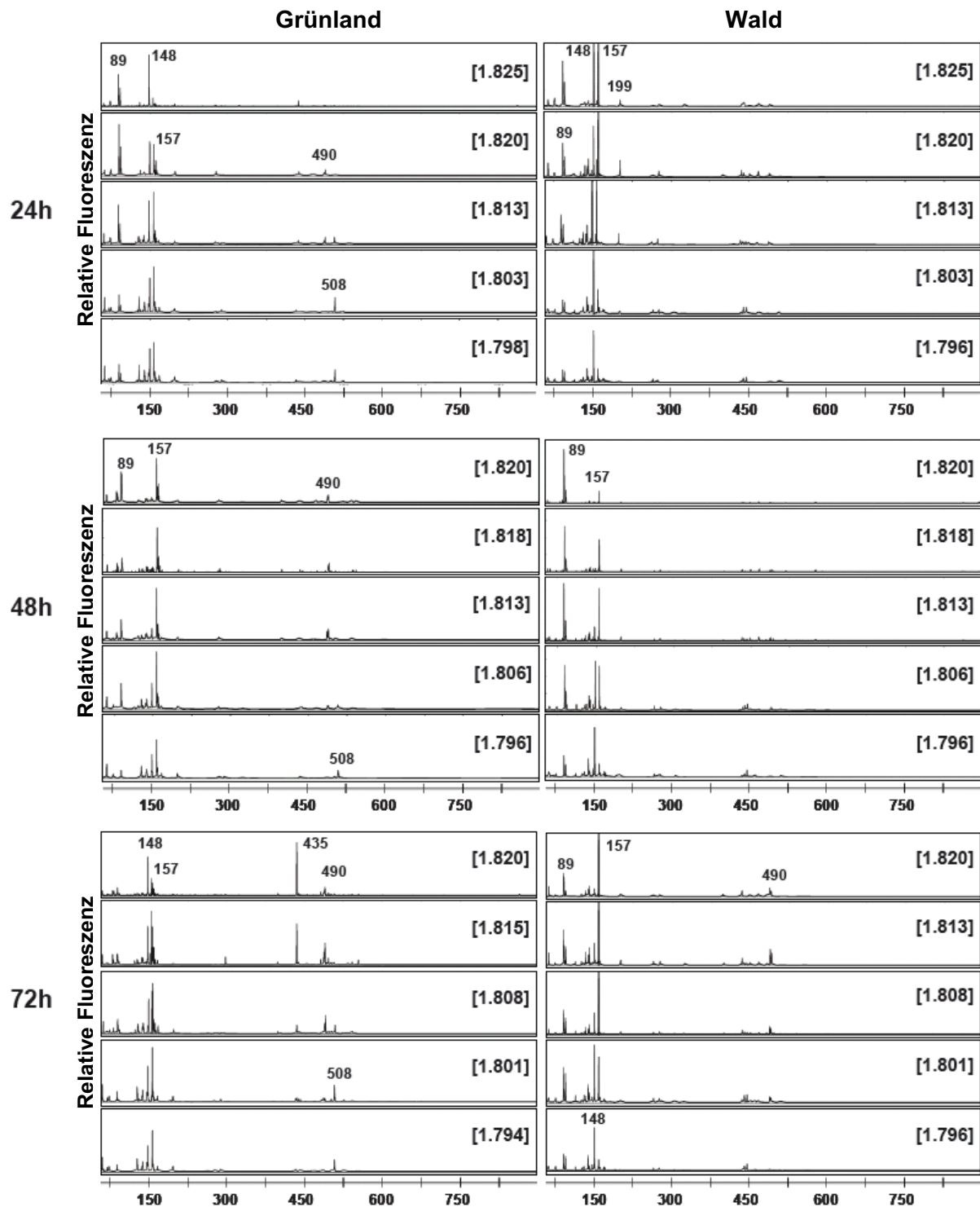


Abbildung 23. Bildung von Gesamt-CO₂ (A) und ¹³CO₂ (B) in der Gasphase der Mikrokosmen über eine Inkubationsdauer von 7 Tagen. Es wurden Mittelwerte (n=3) ± SD aufgetragen. Grünlandboden ohne Zusatz (—), inkubiert mit ¹³C-Weizenwurzeln (♦) oder -blättern (■) und ¹²C-Weizenwurzeln (◊) oder -blättern (□); Waldboden ohne Zusatz (—), inkubiert mit ¹³C-Weizenwurzeln (▲) oder -blättern (●) und ¹²C-Weizenwurzeln (△) oder -blättern (○).

Nur der mit ¹³C-Weizenblättern inkubierte Grünlandboden zeigte kontinuierlich steigende ¹³CO₂-Werte (24 h: 20%, 48 h: 24%, 72 h: 30%, 96 h: 35%, 168 h: 43%, Abb. 20B) und erreichte damit nach 7 Tagen fast das Maximum der Inkubation von Waldboden mit Weizenwurzeln (48 % ¹³CO₂ nach 48 h, Abb. 23B). Die Kontrollmikrokosmen mit Grünland- oder Waldboden ohne Pflanzenmaterial bzw. mit unmarkierten Weizenblättern

oder -wurzeln zeigten keine ^{13}C -Produktion (atmosphärischer Gehalt von $\sim 1.01\%$ ^{13}C , Abb. 23B).

Nach 24, 48, 72, 96 und 168 h der Inkubation, wurde die Gesamt-RNA von Grünland- und Waldboden inkubiert mit ^{13}C - oder unmarkierten Weizenblättern oder -wurzeln extrahiert. Die mit ^{13}C angereicherte ‚schwere‘ RNA wurde von unmarkierter ‚leichter‘ RNA



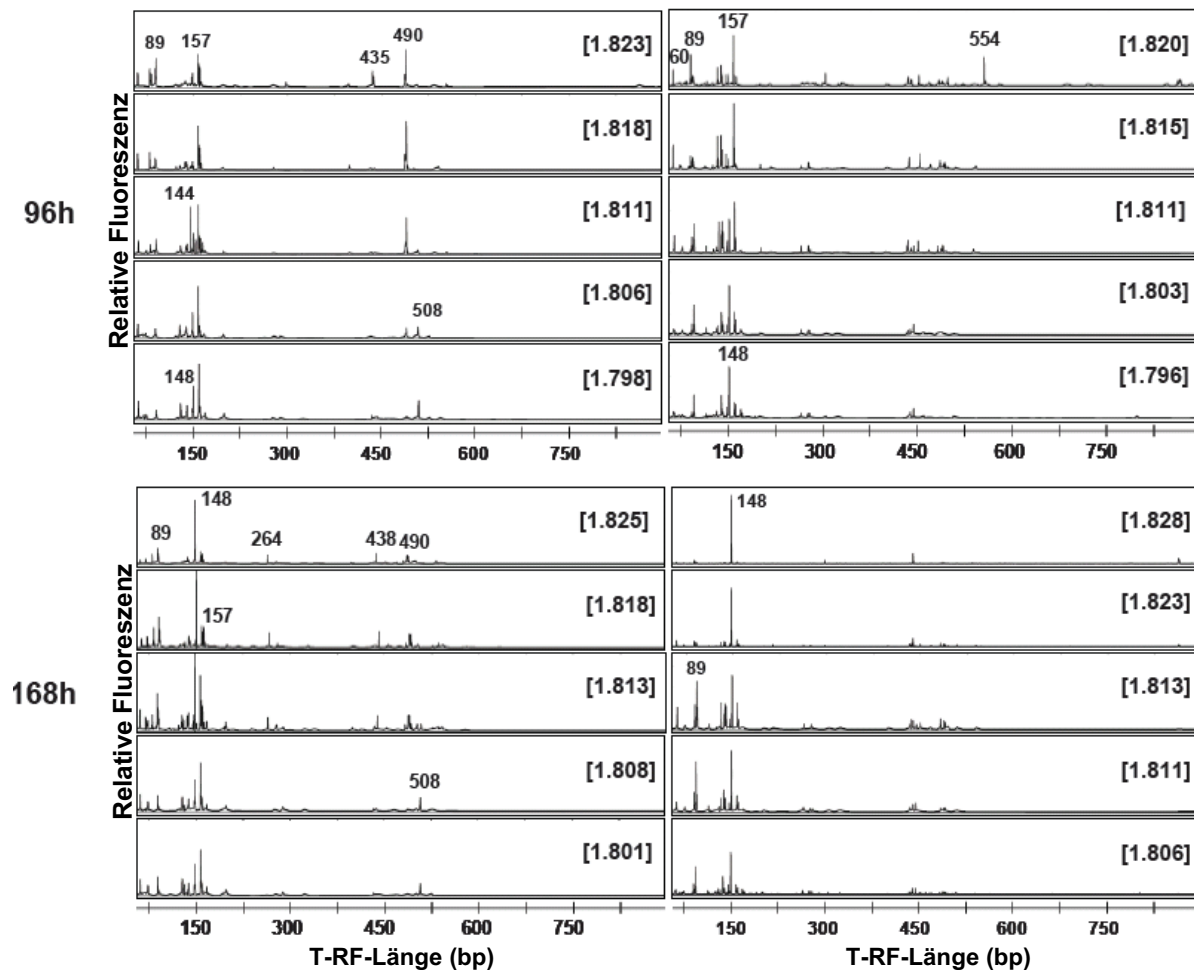


Abbildung 24. Terminale Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-(T-RFLP)-Analysen der nach Dichte aufgetrennten bakteriellen 16S rRNA von ausgewählten ‚leichten‘ und ‚schweren‘ Cäsiumtrifluoracetat-(CsTFA)-Gradientenfractionen der mit ^{13}C -markierten Weizenwurzeln für 24, 48, 72, 96 und 168 Stunden inkubierten Grünland- und Waldbodenmikrokosmen. Die Länge der wichtigsten T-RFs (bp) und die Dichte (g ml^{-1}) der einzelnen Fractionen ist angegeben.

durch Dichtegradientenzentrifugation getrennt. Typischerweise hat vollständig ^{13}C -markierte rRNA eine Dichte (BD) von $1,81\text{-}1,82 \text{ g ml}^{-1}$ in Cäsiumtrifluoracetat (CsTFA) (Lueders *et al.*, 2004a). Die bakterielle 16S rRNA der Gradientenfractionen wurde über T-RFLP-, *fingerprinting*‘ analysiert um die Mitglieder der mikrobiellen Gemeinschaft zu identifizieren, die die ^{13}C -Markierung am effektivsten in ihre RNA eingebaut haben und somit aktiv am Abbau von Weizenmaterial beteiligt waren. Die Profile der bakteriellen 16S rRNA aller Gradientenfractionen zeigten, dass unterschiedliche Populationen an der Assimilierung von ^{13}C aus Weizen beteiligt waren, abhängig vom Zeitpunkt der Inkubation, der Art des Weizenmaterials und dem Boden (Abb. 24, 25, Anhang Abb. 10). Schon nach 24 h konnte eine Veränderung in den Profilen der bakteriellen Gemeinschaft von ‚leichten‘ ($\text{BD} < 1,80 \text{ g ml}^{-1}$) zu ‚schweren‘ ($\text{BD} > 1,81 \text{ g ml}^{-1}$) Gradientenfractionen für Grünland- und Waldbodeninkubationen mit ^{13}C -Wurzeln oder -Blättern festgestellt werden

Boden/Kontrolle

¹²C-Weizenwurzeln

¹³C-Weizenwurzeln

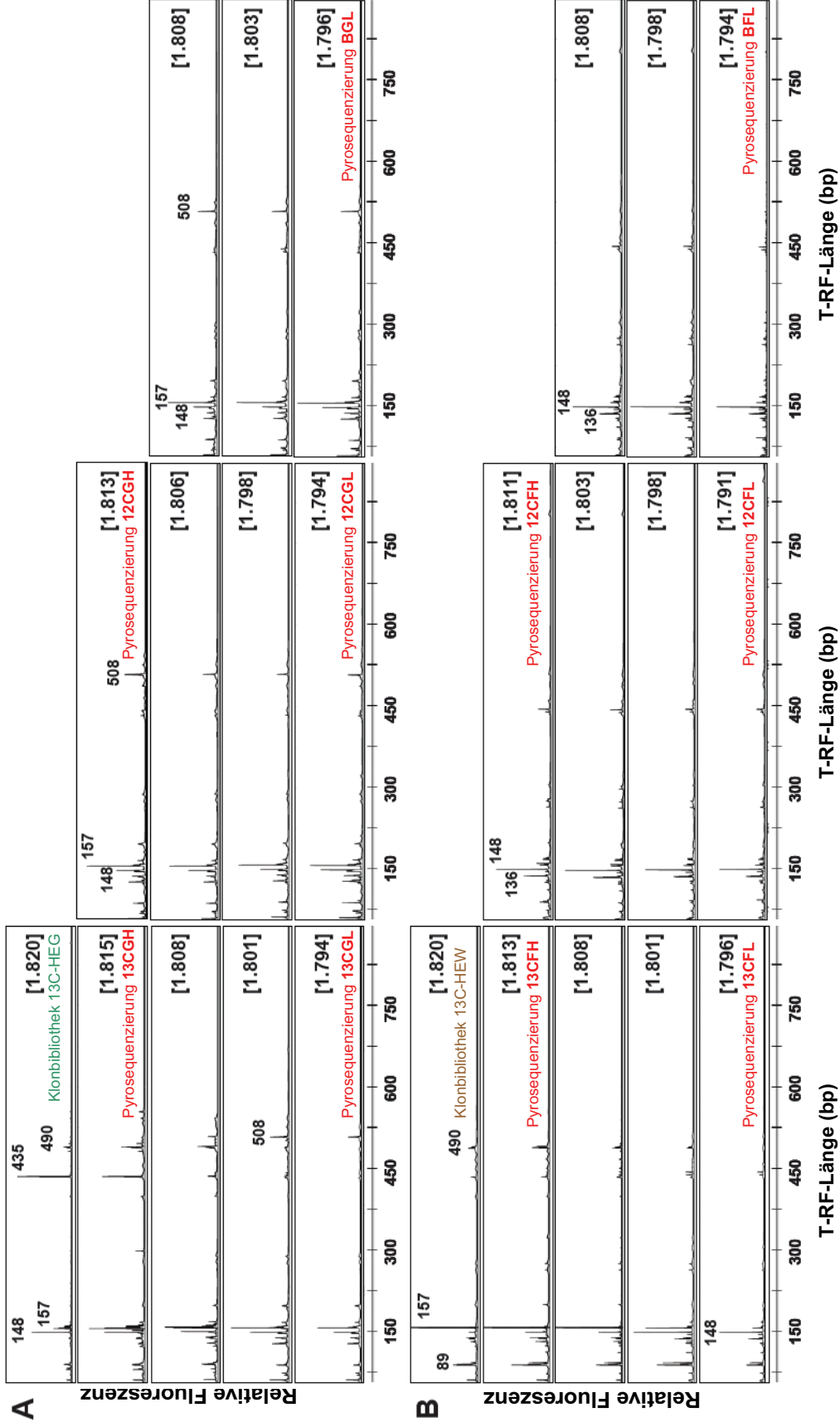


Abbildung 25. Terminale Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus-(T-RFLP)-Analysen der nach Dichte aufgetrennten bakteriellen 16S rRNA von ausgewählten ‚leichten‘ und ‚schweren‘ Cäsiumtrifluoracetat-(CsTFA)-Gradientenfraktionen der mit ¹³C-markierten Weizenwurzeln, ¹²C-markierten Weizenwurzeln oder ohne zusätzliches Pflanzenmaterial für 72 Stunden inkubierten Grünland-(A) und Waldbodenmikrokosmen (B). Die Länge der wichtigsten T-RFs (bp) und die Dichte (g ml⁻¹) der einzelnen Fraktionen ist angegeben.

(Abb. 24, Anhang Abb. 10). In den Weizenwurzel-Inkubationen des Grünland- als auch des Waldbodens waren die T-RFs 89, 148 und/oder 157 bp nach 24 h in den ‚schweren‘ Fraktionen abundanter als in den ‚leichten‘ Fraktionen. Nach 48 h war das T-RF 148 bp allerdings nur noch in den ‚leichten‘ Fraktionen abundant zu finden. Nach drei Tagen Inkubation des Grünlandbodens mit ^{13}C -Weizenwurzeln zeigten sich die T-RFs 435 und 490 bp in den ‚schweren‘ Fraktionen, die T-RFs 148 und 157 bp waren hingegen in allen Fraktionen abundant. Die Abundanz des T-RF 490 bp nahm in den ‚schweren‘ Fraktionen der Grünlandboden-Inkubationen nach 96 h sogar noch zu. Im Waldboden waren nach 72 h die T-RFs 89, 157 und 490 bp in ‚schweren‘ Fraktionen abundanter verglichen mit ‚leichten‘ Fraktionen. Nach vier Tagen Inkubation schien die Weizenwurzeln abbauende bakterielle Gemeinschaft diverser zu werden mit z.B. einem zusätzlichen Peak bei 554 bp. Am Ende der 7-tägigen Inkubation mit Weizenwurzeln dominierte in den ‚schweren‘ Fraktionen sowohl im Grünland- als auch im Waldboden nur noch das T-RF 148 bp (Abb. 24).

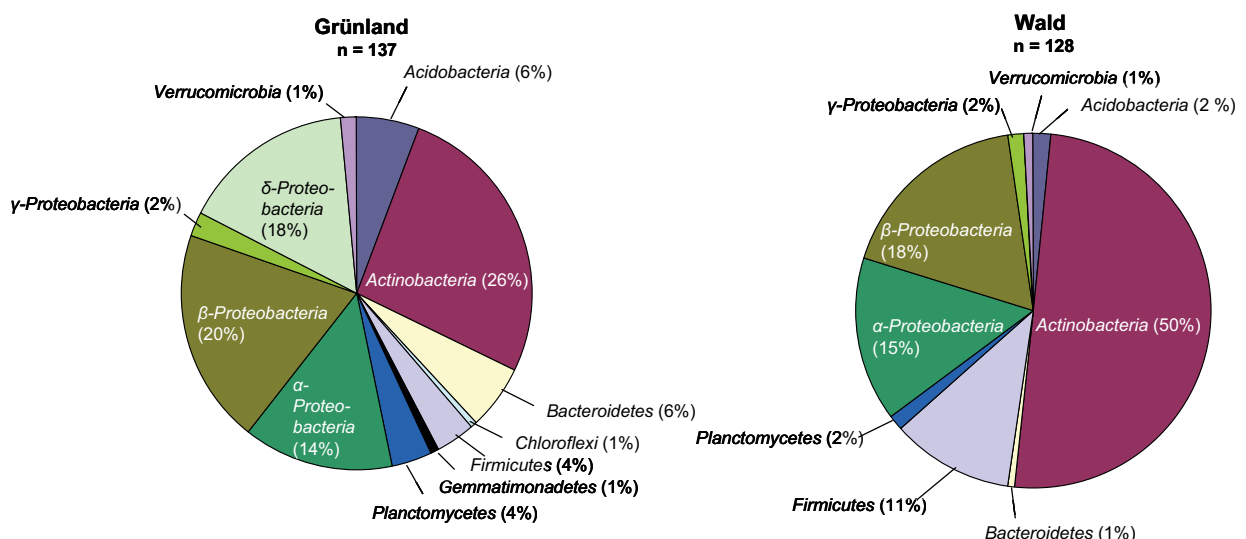


Abbildung 26. Zuordnung der 16S rRNA-Klonsequenzen der ‚schweren‘ CsTFA-Gradientenfraktionen ($1,82 \text{ g ml}^{-1}$) der Grünland- und Waldbodenmikrokosmen inkubiert für 72 h mit ^{13}C -Weizenwurzeln zu verschiedenen Bacteria-Phyla.

Die T-RFLP-Profile für beide Weizenmaterialien, Wurzeln und Blätter, schienen in Grünland- und Waldboden auf den ersten Blick sehr ähnlich zueinander. In den Inkubationen mit Weizenblättern zählte das T-RF 89 bp allerdings schon nach 48 h nicht mehr zu den dominierenden im Waldboden. Außerdem tauchte das T-RF 435 bp in den Grünlandböden und das T-RF 490 bp in den Waldböden kaum auf. Dagegen war in den Weizenblatt-Inkubationen nach 96 h das 554-bp-T-RF in den ‚schweren‘ Fraktionen beider Böden vertreten und im Waldboden zusätzlich ein T-RF von 438 bp (Anhang Abb. 10).

Tabelle 21. Zuordnung der 16S rRNA-Sequenzen der ‚schweren‘ CsTFA-Gradientenfraktionen (1,82 g ml⁻¹) der Grünland- und Waldbodenmikrokosmen inkubiert für 72 h mit ¹³C-Weizenwurzeln zu verschiedenen *Bacteria*-Phyla. Charakteristische *in silico* T-RFs (bp) der verschiedenen phylogenetischen Gruppen, die mehr als eine Sequenz repräsentieren, sind hervorgehoben und entsprechende *in vivo* T-RFs angegeben.

Phylogenetische Gruppe	Grünland Klone (n)	Wald Klone (n)	<i>in silico</i> T-RFs (bp)	<i>in vitro</i> T-RFs (bp) ¹
Acidobacteria	8	2		
Gp1		2	265	
Gp4	1		95	
Gp6	7		200, 216 , 228, 292/294	290
Actinobacteria	36	64		
<i>Acidimicrobidae</i>	3		170 , 527	
<i>Actinobacteridae</i>	26	64	67, 141 , 147, 159/161/163	140-144, 155-162,
<i>Streptomycetaceae</i>	2	44	157, 159 , 163, 169	155-162
<i>Rubrobacteridae</i>	7		132 , 140/142 , 527	131-135, 137-145
Bacteroidetes	8	1		
<i>Flavobacteria</i>	5		83/85/87	81-90
<i>Sphingobacteria</i>	3	1	79, 93, 207, 485	
Chloroflexi	1		174	
Firmicutes	5	14		
<i>Bacillaceae</i>	1	8	145/147 , 151/153	144-148, 155/156
<i>Paenibacillaceae</i>	2	6	153 , 159/161	155/156, 157/159
<i>Staphylococcaceae</i>	2		82	
Gemmatimonadetes	1		77	
Planctomycetes	5	2	66/68, 122, 127, 132, 166, 743	
Proteobacteria	71	44		
α-Proteobacteria	19	19		
<i>Caulobacterales</i>		1	437	
<i>Geminicoccus</i>	2		150/152	
<i>Rhizobiales</i>	14	14	79, 108, 128 , 150/152 , 401, 437	127/128, 148/154, 434/438
<i>Rhodobacterales</i>	3	1	119, 152, 439, 455	
<i>Rhodospirillales</i>		3	67, 445	
β-Proteobacteria	27	23		
<i>Alcanigenaceae</i>	1		141	
<i>Burkholderiaceae</i>	11	2	141 , 414, 436 , 481	138-144, 434/438
<i>Burkholderiales</i> ²	2	1	134, 141	
<i>Comamonadaceae</i>	3	6	141, 490	487/490
<i>Oxalobacteriaceae</i>	10	14	483, 488/490	487/490
γ-Proteobacteria	3	2		
<i>Moraxellaceae</i>	3		299	
<i>Pseudomonadaceae</i>		1	490	
<i>Xanthomonadaceae</i>		1	452	
δ-Proteobacteria	22			
<i>Cystobacteraceae</i>	12		127, 158/160	157/158/160
<i>Desulfuromonadales</i>	2		506	
<i>Nannocystinae</i>	3		128, 132, 216	
<i>Soranginae</i>	5		78 , 219, 504	
Verrucomicrobia	2	1	126, 169, 479	

¹ ± 3 bp ausgehend von *in silico* T-RFs

² *incertae sedis*

Nach einer Inkubation von 72 h wurde die Weizenwurzeln abbauende mikrobielle Gemeinschaft genauer charakterisiert, indem unter anderem die T-RFLP-Profile der ¹³C- mit denen der Kontrollinkubationen (¹²C und Boden) verglichen wurde (Abb. 25). In ¹²C- und Bodeninkubationen konnte nur für weniger ‚schwere‘ oder sogar nur die ‚leichten‘ Fraktionen nach 72 h ein PCR-Produkt erhalten werden. Die daraus resultierenden T-RFLP-Profile waren vergleichbar mit der ‚leichten‘ Fraktionen der ¹³C-Inkubation,

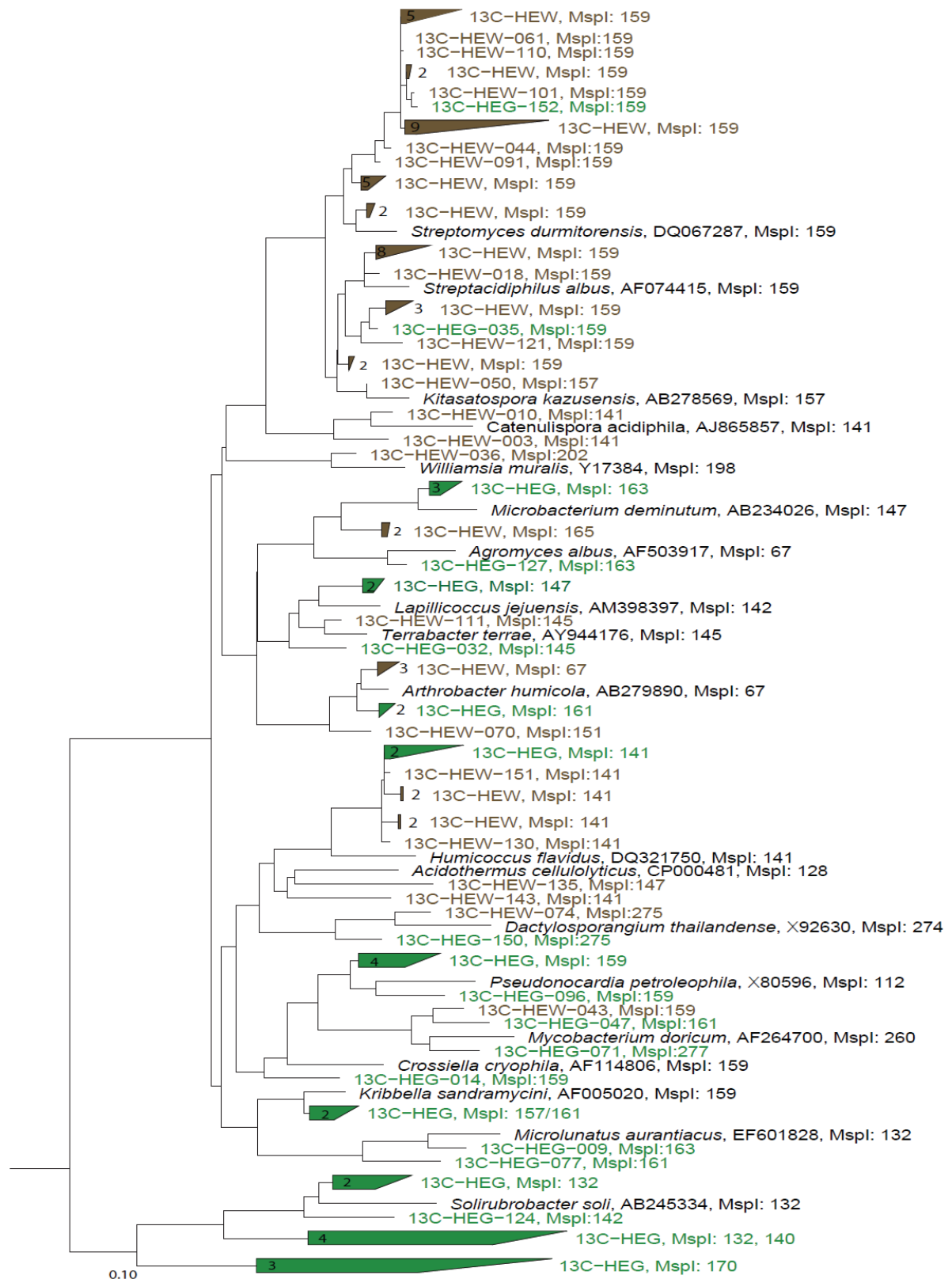


Abbildung 27. Neighbour-Joining-Baum der 16S rDNA-Sequenzen der Actinobacteria der 'schweren' Fraktion (BD 1,82 g ml⁻¹) der Grünland- (13C-HEG) und Waldboden-Inkubationen (13C-HEW) nach 72 Stunden. T-RF-Längen (bp) wurden mittels *in silico*-Verdau der 16S rDNA-Sequenzen mit dem Restriktionsenzym *MspI* bestimmt. Der Maßstab stellt 10% Sequenzunterschied dar, GenBank 'accession numbers' der Referenzsequenzen sind angegeben.

wohingegen sich die aktiv Weizenwurzeln abbauende Bakteriengemeinschaft, repräsentiert durch die T-RFs bei 89, 148, 157, 435 und 490 bp in den ‚schweren‘ Fraktionen der ^{13}C -Inkubation nach 72 h, deutlich davon unterscheidet (Abb. 25).

Nach 72 h wurde die 16S rRNA der ‚schweren‘ Fraktionen (BD $1,82 \text{ g ml}^{-1}$) der ^{13}C -Weizenwurzel-Inkubationen von Grünland- und Waldboden revers transkribiert, die cDNA amplifiziert, über Klonierung vereinzelt und sequenziert, um an der Assimilierung von Kohlenstoff aus Weizen aktiv beteiligte Bakterien zu identifizieren und diese den beobachteten T-RFs zuordnen zu können. Die Sequenzierung und Analyse von 137 und 128 Klonen der ‚schweren‘ Fraktion von Grünland- und Waldboden erlaubte die phylogenetische Zuordnung der bakteriellen Sequenzen mit einer Abdeckung der Diversität (*Coverage*, 3% Sequenzunterschied als Abgrenzung zwischen Arten (Stackebrandt und Goebel, 1994)) von 50 und 77%. Die vergleichende Sequenzanalyse zeigte entsprechend eine diversere Weizen abbauende Bakteriengemeinschaft im Grünland- (Anzahl der OTUs: 87, Shannon-Index: $H=4,2$) als im Waldboden (Anzahl der OTUs: 51, Shannon-Index: $H=3,5$). Die ‚schwere‘ Fraktion im Grünlandboden wurde von *Actinobacteria*, β -, δ - und α -*Proteobacteria*, *Acidobacteria* und *Bacteroidetes* dominiert, wohingegen im Waldboden *Actinobacteria*, β - und α -*Proteobacteria* und *Firmicutes* vorherrschten (Abb. 26, 27, Tab. 21, Anhang Abb. 11-15). Laut RDP-Klassifizierung (*‘Ribosomal Database Project‘*, (Cole et al., 2009)) der Sequenzen stellen im Grünlandboden *Ralstonia* (β -*Proteobacteria*), *Cystobacter* (δ -*Proteobacteria*), *Massilia* (β -*Proteobacteria*), *Pseudonocardia* (*Actinobacteria*, Abb. 24), *Flavobacterium* (*Bacteroidetes*) und *Afipia* (α -*Proteobacteria*) die abundantesten Gattungen (≥ 5 Klone). Im Waldboden dagegen dominierten *Streptomyces* (*Actinobacteria*, Abb. 27), *Streptacidiphilus* (*Actinobacteria*, Abb. 24), *Bacillus* (*Firmicutes*), *Kitasatospora* (*Actinobacteria*, Abb. 27), *Humicoccus* (*Actinobacteria*, Abb. 27), *Paenibacillus* (*Firmicutes*), *Massilia* (β -*Proteobacteria*) und *Bradyrhizobium* (α -*Proteobacteria*). Die *in silico* T-RFLP-Analyse der erhaltenen Klonsequenzen erlaubte es die beobachteten *in vivo* T-RFs verschiedenen phylogenetischen Gruppen zuzuordnen. So konnte das T-RF 148 bp *Rhizobiales* und *Bacillaceae*, T-RF 157 bp *Actinobacteridae*, *Paenibacillaceae* und *Cystobacteraceae*, T-RF 435 bp *Burkholderiaceae* und T-RF 490 bp *Comamonadaceae* und *Oxalobacteraceae* zugeordnet werden (Tab. 21).

Zusätzlich wurde die bakterielle 16S rRNA in den ‚schweren‘ ($\sim \text{BD } 1,815 \text{ g ml}^{-1}$) und ‚leichten‘ ($\sim \text{BD } 1,795 \text{ g ml}^{-1}$) Fraktionen der ^{13}C - und ^{12}C -Inkubationen mit Weizenwurzeln sowie von Grünland- und Waldboden ohne Zusatz von Weizenwurzeln nach 72 h mittels 454-Pyrosequenzierung analysiert. Die verwendeten Fraktionen sind in Abbildung 25 gekennzeichnet. Alle zehn Proben enthielten einen individuellen Barcode,

wurden zu gleichen Anteilen gemischt, analysiert und die Ergebnisse entsprechend der Barcodes nach Proben getrennt. Insgesamt wurden 450.710 Sequenzen erhalten, etwa 42% davon entsprachen jedoch nicht den festgelegten Qualitätskriterien und wurden für weitere Analysen entfernt. Dieser relativ große Anteil an Sequenzen geringer Qualität kann durch viele kurze Sequenzen erklärt werden, die Primer-Dimere mit einer Größe von > 70 bp darstellen, die durch die Aufreinigung der PCR-Produkte mit dem MinElute-Kit (Qiagen, Hilden) vor der Pyrosequenzierung nicht erfolgreich entfernt werden konnten. Zur weiteren Analyse konnten dennoch 259.822 partielle bakterielle 16S rRNA-Sequenzen mit einer mittleren Sequenzlänge von 392 bp verwendet werden. Die Anzahl

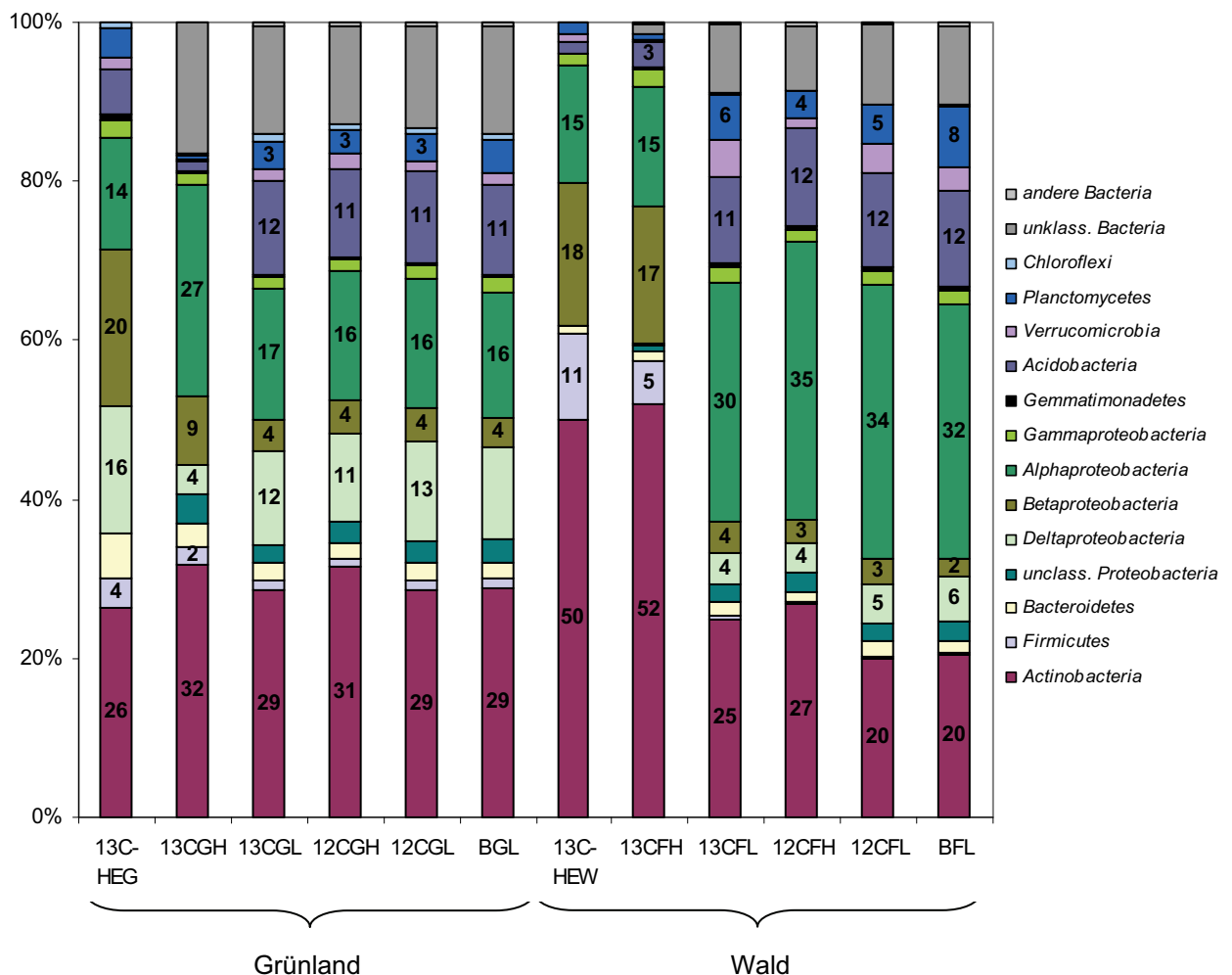


Abbildung 28. Phylogenetische Zuordnung der 16S rRNA-Sequenzen der 454-Pyrosequenzierung (RDP Classifier) der ‚schweren‘ (H, $BD > 1,81 \text{ g ml}^{-1}$) und ‚leichten‘ (L, $BD < 1,81 \text{ g ml}^{-1}$) CsTFA-Gradientenfraktionen von Grünlandböden (BGL) inkubiert mit ^{13}C -Weizenwurzeln (13CGH und 13CGL) oder ^{12}C -Weizenwurzeln (12CGH und 12CGL) und von Waldböden (BFL) inkubiert mit ^{13}C -Weizenwurzeln (13CFH und 13CFL) oder ^{12}C -Weizenwurzeln (12CFH und 12CFL). Zum direkten Vergleich von Pyrosequenzierung und Klonbibliotheken ist auch die Zugehörigkeit der 16S rRNA-Klonsequenzen der ‚schweren‘ CsTFA-Gradientenfraktionen ($1,82 \text{ g ml}^{-1}$) der Grünland- (13C-HEG) und Waldbodenmikrokosmen (13C-HEW) inkubiert für 72 h mit ^{13}C -Weizenwurzeln zu verschiedenen *Bacteria*-Phyla angegeben.

der Sequenzen pro Probe variierte zwischen 17.669 und 60.180 (Tab. 22). Die Diskrepanz zwischen der Anzahl der Cluster und der Schätzung des Artenreichtums mittels Chao1 zeigt, dass selbst mit dieser hohen Zahl an Sequenzen noch nicht alle Phylotypen der Proben detektiert wurden. Die Shannon-Diversität der bakteriellen Gemeinschaften war in

Tabelle 23. Phylogenetische Zuordnung (RDP Classifier) der 16S rRNA-Sequenzen der 454-Pyrosequenzierung der ‚schweren‘ (H, BD > 1,81 g ml⁻¹) und ‚leichten‘ (L, BD < 1,81 g ml⁻¹) CsTFA-Gradientenfraktionen von Grünlandboden (BGL) inkubiert mit ¹³C-Weizenwurzeln (13CGH und 13CGL) oder ¹²C-Weizenwurzeln (12CGH und 12CGL) und von Waldboden (BFL) inkubiert mit ¹³C-Weizenwurzeln (13CFH und 13CFL) oder ¹²C-Weizenwurzeln (12CFH und 12CFL). Der prozentuale Anteil jeder taxonomischen Gruppe ist dargestellt. Am Abbau von Weizenwurzeln beteiligte Phyla oder -klassen sind fett hervorgehoben.

Phylum Klasse	Grünland					Wald				
	13CGH	13CGL	12CGH	12CGL	BGL	13CFH	13CFL	12CFH	12CFL	BFL
unklass. Bacteria	16,47	13,57	12,22	12,84	13,41	1,33	8,63	8,17	9,91	10,01
OD1	-	0,01	0,00	-	-	-	-	-	-	-
BRC1	-	0,01	0,01	0,00	0,02	-	0,01	0,01	-	-
Actinobacteria	31,80	28,60	31,43	28,63	28,84	52,04	24,79	26,89	19,97	20,34
<i>Acidimicrobidae</i>	0,36	1,35	1,68	1,85	1,44	0,06	0,52	0,72	0,53	0,45
<i>Rubrobacteridae</i>	0,8	5,31	3,92	4,54	4,46	0,22	1,63	1,33	1,67	1,50
<i>Actinobacteridae</i>	29,05	20,76	24,62	21,17	21,69	51,63	21,88	24,07	17,00	17,41
Firmicutes	2,20	1,20	1,07	1,17	1,25	5,26	0,66	0,27	0,29	0,30
<i>Bacilli</i>	1,98	0,89	0,73	0,75	0,90	5,23	0,61	0,23	0,26	0,27
<i>Clostridia</i>	0,10	0,25	0,28	0,37	0,27	0,00	0,05	0,04	0,03	0,02
TM7	0,03	0,01	0,01	0,02	0,01	0,24	0,03	0,01	0,01	0,01
Spirochaetes	-	-	0,02	-	0,00	-	-	-	-	-
Bacteroidetes	2,91	2,13	2,02	2,14	2,03	1,21	1,55	1,20	2,00	1,59
<i>Sphingobacteria</i>	1,30	1,43	1,20	1,24	1,34	1,09	1,21	0,83	1,51	1,13
<i>Flavobacteria</i>	1,28	0,19	0,24	0,25	0,14	0,02	0,15	0,11	0,20	0,13
Proteobacteria	44,21	36,17	35,68	37,53	35,79	35,67	42,25	45,59	46,52	44,14
δ-Proteobacteria	3,90	11,84	11,25	12,67	11,63	0,28	4,12	3,56	4,81	5,67
β-Proteobacteria	8,50	3,89	4,04	4,25	3,70	17,32	3,95	3,11	3,18	2,16
α-Proteobacteria	26,53	16,50	16,41	16,21	15,85	14,88	29,87	34,99	34,45	32,15
γ-Proteobacteria	1,66	1,53	1,41	1,69	1,86	2,38	2,06	1,44	1,89	1,75
Nitrospira	0,01	0,46	0,41	0,42	0,43	0,01	0,10	0,18	0,11	0,16
Gemmatimonadetes	0,04	0,18	0,22	0,28	0,25	0,07	0,45	0,45	0,42	0,42
Acidobacteria	1,44	11,70	11,02	11,40	11,37	3,38	10,91	12,27	11,94	12,08
Gp1	0,00	0,01	0,02	0,03	0,01	2,51	4,42	4,96	4,41	4,73
Gp2	-	0,01	-	0,00	-	0,14	1,27	1,02	1,12	0,95
Gp3	0,08	0,13	0,59	0,24	0,20	0,27	0,50	1,74	0,70	0,94
Gp4	0,05	0,69	0,49	0,55	0,64	0,02	0,47	0,54	0,70	0,59
Gp5	0,09	0,53	0,49	0,46	0,45	0,02	0,45	0,43	0,56	0,54
Gp6	1,00	7,29	6,72	7,12	7,02	0,27	2,77	2,34	2,91	2,88
Gp7	0,01	0,14	0,13	0,18	0,17	0,01	0,11	0,10	0,17	0,16
Gp11	0,02	0,25	0,36	0,28	0,22	0,01	0,06	0,10	0,10	0,08
Gp16	0,08	1,94	1,60	1,73	1,94	0,06	0,57	0,71	0,97	0,80
Gp17	0,04	0,49	0,40	0,55	0,50	-	0,08	0,11	0,12	0,16
Gp22	-	0,12	0,09	0,17	0,08	0,00	0,09	0,06	0,10	0,15
Verrucomicrobia	0,22	1,57	1,93	1,37	1,54	0,06	4,53	1,15	3,55	3,00
<i>Spartobacteria</i>	0,05	0,32	0,54	0,27	0,36	0,04	2,31	0,56	1,50	1,44
<i>Opitutae</i>	0,05	0,32	0,37	0,51	0,29	0,01	0,11	0,09	0,21	0,18
Subdivision3	0,05	0,75	0,82	0,50	0,72	0,01	1,72	0,37	1,58	1,13
WS3	-	0,02	0,01	0,04	0,00	-	0,05	0,03	0,04	0,06
Planctomycetes	0,47	3,40	3,07	3,33	4,22	0,70	5,85	3,50	4,90	7,54
Cyanobacteria	0,01	0,06	0,05	0,05	0,05	0,00	-	-	-	0,01
OP10	-	0,01	0,02	0,01	0,02	-	0,01	0,02	0,02	0,01
Chloroflexi	0,18	0,89	0,79	0,76	0,76	0,00	0,05	0,11	0,17	0,15
Bacteria inc. sed.	-	0,01	-	-	-	0,01	0,16	0,15	0,15	0,18

Inkubationen mit Grünlandboden generell höher als in denen mit Waldboden und korreliert per Definition positiv mit der Anzahl der Phylotypen und der Evenness der Gemeinschaft (Tab. 22).

Die relative Abundanz einiger *Bacteria*-Phyla und Gattungen unterschied sich zwischen den ‚schweren‘ ^{13}C -Fraktionen (13CGH und 13CFH) und den entsprechenden Kontrollen (13CGL, 12CGH, 12CGL, BGL und 13CFL, 12CFH, 12CFL, BFL, Abb. 28, 29, 30, Tab. 23, 24) und erlaubte so die Identifizierung der aktiv an der Kohlenstoff-Assimilierung ausgehend von Weizenwurzeln beteiligten und unbeteiligten Bodenbakterien. Im Grünlandboden steigerte die Zugabe von Weizenwurzeln die Aktivität von *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* und *Firmicutes* in der ‚schweren‘ ^{13}C -Fraktion verglichen

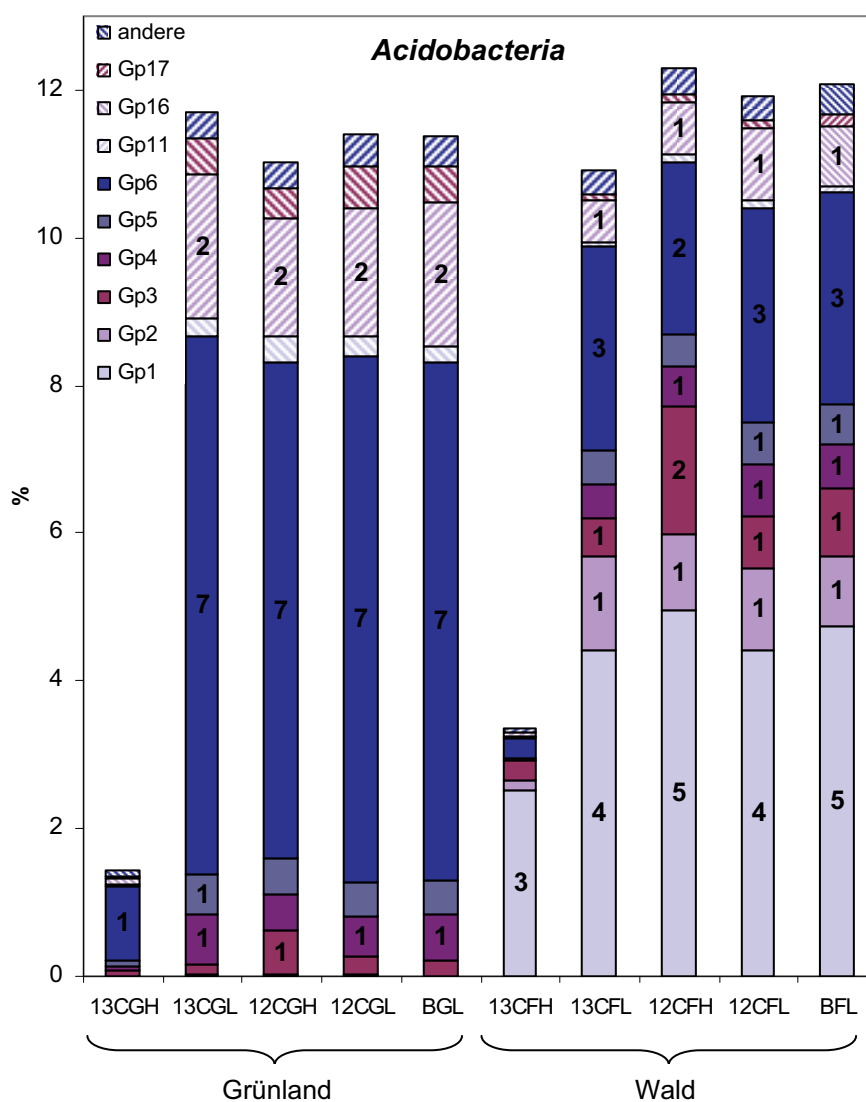


Abbildung 29. *Acidobacteria*-Untergruppen der 16S rRNA-Sequenzen der 454-Pyrosequenzierung (RDP Classifier) der ‚schweren‘ (H, BD > 1,81 g ml⁻¹) und ‚leichten‘ (L, BD < 1,81 g ml⁻¹) CsTFA-Gradientenfraktionen von Grünlandboden (BGL) inkubiert mit ^{13}C -Weizenwurzeln (13CGH und 13CGL) oder ^{12}C -Weizenwurzeln (12CGH und 12CGL) und von Waldboden (BFL) inkubiert mit ^{13}C -Weizenwurzeln (13CFH und 13CFL) oder ^{12}C -Weizenwurzeln (12CFH und 12CFL).

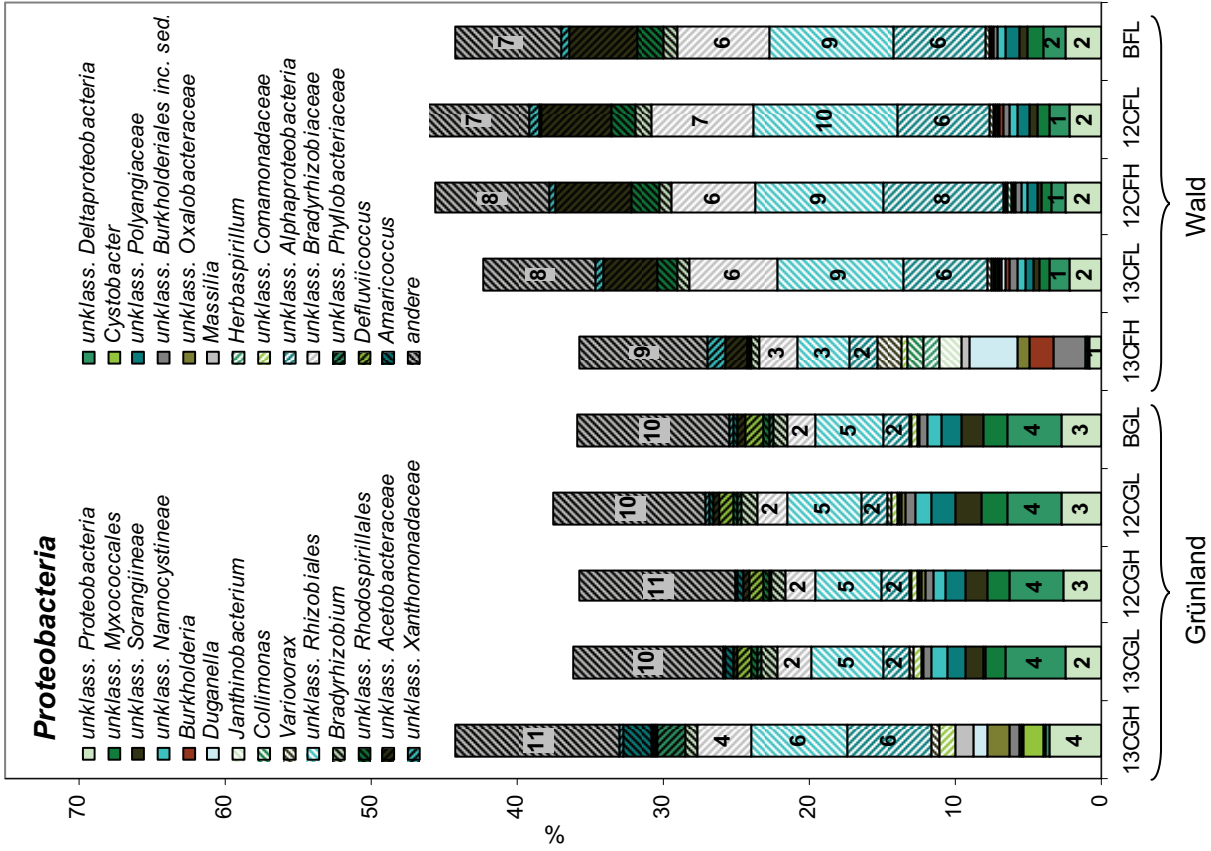
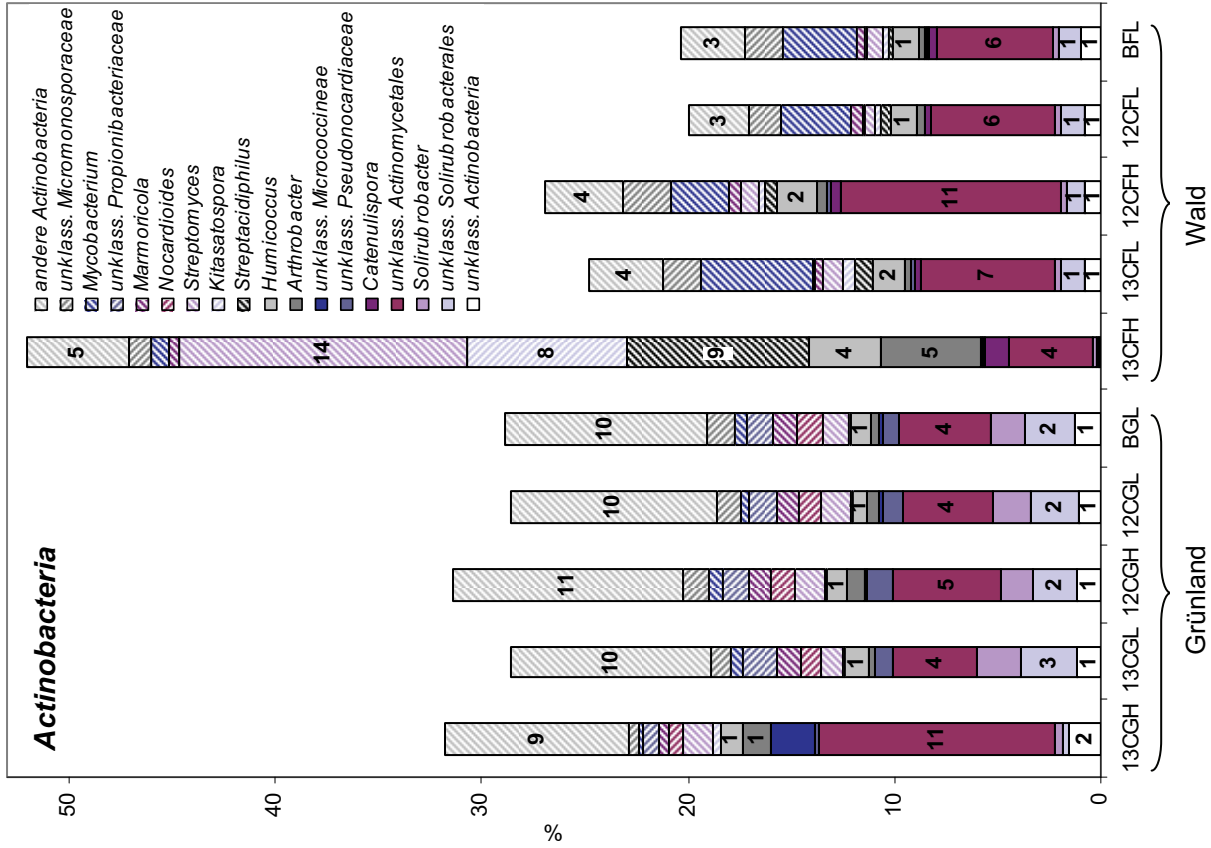


Abbildung 30. *Actinobacteria* und *Proteobacteria* der 16S rRNA-Sequenzen der 454-Pyrosequenzierung (RDP Classifier) der ‚schweren‘ (H, BD > 1,81 g ml⁻¹) und ‚leichten‘ (L, BD < 1,81 g ml⁻¹) CsTFA-Gradientenfraktionen von Grünlandboden (BGL) inkubiert mit ¹³C-Weizenwurzeln (13CGH und 13CGL) oder ¹²C-Weizenwurzeln (12CGH und 12CGL) und von Waldboden (BFL) inkubiert mit ¹³C-Weizenwurzeln (13CFH und 13CFL) oder ¹²C-Weizenwurzeln (12CFH und 12CFL).

mit der ‚leichten‘ ¹³C-Fraktion, den ¹²C- und Bodenkontrollen. Vertreter der α -*Proteobacteria* (*Amaricoccus*, *Mesorhizobium*, *Balneimonas*), β -*Proteobacteria* (*Massilia*, *Duganella*, *Variovorax*, *Pelomonas*), einige δ -*Proteobacteria* (*Cystobacter*), *Actinobacteridae* (*Arthrobacter*, *Agromyces*, *Kitasatospora*), *Flavobacterium* und *Paenibacillus* waren am aktivsten am Umsatz der Weizenwurzeln beteiligt (Abb. 28, 30, Tab. 23, 24). Dagegen sank vor allem die Aktivität der *Acidobacteria* (Abb. 29) aber auch einiger δ -*Proteobacteria* (z.B. *Geobacter*), *Rubrobacteridae*, *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia*, *Acidimicrobidae*, *Chloroflexi*, *Nitrospira* und *Gemmatimonadetes* (Tab. 23) - diese waren offenbar nicht am Abbau von Weizenwurzeln im Grünlandboden beteiligt. Im Waldboden steigerte die Zugabe von Weizenwurzeln die Aktivität der *Actinobacteria*, *Proteobacteria* und *Firmicutes* in der ‚schweren‘ ¹³C-Fraktion verglichen mit der ‚leichten‘ ¹³C-Fraktion, den ¹²C- und Bodenkontrollen. Hier schienen vor allem *Actinobacteridae* (*Streptomyces*, *Streptacidophilus*, *Kitasatospora*, *Arthrobacter*, *Catenulispora*, *Humicoccus*), β -*Proteobacteria* (*Duganella*, *Burkholderia*, *Variovorax*, *Janthinobacterium*, *Collimonas*, *Herbaspirillum*, *Ralstonia*, *Pelomonas*, *Massilia*), einige α -*Proteobacteria* (*Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Labrys*) und *Bacilli* (*Bacillus*, *Paenibacillus*) aktiv an der Umsetzung der Weizenwurzeln beteiligt zu sein (Abb. 28, 30, Tab. 23, 24). Dagegen sank auch im Waldboden vor allem die Aktivität der *Acidobacteria* (Abb. 29) aber auch einiger δ -*Proteobacteria*, α -*Proteobacteria*, *Rubrobacteridae*, *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia*, *Acidimicrobidae* und *Gemmatimonadetes* (Tab. 23).

Obwohl die *Acidobacteria* das abundanteste Phylum nach *Proteobacteria* und *Actinobacteria* sowohl im Grünland- (11%) als auch im Waldboden (12%) waren, scheinen sie nicht aktiv am Abbau von abgestorbenem Weizenmaterial beteiligt zu sein. Ihre Abundanz sank in den ‚schweren‘ Fraktionen der ¹³C-Weizenwurzelninkubationen nach 72 h auf 1 und 3%. Selbst bei Verwendung des *Acidobacteria*-spezifischen Primers Acido31F (Barns *et al.*, 1999) konnte entweder kein PCR-Produkt von ‚schweren‘ Fraktionen der ¹³C-Weizenwurzelninkubationen nach 72 h erhalten werden oder aber die daraus resultierenden T-RFLP-Profile der 16S rRNA unterschieden sich nicht von denen der entsprechenden ‚leichten‘ Fraktionen (Daten nicht gezeigt).

Die 454-Pyrosequenzierung verdeutlichte die Ergebnisse der Klonbibliotheken: im Grünland waren vor allem α - und β -*Proteobacteria* und im Wald vorrangig *Actinobacteria*, β -*Proteobacteria* und *Firmicutes* am frühen Abbau von Weizenwurzeln im Boden beteiligt.

Tabelle 24. Phylogenetische Zuordnung der 16S rRNA-Sequenzen der 454-Pyrosequenzierung (Probenbezeichnung siehe Tab. 23). Der prozentuale Anteil taxonomischer Gruppen, die in mindestens einer Inkubation mit >0,5% vorkommen, ist dargestellt. Am Abbau von ¹³C-markierten Weizenwurzeln beteiligte Gattungen sind fett hervorgehoben.

Phylum	Genus	13CGH			Grünland			Wald			BFL
		13CGH	13CGL	12CGH	12CGL	BGL	13CFH	13CFL	12CFH	12CFL	
Actinobacteria	<i>Iamia</i>	0.06	0.51	0.59	0.74	0.56	0.02	0.15	0.17	0.17	0.12
	<i>Solirubrobacter</i>	0.42	2.10	1.53	1.85	1.68	1.13	0.29	0.27	0.31	0.24
	<i>Catenulispora</i>	-	-	-	-	-	1.13	0.30	0.42	0.29	0.33
	<i>Pseudonocardia</i>	0.09	0.49	0.73	0.55	0.67	0.09	0.17	0.18	0.11	0.18
	<i>Tetrasphaera</i>	0.11	0.54	0.48	0.51	0.43	0.09	0.04	0.05	0.04	0.04
	<i>Terrabacter</i>	0.02	0.02	0.02	0.02	0.04	0.51	0.16	0.16	0.09	0.11
	<i>Arthrobacter</i>	1.33	0.27	0.84	0.59	0.42	4.75	0.23	0.52	0.30	0.29
	<i>Agaricomycetes</i>	1.60	1.01	1.06	0.91	0.73	3.53	1.55	1.87	1.27	1.26
	<i>Humicoccus</i>	1.13	1.15	0.95	0.73	1.01	8.85	0.93	0.60	0.48	0.26
	<i>Streptacidiphilus</i>	-	-	-	-	-	7.77	0.55	0.33	0.29	0.25
	<i>Kitasatospora</i>	0.34	0.09	0.11	0.10	0.07	13.87	0.96	0.83	0.53	0.77
	<i>Streptomycetes</i>	1.45	1.08	1.45	1.28	1.20	0.05	0.07	0.03	0.05	0.09
	<i>Nocardioideis</i>	0.73	1.02	1.13	1.03	1.20	0.42	0.15	0.18	0.13	0.16
	<i>Kribbella</i>	0.61	0.50	0.52	0.52	0.42	0.43	0.32	0.53	0.60	0.41
	<i>Marmoricola</i>	0.45	1.08	1.12	1.13	1.13	0.17	0.09	0.08	0.06	0.05
	<i>Microclunatus</i>	0.60	0.53	0.36	0.38	0.34	0.86	5.42	2.75	3.34	3.58
	<i>Mycobacterium</i>	0.18	0.54	0.66	0.40	0.62	3.03	0.20	0.07	0.07	0.10
<i>Paenibacillus</i>	0.29	0.07	0.06	0.08	0.04	1.41	0.28	0.08	0.10	0.08	
<i>Bacillus</i>	0.13	0.44	0.42	0.43	0.60	0.01	0.14	0.10	0.19	0.12	
Bacteroidetes	<i>Flavobacterium</i>	0.67	0.13	0.18	0.20	0.11	-	0.08	0.04	0.07	0.12
Proteobacteria	<i>Geobacter</i>	0.03	0.84	0.62	0.66	0.82	-	-	-	-	-
	<i>Cystobacter</i>	1.28	0.09	0.01	0.02	-	0.30	0.50	0.43	0.55	0.29
	<i>Methylobium</i>	0.28	0.59	0.52	0.54	0.46	0.90	0.15	-	-	-
	<i>Ralstonia</i>	-	-	-	-	-	1.71	0.19	0.15	0.19	0.14
	<i>Burkholderia</i>	0.01	0.01	0.00	0.00	0.02	3.33	0.28	0.05	0.04	0.01
	<i>Ducanella</i>	0.89	0.07	0.10	0.09	0.02	0.52	0.06	0.01	0.01	-
	<i>Massilia</i>	1.19	0.06	0.11	0.12	0.01	1.54	0.14	0.02	0.02	0.01
	<i>Janthinobacterium</i>	0.02	-	0.01	0.02	0.01	1.06	0.14	0.02	0.01	0.01
	<i>Herbaspirillum</i>	0.00	0.02	0.01	0.02	0.00	1.15	0.14	0.16	0.13	0.03
	<i>Collimonas</i>	0.00	-	-	-	-	1.58	0.28	0.24	0.31	0.30
	<i>Variovorax</i>	0.46	0.18	0.20	0.21	0.17	0.57	0.08	0.04	0.05	-
Planctomycetes	<i>Pelomonas</i>	0.19	0.05	0.07	0.05	0.01	-	-	-	-	-
	<i>Balneimonas</i>	0.81	0.45	0.46	0.46	0.38	0.54	0.88	0.79	0.99	0.98
	<i>Bradyrhizobium</i>	0.76	1.03	0.89	1.09	0.95	0.51	0.03	0.03	0.02	0.01
	<i>Rhizobium</i>	0.11	0.01	0.06	0.05	0.01	0.53	0.15	0.20	0.17	0.12
	<i>Mesorhizobium</i>	0.87	0.33	0.32	0.32	0.36	0.90	0.33	0.26	0.30	0.16
	<i>Labrys</i>	0.01	0.02	0.00	0.00	0.01	0.62	0.33	0.33	0.29	0.28
	<i>Rhodoplanes</i>	0.15	0.68	0.61	0.75	0.62	0.14	0.41	0.54	0.19	0.17
	<i>Methylobacterium</i>	0.05	0.34	0.48	0.27	0.46	-	-	-	-	-
	<i>Defluvicoccus</i>	0.14	0.97	1.00	0.96	1.28	-	-	-	-	-
	<i>Paracoccus</i>	0.13	0.01	0.59	0.02	0.01	-	-	-	-	-
Verrucomicrobia	<i>Armatococcus</i>	1.92	0.45	0.32	0.26	0.34	0.05	0.01	0.04	0.03	0.03
	<i>Pseudomonas</i>	0.34	0.03	0.01	0.06	0.04	0.57	0.36	0.02	0.05	0.05
	<i>Steroidobacter</i>	0.09	0.59	0.41	0.55	0.80	0.01	0.17	0.16	0.16	0.16
	<i>Spartobacteria aenera inc. sed.</i>	0.05	0.32	0.53	0.26	0.35	0.04	2.19	0.54	1.43	1.37
	<i>Subdivision3 aenera inc. sed.</i>	0.05	0.75	0.82	0.50	0.72	0.01	1.72	0.37	1.58	1.13
Planctomycetes	<i>Siraulisphaera</i>	0.02	0.43	0.43	0.41	0.65	0.32	1.40	0.98	0.99	2.04

Nicht aktiv beteiligt waren dagegen in beiden Böden *Acidobacteria*, δ -*Proteobacteria*, *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia* und *Gemmatimonadetes*. Der Vergleich des klassischen und ‚next-generation‘ Verfahrens zur Identifizierung von Bodenbakterien, die aktiv an der Assimilierung von Kohlenstoff aus Weizenpflanzenmaterial beteiligt sind, zeigte, dass alle wichtigen und abundanten bakteriellen Phyla in den Sequenzen der Klonbibliotheken als auch durch Pyrosequenzierung detektiert werden konnten. Nur wenn die Sequenzdaten bis auf die Ebene von Bakteriengattungen, die am Abbau von Weizenwurzeln in den beiden Böden beteiligt waren, analysiert wurden, konnten durch die vielfach höhere Sequenzanzahl mehr Erkenntnisse aus der Pyrosequenzierung erlangt werden. Die Sequenzdaten der Klonbibliotheken hingegen erlaubten über *in silico* T-RFLP-Analyse eine Zuordnung der abundanten T-RFs zu bakteriellen Populationen.

4. Diskussion

Kultivierungsunabhängige Analysen mikrobieller Gemeinschaften lassen vermuten, dass Mitglieder des Phylums *Acidobacteria* phylogenetisch sehr divers sind und zu den abundantesten und aktivsten Bodenbakterien weltweit zählen (Felske *et al.*, 2000; Janssen, 2006). Über das Phylum *Acidobacteria* ist insgesamt aber nur wenig bekannt, da seine Vertreter bisher selten erfolgreich kultiviert werden konnten. Durch zahlreiche 16S rRNA-Gen-basierte Untersuchungen konnte jedoch gezeigt werden, dass *Acidobacteria* abundant und ubiquitär vorkommen (Hugenholtz *et al.*, 1998a). Derzeit sind 26 Untergruppen bekannt (Barns *et al.*, 2007) und diese phylogenetische Diversität der *Acidobacteria* ist vergleichbar mit der des Phylums *Proteobacteria* (Hugenholtz *et al.*, 1998a). Mehrere Studien unterstützen die Annahme, dass *Acidobacteria* langsam wachsende, oligotrophe Bakterien sind, deren Abundanz in einer Gemeinschaft vom pH-Wert reguliert wird (Fierer *et al.*, 2007; Jones *et al.*, 2009; Ward *et al.*, 2009; Will *et al.*, 2010). Die phylogenetische Diversität, Ubiquität und Abundanz der *Acidobacteria* in Bodenhabitaten legt eine wichtige Rolle des Phylums bei biogeochemischen Prozessen sowie vielfältige Stoffwechsellleistungen nahe (Hugenholtz *et al.*, 1998a). Über die Funktion der *Acidobacteria* im Boden und die Beeinflussung ihrer Zusammensetzung durch Landnutzung ist jedoch noch fast nichts bekannt. Die Identifizierung edaphischer und biologischer Variablen, die Diversität und Aktivität von *Acidobacteria* im Boden beeinflussen, ist eine Grundvoraussetzung für das Verständnis ihrer Rolle in biogeochemischen Zyklen und deren Wechselbeziehungen in verschiedenen Landnutzungstypen.

In der vorliegenden Arbeit wurden daher Diversitätsveränderungen der *Acidobacteria* in zahlreichen Grünland- und Waldböden unterschiedlicher Landnutzung untersucht (siehe Kapitel 3.1.). Zielsetzung war die Erfassung der Zusammensetzung und Diversität der abundanten (siehe Kapitel 3.3.) und aktiven (siehe Kapitel 3.4.) *Acidobacteria* in Abhängigkeit von Boden- und Standorteigenschaften sowie die Identifizierung wichtiger funktioneller Gruppen (siehe Kapitel 3.2.). Zusätzlich wurde die jahreszeitliche Veränderung der Diversität der aktiven *Acidobacteria* aufgenommen und auf Abhängigkeit von Umwelteinflüssen geprüft (siehe Kapitel 3.5.). Um die Rolle der *Acidobacteria* im Boden genauer zu verstehen, wurde zudem über stabile Isotopenbeprobung der Abbau von Pflanzenmaterial exemplarisch in einem Grünland- und einem Waldboden verfolgt und die daran beteiligten Bakterien identifiziert (siehe Kapitel 3.6.).

4.1. Diversität der *Acidobacteria* in Grünland- und Waldböden

Zunächst wurde durch Sequenzierung der 16S rRNA-Gene ein Überblick über die Diversität der *Acidobacteria* in allen Grünland- und Waldböden der drei Exploratorien Schorfheide-Chorin, Hainich-Dün und Schwäbische Alb gewonnen. Durch die Sequenzierung zahlreicher Klone konnte eine Erfassung der Diversität von durchschnittlich 85% erreicht werden (Tab. 7), dennoch wäre die Analyse von weiteren Klonen erforderlich, um die sehr hohe Diversität der *Acidobacteria*, vor allem der Grünlandböden der Schorfheide-Chorin noch besser auflösen zu können. Von den 26 Untergruppen der *Acidobacteria* (Barns *et al.*, 2007) wurden 11 in den untersuchten Böden detektiert (Abb. 5). Dabei waren die Untergruppen Gp6, Gp4, Gp5, Gp3 und Gp17 in Grünlandböden dominierend, während in Waldböden Untergruppen Gp1, Gp6 und Gp3 die *Acidobacteria*-Gemeinschaft bestimmten (Abb. 31). Die Zusammensetzung der *Acidobacteria* unterschied sich in allen sechs Klonbibliotheken signifikant voneinander, ausgenommen die Waldböden der Schwäbischen Alb und des Hainich. In den Waldböden der Schorfheide waren etwa dreimal so viele Gp1-Sequenzen vertreten wie in den anderen Waldflächen, wahrscheinlich begründet durch den sehr sauren pH-Wert der Böden (pH ~3,6), der das Wachstum von Vertretern dieser Untergruppe begünstigt (Jones *et al.*, 2009). Die Untergruppen Gp4 und Gp5 konnten in Wäldern der Schorfheide dagegen überhaupt nicht detektiert werden. Außerdem ließen verschiedene Diversitäts-Indices erkennen, dass die Diversität in AEG, HEG, AEW und HEW in etwa vergleichbar war, in SEG deutlich am höchsten und in SEW mit Abstand am niedrigsten (siehe Kapitel 3.2.).

In einer Studie zur Verteilung von *Bacteria* in den Bodenhorizonten A und B derselben neun Grünlandböden im Hainich-Dün waren nach den *Proteobacteria* Vertreter der *Acidobacteria* mit durchschnittlich 19% im A-Horizont und 38% im B-Horizont am häufigsten vertreten (Will *et al.*, 2010). Mittels Pyrosequenzierung der 16S rRNA-Gene wurden 18 der 26 Untergruppen gefunden und die relativen Häufigkeiten der abundantesten *Acidobacteria*-Untergruppen stimmten weitgehend mit den Daten der Klonbibliothek der Hainich-Grünlandböden dieser Arbeit überein (Abb. 31). Außerdem wurden Wald- und Grünlandböden der Schwäbischen Alb mit Hilfe der Pyrosequenzierung auf bakterielle 16S rRNA-Gene untersucht (Nacke *et al.*, 2011a). Hier stellten *Acidobacteria* 19 und 20% der *Bacteria*-Gemeinschaft in Wald- und Grünlandböden. Die relativen Abundanzen stimmen jedoch nicht für alle Untergruppen mit den Daten der Wald- und Grünland-Klonbibliotheken der Schwäbischen Alb der vorliegenden Arbeit überein (Abb. 31). Im Gegensatz zu Will *et al.* (2010) und Nacke *et al.* (2011a) wurden vor allem *Acidobacteria* der Untergruppe Gp5 über zehnmal

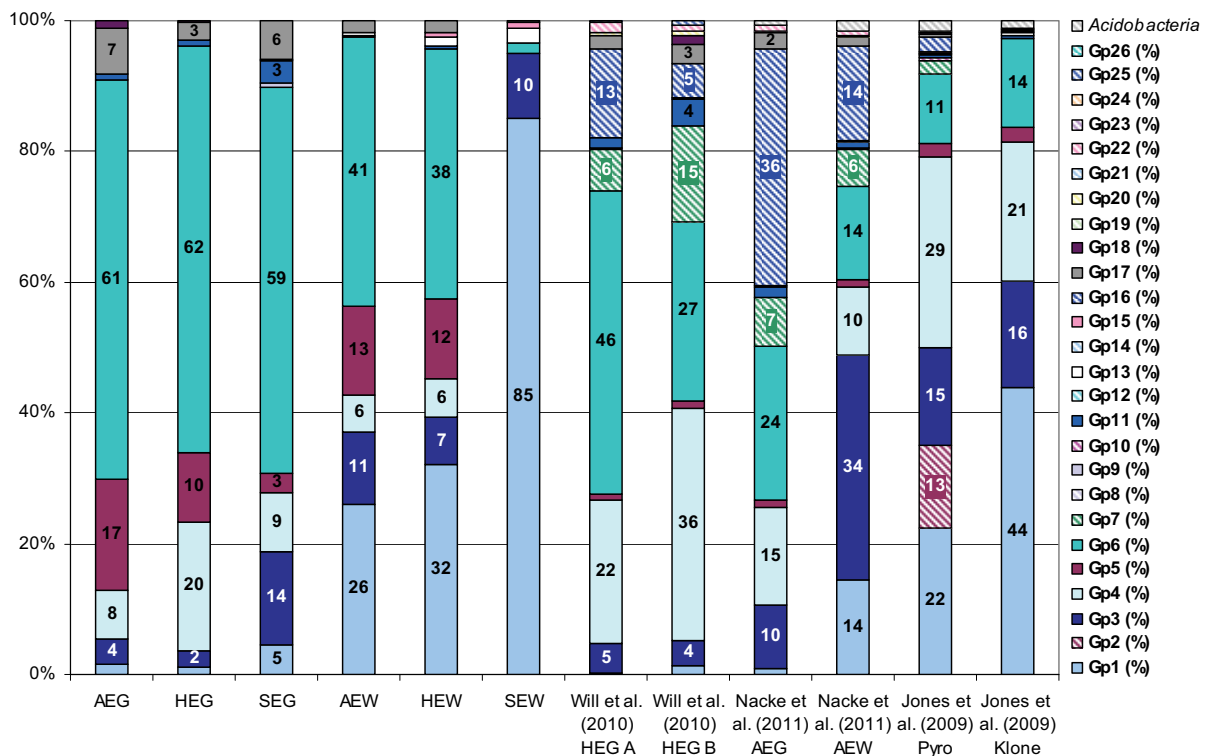


Abbildung 31. Relative Abundanz der 16S rRNA-Gen-Sequenzen der verschiedenen Untergruppen der *Acidobacteria* in den Klonbibliotheken AEG, HEG, SEG, AEW, HEW und SEW im Vergleich zu mittleren relativen Abundanzen der *Acidobacteria*-Untergruppen in A- und B-Horizont der Grünlandböden in Hainich-Dün (Pyrosequenzierung, (Will *et al.*, 2010), Wald- und Grünlandböden der Schwäbischen Alb (Pyrosequenzierung, (Nacke *et al.*, 2011a) und 87 Böden Nord- und Südamerikas (Pyrosequenzierung und Klonbibliotheken, (Jones *et al.*, 2009). Untergruppen, die mit Hilfe der Klonbibliotheken nicht detektiert werden konnten, sind gestreift dargestellt.

häufiger in den entsprechenden Böden des Hainich und der Schwäbischen Alb gefunden und zwei wichtige Untergruppen, Gp7 und Gp16, nicht erfasst. Dies ist begründet durch die Limitierung des hochspezifischen *Acidobacteria*-Primers Acido31F, der zwar an die 16S rRNA-Gene der meisten *Acidobacteria* binden kann, aber dennoch einige wichtige Untergruppen wie z.B. Gp2, Gp7, Gp8, Gp10, Gp16, Gp22, Gp23 und Gp25 überhaupt nicht oder nur unvollständig erfasst (Barns *et al.*, 2007; Kielak *et al.*, 2008; Jones *et al.*, 2009). Auch in Wald-, Grünland- und Ackerböden weltweit machten *Acidobacteria* durchschnittlich 20% (5-46%) der Bakteriengemeinschaft in 16S rRNA-Klonbibliotheken aus, wobei die Untergruppen Gp1, Gp4 und Gp6 diese meist dominierten (Janssen, 2006). In 87 nord- und südamerikanischen Wald- und Grünlandböden wurden mittels Pyrosequenzierung durchschnittlich 31% (2-79%) *Acidobacteria* detektiert und eine hohe Abundanz der Untergruppen Gp1-Gp7 und Gp16 ermittelt (Abb. 31). Die Analyse von Klonbibliotheken (erstellt mit dem *Acidobacteria*-spezifischen Vorwärtsprimer Acido31F) von 22 dieser 87 Böden sprach hingegen für eine Dominanz der Untergruppen Gp1 und Gp3-Gp6 (Abb. 31, Jones *et al.*, 2009). In Böden mit Wald, Weide oder Strauchbedeckung in SW-China stellten *Acidobacteria* 62, 30 und 23% der *Bacteria*,

wobei Untergruppen Gp1-Gp3 im Wald gleichwertig dominierten, aber Gp2 und Gp3 in Weide- und Strauchland seltener vorkamen (Chan *et al.*, 2008). Die in dieser Arbeit erlangten Ergebnisse zur Abundanz der verschiedenen Untergruppen der *Acidobacteria* in den Grünland- und Waldböden der drei Untersuchungsregionen in Deutschland zeigen demzufolge eine hohe Übereinstimmung mit der weltweiten Verteilung von *Acidobacteria* in Böden.

Die Verfügbarkeit der nahezu kompletten 16S rRNA-Gen-Sequenzen erlaubte eine differentielle vergleichende Sequenzanalyse. Die phylogenetische Divergenz, der Bereich der Sequenzidentität der Klone untereinander, war von den Untergruppen mit mehr als 100 Klonsequenzen für Gp4 (82-100%) am stärksten ausgeprägt, gefolgt von Gp3 (84-100%), Gp6 (85-100%) und Gp1 (86-100%). Die Klone der Untergruppe Gp5 waren am wenigsten divergent (90-100%). Ähnliche genetische Distanzen zwischen den Untergruppen der *Acidobacteria* wurden auch bei einem Vergleich ausgewählter acidobakterieller 16S rRNA-Gensequenzen der RDP-Datenbank gefunden (Lee und Cho, 2011). In der vorliegenden Arbeit wurde für das Habitat Boden und 11 Untergruppen eine maximale phylogenetische Distanz von ~24% für über 2000 *Acidobacteria*-Sequenzen ermittelt. Die mittlere genetische Distanz zwischen *Acidobacteria* verschiedenster Habitate lag bei ~24%, wobei 23 Untergruppen in die Analyse einfließen (Lee und Cho, 2011). Dies ist vergleichbar mit der mittleren phylogenetischen Divergenz der *Proteobacteria* (26%, Lee und Cho, 2011) und deutet darauf hin, dass der taxonomische Rang der acidobakteriellen Untergruppen mit dem der Klassen der *Proteobacteria* gleichgesetzt werden kann. Unter Berücksichtigung der hohen phylogenetischen Diversität und dem breiten Vorkommen, könnten *Acidobacteria* ein metabolisch und genetisch diverses Phylum ähnlich wie *Proteobacteria* sein (Hugenholtz *et al.*, 1998a). In öffentlichen Datenbanken verfügbare acidobakterielle 16S rRNA Sequenzen zeigen aber, dass auch global gesehen die phylogenetische Diversität der meisten Untergruppen dieses Phylums bei Weitem noch nicht abgedeckt wird (Lee und Cho, 2011).

Klone dieser Arbeit waren teilweise sehr nah verwandt mit den wenigen beschriebenen oder isolierten Vertretern der *Acidobacteria*. So wurden Vertreter der erstmalig aus Boden isolierten *Edaphobacter modestus* und *E. aggregans* (Gp1, 99% Sequenzidentität, Koch *et al.*, 2008) sowie *Granulicella*-Spezies (Gp1, 97-98% Sequenzidentität, Pankratov und Dedysh, 2010) und Candidatus *Solibacter usitatus* (Gp3, 99% Sequenzidentität, Ward *et al.*, 2009) gefunden. Weitere Klone konnten einem Isolat der Untergruppe Gp6 aus Boden in Belgien (IGE-011, GU187027) oder einem Boden-Isolat der Untergruppe Gp4 (Ellin6099, AY234751) zugeordnet werden. Unter den über 2000 Klonen wurden weiterhin nahe Verwandte von *Acidobacterium capsulatum* (Gp1, Kishimoto *et al.*, 1991),

Terriglobus roseus (Gp1, Eichorst *et al.*, 2007), *Acidipila rosea* (Gp1, Okamura *et al.*, 2011) und Candidatus *Koribacter versatilis* (Gp1, Sait *et al.*, 2002) mit je 96% Sequenzidentität gefunden (siehe Kapitel 3.2.). Diese kultivierten und taxonomisch beschriebenen Isolate spiegeln aber bei Weitem nicht die Diversität der *Acidobacteria* der Böden dieser Arbeit wieder, denn der weitaus größere Teil der Klonsequenzen zeigte die größte Sequenzidentität zu unkultivierten *Acidobacteria*. Die Klonsequenzen der Wald- und Grünlandflächen der drei verschiedenen Untersuchungsregionen bildeten nur in sehr geringem Maße phylogenetische Cluster entsprechend der Herkunft. *Acidobacteria*-Sequenzen wurden nur selten getrennten Wald- und Grünland-Clustern bzw. -Untergruppen zuzuordnen (Abb. 6, Anhang Abb. 1-9). In zahlreichen anderen 16S rRNA-Gen basierten Studien konnte gezeigt werden, dass *Acidobacteria*, deren abundanteste Untergruppen und auch einzelne Phylotypen weltweit in Böden verbreitet sind und deren Zusammensetzung vor allem von edaphischen Eigenschaften und weniger der geographischen Trennung abhängt (Barns *et al.*, 1999; Janssen, 2006; Jones *et al.*, 2009; Lee und Cho, 2009).

Die Sequenzierung der 16S rRNA-Gene erlaubte eine detaillierte Analyse der Sequenzdaten nicht nur auf Ebene der *Acidobacteria*-Untergruppen sondern auch einzelner OTUs. In den über 2000 acidobakteriellen Klonsequenzen der Wald- und Grünlandflächen der drei verschiedenen Untersuchungsregionen Schwäbische Alb, Hainich-Dün und Schorfheide-Chorin wurden insgesamt 414 Phylotypen (OTUs) mit 97% Sequenzunterschied gefunden. (Lee und Cho (2011) detektierten in über 3000 ausgewählten 16S rRNA-Gensequenzen der *Acidobacteria* der RDP-Datenbank 556 Phylotypen und Jones *et al.* (2009) in über 1750 acidobakteriellen Klonsequenzen 317 Phylotypen. In der vorliegenden Arbeit kamen nur zwei der 414 OTUs in allen sechs Klonbibliotheken und 217 OTUs in je nur einem Boden vor (Anhang Tab. 3). Entsprechend wurden 52% der Phylotypen in nur einer der sechs in Landnutzungstyp Wald oder Grünland und geographischer Herkunft verschiedenen Bodenproben gefunden. Lauber *et al.* (2009) detektierte durch Pyrosequenzierung der bakteriellen Gemeinschaft von 88 Böden aus Nord- und Südamerika sogar 75% der Phylotypen in je nur einem der Böden. Diese eingeschränkte geographische Verteilung der Mehrheit der Phylotypen wurde auch für *Acidobacteria* (76%) durch Pyrosequenzierung bakterieller Gemeinschaften von vier Böden Nord- und Südamerikas bestätigt (Fulthorpe *et al.*, 2008). Auch andere Studien (Cho und Tiedje, 2000; Wawrik *et al.*, 2007) stützen die Annahme, dass *Bacteria* zum Teil geographisch isoliert und endemisch in verschiedenen Habitaten und Regionen vorkommen.

In den Wald- und Grünlandflächen der drei verschiedenen Untersuchungsregionen kamen in 15 OTUs der Untergruppen Gp1, Gp5 und Gp6 jeweils mehr als 20 Klonsequenzen vor (Tab. 8). Ein OTU der Untergruppe Gp5 war der häufigste Phylotyp, der 3,5% aller Klone und bis zu 7% der Klone eines Bodens stellte. Ein Phylotyp der Untergruppe Gp1 umfasste sogar 12% und alle 15 häufigsten OTUs zusammen 40% aller SEW-Klone. Der abundanteste Phylotyp in 22 Böden Nord- und Südamerikas gehörte hingegen zur Untergruppe Gp1 mit 18% aller *Acidobacteria* und bis zu 41% der *Acidobacteria*-Sequenzen eines Bodens (Jones *et al.*, 2009). In der vorliegenden Arbeit konnte nur einer der abundanten Phylotypen der Untergruppe Gp1 (OTU32) einem kultivierten und beschriebenen Vertreter zugeordnet werden (~97% Sequenzidentität mit *Edaphobacter modestus* und *E. aggregans*). Die bekannten Isolate spiegeln demzufolge weder die gesamte Diversität der *Acidobacteria* im Boden wieder und noch sind sie, bis auf wenige Ausnahmen, charakteristisch für dieses Habitat. Obwohl *Acidobacteria* phylogenetisch divers sind, machen die 20 häufigsten Phylotypen mehr als 26% der gesamten Gemeinschaft aller drei Untersuchungsregionen aus. Diese abundanten Phylotypen tragen wahrscheinlich gegenüber den eher seltenen Phylotypen überproportional zur Funktion biogeochemischer Zyklen im Boden bei.

4.2. Einflussfaktoren auf Diversität und Aktivität von *Acidobacteria*

Mittels Sequenzierung der 16S rRNA-Gene wurde zunächst ein Überblick über die Diversität der *Acidobacteria* in allen Grünland- und Waldböden der drei Untersuchungsregionen gewonnen. Die Diversität und Zusammensetzung der *Acidobacteria* jedes einzelnen Bodens der 57 Untersuchungsflächen wurde über ‚fingerprinting‘-Analysen erfasst. Die T-RFLP-Analyse wurde sowohl auf Basis der 16S rRNA-Gene als auch der 16S rRNA durchgeführt, um nicht nur die anwesenden sondern auch die physiologisch aktiven *Acidobacteria* zu erfassen. Mittels statistischer Datenanalyse konnten Abhängigkeiten der Zusammensetzung und Diversität der *Acidobacteria* und ihrer Untergruppen von Boden- und Standorteigenschaften sowie Landnutzung sowohl für ‚fingerprinting‘- als auch vergleichende Sequenzanalysen aufgezeigt werden.

Im Rahmen der Biodiversitäts-Exploratorien wurde die Diversität der *Acidobacteria* mit einer zweiten ‚fingerprinting‘-Technik – DGGE – auf Basis der 16S rRNA und ihrer Gene unter Verwendung des *Acidobacteria*-spezifischen Primers Acido31F analysiert (Foesel *et al.*, 2011). Die mittels T-RFLP-Analysen gefundenen Einflüsse von Bodeneigenschaften und Standortfaktoren auf die Zusammensetzung des gesamten Phylums und einzelner Untergruppen der *Acidobacteria* konnten durch die DGGE-Analysen bestätigt werden.

Allerdings boten T-RFLP-Profile eine größere statistisch erklärbare Varianz als DGGE-Profile, möglicherweise aufgrund der Analyse unterschiedlich langer 16S rRNA-Fragmente. Für die T-RFLP-Analyse wurden die ersten ~ 900 bp der 16S rRNA amplifiziert und T-RFs mit einer Länge von 50 bis 600 bp mit einer Auflösung von 1-2 bp in die Auswertung einbezogen, wohingegen in die DGGE-Analyse nur die ersten ~ 350 bp der 16S rRNA einfließen. In DGGE-Profilen können DNA-Fragmente mit nur einem Basenpaarunterschied erkannt werden (Nubel *et al.*, 1996) und DGGE-Banden aus dem Gel ausgeschnitten, sequenziert und phylogenetischen Gruppen zugeordnet werden. Die Zuordnung einzelner T-RFs zu phylogenetischen Gruppen erfolgt hingegen über Klonierung und Sequenzierung. Auch Smalla *et al.* (2007) untersuchte die bakterielle Diversität in Böden mittels DGGE- und T-RFLP-Analysen und obwohl verschiedene Regionen des 16S rRNA-Gens genutzt wurden, lieferten beide Methoden vergleichbare Ergebnisse. Nunan *et al.* (2005) zeigte ebenfalls, dass DGGE- und T-RFLP-Analysen zu ähnlichen Resultaten führen, T-RFLP-Profile aber dennoch über eine größere Auflösung verfügen. Beide ‚*fingerprinting*‘-Techniken basieren auf der Extraktion von Nukleinsäuren sowie Amplifikation der 16S rRNA und könnten der Artefaktbildung durch Anwendung von PCR-Techniken unterliegen (Kanagawa, 2003). Unterschiedlich gute Extraktionseffizienzen von Nukleinsäuren aus Bakterien (DeSantis *et al.*, 2005; Feinstein *et al.*, 2009), der Einbau von Sequenzfehlern durch die DNA-Polymerase, die Bildung chimärer PCR-Produkte (Qiu *et al.*, 2001), die bevorzugte Amplifikation bestimmter Matrizen (Polz und Cavanaugh, 1998; Wintzingerode *et al.*, 1997) oder auch das ‚*re-annealing*‘ von Matrizen mit steigender Zyklenanzahl (Suzuki und Giovannoni, 1996) können Unterschiede im Vorkommen der ursprünglichen Matrizen im Vergleich zu ihren Verhältnissen nach der Amplifikation hervorrufen. Das Auftreten der genannten Artefakte könnte eine Auswirkung auf die mittels PCR-basierter Methoden detektierte Zusammensetzung mikrobieller Gemeinschaften in Umweltproben haben und zur Unter- oder Überschätzung der Diversität aber auch der Abundanz einzelner Bakterienpopulationen führen. Um diese Fehler zu minimieren, erfolgte die Extraktion von Nukleinsäuren immer in Duplikaten und die Zyklenzahl der PCR wurde so gering wie möglich gehalten. Außerdem wurden vielfältige molekularbiologische Methoden wie Klonierung und Sequenzierung, T-RFLP-Analysen, DGGE-Analysen (Foesel *et al.*, 2011) und quantitative PCR (Foesel *et al.*, 2011) mit verschiedenen Rückwärtsprimern in Kombination mit dem *Acidobacteria*-spezifischen Acido31F-Vorwärtsprimer angewendet. Diese verschiedenen Methoden wurden auf DNA- sowie RNA-Basis durchgeführt und zeigten eine hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Und auch trotz unterschiedlicher DNA-Extraktionsmethoden für T-RFLP- (siehe Kapitel 2.4.1.) und DGGE-Analysen (PowerSoil DNA Isolation Kit, MoBio Laboratories) der 16S rRNA-Gene, führten beide

„fingerprinting“-Techniken zu vergleichbaren Ergebnissen bezüglich der Einflüsse von Bodeneigenschaften und Standortfaktoren auf das Phylum *Acidobacteria*. Ferner konnten Verhältnisse der 16S rRNA-Matrizen definierter Mischungen von vier Reinkulturen über T-RFLP-Analyse uneingeschränkt wieder gefunden werden und auch die 16S rRNA-basierte T-RFLP-Analyse einer Bodenprobe erwies sich als höchst reproduzierbar (Lueders und Friedrich, 2003). Bei der PCR-Amplifikation von 16S rRNA-Genen von Reinkulturen und Mischproben können partiell einzelsträngige DNA-Amplikons als PCR-Artefakte entstehen, die die Ursache für die Entstehung von sogenannten „pseudo-T-RFs“ sind, da einzelsträngige DNA von Restriktionsendonukleasen nicht geschnitten werden kann (Egert und Friedrich, 2003). Diese zusätzlichen T-RFs, die nach Sequenzanalyse nicht der terminalen sondern einer höheren Restriktionsschnittstelle entsprechen, können ohne Kenntnis der zugrunde liegenden Sequenzen leicht mit „echten“ T-RFs verwechselt werden und die Aussage über die Diversität einer Umweltprobe verfälschen. Eine Behandlung des Amplikonpools mit DNA-Einzelstrang-abbauender „mung-bean“-Nuklease vor der T-RFLP-Analyse führt zum Verschwinden der „pseudo-T-RFs“ (Egert und Friedrich, 2003). Um „pseudo-T-RFs“ auszuschließen, wurden zu Beginn der vorliegenden Arbeit acidobakterielle T-RFLP-Profile mit und ohne „mung-bean“-Nuklease-Behandlung verglichen und keine „pseudo-T-RFs“ detektiert. Im Falle des Vorkommens von „pseudo-T-RFs“ könnten diese durch eine Behandlung der PCR-Produkte mit Klenow-Fragment, welches partiell einzelsträngige PCR-Produkte zu doppelsträngigen Fragmenten auffüllen kann, vermindert werden (Egert und Friedrich, 2005).

In der vorliegenden Arbeit unterschied sich die Zusammensetzung des Phylums *Acidobacteria* zwischen Grünland- und Waldböden sowie zwischen den drei Untersuchungsregionen, allerdings nicht zwischen den verschiedenen Landnutzungstypen (Tab. 9, 15, Abb. 7, 9). Unterschiede in der *Acidobacteria*-Zusammensetzung der Grünland- und Waldböden konnten vor allem durch verschiedene edaphische Eigenschaften und Nährstoffverfügbarkeiten erklärt werden. So beeinflusste besonders der pH-Wert, aber auch das CN-Verhältnis sowie der Kohlenstoff-, Stickstoff-, Ammonium- und Phosphatgehalt des Bodens die Struktur der *Acidobacteria*-Gemeinschaften. Insbesondere in Waldböden war auch die Bodenfeuchte ein wichtiger Faktor (Tab. 10, 16, Abb. 8, 10). Auch in Böden Nord- und Südamerikas wurde die phylogenetische Diversität und Zusammensetzung der *Bacteria* aber auch einzelner Phyla, wie z.B. der *Acidobacteria* durch den pH-Wert beeinflusst (Lauber *et al.*, 2009; Jones *et al.*, 2009). In einem Birkenwaldboden war die Abundanz der *Acidobacteria* neben organischem Kohlenstoff und Stickstoff auch positiv mit Ammonium und Bodenfeuchte korreliert (Rasche *et al.*, 2010). In der vorliegenden Arbeit war nur die Zusammensetzung der

Gemeinschaft der aktiven *Acidobacteria* in Grünlandböden schwach abhängig von der Anzahl der vaskulären Pflanzenarten und der Landnutzungsintensität (Tab. 16). Auch in einer Studie der Grünland- und Waldböden der Schwäbischen Alb mittels Pyrosequenzierung dominierten *Acidobacteria* die bakterielle Gemeinschaft in den unterschiedlich bewirtschafteten Böden (Nacke *et al.*, 2011a). *Acidobacteria* zeigten aber im Gegensatz zu anderen Phyla keine Unterschiede in der Abundanz des gesamten Phylums sondern nur für einzelne Untergruppen zwischen den verschiedenen Landnutzungsformen Grünland und Wald (Nacke *et al.*, 2011a). In den Grünlandböden des Hainich war die Gemeinschaft der Bodenbakterien umso diverser, je höher der Gehalt an organischem Kohlenstoff sowie Stickstoff und je niedriger die Landnutzungsintensität war (Will *et al.*, 2010). In einer Studie zur Struktur bakterieller Gemeinschaften in Böden verschiedener Landnutzungstypen (Laubholz-, Kieferwald, Ackerland, Viehweide) war die Abundanz der *Acidobacteria* im Wald signifikant höher als in landwirtschaftlich genutzten Böden (Lauber *et al.*, 2008). Die Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaften wurde vor allem von pH-Wert und Bodentextur beeinflusst. Wahrscheinlich waren Änderungen von Bodeneigenschaften durch Landnutzung und nicht die Landnutzungsänderung selbst verantwortlich für die Unterschiede in der Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaften (Lauber *et al.*, 2008). Das Vorkommen von *Acidobacteria* im Boden könnte also direkt vor allem von Bodeneigenschaften und Nährstoffverfügbarkeit im Habitat beeinflusst werden und eher indirekt durch Landnutzung und Pflanzendiversität. Deshalb wird der mögliche Einfluss jeder in dieser Arbeit getesteten Umweltvariable auf *Acidobacteria* und ihre Untergruppen in den folgenden Abschnitten gesondert diskutiert.

Die meisten *Acidobacteria* wurden in Böden mit saurem pH-Wert gefunden (Jones *et al.*, 2009) und auch in dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass der pH-Wert die Zusammensetzung der anwesenden aber auch physiologisch aktiven *Acidobacteria*-Gemeinschaften maßgeblich bestimmt (Tab. 10, 16, Abb. 8, 10). Die einzelnen Untergruppen der *Acidobacteria* reagierten allerdings sehr unterschiedlich auf den pH-Wert der untersuchten Böden (Tab. 25). So waren Vertreter der Untergruppe Gp1 in sauren Böden häufiger zu finden. Der Zusammenhang von hoher Abundanz der *Acidobacteria* der Untergruppe Gp1 im Boden und niedrigem pH-Wert wurde schon in anderen Studien gezeigt (Jones *et al.*, 2009; Nacke *et al.*, 2011a). Jones *et al.* (2009) und Nacke *et al.* (2011a) fanden durch Pyrosequenzierung der 16S rRNA-Gene zahlreicher Böden auch eine positive Korrelation der Untergruppe Gp4 mit dem pH-Wert des Bodens. In der vorliegenden Arbeit wurde allerdings ein gegenteiliger Zusammenhang physiologisch aktiver *Acidobacteria* der Untergruppe Gp4 in Waldböden ermittelt - Gp4-*Acidobacteria*

Tabelle 25. Überblick über Korrelationen der Abundanzen einzelner *Acidobacteria*-Untergruppen in den untersuchten 27 Grünland- und 30 Waldböden mit den analysierten Boden- und Standortparametern. + schwache positive Korrelation, ++ starke positive Korrelation, +++ sehr starke positive Korrelation, - schwache negative Korrelation, -- starke negative Korrelation, --- sehr starke negative Korrelation

	Gp1	Gp3	Gp4	Gp5	Gp6	Gp11	Gp17	Gp18
pH	-- ^{a, c}	+ ^a	--- ^a	+++ ^a	+++ ^{a, c}	+++ ^a	+++ ^a	++ ^a
org. Kohlenstoff [C, g kg ⁻¹]	-- ^a	+ ^b	-- ^a	-- ^b /++ ^a	++ ^a	- ^b /++ ^a	++ ^a	- ^b /+ ^a
Stickstoff [N, g kg ⁻¹]	-- ^{a, c}	+ ^b	-- ^a	-- ^b /++ ^a	++ ^{a, c}	- ^b /++ ^a	++ ^a	- ^b /+ ^a
CN-Verhältnis	++ ^{a, c}	-- ^a	++ ^a	-- ^a	-- ^{a, c}	-- ^a	--- ^a	-- ^a
Bodenfeuchte [% vol]	-- ^a	+ ^a	-- ^a	- ^a	++ ^a	++ ^a	++ ^a	+ ^a
Bodentemperatur [°C]	++ ^b			- ^b	-- ^b	-- ^b		-- ^b
Bodenatmung [μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹]	+ ^b	+ ^b		-- ^b	-- ^b	-- ^b	- ^a	- ^b
Amöben [10 ⁴ g ⁻¹]	-- ^c		- ^a	+ ^c	+ ^{a, c}		+ ^a	
Flagellaten [10 ⁴ g ⁻¹]				+ ^a				
Ciliaten [10 ² g ⁻¹]		++ ^b		-- ^b	-- ^b	- ^b		-- ^b
Anzahl vaskulärer Pflanzenarten	- ^b			++ ^c				+ ^b
Landnutzungsintensität (LUI)								
Ammonium [μmol]	+ ^{a, c}		+ ^a	- ^a	- ^{a, c}		- ^a	
Nitrat [μmol]	- ^c	+ ^a			+ ^{a, c}		+ ^a	
Phosphor [mg kg ⁻¹]	-- ^{a, c}		-- ^a	++ ^a	++ ^{a, c}	++ ^a	++ ^a	++ ^a

^a vor allem in Waldböden

^b vor allem in Grünlandböden

^c durch Analyse einzelner OTUs der Klonbibliotheken

waren in Böden mit niedrigem pH-Wert am aktivsten (Tab 18, 25). In dieser Studie konnte auch erstmalig eine Abhängigkeit der Untergruppe Gp5 vom pH-Wert gezeigt werden (Tab. 25). Das Vorkommen von *Acidobacteria* der Untergruppen Gp6 und Gp17 korrelierte in Waldböden positiv mit dem pH-Wert, wohingegen dieser Zusammenhang in den Untergruppen Gp11 und Gp18 ausschließlich für physiologisch aktive Vertreter gezeigt werden konnte (Tab. 12, 18). Die positive Korrelation der Abundanz dieser Untergruppen mit dem pH-Wert des Bodens bestätigte die Ergebnisse von Jones *et al.* (2009) und Nacke *et al.* (2011a). Der pH-Wert eines Bodens kann allerdings auch als eine Variable angesehen werden, die an andere Boden- und Standorteigenschaften gekoppelt ist (Anhang Tab. 2). Man weiß demzufolge nicht, ob der pH-Wert selbst einen direkten Einfluss auf die Zusammensetzung der *Acidobacteria*-Gemeinschaften im Boden hat oder mit einem anderen Parameter korreliert, der die Diversität der *Acidobacteria* beeinflusst.

Eine weitere wichtige Rolle für die Zusammensetzung acidobakterieller Gemeinschaften in den untersuchten Wald- und Grünlandböden spielt der Gehalt an organischem Kohlenstoff und Stickstoff und daraus folgend auch das CN-Verhältnis, wobei berücksichtigt werden muss, dass diese Bodeneigenschaften zum Teil mit dem pH-Wert korrelieren (Anhang Tab. 2). Physiologisch aktive *Acidobacteria* der Untergruppe Gp1

waren in Böden mit niedrigem Kohlenstoff- und Stickstoffgehalt, aber hohem CN-Verhältnis häufiger zu finden (Tab. 18, 25). Dies bestätigt die Annahme, dass diese Bakterien unter oligotrophen Bedingungen leben können und bei geringer Nährstoffverfügbarkeit aktiv sind (Fierer *et al.*, 2007). Vertreter der Untergruppe Gp3 hingegen waren in Grünlandböden mit hohen Kohlenstoff- und Stickstoffkonzentrationen stark vertreten sowie in Waldböden mit niedrigem CN-Verhältnis, basierend auf der Häufigkeit der 16S rRNA, besonders aktiv (Tab. 11, 18, 25). In 16S rRNA-Gen-basierten Analysen mittels Pyrosequenzierung der neun Grünlandböden des Hainich korrelierte die Abundanz der Untergruppe Gp4 negativ mit dem Gehalt an organischem Kohlenstoff und Stickstoff (Will *et al.*, 2010). In der vorliegenden Arbeit hingegen konnte eine signifikant höhere Aktivität einiger *Acidobacteria* der Untergruppe Gp4 in Böden mit niedrigem Kohlenstoff- und Stickstoffgehalt aber hohem CN-Verhältnis festgestellt werden (Tab. 4, 25). Vertreter der Untergruppe Gp5 hingegen zeigten ausschließlich in Analysen der 16S rRNA-Gene eine Beeinflussung durch die Verfügbarkeit von Kohlen- und Stickstoff im Boden, die sich allerdings in Grünland- und Waldböden gegensätzlich verhielt – bei hohen Konzentrationen beider Nährstoffe war die Abundanz im Grünland gering und im Wald hoch (Tab. 11, 12, 25). Nacke *et al.* (2011a) beschrieb eine positive Korrelation von *Acidobacteria* der Untergruppe Gp6 mit dem Stickstoffgehalt im Boden der Untersuchungsflächen der Schwäbischen Alb. Für die Böden aller drei Untersuchungsregionen konnte jedoch gezeigt werden, dass *Acidobacteria* der Untergruppe Gp6 außerdem positiv mit dem Gehalt an organischem Kohlenstoff korrelieren und desto häufiger vorkommen, je niedriger das CN-Verhältnis ist (Tab. 25). Das Vorkommen von Vertretern der Untergruppe Gp17 folgte dem gleichen Muster. *Acidobacteria* der Untergruppen Gp11 und Gp18 zeigten in T-RFLP-Profilen der 16S-rRNA-Gene im Grünland eine hohe Abundanz bei niedrigen Nährstoffkonzentrationen, im Wald jedoch eine hohe Aktivität bei einer hohen Verfügbarkeit von Kohlen- und Stickstoff sowie niedrigem CN-Verhältnis (Tab. 11, 18, 25). Auch die Pyrosequenzierung von bakteriellen 16S rRNA-Genen in 87 Böden Nord- und Südamerikas ließen auf einen positiven Zusammenhang der Abundanz der Untergruppe Gp18 und dem Gehalt an organischem Kohlenstoff im Boden schließen (Jones *et al.*, 2009). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten an, dass nicht das gesamte Phylum *Acidobacteria* sondern nur einzelne, häufig sehr abundante Untergruppen, wie z.B. Gp1 unter oligotrophen Bedingungen aktiv sind. Vertreter anderer Untergruppen, wie z.B. Gp6 und Gp17 bevorzugten hingegen nährstoffreichere Böden.

Auch Bodentemperatur und Bodenfeuchte beeinflussen die Zusammensetzung und Diversität bakterieller Gemeinschaften im Boden (Stres *et al.*, 2008). In der vorliegenden

Arbeit wurde vor allem die Bodenfeuchte als wichtiger Faktor für die Zusammensetzung der *Acidobacteria* in den untersuchten Böden erkannt (Tab. 10, 16, Abb. 8, 10), wobei die detektierten Untergruppen zum Teil unterschiedliche Reaktionen auf Änderungen dieses Bodenparameters zeigten (Tab. 11, 12, 17, 18, 25). So waren *Acidobacteria* der Untergruppe Gp1 umso abundanter je niedriger die Bodenfeuchte und höher die Bodentemperatur, die Untergruppe Gp3 hingegen bevorzugte eine hohe Bodenfeuchte und Gp4 zeigte eine höhere Aktivität in Waldböden bei niedrigerer Bodenfeuchte. Auch Jones *et al.* (2009) konnte einen Einfluss der Jahresniederschlagsmenge auf die Abundanz der Untergruppen Gp3 (positiv) und Gp4 (negativ) feststellen. Weiterhin waren *Acidobacteria* der Untergruppen Gp6 und Gp17 in feuchten Waldböden abundanter und aktiver (Tab. 12, 18, 25). Vertreter der Untergruppe Gp6 waren zudem in Grünlandböden niedriger Bodentemperatur abundant, Gp11 und Gp18 hingegen in Waldböden mit hoher Bodenfeuchte und geringer Bodentemperatur (Tab. 25). Jones *et al.* (2009) fand ebenfalls einen positiven Effekt des mittleren Jahresniederschlags auf die Häufigkeit der Untergruppen Gp11 und Gp18, aber auch der Jahresmitteltemperatur auf die Abundanz von Gp11 in Böden Nord- und Südamerikas. Außerdem nahm die Abundanz des Phylums *Acidobacteria* in einer Studie zu Saisonalität und Nährstoffverfügbarkeit in einem Birkenwaldboden mit niedriger Bodentemperatur und hoher Bodenfeuchte zu (Rasche *et al.*, 2010). Eine hohe Bodenfeuchte kann den Nährstoffaustausch vereinfachen und beschleunigen sowie die Beweglichkeit von Mikroorganismen erhöhen, während höhere Temperaturen die mikrobielle Aktivität sowie die Umsetzung organischen Materials steigern können.

Die Dynamik des Kohlenstoffs im Boden, Kohlenstoffbindung und -mineralisierung sowie Bodenatmung, spielt die wichtigste Rolle im Kohlenstoffzyklus in terrestrischen Ökosystemen (Raich und Schlesinger, 1992; Deng *et al.*, 2009). Über die Bodenatmungsrate kann eine Aussage über die Aktivität aller Organismen im Boden und den Umsatz an Kohlenstoff gemacht werden. Die Bodenatmungsrate hatte zwar kaum einen Effekt auf die Zusammensetzung des gesamten Phylums *Acidobacteria* in den Grünland- und Waldböden der drei Untersuchungsregionen (Tab. 10, 16, Abb. 8, 10), allerdings reagierten Vertreter einzelner Untergruppen auf die Bodenrespirationsrate. In Grünlandböden zeigten *Acidobacteria* der Untergruppen Gp1 und Gp3 eine höhere Abundanz bei hohem Umsatz von Kohlenstoff und die Untergruppen Gp5, Gp6, Gp11, Gp17 und Gp18 waren bei niedriger Bodenatmungsrate häufiger und aktiver (Tab. 25). Diese negative Beziehung der Kohlenstoffmineralisierungsrate zu den abundantesten *Acidobacteria*-Untergruppen in den untersuchten Böden passt zur Annahme, dass Vertreter der *Acidobacteria* K-Strategen sind und in oligotrophen Habitaten dominieren (Fierer *et al.*, 2007; Janssen, 2006).

In dieser Arbeit konnte ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Abundanz von *Protozoa*, möglichen Prädatoren von Bakterien, und *Acidobacteria* hergestellt werden. In Grünlandböden beeinflussten vor allem Ciliaten die Diversität des gesamten Phylums (Tab. 10, 16, Abb. 8, 10), allerdings war die Abundanz einzelner Untergruppen auch vom Vorkommen von Flagellaten und Amöben im Boden abhängig (Tab. 25). *Acidobacteria* der Untergruppe Gp4 waren in Waldböden mit geringer Anzahl an Amöben aktiver als in solchen mit einem hohen Vorkommen von Amöben, wohingegen Vertreter der Untergruppen Gp6 und Gp17 in amöbenreichen Böden häufiger vorkamen. Flagellaten waren hingegen in Waldböden zahlreicher vertreten in denen auch viele *Acidobacteria* der Untergruppe Gp5 zu finden waren. Bakteriengemeinschaften reagieren häufig mit morphologischen Veränderungen auf Prädation durch *Protozoa*, z.B. durch Bildung von filamentösen Zellen oder Mikrokolonien, die *Protozoa* nicht effektiv aufnehmen können (Hahn *et al.*, 1999; Jurgens und Matz, 2002). Allerdings sind *Protozoa* bei der Auswahl ihrer bakteriellen Beute, die sich zwischen verschiedenen Taxa unterscheiden kann, sehr selektiv (Boenigk und Arndt, 2002). Zum Beispiel können dieselben Bakterien durch verschiedene *Protozoa* auch unterschiedlich stark als Beute genutzt werden, aber auch ein Vertreter der *Protozoa* kann verschiedene bakterielle Beute unterschiedlich gut nutzen (Weisse, 2002). So können *Protozoa* langsam wachsende Bakterienpopulationen, wie z.B. einige Vertreter der *Acidobacteria*, durch Prädation ihrer schneller wachsenden bakteriellen Konkurrenten stimulieren (Bonkowski, 2004). Es konnte zwar bereits gezeigt werden, dass *Protozoa* sowie ihre bakterielle Beute sterilen Boden schnell besiedeln (Altenburger *et al.*, 2010), aber weitere Untersuchungen zu Einflüssen von *Protozoa* auf die morphologische, taxonomische und funktionelle Zusammensetzung von Bodenbakterien sind notwendig (Bonkowski, 2004).

Mikrobielle Gemeinschaften im Boden, und die Ökosystemprozesse, zu denen sie beitragen, können auch von Veränderungen der Pflanzenartenvielfalt beeinflusst werden (Zak *et al.*, 2003; Grüter *et al.*, 2006) Die Pflanzendiversität beeinflusste die acidobakterielle Gemeinschaft in einer Studie zur bakteriellen Zusammensetzung in vier Bodenlysimetern mit ansteigender Pflanzendiversität jedoch nicht (Zul *et al.*, 2007). Auch in der vorliegenden Arbeit zeigte nur die Zusammensetzung der Gemeinschaft der aktiven *Acidobacteria* in Grünlandböden eine leichte Abhängigkeit von der Anzahl der vaskulären Pflanzenarten (Tab. 16). Auf Ebene der Untergruppen zugeordneten abundanten T-RFs konnte nur für *Acidobacteria* der Untergruppe Gp1 eine höhere Aktivität in Grünlandböden mit geringer Pflanzendiversität (Tab. 17) und für Vertreter der Untergruppe Gp18 eine höhere Abundanz bei hoher Pflanzendiversität festgestellt werden (Tab. 11). Auch Kowalchuk *et al.* (2002) konnte zeigen, dass die Zusammensetzung der Pflanzenarten nur

einen sehr kleinen direkten Effekt auf die Zusammensetzung bakterieller Gemeinschaften im Boden hat. Indirekte Einflüsse von Pflanzendiversität z.B. über Veränderungen der Nährstoffverfügbarkeit im Boden auf Bodenbakterien sind aber durchaus denkbar. So verdoppelte sich die Anzahl von *Acidobacteria* der Untergruppe Gp1 in einem bewachsenen Graslandboden, wenn alle Pflanzen entfernt wurden, wohl begründet durch eine geringere Verfügbarkeit von organischem Kohlenstoff und Stickstoff, sobald der Eintrag organischen Materials durch Pflanzen wegfiel (Thomson *et al.*, 2010).

Die Struktur bakterieller Gemeinschaften kann nicht nur durch Bodenparameter sondern auch durch Landnutzung und Landnutzungsänderungen beeinflusst werden (Acosta-Martinez *et al.*, 2008; Wakelin *et al.*, 2008; Jesus *et al.*, 2009). Allerdings zeigte in dieser Arbeit nur die Zusammensetzung der Gemeinschaft der aktiven *Acidobacteria* in Grünlandböden eine schwache Abhängigkeit von der Landnutzungsintensität (Tab. 16). Auch Ergebnisse von Lauber *et al.* (2008) ließen darauf schließen, dass eher Modifikationen edaphischer Eigenschaften als die Landnutzung selbst Veränderungen mikrobieller Gemeinschaften hervorrufen. Bakteriengemeinschaften in Böden schienen zudem gegenüber Landnutzungsänderungen stabiler als gegenüber saisonalen Veränderungen (Hamer *et al.*, 2008).

Eine weitere Rolle für die Zusammensetzung acidobakterieller Gemeinschaften in den untersuchten Waldböden spielte der Gehalt an Ammonium (Tab. 10, 16), wohingegen Einflüsse von Nitrat nur für wenige Untergruppen gezeigt werden konnten (Tab. 25). Das Ausgangsprodukt der Nitrifikation, Ammonium, wird durch Adsorption an Tonminerale im Boden gebunden, wohingegen das Endprodukt der Nitrifikation, Nitrat, leicht ausgewaschen werden kann. So waren *Acidobacteria* der Untergruppen Gp1 und Gp4 umso abundanter bzw. aktiver je höher die Ammoniumkonzentration im Boden war. Für Vertreter der Untergruppen Gp1 und Gp3 wurde auch bereits in Genomanalysen gezeigt, dass diese zur Nitrifikation befähigt sind (Ward *et al.*, 2009). Für *Acidobacteria* der Untergruppen Gp5, Gp6 und Gp17 wurde hingegen eine erhöhte Abundanz und Aktivität in Waldböden mit einem geringen Gehalt an Ammonium festgestellt. Die Anzahl von *Acidobacteria* der Untergruppen Gp3, Gp6 und Gp17 erhöhte sich mit hohem Nitratgehalt in Böden (Tab. 25). *Acidobacteria* zeigten auf der Ebene des gesamten Phylums ebenfalls eine positive Korrelation mit der Ammoniumkonzentration in einem Birkenwaldboden, aber keine Abhängigkeit vom Nitratgehalt (Rasche *et al.*, 2010).

Um eine ausreichende Versorgung von Organismen mit Phosphor zu gewährleisten, ist dessen permanente Mobilisierung aus labilen Phosphorfraktionen notwendig, da die Konzentration von Phosphor in der Bodenlösung generell gering ist (Alt *et al.*, 2011). Die Verfügbarkeit von Phosphor wird kurzfristig durch biologische und langfristig durch

geochemische Prozesse reguliert (Cross und Schlesinger, 1995). In der vorliegenden Arbeit zeigte der Phosphorgehalt der Böden einen großen Einfluss auf die Zusammensetzung von *Acidobacteria*-Gemeinschaften (Tab. 10, 16, Abb. 8, 10), wobei zu beachten ist, dass dieser mit dem pH-Wert korreliert (Anhang Tab. 2). In sauren Böden (pH < 5,5) kann die Verfügbarkeit von Phosphor gering sein, da er als Al- oder Fe-Phosphat ausfällt (Foy *et al.*, 1978; Haynes, 1982), aber auch in Böden mit höherem pH-Wert kann Phosphor als Ca-Phosphat ausfallen (Sornsrivichai *et al.*, 1984). *Acidobacteria* der Untergruppen Gp1 und Gp4 traten in Böden mit niedrigem Phosphatgehalt besonders häufig auf, wohingegen Vertreter der Untergruppen Gp5, Gp6, Gp11, Gp17 und Gp18 dem umgekehrten Muster folgten und sich in phosphorreichen Böden abundanter und/oder aktiver zeigten (Tab. 25). In einem südbrasilianischen Regenwald, wo *Acidobacteria* 63% der Bakteriengemeinschaft ausmachten, war die bakterielle Diversität bei hohem Phosphatgehalt gering (Faoro *et al.*, 2010) und auch in Ackerböden mit hohem Phosphatgehalt wurden relativ wenige *Acidobacteria* detektiert im Vergleich zu nicht mehr bewirtschafteten phosphatarmen Graslandböden (Kuramae *et al.*, 2010).

Die Sequenzierung der 16S rRNA-Gene erlaubte eine detaillierte Analyse der Sequenzdaten auf Korrelationen mit Umweltvariablen nicht nur auf dem Niveau der *Acidobacteria* und ihrer Untergruppen sondern auch einzelner Phylotypen (Tab. 13, 14). Bisher wurde nur für das Vorkommen der abundantesten Phylotypen acidobakterieller 16S rRNA-Gensequenzen aus Böden Nord- und Südamerikas ein Bezug zum pH-Wert des entsprechenden Bodens hergestellt (Jones *et al.*, 2009). In der vorliegenden Arbeit konnten die Korrelationen der Umweltfaktoren mit der Abundanz der *Acidobacteria*-Untergruppen, wie sie durch die Analyse relativer Häufigkeiten einzelner T-RFs für Grünland- oder Waldböden gezeigt wurden, durch die Analyse über alle OTUs einer Untergruppe bestätigt werden (Tab. 13). Ein Einfluss der Anzahl der vaskulären Pflanzen auf die Zusammensetzung der *Acidobacteria*-Untergruppe Gp5 konnte jedoch nur durch diese detaillierte Analyse der 16S rRNA-Gensequenzdaten der Grünland- und Waldböden aller drei Untersuchungsregionen bis auf die Ebene einzelner Phylotypen aufgedeckt werden (Tab. 25). Aber nicht nur die einzelnen *Acidobacteria*-Untergruppen, sondern selbst die verschiedenen Phylotypen (OTUs) einer Untergruppe reagierten zum Teil unterschiedlich auf Umweltvariablen. Für die Untergruppe Gp1 war z.B. die negative Korrelation mit dem Gehalt an Stickstoff nicht für alle abundanten OTUs signifikant und die abundanten Phylotypen der Untergruppe Gp6 zeigten am wenigsten Konsistenz bezüglich der Beeinflussung durch Umweltfaktoren. Für die Untergruppe Gp5 konnte durch zwei OTUs der Einfluss der Anzahl der vaskulären Pflanzen auf die Zusammensetzung dieser *Acidobacteria*-Untergruppe bekräftigt werden (Tab. 14, Abb.

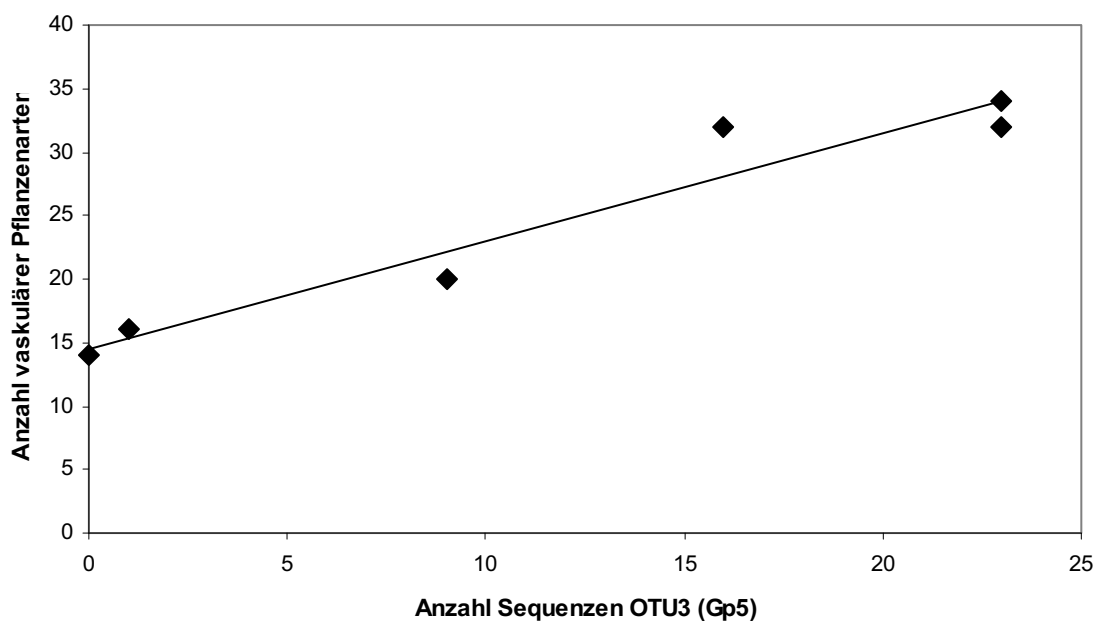


Abbildung 32. Zusammenhang zwischen der Anzahl vaskulärer Pflanzenarten und der Anzahl der Klonsequenzen im Phylotyp OTU3 der *Acidobacteria*-Untergruppe Gp5.

32) – ein Effekt, der darauf hindeutet, dass Biodiversitätsveränderungen höherer Taxa bestimmte Bakterienpopulationen im Boden beeinflussen können. Allerdings konnte nur einer der abundanten Phylotypen der Untergruppe Gp1 (OTU32) kultiviert und beschriebenen Vertretern zugeordnet werden: *Edaphobacter modestus* und *E. aggregans*. Da diese insgesamt 15 abundanten Phylotypen aber vermutlich überproportional zur Funktion biogeochemischer Zyklen im Boden beitragen, sollte mit Hilfe der in dieser Arbeit gewonnenen Kenntnisse ihrer Physiologie die Isolierung aus den geeigneten Böden und ihre Charakterisierung angestrebt werden.

Die meisten Studien zur Diversität der *Acidobacteria* im Boden versuchten das Vorkommen des gesamten Phylums und nur selten auch einzelner abundanter Untergruppen mit wenigen Boden- und Standorteigenschaften in Verbindung zu bringen (Kielak *et al.*, 2008; Rasche *et al.*, 2010; Will *et al.*, 2010; Nacke *et al.*, 2011a). In der vorliegenden Arbeit hingegen wurden Einflüsse von Bodeneigenschaften, Nährstoffverfügbarkeiten, Abundanzen höherer Taxa und Landnutzung auf das Phylum *Acidobacteria*, als auch dessen Untergruppen und sogar einzelne Phylotypen untersucht. Dabei wurde deutlich, dass die einzelnen Untergruppen unterschiedliche Böden bevorzugen und es selbst innerhalb von Untergruppen, also auf Ebene der Phylotypen, verschiedene Reaktionen auf Umweltvariablen geben kann. Bisher wurden *Acidobacteria* generell als *K*-Strategen und oligotrophe Bakterien charakterisiert (Fierer *et al.*, 2007), die

Tabelle 26. Überblick über Korrelationen der Abundanzen von Vertretern einzelner *Acidobacteria*-Untergruppen in den untersuchten 27 Grünland- und 30 Waldböden mit ausgewählten Boden- und Standortparametern (+ positive Korrelation, - negative Korrelation) und der darauf basierende Vorschlag der Zuordnung zu oligotropher oder copiotropher Lebensweise (Fierer *et al.*, 2007).

		Gp1	Gp3	Gp4	Gp5	Gp6	Gp11	Gp17	Gp18
T-RF (bp)		253, 256	142	139	134	163, 189, 192, 281, 283	460	130	272
Stressfaktoren	pH	-	+	-	+	+	+	+	+
	Bodenfeuchte	-	+	-	+/-	+	+	+	+
	Bodentemperatur	+			-	-	-		-
Nährstoff- verfügbarkeit	org. Kohlenstoff	-	+	-	+/-	+	+/-	+	+/-
	Stickstoff	-	+	-	+/-	+	+/-	+	+/-
	Ammonium	+		+	-	-		-	
	Phosphor	-		-	+	+	+	+	+
Oligotrophie/ Copiotrophie		oligo- troph	copio- troph	oligo- troph	eher copio- troph	copio- troph	eher copio- troph	copio- troph	eher copio- troph

langsame Wachstumsraten und bei geringer Nährstoffverfügbarkeit aufgrund hoher Substrataffinitäten Vorteile gegenüber copiotrophen *Bacteria* zeigen. Copiotrophe *Bacteria* hingegen konsumieren vorrangig leicht abbaubaren organischen Kohlenstoff, haben hohe Nährstoffansprüche und können schnelle Wachstumsraten aufweisen (Tate, 2000). Demzufolge sollten in Böden mit großen Mengen verfügbaren organischen Kohlenstoffs copiotrophe *Bacteria* abundant und aktiv sein, wohingegen oligotrophe *Bacteria* in Böden mit organischem Kohlenstoff niedriger Qualität oder Menge dominieren sollten (Fierer *et al.*, 2007). Die hier untersuchten Böden zeigten eine Spanne von 14 bis 284 g organischen Kohlenstoff je kg Boden, also Unterschiede von über einer Größenordnung. *Acidobacteria* der Untergruppe Gp1 und Gp4 waren in Böden mit geringem organischem Kohlenstoffgehalt tatsächlich häufiger und aktiver als in kohlenstoffreichen Böden – zeigten also eine oligotrophe Lebensweise (Tab. 26). Vertreter der Untergruppen Gp3, Gp5, Gp6, Gp11, Gp17 und Gp18 würden nach dieser Definition allerdings eher den copiotrophen *Bacteria* zugeordnet werden (Tab. 26). Außer gegenüber Nährstoffverfügbarkeiten zeigten diese *Acidobacteria* in der vorliegenden Arbeit auch gegenüber Stressfaktoren, wie pH-Wert, Bodenfeuchte und -temperatur, ein Verhalten entsprechend der Einteilung in oligotrophe und copiotrophe *Bacteria* (Tab. 26, Fierer *et al.*, 2007). Während oligotrophe *Bacteria* solchen Stressfaktoren standhalten können, reagieren copiotrophe *Bacteria* darauf hochsensibel, z.B. mit Bildung von Sporen. Weitere von Fierer *et al.* (2007) vorgeschlagene ökologische Merkmale, die oligotrophe und copiotrophe Lebensweisen beschreiben könnten, weisen wiederum eher auf eine generell oligotrophe Lebensweise der *Acidobacteria* hin: z.B. Benachteiligung gegenüber copiotrophen *Bacteria* in nährstoffreichen Habitaten (siehe Kapitel 3.6. und 4.5.). Auch im

Phylum *Proteobacteria* folgten nicht beide analysierten Klassen (α - und β -*Proteobacteria*) eindeutig dieser durch Fierer *et al.* (2007) angeregten Klassifikation. Die vorliegende Arbeit lässt daher vermuten, dass *Acidobacteria* nicht allgemein als oligotroph einzuordnen sind, sondern verschiedene Untergruppen und vielleicht sogar einzelne Phylotypen dieser Untergruppen copiotroph sein können. Allerdings sind bisher nur wenige Vertreter der hier potentiell copiotroph beschriebenen *Acidobacteria*-Untergruppen isoliert oder charakterisiert wurden und erschweren somit die Überprüfung ökologischer Merkmale oligotropher und copiotropher Lebensweisen.

Erstmalig konnte mit dieser Arbeit auch ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Abundanz von *Protozoa*, möglichen Prädatoren von Bakterien, und verschiedenen Untergruppen bzw. Phylotypen der *Acidobacteria* hergestellt werden. Anhand der unterschiedlichen Beeinflussung der Abundanz von *Acidobacteria* der Untergruppe Gp5 durch Flagellaten und Ciliaten wurde deutlich, dass Bakterien durch verschiedene *Protozoa* unterschiedlich gut als Beute genutzt werden können. Eine Beziehung zwischen der Anzahl der Amöben und *Acidobacteria* der Untergruppen Gp1 und Gp5 in Böden wurde jedoch nur anhand der Analyse von abundanten Phylotypen deutlich (Tab. 27). Positive Korrelationen von *Protozoa* und Vertretern der *Acidobacteria* könnten darauf hindeuten, dass diese langsam wachsenden Bakterienpopulationen durch Prädation ihrer schneller wachsenden bakteriellen Konkurrenten stimuliert werden (Bonkowski, 2004) oder aber für *Protozoa* toxische Sekundärmetabolite bilden (Matz *et al.*, 2004). Entsprechend könnte eine negative Korrelation von *Protozoa* und Vertretern der *Acidobacteria* anzeigen, dass diese zu ihrer bevorzugten Beute gehören. Demnach würden sich Amöben, die im Boden erfolgreichsten Prädatoren unter den *Protozoa* (Bonkowski, 2004), speziell von oligotrophen *Acidobacteria* der Untergruppen Gp1 und Gp4 ernähren, wohingegen Ciliaten die eher copiotrophen *Acidobacteria* (Gp5, Gp6, Gp11 und Gp18) bevorzugen

Tabelle 27. Überblick über Korrelationen der Abundanzen von Vertretern einzelner *Acidobacteria*-Untergruppen in den untersuchten 27 Grünland- und 30 Waldböden mit Abundanzen von *Protozoa* (+ positive Korrelation, - negative Korrelation).

	Gp1	Gp3	Gp4	Gp5	Gp6	Gp11	Gp17	Gp18
T-RF (bp) ^a	86	142	139	134	163, 189, 192, 281, 283	460	130	272
OTU ^b	2, 7, 32, 94, 119			3, 15, 31	6, 9, 45, 92, 99, 115			
Amöben	- ^b		- ^a	+ ^b	+ ^{a, b}		+ ^a	
Flagellaten				+ ^a				
Ciliaten		+ ^a		- ^a	- ^a	- ^a		- ^a

könnten (Tab. 27). Da Beziehungen von *Protozoa*-Prädatoren zu ihrer bakteriellen Beute im Boden aber einer großen Dynamik unterliegen, ist durchaus vorstellbar, dass auch umgekehrte Verhältnisse vorliegen könnten und Vertreter der *Protozoa* gerade da, wo ihre Beute zahlreich ist auch selbst abundant auftreten. Mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung oder auch stabiler Isotopenbeprobung könnten solche mutmaßlichen Räuber-Beute-Beziehungen geprüft und ein Einblick in die komplexen Nahrungsnetze im Boden gewonnen werden.

4.3. Vergleich abundanter und physiologisch aktiver *Acidobacteria*

Die Diversität und Zusammensetzung der *Acidobacteria* jedes einzelnen Bodens wurde über T-RFLP-Analyse sowohl auf Basis der 16S rRNA-Gene als auch der 16S rRNA durchgeführt, um nicht nur die numerisch abundanten (siehe Kapitel 3.3.) sondern auch die physiologisch aktiven (siehe Kapitel 3.4.) *Acidobacteria* zu erfassen. DNA-basierte Analysen geben lediglich einen Aufschluß über das genetische Potenzial eines Habitats, da DNA auch in ruhenden, sterbenden, oder toten Zellen überdauern oder als extrazelluläre DNA vorkommen kann (Coolen und Overmann, 1998). Im Gegensatz dazu ist RNA sehr instabil, und der Gehalt ribosomaler RNA in einer Zelle abhängig von ihrem physiologischen Zustand (Kramer und Singleton, 1993; Lee und Kemp, 1994). Mit Hilfe von 16S rRNA-basierten Analysen erhält man demzufolge einen Überblick über die metabolisch aktiven Mitglieder in einer komplexen mikrobiellen Gemeinschaft.

Hinsichtlich der Zusammensetzung und Strukturierung unterschieden sich die abundanten (16S rRNA-Gene) von den aktiven (16S rRNA) *Acidobacteria* kaum (Abb. 7, 9; Tab. 9, 15). Allerdings war die durchschnittliche Anzahl der T-RFs und auch die mittlere Shannon-Diversität der 16S rRNA-basierten Profile signifikant höher, vermutlich weil bei Fokussierung auf die 16S rRNA-Gene vor allem die abundanten und nicht auch die seltenen aber physiologisch aktiven Bakterien detektiert werden. Der Vergleich von 16S rRNA- und 16S rRNA-Gen-*fingerprints* lässt üblicherweise sich überlappende mikrobielle Gemeinschaften in Böden erkennen, mit wenigen DNA- und RNA-exklusiven Vertretern und höherer Diversität in DNA-basierten Analysen (Mengoni *et al.*, 2005; Juottonen *et al.*, 2008; Lillis *et al.*, 2009). Allerdings könnten z.B. auch durch Huminstoffe, die bei der Nukleinsäureextraktion nicht vollständig entfernt werden konnten, Inhibierungseffekte bei der Amplifikation auftreten (Tebbe und Vahjen, 1993) und zur Detektion einer geringeren Diversität führen. Die Verunreinigung mit Huminsäuren in den Gesamtnukleinsäureextrakten, die verdünnt als DNA-Matrize eingesetzt wurden, war vermutlich größer als in RNA-Extrakten (aufgrund zusätzlicher Aufreinigungs- und Verdünnungsschritte). Während in DGGE-Analysen bakterieller Gemeinschaften der Rhizosphäre von *Chrysanthemum*

Profile ausgehend von 16S rRNA weniger komplex waren als Profile der 16S rRNA-Gene (Duineveld *et al.*, 2001), wurden in nur einem von zwei Böden weniger bakterielle T-RFs mit 16S rRNA- im Vergleich zu DNA-basierten Analysen detektiert (Mengoni *et al.*, 2005). Im Rahmen der Biodiversitäts-Exploratorien wurden außerdem die acidobakterielle 16S rRNA und ihre Gene in den 27 Grünland- und 30 Waldböden der drei Untersuchungsregionen quantifiziert (Foesel *et al.*, 2011). In Grünlandböden waren durchschnittlich 18% (10-28%) *Acidobacteria* vorhanden, aber nur 9% (4-16%) davon waren auch physiologisch aktiv. In Waldböden waren die *Acidobacteria* mit 21% (11-31%) etwas abundanter, aber davon etwa ebenfalls nur die Hälfte (10%, 4-16%) physiologisch aktiv (Foesel *et al.*, 2011). Diese geringere Abundanz physiologisch aktiver *Acidobacteria* in den untersuchten Böden kann dazu geführt haben, dass bei Fokussierung auf die 16S rRNA nicht nur die abundanten, sondern auch die seltenen aber physiologisch aktiven Bakterien detektiert wurden und somit zu einer höheren Diversität und Anzahl von T-RFs führte.

Auf Ebene einzelner T-RFs konnten in der vorliegenden Arbeit signifikante Unterschiede der relativen Häufigkeit zwischen den T-RFLP-Profilen der 16S rRNA-Gene und 16S rRNA festgestellt werden (Abb. 33). Es wurden nur acidobakterielle T-RFs, deren mittlere relative Abundanz entweder in Grünland- oder Waldböden > 3% war, auf signifikante Unterschiede zwischen Präsenz (16S rRNA-Gene) und Aktivität (16S rRNA) getestet. So waren T-RFs der Untergruppen Gp1 (T-RF 86 bp) und Gp6 (T-RF 192 bp) vor allem in den untersuchten Grünland- aber auch in den Waldböden abundant vertreten, allerdings mit geringer Aktivität. Umgekehrt verhielt es sich für T-RFs der Untergruppen Gp17 (T-RF 130 bp), Gp4 (T-RF 139 bp) und Gp3 (T-RF 142 bp), die zum Zeitpunkt der Probenahme wenig abundant aber sehr aktiv waren. Für T-RF 134 bp (Gp5) war dieser Unterschied zwischen geringer Abundanz und hoher Aktivität nur in Waldböden signifikant (Abb. 33).

Generell waren die Einflüsse von Umweltfaktoren auf die Zusammensetzung abundanter (16S rRNA-Gene) und aktiver (16S rRNA) *Acidobacteria* ähnlich. In Grünlandböden wurden die abundanten *Acidobacteria* aber eher vom Kohlenstoff- und Stickstoffgehalt, die aktiven *Acidobacteria* jedoch durch den pH-Wert und die Feuchte des Bodens beeinflusst. (Tab. 10, 16; Abb. 8, 10). Die differentiellen Aktivitätsmuster der *Acidobacteria*-Untergruppen spiegelten sich auch in der Beeinflussung der Untergruppen durch Umweltfaktoren wieder. So wurden bei Betrachtung der abundanten und aktiven *Acidobacteria* für unterschiedliche T-RFs Abhängigkeiten von Umweltfaktoren gefunden oder dieselben T-RFs korrelierten mit anderen Umweltfaktoren (Tab. 11, 12, 17, 18). So konnte ein Effekt von Umweltfaktoren ausschließlich auf vorhandene *Acidobacteria* der Untergruppe Gp5 (T-RF 134 bp) und ausschließlich auf aktive *Acidobacteria* der Untergruppe Gp1 (T-RF 86) beobachtet werden (Tab. 11, 12, 17). Die T-RFs 130 bp

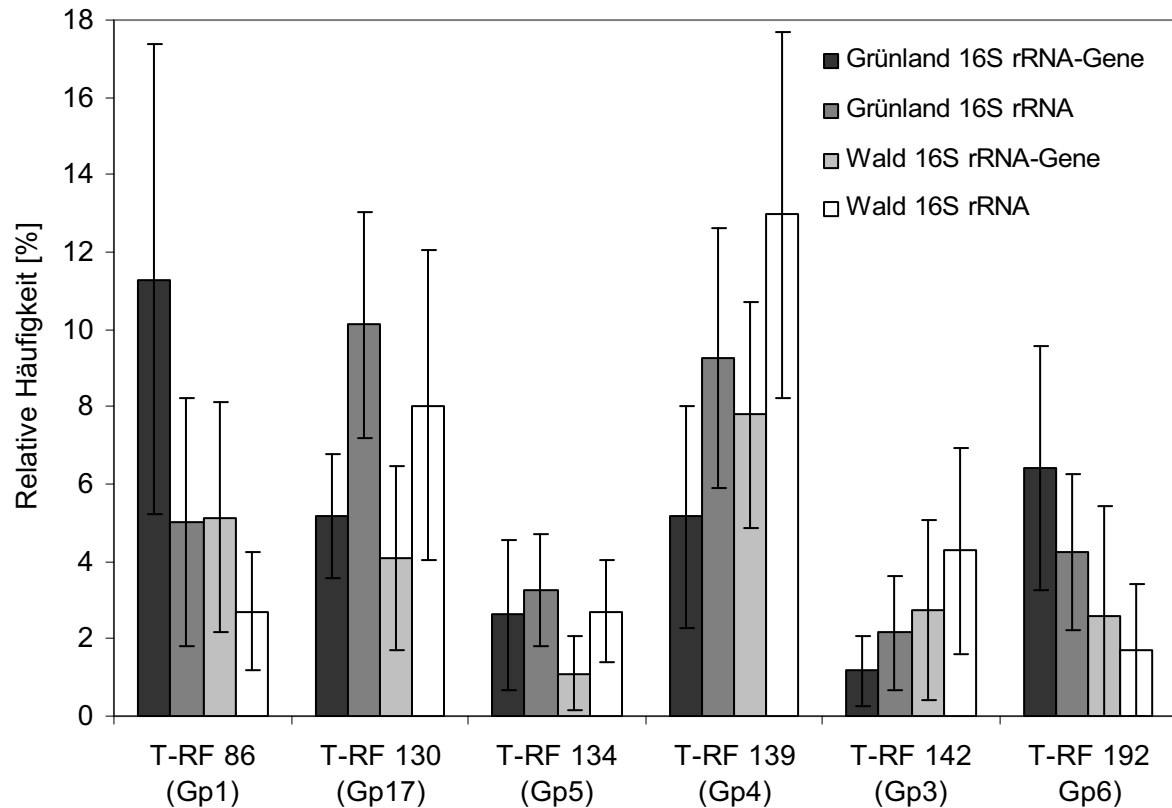


Abbildung 33. Vergleich der mittleren relativen Häufigkeit einzelner T-RFs zwischen T-RFLP-Profilen der 16S rRNA-Gene und 16S rRNA für Grünland- und Waldböden. Nur T-RFs mit signifikanten Unterschieden (*t*-Test) sind dargestellt.

(Gp17), 142 bp (Gp3) und 192 bp (Gp6) folgten in T-RFLP-Profilen der 16S rRNA-Gene und der 16S rRNA demselben Muster der Beeinflussung durch Umweltfaktoren, obwohl sie sich in ihren Abundanzen zwischen vorhandenen und aktiven Vertretern der entsprechenden *Acidobacteria* signifikant unterschieden. *Acidobacteria* der Untergruppe Gp4 (T-RF 139 bp) hingegen waren in Waldböden sehr aktiv, ihre Abundanz steigerte sich in 16S rRNA-basierten T-RFLP-Profilen um 60% gegenüber 16S rRNA-Gen-basierten Studien. Nur für die aktiven *Acidobacteria* der Untergruppe Gp4, repräsentiert durch das T-RF 139 bp, konnte gezeigt werden, dass sie durch einen eher sauren pH-Wert, niedrige Kohlenstoff- und Stickstoffverfügbarkeit sowie Trockenheit stimuliert werden (Tab. 18). Die Änderungen von Abundanzen einzelner T-RFs bzw. Untergruppen der *Acidobacteria* als Antwort auf veränderliche Standort- und Bodeneigenschaften sowie Abundanzen höherer Taxa wurden, wie bereits in anderen Studien (Mengoni *et al.*, 2005; Lillis *et al.*, 2009) gezeigt, deutlicher durch RNA-basierte Analysen gefunden. Diese differentiellen Aktivitäten verschiedener Vertreter der *Acidobacteria*-Untergruppen zeigen, dass nicht die Aktivität des gesamten Phylums in jedem Boden gegenüber der Präsenz

herabgesetzt ist (Foesel *et al.*, 2011), sondern verschiedene *Acidobacteria* auch unter ganz verschiedenen Bedingungen sehr aktiv sein können.

4.4. Saisonale Veränderungen aktiver *Acidobacteria*-Gemeinschaften

Saisonale Veränderungen von Umweltfaktoren können auch die Zusammensetzung mikrobieller Gemeinschaften im Boden verändern. So zeigte Rasche *et al.* (2010), dass Saisonalität und Nährstoffverfügbarkeit bakterielle und archaeelle Gemeinschaften in einem Birkenwaldboden beeinflussen. PLFA-Analysen eines alpinen Tundrabodens in Schweden wiesen auf zwei Zeitpunkte saisonaler Veränderungen der mikrobiellen Gemeinschaft hin, von denen einer mit der Schneeschmelze in Verbindung stand und der zweite in der Vegetationsperiode auftrat (Björk *et al.*, 2008). Weiterhin hatten jahreszeitliche Variationen, vor allem der Bodentemperatur, Bodenfeuchte und verfügbaren Nährstoffe einen starken Einfluss auf die Diversität nitrifizierender und denitrifizierender Mikroorganismen in konventionell bewirtschafteten und unbewirtschafteten Böden in Kanada (Smith *et al.*, 2010). Keine dieser Studien fokussierte jedoch auf saisonale Veränderungen nur eines einzelnen bakteriellen Phylums in einer größeren Anzahl verschiedenartiger Böden. In der vorliegenden Arbeit wurde die saisonale Dynamik der Zusammensetzung und Diversität von *Acidobacteria*-Gemeinschaften in 26 Grünland- und 30 Waldböden der drei Untersuchungsregionen Deutschlands im April, Juni, August und Oktober eines Jahres analysiert. Veränderungen physiologisch aktiver *Acidobacteria* wurden mittels vergleichender T-RFLP-Analysen der 16S rRNA beobachtet. Eine DNA-basierte Analyse hätte schnelle Änderungen der acidobakteriellen Gemeinschaft übersehen können, da sowohl aktive als auch inaktive Mikroorganismen erfasst werden, wohingegen die Ribosomenzahl pro Zelle in etwa proportional mit der Wachstumsrate steigt und 16S rRNA-basierte Analysen als ein Indikator aktiver Bakterien gesehen werden können (Mannistö *et al.*, 2009).

Ähnlich wie in anderen Studien (Rasche *et al.*, 2010) unterschieden sich Bodenfeuchte und Bodentemperatur signifikant über das Jahr (Abb. 11), der pH-Wert zeigte hingegen keine jahreszeitlichen Schwankungen. Auch in Wäldern Nordenglands variierte der pH-Wert in Eichen- und Lärchenstreu monatlich aber nicht im Mineralboden unter dieser Streuauflage (Frankland *et al.*, 1963). Der Einfluss der Region, des Bodentyps, der Landnutzung Grünland oder Wald, des pH-Wertes und der Bodenfeuchte auf die Zusammensetzung der *Acidobacteria*-Gemeinschaften im Boden war größer als ein Effekt der Jahreszeit. Insbesondere in Grünlandböden waren Unterschiede zwischen den T-RFLP-Profilen der saisonal verschiedenen Böden detektierbar (Tab. 19, 20). Ebenso

beeinflusste Saisonalität die Zusammensetzung der *Acidobacteria* und die Abundanz des gesamten Phylums in einem Birkenwaldboden (Rasche *et al.*, 2010). Die *Acidobacteria*-Diversität wurde sowohl in Grünland- als auch in Waldböden nicht nur von Region, Bodentyp und pH-Wert des Bodens bestimmt sondern ähnlich stark auch durch die Saisonalität (Abb. 12, Anhang Tab. 5). Saisonalität in Böden beinhaltet Änderungen der Bodenfeuchte und -temperatur, bekannte Kontrollfaktoren der Zusammensetzung mikrobieller Gemeinschaften (Stres *et al.*, 2008). Außerdem unterliegt die Verfügbarkeit von Nährstoffen saisonalen Schwankungen (Farley und Fitter, 1999) und ist ein weiterer Faktor, der die Struktur von Bodenbakteriengemeinschaften beeinflusst. In nicht landwirtschaftlich genutzten Böden der gemäßigten Breiten nimmt die Nährstoffkonzentration im Allgemeinen im Frühjahr zu, es kann aber auch noch ein zweites kleineres Nährstoffmaximum im Herbst oder Winter auftreten (Chapin, 1980). In den 56 untersuchten Böden waren die *Acidobacteria* im August, wenn die Bodenfeuchte niedrig war, am wenigsten divers. Im Oktober, wenn die Bodenfeuchte etwa 10 vol% höher und die Bodentemperatur etwa 8°C niedriger als im August lag, war die Diversität der *Acidobacteria* am höchsten (Abb. 11, 12). In einem tropischen Weideboden waren *Acidobacteria* hingegen in der Trockenzeit häufiger als in der Regenzeit (Diallo *et al.*, 2004) und in einem trockenen Boden in den USA abundanter als in einem feuchten Boden (Castro *et al.*, 2010). Im Gegensatz dazu stellte Rasche *et al.* (2010), in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit (Abb. 12), eine positive Korrelation von *Acidobacteria* und Bodenfeuchte und eine negative Korrelation der Abundanz und Bodentemperatur fest. Steigende Temperaturen können die mikrobielle Aktivität und die Umsetzung organischen Materials steigern und dazu führen, dass sich die mikrobielle Gemeinschaft dahingehend verändert, dass Bakterien mit hohen Wachstumsraten und Anpassung an höhere Temperaturen die Gemeinschaft dominieren (Zogg *et al.*, 1997; Ehrenfeld *et al.*, 1997). Entsprechend würden kalte Temperaturen die Konkurrenz zwischen Bakterien senken und zur Detektion von eher seltenen Arten und einer höheren Diversität führen. Die meisten Studien über *Acidobacteria* heben deren metabolische Vielseitigkeit, Anpassung an Nährstofflimitierung und Umweltveränderungen sowie langsames Wachstum hervor (Ward *et al.*, 2009; Fierer *et al.*, 2007). Die Genome von drei *Acidobacteria* der Untergruppen Gp1 und Gp3 zeigen genetische Eigenschaften, die typisch für Mikroorganismen sind, die Trockenstress und Schwankungen der Bodenfeuchte überstehen können (Ward *et al.*, 2009). In den hier untersuchten Böden reagierten die *Acidobacteria*-Untergruppen unterschiedlich auf die saisonal schwankende Bodenfeuchte. Die Vertreter der Untergruppen Gp1 (T-RF 85 bp) und Gp6 (T-RF 191 Gp) bevorzugten eher trockenere Böden, *Acidobacteria* der Untergruppen Gp11 (T-RF 461 bp) und Gp18 (T-RF 273 bp) hingegen eher feuchte Böden (Tab. 28). Eine hohe

Bodenfeuchte kann den Nährstoffaustausch vereinfachen und beschleunigen sowie die Beweglichkeit von Mikroorganismen erhöhen. Vertreter der *Acidobacteria* scheinen jedoch gut an eine Limitierung von Nährstoffen angepasst zu sein (*K*-Strategen) und könnten in trockenen Böden dominieren, in denen eine niedrigere Pflanzenproduktivität zu einer geringeren Verfügbarkeit von Kohlenstoffquellen und generell eher oligotrophen Nischen führen könnte (Castro *et al.*, 2010). *Betaproteobacteria* bevorzugen hingegen copiotrophe Bedingungen (Fierer *et al.*, 2007) und das Verhältnis der *Acidobacteria* zu *Proteobacteria* wurde als Indikator der trophischen Einteilungen von Böden vorgeschlagen (Smit *et al.*, 2001). Die beobachteten Verhältnisse von *Acidobacteria* zu *Proteobacteria* deuteten tatsächlich darauf hin, dass trockene Böden oligotropher sind als feuchte Böden (Castro *et al.*, 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurden nicht nur saisonale Veränderungen des gesamten Phylums *Acidobacteria* im Boden analysiert, sondern auch die saisonale Dynamik einzelner Untergruppen der *Acidobacteria*, repräsentiert durch abundante T-RFs in den untersuchten Böden (Anhang Tab. 7, Abb. 14-22). Die Abundanz des T-RFs bei 85 bp, welches *Acidobacteria* der Untergruppe Gp1 zugeordnet werden kann, zeigte sich abhängig von Bodentyp und Jahreszeit und variierte zwischen Grünland- und Waldböden. Im Grünland konnten Bodentyp und Jahreszeit, im Wald Baumbestand und Nutzungsintensität Variationen des T-RFs 85 bp erklären. In ähnlicher Weise unterschied sich der Prozentsatz der T-RFs 191 bp und 281 bp, die beide *Acidobacteria* der Untergruppe Gp6 repräsentieren, zwischen den drei Untersuchungsregionen, Grünland und Wald, Bodentyp und pH-Wert, aber nur in Grünlandböden auch zwischen den Jahreszeiten. Im Gegensatz dazu variierte die Abundanz der T-RFs 188 bp (Gp6) und 273 bp (Gp11) saisonal sowohl in Grünland- als auch in Waldböden (Tab. 28). In

Tabelle 28. Überblick über signifikante jahreszeitliche Unterschiede in Bodenfeuchte, Bodentemperatur, *Acidobacteria*-Diversität und relativer Abundanz einzelner *Acidobacteria*-Untergruppen (Gp1, Gp6, Gp11, Gp18) der 26 Grünland- und 30 Waldflächen. + niedrigster Wert, ++ mittlerer Wert, +++ höchster Wert.

		April	Juni	August	Oktober
Bodenfeuchte		++	++	+	+++
Bodentemperatur		++	+++	+++	+
<i>Acidobacteria</i> -Diversität		++	++	+	+++
Gp1	T-RF 85 bp	++ ^a	+ ^a	+++ ^a	++ ^a
	T-RF 188 bp	+ ^a / +++ ^b	++ ^a / + ^b	++ ^a / + ^b	+++ ^a / ++ ^b
Gp6	T-RF 191 bp	++ ^a	++ ^a	+++ ^a	++ ^a
	T-RF 281 bp	++ ^a	+++ ^a	+ ^a	++ ^a
	T-RF 283 bp	+++ ^a	++ ^a	+ ^a	++ ^a
Gp11	T-RF 461 bp	+++ ^a	++ ^a	+ ^a	++ ^a
Gp18	T-RF 273 bp	++ ^a / +++ ^b	+++ ^a / ++ ^b	+ ^a / + ^b	++ ^a / +++ ^b

^a in Grünlandböden

^b in Waldböden

Grünlandböden waren die T-RFs 85 bp (Gp1) und 191 bp (Gp6) im August am abundantesten, das T-RF 281 bp (Gp6) im Juni sowie die T-RFs 283 bp (Gp6) und 461 bp (Gp11) im April am häufigsten. Das T-RF 188 bp (Gp6) zeigte in Grünland und Wald im Oktober die höchste Abundanz, wohingegen das T-RF 273 bp (Gp18) im Juni in Grünland- und im April sowie Oktober in Waldböden am abundantesten war (Tab. 28). Demzufolge zeigten Vertreter der *Acidobacteria*-Untergruppen unterschiedliche Reaktionen auf saisonale Variationen in den untersuchten Grünland- und Waldböden. In alpinen Böden wurden saisonale Veränderungen bakterieller Gemeinschaften auf einem ähnlichen taxonomischen Niveau untersucht. Dabei wurden *Acidobacteria* der Untergruppen Gp2, Gp5 und Gp7 nur im Frühjahr, der Untergruppe Gp3 im Frühjahr als auch Winter und der Untergruppen Gp1, Gp4 und Gp6 im Frühjahr, Sommer und Winter in variierenden Abundanzen detektiert (Lipson und Schmidt, 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals auf saisonale Veränderungen von *Acidobacteria*-Gemeinschaften auf Phylum- und Untergruppenebene fokussiert und die Analysen von zahlreichen verschiedenen Böden unterschiedlicher Landnutzung in drei Regionen verglichen. Es konnten saisonale Veränderungen der Zusammensetzung der *Acidobacteria* und der Abundanz einzelner Untergruppen vor allem in Grünlandböden detektiert werden, die Diversität der *Acidobacteria* unterschied sich aber auch in Waldböden saisonal. Die saisonale Variation konnte vor allem durch Veränderungen der Bodenfeuchte und Bodentemperatur erklärt werden, wohingegen der pH-Wert des Bodens über das Jahr stabil blieb, nichtsdestotrotz aber einen starken Einfluss auf die Zusammensetzung der *Acidobacteria*-Gemeinschaften hatte. Sicherlich ist die Verfügbarkeit von Nährstoffen ein weiterer Grund für saisonale Variationen der *Acidobacteria*. Saisonale Effekte auf bakterielle Gemeinschaften könnten eine Folge dessen sein, dass wechselnde Einträge von Wurzelexsudaten und Streu durch Veränderungen des Pflanzenwachstums und der Pflanzenphysiologie zu Unterschieden in der Verfügbarkeit von Nährstoffen führen.

4.5. Identifizierung am Abbau von Pflanzenmaterial beteiligter Bakterien

Abgestorbenes Pflanzenmaterial ist eine der Hauptquellen für Nährstoffe in natürlichen und landwirtschaftlich genutzten Ökosystemen. Pflanzenwachstum und der gleichzeitige Abbau von Pflanzenmaterial durch (Mikro-)Organismen sind essentiell für die Funktionen und Fruchtbarkeit des Bodens. Bodenmikroorganismen bauen Pflanzenpolymere ab und so sind zum Beispiel Vertreter der Gattungen *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Cytophaga*, *Cellulomonas*, *Actinomycetes* (Wirth und Ulrich, 2002), *Streptomyces* und *Micromonospora* (Lynd *et al.*, 2002) in der Lage Cellulose aerob zu verwerten. Bei

Verwendung von Pflanzenpolymeren als Kohlenstoff- und Energiequelle konnte auch die Diversität der kultivierbaren *Acidobacteria* erhöht werden (Eichorst *et al.*, 2011), weitergehend wurde die Fähigkeit des Phylums *Acidobacteria* Pflanzenpolymere abzubauen bisher jedoch wenig untersucht. Genomanalysen von drei *Acidobacteria* zeigten aber, dass diese als vielseitige heterotrophe Bakterien in der Lage sind Pflanzenpolymere sowie leicht oxidierbaren Kohlenstoff zu verwerten (Ward *et al.*, 2009).

Inkubationsexperimente zum Abbau von Pflanzenmaterial wurden bisher meist über Wochen oder sogar Monate und in nur einem Bodenökosystem durchgeführt (Bernard *et al.*, 2007). Jedoch ist wenig über Veränderungen mikrobieller Gemeinschaften in den ersten Tagen des Abbaus und Unterschiede zwischen Ökosystemen und Bodentypen bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde Boden einer Rinderweide und eines Naturbuchenwaldes der Region Hainich in Mikrokosmen mit ^{13}C -markierten Weizenblättern oder -wurzeln sieben Tage inkubiert. Der Abbau des Pflanzenmaterials wurde durch die Messung von Gesamt- CO_2 und $^{13}\text{CO}_2$ verfolgt. Nach verschiedenen Zeitpunkten der Inkubation wurde RNA extrahiert und mit ^{13}C angereicherte ‚schwere‘ RNA von unmarkierter ‚leichter‘ RNA durch Dichtegradientenzentrifugation getrennt. Die am Abbau von Pflanzenmaterial beteiligten Bakterien wurden mittels T-RFLP-Analyse, Klonierung und Sequenzierung sowie Pyrosequenzierung der ‚schweren‘ und ‚leichten‘ 16S rRNA identifiziert. Während der Inkubation assimilierte die mikrobielle Gemeinschaft in allen Mikrokosmen aktiv Kohlenstoff, aber Mikrokosmen mit Zusatz von Weizenmaterial zeigten höhere Mineralisierungsraten (Abb. 23A). Die biochemischen Eigenschaften und die Qualität von abgestorbenem Pflanzenmaterial beeinflussen dessen Abbau und die daraus resultierenden Kohlenstoff- und Stickstoffflüsse (Swift *et al.*, 1979). In einer Studie zur Zersetzung von Weizenmaterial wurden die Zusammensetzung der Zellwand und die Gewebestruktur von Blättern, Internodien und Wurzeln vor und nach dem Eintrag in Boden bestimmt. Schwach lignifizierte Blätter zersetzten sich schneller als Internodien oder Wurzeln und Cellulose war das am stärksten abgebaute Polysaccharid, unabhängig vom Weizenbestandteil (Bertrand *et al.*, 2006). Auch biochemische Charakteristika physiologisch vollständig ausgereiften Weizenmaterials unterscheiden sich zwischen Blättern und Wurzeln hinsichtlich des Gehaltes an Gesamtkohlenstoff (45 und 37%), des Gesamtstickstoff (0,7 und 0,5%), der wasserlöslichen Stoffe (26 und 10%), der Hemicellulose (33 und 37%), der Cellulose (beide 36%) und des Lignin (6 und 18%) in intaktem getrockneten Pflanzenmaterial (Bertrand *et al.*, 2006). Demzufolge sollte der deutlich höhere Anteil wasserlöslicher Substanzen in Weizenblättern in der Anfangsphase der Zersetzung zu einem schnellen Abbau des Weizenmaterials durch die mikrobielle Gemeinschaft in Böden mit Weizenblättern führen. Allerdings schienen in dieser Arbeit

Weizenwurzeln einfacher und schneller abbaubar als Weizenblätter, wobei das in den Versuchen verwendete Weizenmaterial nur 13 Wochen alt war und sich dessen biochemische Zusammensetzung von physiologisch vollständig ausgereiftem Weizenmaterial unterscheiden könnte. Außerdem wurden im Verlauf der Inkubation bis zu 48% des CO₂ durch die Mineralisierung des Weizenmaterials ¹³C-markiert (Abb. 23B). Diese starke Freisetzung von ¹³CO₂ deutet darauf hin, dass andere nicht markierte Kohlenstoffquellen nicht verfügbar waren oder nur in geringem Maße genutzt wurden. Allerdings kann die restliche Abgabe von unmarkiertem CO₂ nicht nur durch die gemessene Hintergrundmineralisierung der Kontrollmikrokosmen (Abb. 23A) oder die verbleibenden 3% ¹²C-Kohlenstoff in dem markierten Weizen erklärt werden. Daher könnte auch ein so genannter ‚*priming effect*‘ von frischem organischem Material zu einer generell gesteigerten Mineralisierung von organischem Material im Boden geführt haben (Fontaine *et al.*, 2003).

Die stabile Isotopenbeprobung basierend auf RNA hat den Vorteil einer hohen Sensitivität, da ¹³C-Einbau in RNA größer ist und schneller erfolgt als in DNA (Manfield *et al.*, 2002a). Die Anwendung von RNA-SIP erlaubt die Detektion aktivierter Zellen, die sich noch nicht geteilt haben oder solcher die metabolisch aktiv sind, aber kein Wachstum zeigen (Friedrich, 2006). Bei Verfahren, die eine Substratzugabe erfordern, ist schwer zu ermitteln, ob das bakterielle Wachstum von der Assimilierung des Substrats durch Primärverbraucher oder Nutzung von Abbauprodukten durch Sekundärverbraucher herrührt (‚*crossfeeding*‘). Durch die Analyse des Einbaus von ¹³C über den zeitlichen Verlauf der stabilen Isotopenbeprobung kann der ¹³C-Fluss durch Mikroorganismen in der Umwelt verfolgt sowie mikrobielle Nahrungsketten und die Sukzession von Populationen untersucht werden (Dumont und Murrell, 2005; Friedrich, 2011). In diesem SIP-Experiment sollte ‚*crossfeeding*‘ aufgrund der kurzen Inkubationszeit jedoch keine große Rolle spielen. Außerdem wurden nur sehr geringe Substratkonzentrationen (~2 mg C/g Boden, Bertrand *et al.*, 2006) eingesetzt um systematische Fehler durch Anreicherungs-effekte, die eine Einschränkung der stabilen Isotopenbeprobung darstellen können (Friedrich, 2006; Neufeld *et al.*, 2007), zu vermeiden.

Ein Einbau von ¹³C in die RNA von Weizenmaterial abbauenden Bakterien war bereits nach 24 h durch den Anstieg der Abundanz von T-RFs in ‚schweren‘ und ‚leichten‘ T-RFLP-Profilen (Abb. 24, Anhang Abb. 10), die in den selben Böden ohne Weizenzugabe mit einer geringeren Häufigkeit auftraten, detektierbar. Dies deutet daraufhin, dass einige bakterielle Populationen, die in der anfänglichen mikrobiellen Gemeinschaft nicht numerisch abundant waren, durch Weizenmaterial stimuliert wurden. Da diese Bakterien nach Zugabe von frischem organischem Material ein schnelles Wachstum zeigten,

könnten diese r-Strategen entsprechen (Fontaine *et al.*, 2003; Fierer *et al.*, 2007). Einige Phyla oder Gattungen (z.B. Vertreter der *Verrucomicrobia*, Tab. 23) reicherten sich nur in den ‚leichten‘ Fraktionen der Grünland- und Waldboden-Inkubationen mit Weizenmaterial an. Diese unmarkierten *Bacteria* reagieren auf die Zugabe von frischem organischem Material („*priming effect*“). Als Spezialisten der Zersetzung von schwer abbaubaren organischem Material im Boden und durch langsame Wachstumsraten können diese als K-Strategen klassifiziert werden (Fontaine *et al.*, 2003; Fierer *et al.*, 2007). In T-RFLP-Profilen der ‚schweren‘ Gradientenfraktionen unterschied sich die Weizen abbauende bakterielle Gemeinschaft auf den ersten Blick kaum zwischen Inkubationen mit Weizenwurzeln und Weizenblättern (Abb. 24, Anhang Abb. 10). Die gleichen T-RFs dominierten zwar zum Teil zu verschiedenen Zeitpunkten der Inkubationen, variierten aber vor allem zwischen Grünland- und Waldboden. Allerdings unterschied sich innerhalb einer Inkubation eines Bodens und eines Weizenmaterials die aktive bakterielle Gemeinschaft fast zu jedem Zeitpunkt in Zusammensetzung und Diversität. Diese Ergebnisse legen nahe, dass Veränderungen in der mikrobiellen Gemeinschaft in den ersten Tagen der Inkubationen in Verbindung mit Kohlenstoffverfügbarkeit, Sukzession und Nahrungsnetzen stehen. Auf ähnliche Art und Weise änderte sich die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft innerhalb der ersten zwei Wochen des Abbaus von Weizenmaterial, was zumindest teilweise durch die Konkurrenz um leicht abbaubare Substrate der wasserlöslichen Fraktion erklärt werden konnte (Marschner *et al.*, 2011).

Nach 72 h der Inkubation wurde die Weizenwurzeln abbauende bakterielle Gemeinschaft des Grünland- und des Waldbodens durch Klonierung und Sequenzierung bzw. Pyrosequenzierung charakterisiert. Der Vergleich des klassischen und ‚*next-generation*‘ Ansatzes zur Identifizierung an der Assimilierung von Kohlenstoff aus Weizenmaterial beteiligten Bakterien zeigte, dass alle wichtigen bakteriellen Phyla sowohl in den Sequenzen der Klonbibliotheken als auch durch Pyrosequenzierung detektiert werden konnten (Abb. 28). Nur bei Betrachtung der am Abbau von Weizenwurzeln beteiligten Bakteriengattungen erlaubten die Daten der Pyrosequenzierung durch die weitaus höhere Sequenzanzahl einen detaillierteren Einblick (Tab. 24). Allerdings kann es vor allem bei der Pyrosequenzierung durch Sequenzierungsfehler zur Überschätzung der bakteriellen Diversität kommen (Engelbrekton *et al.*, 2010; Kunin *et al.*, 2010). Studien zeigten, dass der große Anteil eigentlich seltener Taxa in Pyrosequenzierung-Analysen das Ergebnis von Sequenzierungsfehlern und/oder ungeeigneten Methoden zur Bestimmung von OTUs waren (Quince *et al.*, 2009; Kunin *et al.*, 2010). In einem Vergleich der biologischen Abundanz und der resultierenden Sequenzanzahl durch Pyrosequenzierung, zeigten sich Unterschiede einer ganzen Größenordnung zwischen Arten (Amend *et al.*, 2010). Da

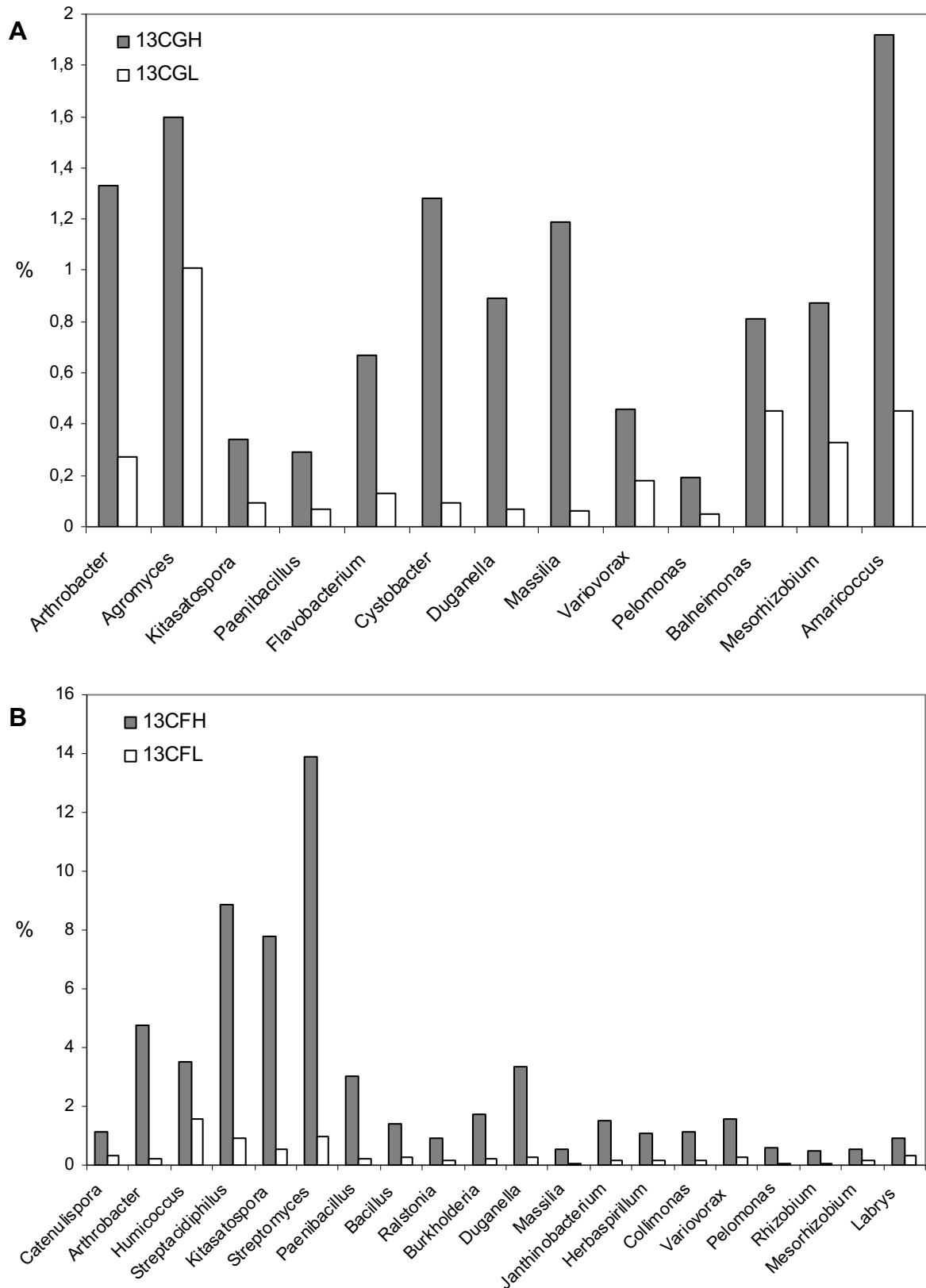


Abbildung 34. Darstellung am Abbau von ^{13}C -markierten Weizenwurzeln beteiligter Genera. Die Zuordnung der 16S rRNA-Sequenzen der 454-Pyrosequenzierung der ‚schweren‘ (H, $\text{BD} > 1,81 \text{ g ml}^{-1}$) und ‚leichten‘ (L, $\text{BD} < 1,81 \text{ g ml}^{-1}$) CsTFA-Gradientenfractionen von Grünlandböden (A) inkubiert mit ^{13}C -Weizenwurzeln (13CGH und 13CGL) und von Waldböden (B) inkubiert mit ^{13}C -Weizenwurzeln (13CFH und 13CFL) erfolgte mittels RDP Classifier. Der prozentuale Anteil jeder taxonomischen Gruppe ist dargestellt.

außerdem die Anzahl der 16S rRNA-Gene zwischen phylogenetischen Gruppen variiert (Rastogi *et al.*, 2009), sollten, wie in der vorliegenden Studie, nur Sequenzanzahlen innerhalb einer Gruppe quantitativ verglichen werden. Um eine verlässlichere Einschätzung der Diversität zu erhalten und Sequenzen niedriger Qualität oder mit Sequenzierungsfehlern aus Pyrosequenzierung-Analysen zu entfernen, könnte aber z.B. auch AmpliconNoise (Quince *et al.*, 2011) genutzt werden. Die vorliegende ist eine der ersten Studien, die SIP mit Pyrosequenzierung verbindet. Bisher wurden die 16S rRNA-Gene von SIP-Mikrokosmen mit kontaminiertem Grundwasser zur Identifizierung anaerober Toluol abbauender Bakterien mittels Pyrosequenzierung analysiert (Pilloni *et al.*, 2011). In der vorliegenden Arbeit wurde allerdings die bakterielle 16S rRNA in den ‚schweren‘ und ‚leichten‘ Gradientenfraktionen der ^{13}C - und ^{12}C -Inkubationen mit Weizenwurzeln sowie von Grünland- und Waldboden ohne Zusatz von Weizenwurzeln mittels Pyrosequenzierung analysiert. Die effektivste Assimilierung von ^{13}C aus Weizenwurzeln nach 72 h zeigten bestimmte *Actinobacteria* (*Arthrobacter*, *Agromyces*, *Kitasatospora*), *Firmicutes* (*Paenibacillus*), *Bacteroidetes* (*Flavobacterium*), δ -*Proteobacteria* (*Cystobacter*), β -*Proteobacteria* (*Duganella*, *Massilia*, *Variovorax*, *Pelomonas*), α -*Proteobacteria* (*Balneimonas*, *Mesorhizobium*, *Amaricoccus*) im Grünlandboden (Abb. 34A). Im Waldboden steigerte die Zugabe von Weizenwurzeln die Aktivität vieler *Actinobacteria* (*Catenulispora*, *Arthrobacter*, *Humicoccus*, *Streptacidiphilus*, *Kitasatospora*, *Streptomyces*), *Firmicutes* (*Paenibacillus*, *Bacillus*), β -*Proteobacteria* (*Ralstonia*, *Burkholderia*, *Duganella*, *Massilia*, *Janthinobacterium*, *Herbaspirillum*, *Collimonas*, *Variovorax*, *Pelomonas*) und α -*Proteobacteria* (*Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Labrys*, Abb. 34B). Eher oligotrophe Bedingungen bevorzugende Bakterien wie z. B. Vertreter der *Acidobacteria*, *Planctomycetes* und *Verrucomicrobia* verringerten ihre Aktivität während des frühen Abbaus von Weizenwurzeln in beiden Böden (Abb. 28, 29, Tab. 23). Auch ein ‚litter bag‘-Experiment mit leicht abbaubarem Roggen- und abbauresistenterem Weizenpflanzenmaterial wurde genutzt um die bakterielle Diversität während der Zersetzung in landwirtschaftlich genutzten Böden Nord-, Mittel- und Süddeutschlands zu untersuchen (Dilly *et al.*, 2004). Die Studie zeigte, dass die Art der Streu, die Lokalisierung des Bodens und die Bakterien des umgebenden Bodens die Entwicklung der bakteriellen Gemeinschaften in der Streu beeinflusste (Dilly *et al.*, 2004). In der vorliegenden Arbeit waren die numerisch dominanten Phyla im Wald- und Grünlandboden *Proteo*- und *Actinobacteria* (Tab. 23). Einige *Actinobacteria* besitzen die Fähigkeit schwer abbaubare organische Substanzen zu zersetzen, so können zum Beispiel *Actinomycetes* in Konkurrenz mit Pilzen Lignin abbauen (de Boer *et al.*, 2005). *Streptomyces* sind im Boden weit verbreitet und spielen eine wichtige Rolle im Celluloseabbau (Wirth und Ulrich, 2002; Haichar *et al.*, 2007), obwohl die meisten

Vertreter nicht in der Lage sind den Cellulasekomplex zu bilden, nur die Endoglucanase produzieren und die Exoglucanaseaktivität zur vollständigen Hydrolyse von Cellulose durch andere cellulolytischen Bakterien bereitgestellt wird (Semedo *et al.*, 2000). Die Anreicherung von proteobakteriellen Gattungen wie *Massilia*, *Variovorax*, *Pseudomonas*, *Janthinobacterium* und *Mesorhizobium* sowie *Bacteroidetes* wie *Flavobacterium* wurde bereits in Böden gefunden, die mit Glucose, Phenol oder Naphthalin (Padmanabhan *et al.*, 2003), Cellulose (Haichar *et al.*, 2007) oder Weizenpflanzenmaterial (Bernard *et al.*, 2007) versetzt wurden. Während des Abbaus von Pflanzenmaterial dominieren *r*-Strategen in der frühen schnellen Phase der Zersetzung, wenn noch leicht abbaubare Substanzen zur Verfügung stehen. Diese werden in einer späteren langsameren Phase durch *K*-Strategen ersetzt, wenn wachstumslimitierende Substratkonzentrationen erreicht sind und die Zersetzung von schwer abbaubaren Substanzen des Pflanzenmaterials einsetzt (Slater und Lovatt, 1984; Wang *et al.*, 2004). Demzufolge sinkt innerhalb der ersten zwei Wochen des Abbaus der Anteil an Zuckern und Stärke wohingegen der Prozentsatz an Lignin zunimmt und sich abbauresistentere Substanzen in späten Phasen der Zersetzung anreichern (Aneja *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2004). Diese späteren Phasen des Abbaus von Pflanzenmaterial könnten von oligotrophen Vertretern der *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Chloroflexi*, α -*Proteobacteria* (*Rhodomicrobium*), *Firmicutes* (*Bacillus*) und *Verrucomicrobia* dominiert werden. Diese Bakterien wurden in mit Lignin versetzten Kügelchen, die in einem tropischen Waldboden eingebracht wurden, in einer Woche angereichert und zeigten eine hohe Lignaseaktivität (Deangelis *et al.*, 2011).

Obwohl *Acidobacteria* das abundanteste Phylum nach *Proteobacteria* sowohl im Grünland- (11%) als auch im Waldboden (12%) waren, schienen sie nicht aktiv am frühen Abbau von abgestorbenem Weizenmaterial beteiligt zu sein (Tab. 23, Abb. 29). Ihre Abundanz sank in den ‚schweren‘ Fraktionen der ^{13}C -Weizenwurzel-Inkubationen nach 72 h auf 1 und 3% (Tab. 23, Abb. 29). Selbst bei Verwendung des *Acidobacteria*-spezifischen Primers Acido31F (Barns *et al.*, 1999) konnte entweder kein PCR-Produkt von ‚schweren‘ Fraktionen der ^{13}C -Weizenwurzel-Inkubationen nach 72 h erhalten werden oder aber die daraus resultierenden T-RFLP-Profile der 16S rRNA unterschieden sich nicht von denen der entsprechenden ‚leichten‘ Fraktionen. Wasserlösliche und leicht abbaubare Substanzen in beiden Arten des Weizenpflanzenmaterials scheinen besonders wichtig für die hohe Aktivität copiothropher im Vergleich zu oligotrophen Bakterien in der frühen Phase des Abbaus von Pflanzenmaterial zu sein. Stabile Isotopenbeobachtung mit Pflanzenmaterial oder komplexen Pflanzenderivaten über einen längeren Inkubationszeitraum und die parallele Analyse von Konzentrationen potentieller Zwischenprodukte des Abbaus könnten weitere Einsichten in die Physiologie der *Acidobacteria* im Boden geben.

4.6. Einflüsse von Biodiversität und Landnutzung auf bakterielle Diversität

Die Erhaltung der Biodiversität in landwirtschaftlich genutzten Naturräumen ist eine der wichtigsten Aufgaben des Naturschutzes (Isselstein *et al.*, 2005; de Bello *et al.*, 2010), da Biodiversität eine wichtige Rolle für die Nahrungskreisläufe spielt, sich aber ein großer Teil der Fläche Deutschlands in landwirtschaftlicher (53%) oder forstwirtschaftlicher (30%) Nutzung befindet (Deggau, 2006). Eine Abnahme der Biodiversität beeinflusst Ökosystemfunktionen und -leistungen (Loreau *et al.*, 2001) und kann gegenwärtig vor allem durch groß- und kleinskalige Veränderungen in der Landnutzung erklärt werden (Settele *et al.*, 2010). Die Intensivierung und Änderung der Landnutzung kann auch einen Einfluss auf mikrobielle Gemeinschaften im Boden haben (Buckley und Schmidt, 2001; 2003; Wessen *et al.*, 2010). Mikrobielle Gemeinschaften unterscheiden sich zwischen Weide- und Waldböden (Nusslein und Tiedje, 1999; Stevenson *et al.*, 2004a) als auch zwischen verschiedenen Wäldern (Hackl *et al.*, 2004) und zwischen Weideböden unterschiedlicher Beweidungsintensität (Bardgett *et al.*, 2001; Clegg, 2006).

In der vorliegenden Arbeit beeinflussten vor allem die Landnutzungstypen Wald und Grünland die Diversität und Zusammensetzung der *Acidobacteria* nicht nur auf Ebene des gesamten Phylums sondern auch auf Ebene der Untergruppen und sogar einzelner Phylotypen. So wurden zum Beispiel Waldböden von *Acidobacteria* der Untergruppe Gp1 dominiert und Grünlandböden von Vertretern der Untergruppe Gp6 (Abb. 5, Tab. 7). Allerdings unterschied sich die Diversität und Aktivität der *Acidobacteria* im Boden nicht signifikant zwischen den verschiedenen Nutzungsformen der Grünland- (gedüngte Wiese, Mähweide und ungedüngte Weide) oder Waldflächen (Altersklassen-Nadelwald, Altersklassen-Buchenwald und Naturwald Buche), die mit je drei Flächen pro Untersuchungsregion vertreten waren (Tab. 9, 15). Neben dieser Einteilung der Flächen in kategorische Landnutzungstypen, wurde auch ein Landnutzungsindex für alle Grünlandflächen basierend auf Düngung, Beweidung und Mahd sowie ein Landnutzungs- und Störungsindex für alle Waldflächen berechnet (Hessenmoeller *et al.*, 2011). Im Grünland beeinflusste diese Landnutzungsintensität die Zusammensetzung der aktiven *Acidobacteria* im Boden (Tab. 16). Einflüsse von Landnutzung traten in den Untersuchungsflächen bei Analysen zur saisonalen Dynamik von *Acidobacteria* deutlicher auf. Durch vierfache Beprobung im Jahr 2009 konnten hier mehrere Wiederholungen pro Landnutzungstyp ausgewertet werden. So unterschied sich die Zusammensetzung der *Acidobacteria* sowohl im Grünland als auch im Wald zwischen den verschiedenen Landnutzungstypen und wurde auch vom Landnutzungsindex, vor allem im Grünland, beeinflusst (Tab. 19, 20). In der saisonalen Analyse der *Acidobacteria*-Diversität konnten Landnutzungseffekte auch für einzelne Untergruppen aufgezeigt werden. Ein Phylotyp der

Untergruppe Gp1 war in Nadelwäldern abundanter (T-RF 256 bp, Abb. 18) wohingegen ein weiterer Phylotyp dieser Untergruppe in Buchwäldern zahlreicher auftrat (T-RF 85 bp, Abb. 14). *Acidobacteria* der Untergruppe Gp6 (T-RF 283 bp, Abb. 21) waren in gedüngten Wiesen häufiger als in weniger intensiv genutzten Mähweiden. Schon die positive Korrelation der Abundanz der Untergruppe Gp6 mit Kohlenstoff- und Stickstoffgehalten (Tab. 25) deutete darauf hin, dass diese Vertreter der *Acidobacteria* eher copiotrophe Habitate bevorzugen, wie z.B. auch gedüngte Wiesen. Durch Pyrosequenzierung der 16S rRNA-Gene der A- und B-Horizonte der neun Grünlandböden im Hainich konnte eine mittlere bakterielle Diversität berechnet werden, die in gedüngten Wiesen am niedrigsten und in ungedüngten Weiden am höchsten war (Will *et al.*, 2010). In den Böden der Untersuchungsflächen der Schwäbischen Alb wurden Unterschiede der bakteriellen Gemeinschaft zwischen Grünland- und Waldböden deutlich, aber die verschiedenen Landnutzungstypen der Grünland- oder Waldflächen riefen keine unterschiedlichen Bakteriengemeinschaften hervor (Nacke *et al.*, 2011a). Wie schon in vorangegangenen Studien gezeigt (Hackl *et al.*, 2004), hatte allerdings die Baumart (Buche oder Fichte) einen Einfluss auf die Diversität und Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft im Waldboden (Nacke *et al.*, 2011a).

Landnutzung könnte die Zusammensetzung mikrobieller Gemeinschaften aber auch indirekt über die Modifizierung von Bodeneigenschaften und Nährstoffkonzentrationen beeinflussen (Lauber *et al.*, 2008; Jesus *et al.*, 2009). Landnutzung scheint tatsächlich eine wichtige Einflussgröße auf die Konzentration und Verteilung von Phosphor in Böden der drei Untersuchungsregionen zu sein (Alt *et al.*, 2011). Nach der statistischen Eliminierung des Effektes des pH-Wertes konnte die Landnutzungsintensität noch immer 10% der Varianz der Konzentrationen der Phosphorfractionen im Boden erklären. Die Landnutzungsintensität hatte einen besonders starken Einfluss auf instabilen inorganischen Phosphor mit niedrigen Konzentrationen in intensiv genutzten Grünlandböden der Schwäbischen Alb und Schorfheide-Chorin und höheren Konzentrationen in intensiv genutzten Grünlandböden des Hainich-Dün (Alt *et al.*, 2011). Um Landnutzungseffekte auf Nährstoffe zu untersuchen, bieten sich die unbeständigen Phosphorfractionen an, da diese selbst kurzfristig substantiell durch Landnutzung beeinflusst werden (Negassa und Leinweber, 2009). Ferner wurden die Konzentrationen verschiedener Nährstoffe in Pflanzenbiomasse der Grünländer der drei Untersuchungsregionen von Pflanzendiversität und Landnutzung beeinflusst (Klaus *et al.*, 2011). Phosphorkonzentrationen nahmen mit steigender Landnutzungsintensität und sinkender Pflanzendiversität zu, Stickstoff und Kalium zeigten kein so eindeutiges Muster. Da das Verhältnis von Stickstoff zu Phosphor in Pflanzenbiomasse positiv mit dem Artenreichtum

vaskulärer Pflanzen korrelierte, sollte eine geringfügige Düngung mit Phosphor zu artenreichen landwirtschaftlich genutzten Grünländern führen (Klaus *et al.*, 2011).

Pflanzendiversität wird als einer der wichtigsten Faktoren für mikrobielle Diversität im Boden angesehen, obwohl viele Studien keine Korrelation zwischen diesen beiden Parametern feststellen konnten (Kowalchuk *et al.*, 2002; Buckley und Schmidt, 2001). Die Zusammensetzung der Pflanzen beeinflusste nur Bakterien der Rhizosphäre (Kowalchuk *et al.*, 2002) und eine Herabsetzung der mikrobiellen Diversität im Boden führte zu eher kleinen Veränderungen der Pflanzengemeinschaft (Bonkowski und Roy, 2005). Im Gegensatz dazu wurde die bakterielle Diversität in Grünlandböden deutlich durch die Zahl der Pflanzenarten beeinflusst (Grüter *et al.*, 2006). Auch verschiedene Aspekte der Landnutzung können mit überirdischen Pflanzen und Bakteriengemeinschaften im Boden in Verbindung gebracht werden. So unterschieden sich bakterielle Gemeinschaften zwischen Regenwald- und benachbarten Weidelandböden (Borneman und Triplett, 1997) und Veränderungen der Pflanzendecke von Wald zu Weide führten zu einer Verschiebung der dominanten Bodenbakterien von *Acidobacteria* zu β -*Proteobacteria* (Nüsslein und Tiedje, 1998). Aber auch Düngung mit Stickstoff und Kalk veränderte die Struktur der Bakteriengemeinschaft in Grünlandböden wohingegen die Zusammensetzung der Pflanzen nur einen schwachen Einfluss auf die Bodenbakterien ausübte (Kennedy *et al.*, 2004). In der vorliegenden Arbeit wurde die Zusammensetzung der aktiven *Acidobacteria* im Grünland durch die Anzahl der vaskulären Pflanzenarten beeinflusst (Tab. 16). *Acidobacteria* der Untergruppe Gp1 (T-RF 85 bp) zeigten eine höhere Abundanz in Böden von Grünlandflächen mit wenig vaskulären Pflanzenarten und Vertreter der Untergruppe Gp18 (T-RF 273 bp) eine hohe Abundanz in Grünlandböden mit hoher Pflanzendiversität (Tab. 25). Auf Ebene der Phylotypen zeigten *Acidobacteria* der Untergruppe Gp5 eine sehr deutliche Beeinflussung durch Pflanzendiversität: zwei Phylotypen dieser Untergruppe waren in Böden mit hoher Anzahl vaskulärer Pflanzenarten sehr abundant (Tab. 14). Die Abundanz von *Acidobacteria* der Untergruppe Gp1 verdoppelte sich in einem Grünlandboden, wenn alle Pflanzen entfernt wurden (Thomson *et al.*, 2010), auf ähnliche Weise waren in der vorliegenden Arbeit einige Vertreter der Untergruppe Gp1 häufiger in Böden mit einem weniger diversen Pflanzenbewuchs zu finden. Da die Zunahme mikrobieller Biomasse mit steigender Pflanzendiversität wahrscheinlich auf eine höhere Pflanzenproduktion zurückgeht (Zak *et al.*, 2003), kann die niedrige Abundanz der Untergruppe Gp1 in Flächen niedriger Pflanzendiversität möglicherweise durch die geringere Verfügbarkeit von organischem Kohlenstoff und Stickstoff bei geringem Eintrag von organischem Material durch Pflanzen begründet werden. Dieser Sachverhalt bestätigt das vorrangige Auftreten von *Acidobacteria* der Untergruppe Gp1 in oligotrophen

Bodenhabitaten mit niedrigem Kohlenstoff-, Stickstoff- und Phosphatgehalt sowie niedriger Bodenfeuchte.

Pflanzenmaterial ist eine wichtige Quelle organischen Kohlenstoffs für Mikroorganismen im Boden (Swift *et al.*, 1979; Berg und McClaugherty, 2003). Der Abbau von Pflanzenmaterial wird durch dessen chemische Zusammensetzung, Umweltfaktoren und die Zusammensetzung der abbauenden Organismengemeinschaft bestimmt. Einige mikrobielle Taxa können bestimmte Kohlenstoffquellen jedoch besser abbauen als Andere und die Abbaurate kann zwischen Bodentypen und Ökosystem stark variieren (Fierer *et al.*, 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde über stabile Isotopenbeprobung der mikrobielle Abbau von Weizenpflanzenmaterial in einem Grünland- und einem Waldboden verfolgt. Tatsächlich unterschied sich die Gemeinschaft der am Abbau von Pflanzenmaterial beteiligten Bakterien zwischen den beiden Landnutzungstypen Rindermähweide und Naturwald Buche (Abb. 34). Es ist vorstellbar, dass sich die Pflanzenpolymere abbauende Bakteriengemeinschaft auch zwischen intensiv und extensiv bewirtschafteten Grünlandböden oder Fichten-Monokulturen und Naturwäldern unterscheidet. Die dominierende Baumart eines Waldes hatte zum Beispiel einen deutlichen Einfluss auf die Zusammensetzung der Cellulose abbauenden mikrobiellen Gemeinschaft (Kubartova *et al.*, 2007). Dies könnte durch weitere SIP-Experimente mit Pflanzenmaterial oder -polymeren z.B. in Bodenmikrokosmen mit und ohne zusätzliche Düngung analysiert werden.

Studien, die die Faktoren Vegetation, Landnutzung und Bodeneigenschaften zusammen untersuchen und versuchen den vorherrschenden dieser Effekte auf die Struktur bakterieller Gemeinschaften im Boden aufzuzeigen, sind bisher selten. Chan *et al.* (2008) zeigte, dass der Pflanzenbewuchs in Wald, Weideland und Flächen mit Sträuchern die Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft deutlicher beeinflusste als bodenchemische Eigenschaften. In der vorliegenden Arbeit schienen hingegen Bodeneigenschaften, allen voran der pH-Wert, aber auch die Nährstoffverfügbarkeit und die Abundanz von *Protozoa* die Diversität und Zusammensetzung der *Acidobacteria* stärker zu beeinflussen als Landnutzung und Pflanzendiversität. Allerdings können Landnutzungsänderungen physikalische und chemische Eigenschaften von Boden verändern. So beeinflusst Landnutzung die Kohlenstoff- und Stickstoffgehalte, die Textur und den pH-Wert des Bodens signifikant und langfristig (Post und Mann, 1990; Murty *et al.*, 2002). Diese Effekte gehen größtenteils auf Änderungen in der Zusammensetzung der Pflanzenarten und die Art der Bewirtschaftung zurück. Folglich zeigen auch in der vorliegenden Arbeit Landnutzung und Pflanzendiversität eher indirekte Effekte auf die Gemeinschaft der *Acidobacteria* über die Beeinflussung von Bodeneigenschaften und

Nährstoffkonzentrationen in den Böden der drei Untersuchungsregionen. Nur das Vorkommen weniger Vertreter der *Acidobacteria*-Untergruppen oder einzelner Phylotypen schien direkt von Pflanzendiversität oder Landnutzungsform abhängig zu sein.

4.7. Ausblick

Die in dieser Dissertation durchgeführten molekularbiologischen Analysen ermöglichen einen umfangreichen Einblick in die Diversität und Zusammensetzung von *Acidobacteria* in Grünland- und Waldböden dreier Regionen in Deutschland. Mittels statistischer Datenanalyse konnten Abhängigkeiten der *Acidobacteria*, ihrer Untergruppen und sogar einzelner Phylotypen von Boden- und Standorteigenschaften sowie Pflanzendiversität und Landnutzung aufgezeigt werden. Durch das Projekt der Biodiversitäts-Exploratorien und seiner Interdisziplinarität könnten noch weitere Einflüsse von Boden, Umwelt und höheren Taxa auf die Diversität der *Acidobacteria* getestet werden. Auch Effekte von intensiver und extensiver Landnutzung sowie Düngung auf dieses Phylum könnten durch eine Erhöhung der Probenanzahl detaillierter untersucht werden. Aber auch durch die Analyse räumlich kleinskaliger Variationen in Diversität und Zusammensetzung innerhalb ausgesuchter Untersuchungsflächen könnten weitere Erkenntnisse über die Physiologie und Ökologie der *Acidobacteria* gewonnen werden. Ferner könnte über Methoden der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung ungestörter Bodenproben (Eickhorst und Tippkötter, 2008) versucht werden festzustellen, welche Mikrohabitate *Acidobacteria* in der Bodenmatrix vorrangig besiedeln.

In der vorliegenden Dissertation wurden außerdem jahreszeitliche Veränderungen der Diversität und Zusammensetzung der aktiven *Acidobacteria* analysiert und auf Abhängigkeit von Umwelteinflüssen geprüft. Es wurden allerdings nur Bodenproben während einer Vegetationsperiode im April, Juni, August und Oktober eines Jahres untersucht. Es könnte jedoch auch von Interesse sein, die *Acidobacteria*-Gemeinschaft im Winter oder direkt nach Bodenfrösten zu charakterisieren (Nemergut *et al.*, 2007; Schmidt *et al.*, 2007).

Um die Rolle der *Acidobacteria* im Boden genauer zu verstehen, wurde zudem über stabile Isotopenbeobachtung der Abbau von Weizenpflanzenmaterial exemplarisch in einem Grünland- und einem Waldboden verfolgt und die daran beteiligten Bakterien über ‚fingerprinting‘-Analysen und (Pyro)Sequenzierung der 16S rRNA identifiziert. Stabile Isotopenbeobachtung mit Pflanzenmaterial oder komplexen Pflanzenderivaten wie z.B. Lignin über einen längeren Inkubationszeitraum und die parallele Analyse von Konzentrationen potentieller Zwischenprodukte des Abbaus könnten weitere Einblicke in

die Physiologie der *Acidobacteria* geben. Zur Aufklärung von Nahrungsnetzen im Boden könnten außerdem auch aus Boden isolierte ^{13}C -markierte *Acidobacteria* in RNA-SIP-Experimenten eingesetzt werden.

Um nähere Informationen über metabolische Eigenschaften dominanter *Acidobacteria* in den untersuchten Böden zu erlangen, könnten des Weiteren bereits bestehende Metagenombibliotheken (Nacke *et al.*, 2011b) auf Genomfragmente der *Acidobacteria* untersucht werden. *Acidobacteria* können in Metagenombibliotheken dominieren und zeigten die Präsenz von Genen, die für die Aufnahme von Aminosäuren verantwortlich sind (Liles *et al.*, 2003), die Proteasen und Zink-Metallopeptidasen codieren (Quaiser *et al.*, 2008) oder auch Gene, welche die Polyketid-Synthese steuern (Parsley *et al.*, 2011). Durch die hohe Abundanz der *Acidobacteria* in den untersuchten Flächen ist zu erwarten, dass die Metagenombibliotheken auch eine hohe Anzahl an Genomfragmenten von *Acidobacteria* enthalten. Weitere Auskünfte über die Physiologie könnten über Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung repräsentativer *Acidobacteria* gewonnen werden.

5. Literaturverzeichnis

- Abdo, Z., Schuette, U. M. E., Bent, S. J., Williams, C. J., Forney, L. J., und Joyce, P.** (2006) Statistical methods for characterizing diversity of microbial communities by analysis of terminal restriction fragment length polymorphisms of 16S rRNA genes. *Environmental Microbiology* **8**: 929-938.
- Acosta-Martinez, V., Dowd, S., Sun, Y., und Allen, V.** (2008) Tag-encoded pyrosequencing analysis of bacterial diversity in a single soil type as affected by management and land use. *Soil Biology & Biochemistry* **40**: 2762-2770.
- Akaike, H.** (1974) A new look at the statistical model identification. *Automatic Control, IEEE Transactions on* **19**: 716-723.
- Alt, F., Oelmann, Y., Herold, N., Schrupf, M., und Wilcke, W.** (2011) Phosphorus partitioning in grassland and forest soils of Germany as related to land-use type, management intensity, and land use-related pH. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* **174**: 195-209.
- Altenburger, A., Ekelund, F., und Jacobsen, C. S.** (2010) Protozoa and their bacterial prey colonize sterile soil fast. *Soil Biology & Biochemistry* **42**: 1636-1639.
- Amann, R. I., Ludwig, W., und Schleifer, K. H.** (1995) Phylogenetic Identification and In-Situ Detection of Individual Microbial-Cells Without Cultivation. *Microbiological Reviews* **59**: 143-169.
- Amend, A. S., Seifert, K. A., und Bruns, T. D.** (2010) Quantifying microbial communities with 454 pyrosequencing: does read abundance count? *Molecular Ecology* **19**: 5555-5565.
- Aneja, M. K., Sharma, S., Fleischmann, F., Stich, S., Heller, W., Bahnweg, G. et al.** (2006) Microbial colonization of beech and spruce litter - Influence of decomposition site and plant litter species on the diversity of microbial community. *Microbial Ecology* **52**: 127-135.
- Ansorge, W. J.** (2009) Next-generation DNA sequencing techniques. *New Biotechnology* **25**: 195-203.
- Ashelford, K. E., Chuzhanova, N. A., Fry, J. C., Jones, A. J., und Weightman, A. J.** (2006) New screening software shows that most recent large 16S rRNA gene clone libraries contain chimeras. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 5734-5741.
- Balvanera, P., Pfisterer, A. B., Buchmann, N., He, J. S., Nakashizuka, T., Raffaelli, D., und Schmid, B.** (2006) Quantifying the evidence for biodiversity effects on ecosystem functioning and services. *Ecology Letters* **9**: 1146-1156.
- Bardgett, R. D.** (2005) Organism interactions and soil processes. S. 57-85. In: *The biology of soil: a community and ecosystem approach*. Bardgett, R. D. (Hrsg.). Oxford University Press, Oxford.
- Bardgett, R. D., Jones, A. C., Jones, D. L., Kemmitt, S. J., Cook, R., und Hobbs, P. J.** (2001) Soil microbial community patterns related to the history and intensity of grazing in sub-montane ecosystems. *Soil Biology & Biochemistry* **33**: 1653-1664.
- Bardgett, R. D., Lovell, R. D., Hobbs, P. J., und Jarvis, S. C.** (1999) Seasonal changes in soil microbial communities along a fertility gradient of temperate grasslands. *Soil Biology & Biochemistry* **31**: 1021-1030.
- Barns, S. M., Cain, E. C., Sommerville, L., und Kuske, C. R.** (2007) *Acidobactetia* phylum sequences in uranium-contaminated subsurface sediments greatly expand the known diversity within the phylum. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 3113-3116.

- Barns, S. M., Takala, S. L., und Kuske, C. R.** (1999) Wide distribution and diversity of members of the bacterial kingdom *Acidobacterium* in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1731-1737.
- Bastias, B. A., Anderson, I. C., Rangel-Castro, J. I., Parkin, P. I., Prosser, J. I., und Cairney, J. W. G.** (2009) Influence of repeated prescribed burning on incorporation of C-13 from cellulose by forest soil fungi as determined by RNA stable isotope probing. *Soil Biology & Biochemistry* **41**: 467-472.
- Berg, B. and McClaugherty, C.** (2003) Plant Litter: Decomposition, humus formation, carbon sequestration. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Berg, G. und Smalla, K.** (2009) Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *Fems Microbiology Ecology* **68**: 1-13.
- Bernard, L., Mougél, C., Maron, P. A., Nowak, V., Leveque, J., Henault, C. et al.** (2007) Dynamics and identification of soil microbial populations actively assimilating carbon from C-13-labelled wheat residue as estimated by DNA- and RNA-SIP techniques. *Environmental Microbiology* **9**: 752-764.
- Bertrand, I., Chabbert, B., Kurek, B., und Recous, S.** (2006) Can the biochemical features and histology of wheat residues explain their decomposition in soil? *Plant and Soil* **281**: 291-307.
- Björk, R. G., Bjorkman, M. P., Andersson, M. X., und Klemedtsson, L.** (2008) Temporal variation in soil microbial communities in Alpine tundra. *Soil Biology & Biochemistry* **40**: 266-268.
- Blüthgen, N., Dormann, C., Alt, F., Boch, S., Klaus, V., Kleinebecker, T. et al.** An index of land-use intensity in grasslands that integrates the quantity of mowing, grazing and fertilization. (eingereicht)
- Boenigk, J. und Arndt, H.** (2002) Bacterivory by heterotrophic flagellates: community structure and feeding strategies. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* **81**: 465-480.
- Bonkowski, M.** (2004) Protozoa and plant growth: the microbial loop in soil revisited. *New Phytologist* **162**: 617-631.
- Bonkowski, M., Griffiths, B., und Scrimgeour, C.** (2000) Substrate heterogeneity and microfauna in soil organic 'hotspots' as determinants of nitrogen capture and growth of ryegrass. *Applied Soil Ecology* **14**: 37-53.
- Bonkowski, M. und Roy, J.** (2005) Soil microbial diversity and soil functioning affect competition among grasses in experimental microcosms. *Oecologia* **143**: 232-240.
- Borneman, J. und Triplett, E. W.** (1997) Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: Evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 2647-2653.
- Boschker, H. T. S., Nold, S. C., Wellsbury, P., Bos, D., de Graaf, W., Pel, R. et al.** (1998) Direct linking of microbial populations to specific biogeochemical processes by C-13-labelling of biomarkers. *Nature* **392**: 801-805.
- Bossio, D. A., Scow, K. M., Gunapala, N., und Graham, K. J.** (1998) Determinants of soil microbial communities: Effects of agricultural management, season, and soil type on phospholipid fatty acid profiles. *Microbial Ecology* **36**: 1-12.
- Brand, W. A.** (1996) High precision isotope ratio monitoring techniques in mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **31**: 225-235.

- Bray, J. R. und Curtis, J. T.** (1957) An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin. *Ecological Monographs* **27**: 326-349.
- Bru, D., Martin-Laurent, F., und Philippot, L.** (2008) Quantification of the detrimental effect of a single primer-template mismatch by real-time PCR using the 16S rRNA gene as an example. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 1660-1663.
- Bryant, D. A., Costas, A. M. G., Maresca, J. A., Chew, A. G. M., Klatt, C. G., Bateson, M. M. et al.** (2007) Candidatus *Chloracidobacterium thermophilum*: An aerobic phototrophic acidobacterium. *Science* **317**: 523-526.
- Buckley, D. H. und Schmidt, T. M.** (2001) The structure of microbial communities in soil and the lasting impact of cultivation. *Microbial Ecology* **42**: 11-21.
- Buckley, D. H. und Schmidt, T. M.** (2003) Diversity and dynamics of microbial communities in soils from agro-ecosystems. *Environmental Microbiology* **5**: 441-452.
- Cardinale, B. J., Srivastava, D. S., Duffy, J. E., Wright, J. P., Downing, A. L., Sankaran, M., und Jouseau, C.** (2006) Effects of biodiversity on the functioning of trophic groups and ecosystems. *Nature* **443**: 989-992.
- Carrascal, L. M., Galvan, I., und Gordo, O.** (2009) Partial least squares regression as an alternative to current regression methods used in ecology. *Oikos* **118**: 681-690.
- Castro, H. F., Classen, A. T., Austin, E. E., Norby, R. J., und Schadt, C. W.** (2010) Soil Microbial Community Responses to Multiple Experimental Climate Change Drivers. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**: 999-1007.
- Chan, O. C., Casper, P., Sha, L. Q., Feng, Z. L., Fu, Y., Yang, X. D. et al.** (2008) Vegetation cover of forest, shrub and pasture strongly influences soil bacterial community structure as revealed by 16S rRNA gene T-RFLP analysis. *Fems Microbiology Ecology* **64**: 449-458.
- Chao, A. und Bunge, J.** (2002) Estimating the number of species in a Stochastic abundance model. *Biometrics* **58**: 531-539.
- Chapin, F. S.** (1980) The Mineral-Nutrition of Wild Plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* **11**: 233-260.
- Cho, J. C. und Tiedje, J. M.** (2000) Biogeography and degree of endemism of fluorescent *Pseudomonas* strains in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 5448-5456.
- Clarke, K. R.** (1993) Nonparametric Multivariate Analyses of Changes in Community Structure. *Australian Journal of Ecology* **18**: 117-143.
- Clarke, K. R. and Gorley, R. N.** (2001) PRIMER v5: User manual/tutorial. PRIMER-E, Plymouth, UK.
- Clegg, C. D.** (2006) Impact of cattle grazing and inorganic fertiliser additions to managed grasslands on the microbial community composition of soils. *Applied Soil Ecology* **31**: 73-82.
- Coates, J. D., Ellis, D. J., Gaw, C. V., und Lovley, D. R.** (1999) *Geothrix fermentans* gen. nov., sp nov., a novel Fe(III)-reducing bacterium from a hydrocarbon-contaminated aquifer. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**: 1615-1622.
- Cole, J. R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R. J. et al.** (2009) The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucl. Acids Res.* **37**: D141-D145.

- Colwell, R. K. und Coddington, J. A.** (1994) Estimating Terrestrial Biodiversity Through Extrapolation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **345**: 101-118.
- Coolen, M. J. L. und Overmann, J.** (1998) Analysis of subfossil molecular remains of purple sulfur bacteria in a lake sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 4513-4521.
- Cross, A. F. und Schlesinger, W. H.** (1995) A Literature-Review and Evaluation of the Hedley Fractionation - Applications to the Biogeochemical Cycle of Soil-Phosphorus in Natural Ecosystems. *Geoderma* **64**: 197-214.
- Culman, S. W., Bukowski, R., Gauch, H. G., Cadillo-Quiroz, H., und Buckley, D. H.** (2009) T-REX: software for the processing and analysis of T-RFLP data. *Bmc Bioinformatics* **10**.
- Curtis, T. P., Sloan, W. T., und Scannell, J. W.** (2002) Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 10494-10499.
- da Rocha, U. N., van Elsas, J. D., und van Overbeek, L. S.** (2010) Real-time PCR detection of *Holophagae* (*Acidobacteria*) and *Verrucomicrobia* subdivision 1 groups in bulk and leek (*Allium porrum*) rhizosphere soils. *Journal of Microbiological Methods* **83**: 141-148.
- Daniel, R.** (2005) The metagenomics of soil. *Nature Reviews Microbiology* **3**: 470-478.
- Davis, K. E. R., Joseph, S. J., und Janssen, P. H.** (2005) Effects of growth medium, inoculum size, and incubation time on culturability and isolation of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 826-834.
- Davis, K. E. R., Sangwan, P., und Janssen, P. H.** (2011) *Acidobacteria*, *Rubrobacteridae* and *Chloroflexi* are abundant among very slow-growing and mini-colony-forming soil bacteria. *Environmental Microbiology* **13**: 798-805.
- de Bello, F., Lavorel, S., Gerhold, P., Reier, U., und Partel, M.** (2010) A biodiversity monitoring framework for practical conservation of grasslands and shrublands. *Biological Conservation* **143**: 9-17.
- de Boer, W., Folman, L. B., Summerbell, R. C., und Boddy, L.** (2005) Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. *Fems Microbiology Reviews* **29**: 795-811.
- Deangelis, K. M., Allgaier, M., Chavarria, Y., Fortney, J. L., Hugenholtz, P., Simmons, B. et al.** (2011) Characterization of trapped lignin-degrading microbes in tropical forest soil. *PLoS One* **6**: e19306.
- Dedysh, S. N., Pankratov, T. A., Belova, S. E., Kulichevskaya, I. S., und Liesack, W.** (2006) Phylogenetic analysis and in situ identification of Bacteria community composition in an acidic *Sphagnum* peat bog. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 2110-2117.
- Dedysh, S. N., Kulichevskaya, I. S., Serkebaeva, Y. M., Mityaeva, M. A., Sorokin, V. V., Suzina, N. E. et al.** (2011) *Bryocella elongata* gen. nov., sp. nov., a novel member of Subdivision 1 of the *Acidobacteria* isolated from a methanotrophic enrichment culture, and emended description of *Edaphobacter aggregans* Koch et al. 2008. *Int J Syst Evol Microbiol* ijs.
- Deggau, M.** (2006) Nutzung der Bodenfläche. Flächenerhebung 2004 nach Art der tatsächlichen Nutzung. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden. Wirtschaft und Statistik 3/2006.
- Deng, W. G., Wu, W. D., Wang, H. L., Luo, W., und Kimberley, M. O.** (2009) Temporal dynamics of iron-rich, tropical soil organic carbon pools after land-use change from forest to sugarcane. *Journal of Soils and Sediments* **9**: 112-120.

- DeSantis, T. Z., Stone, C. E., Murray, S. R., Moberg, J. P., und Andersen, G. L.** (2005) Rapid quantification and taxonomic classification of environmental DNA from both prokaryotic and eukaryotic origins using a microarray. *Fems Microbiology Letters* **245**: 271-278.
- Diallo, M. D., Martens, M., Vloemans, N., Cousin, S., Vandekerckhove, T. T. M., Neyra, M. et al.** (2004) Phylogenetic analysis of partial bacterial 16S rDNA sequences of tropical grass pasture soil under *Acacia tortilis* subsp. *raddiana* in Senegal. *Systematic and Applied Microbiology* **27**: 238-252.
- Dilly, O., Bloem, J., Vos, A., und Munch, J. C.** (2004) Bacterial diversity in agricultural soils during litter decomposition. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 468-474.
- Dirzo, R. und Raven, P. H.** (2003) Global state of biodiversity and loss. *Annual Review of Environment and Resources* **28**: 137-167.
- Dormann, C. F. and Kühn, I.** (2011) Angewandte Statistik für die biologischen Wissenschaften. Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung - UFZ Leipzig-Halle (Hrsg.).
- Duineveld, B. M., Kowalchuk, G. A., Keijzer, A., van Elsas, J. D., und van Veen, J. A.** (2001) Analysis of bacterial communities in the rhizosphere of chrysanthemum via denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rRNA as well as DNA fragments coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 172-178.
- Dumont, M. G. und Murrell, J. C.** (2005) Stable isotope probing - linking microbial identity to function. *Nature Reviews Microbiology* **3**: 499-504.
- Dunbar, J., Takala, S., Barns, S. M., Davis, J. A., und Kuske, C. R.** (1999) Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1662-1669.
- Edwards, U., Rogall, T., Blocker, H., Emde, M., und Bottger, E. C.** (1989) Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucl. Acids Res.* **17**: 7843-7853.
- Egert, M. und Friedrich, M. W.** (2003) Formation of pseudo-terminal restriction fragments, a PCR-related bias affecting terminal restriction fragment length polymorphism analysis of microbial community structure. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 2555-2562.
- Egert, M. und Friedrich, M. W.** (2005) Post-amplification Klenow fragment treatment alleviates PCR bias caused by partially single-stranded amplicons. *Journal of Microbiological Methods* **61**: 69-75.
- Ehrenfeld, J. G., Han, X. G., Parsons, W. F. J., und Zhu, W. X.** (1997) On the nature of environmental gradients: temporal and spatial variability of soils and vegetation in the New Jersey Pinelands. *Journal of Ecology* **85**: 785-798.
- Eichorst, S. A., Breznak, J. A., und Schmidt, T. M.** (2007) Isolation and characterization of soil bacteria that define *Terriglobus* gen. nov., in the phylum *Acidobacteria*. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 2708-2717.
- Eichorst, S. A., Kuske, C. R., und Schmidt, T. M.** (2011) Influence of Plant Polymers on the Distribution and Cultivation of Bacteria in the Phylum *Acidobacteria*. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**: 586-596.
- Eickhorst, T. und Tippkötter, R.** (2008) Detection of microorganisms in undisturbed soil by combining fluorescence in situ hybridization (FISH) and micropedological methods. *Soil Biology & Biochemistry* **40**: 1284-1293.

- El Fantroussi, S., Verschuere, L., Verstraete, W., und Top, E. M.** (1999) Effect of phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA gene fingerprints and community-level physiological profiles. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 982-988.
- Engelbrektsen, A., Kunin, V., Wrighton, K. C., Zvenigorodsky, N., Chen, F., Ochman, H., und Hugenholtz, P.** (2010) Experimental factors affecting PCR-based estimates of microbial species richness and evenness. *Isme Journal* **4**: 642-647.
- Faith, D. P.** (1992) Conservation Evaluation and Phylogenetic Diversity. *Biological Conservation* **61**: 1-10.
- Faoro, H., Alves, A. C., Souza, E. M., Rigo, L. U., Cruz, L. M., Al-Janabi, S. M. et al.** (2010) Influence of Soil Characteristics on the Diversity of Bacteria in the Southern Brazilian Atlantic Forest. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**: 4744-4749.
- Farley, R. A. und Fitter, A. H.** (1999) Temporal and spatial variation in soil resources in a deciduous woodland. *Journal of Ecology* **87**: 688-696.
- Feinstein, L. M., Sul, W. J., und Blackwood, C. B.** (2009) Assessment of Bias Associated with Incomplete Extraction of Microbial DNA from Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 5428-5433.
- Felsenstein, J.** (1981) Evolutionary Trees from DNA-Sequences - A Maximum-Likelihood Approach. *Journal of Molecular Evolution* **17**: 368-376.
- Felske, A., de Vos, W. M., und Akkermans, A. D. L.** (2000) Spatial distribution of 16S rRNA levels from uncultured acidobacteria in soil. *Letters in Applied Microbiology* **31**: 118-122.
- Fierer, N., Bradford, M. A., und Jackson, R. B.** (2007) Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology* **88**: 1354-1364.
- Fierer, N., Grandy, A. S., Six, J., und Paul, E. A.** (2009) Searching for unifying principles in soil ecology. *Soil Biology & Biochemistry* **41**: 2249-2256.
- Fierer, N. und Jackson, R. B.** (2006) The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 626-631.
- Fischer, M., Bossdorf, O., Gockel, S., Hansel, F., Hemp, A., Hessenmöller, D. et al.** (2010) Implementing large-scale and long-term functional biodiversity research: The Biodiversity Exploratories. *Basic and Applied Ecology* **11**: 473-485.
- Fitch, W. M.** (1971) Toward Defining Course of Evolution - Minimum Change for A Specific Tree Topology. *Systematic Zoology* **20**: 406-&.
- Foesel, B. U., Nägele, V., Naether, A., Wüst, P., Weinert, J., Bonkowski, M. et al.** Determinants of *Acidobacteria* activity in German grass- and woodland soils. (in Bearbeitung)
- Fontaine, S., Mariotti, A., und Abbadie, L.** (2003) The priming effect of organic matter: a question of microbial competition? *Soil Biology & Biochemistry* **35**: 837-843.
- Foster, R. C.** (1988) Microenvironments of Soil-Microorganisms. *Biology and Fertility of Soils* **6**: 189-203.
- Foy, C. D., Chaney, R. L., und White, M. C.** (1978) Physiology of Metal Toxicity in Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **29**: 511-566.
- Frankland, J. C., Ovington, J. D., und Macrae, C.** (1963) Spatial and Seasonal-Variations in Soil, Litter and Ground Vegetation in Some Lake District Woodlands. *Journal of Ecology* **51**: 97-112.

- Friedrich, M. W.** (2006) Stable-isotope probing of DNA: insights into the function of uncultivated microorganisms from isotopically labeled metagenomes. *Current Opinion in Biotechnology* **17**: 59-66.
- Friedrich, M. W.** (2011) Trophic interactions in microbial communities and food webs traced by stable isotope probing of nucleic acids. In: *Stable Isotope Probing in Microbial Molecular Ecology*. Murrell, C. und Whiteley, A. (Hrsg.). ASM Press, Washington, DC.
- Fukunaga, Y., Kurahashi, M., Yanagi, K., Yokota, A., und Harayama, S.** (2008) *Acanthopleuribacter pedis* gen. nov., sp nov., a marine bacterium isolated from a chiton, and description of *Acanthopleuribacteraceae* fam.nov., *Acanthopleuribacterales* ord. nov., *Holophagaceae* fam. nov., *Holophagales* ord. nov and *Holophagae* classis nov in the phylum 'Acidobacteria'. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**: 2597-2601.
- Fulthorpe, R. R., Roesch, L. F. W., Riva, A., und Triplett, E. W.** (2008) Distantly sampled soils carry few species in common. *Isme Journal* **2**: 901-910.
- George, I. F., Liles, M. R., Hartmann, M., Ludwig, W., Goodman, R. M., und Agathos, S. N.** (2009) Changes in soil *Acidobacteria* communities after 2,4,6-trinitrotoluene contamination. *Fems Microbiology Letters* **296**: 159-166.
- Gotelli, N. J.** (2002) Ecology - Biodiversity in the scales. *Nature* **419**: 575-576.
- Griffiths, R. I., Thomson, B. C., James, P., Bell, T., Bailey, M., und Whiteley, A. S.** (2011) The bacterial biogeography of British soils. *Environmental Microbiology* no.
- Grüter, D., Schmid, B., und Brandl, H.** (2006) Influence of plant diversity and elevated atmospheric carbon dioxide levels on belowground bacterial diversity. *Bmc Microbiology* **6**.
- Gutell, R. R., Larsen, N., und Woese, C. R.** (1994) Lessons from An Evolving Ribosomal-RNA - 16S and 23S Ribosomal-RNA Structures from A Comparative Perspective. *Microbiological Reviews* **58**: 10-26.
- Hackl, E., Zechmeister-Boltenstern, S., Bodrossy, L., und Sessitsch, A.** (2004) Comparison of diversities and compositions of bacterial populations inhabiting natural forest soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 5057-5065.
- Hahn, M. W., Moore, E. R. B., und Hofle, M. G.** (1999) Bacterial filament formation, a defense mechanism against flagellate grazing, is growth rate controlled in bacteria of different phyla. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 25-35.
- Haichar, F. E. Z., Achouak, W., Christen, R., Heulin, T., Marol, C., Marais, M. F. et al.** (2007) Identification of cellulolytic bacteria in soil by stable isotope probing. *Environmental Microbiology* **9**: 625-634.
- Hamer, U., MakesChin, F., Stadler, J., und Klotz, S.** (2008) Soil organic matter and microbial community structure in set-aside and intensively managed arable soils in NE-Saxony, Germany. *Applied Soil Ecology* **40**: 465-475.
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T., und Ryan, P. D.** (2001) PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* **4**: 9 pp.
- Hattori, T. und Hattori, R.** (1976) The physical environment in soil microbiology: an attempt to extend principles of microbiology to soil microorganisms. *CRC Critical Reviews in Microbiology* **4**: 423-461.
- Haynes, R. J.** (1982) Effects of Liming on Phosphate Availability in Acid Soils - A Critical-Review. *Plant and Soil* **68**: 289-308.

- Hector, A. und Bagchi, R.** (2007) Biodiversity and ecosystem multifunctionality. *Nature* **448**: 188-196.
- Hedley, M. J., Stewart, J. W. B., und Chauhan, B. S.** (1982) Changes in Inorganic and Organic Soil-Phosphorus Fractions Induced by Cultivation Practices and by Laboratory Incubations. *Soil Science Society of America Journal* **46**: 970-976.
- Herzog, F., Steiner, B., Bailey, D., Baudry, J., Billeter, R., Bukacek, R. et al.** (2006) Assessing the intensity of temperate European agriculture at the landscape scale. *European Journal of Agronomy* **24**: 165-181.
- Hessenmoeller D., von Lübke N., Kaiser S., und Schulze E.D.** On the quantification of Disturbance- and Land Use Intensity in Forestry based on scaling along the self-thinning line. (eingereicht)
- Hill, T. C. J., Walsh, K. A., Harris, J. A., und Moffett, B. F.** (2003) Using ecological diversity measures with bacterial communities. *Fems Microbiology Ecology* **43**: 1-11.
- Holm, S.** (1979) A Simple Sequentially Rejective Multiple Test Procedure. *Scandinavian Journal of Statistics* **6**: 65-70.
- Hooper, D. U., Bignell, D. E., Brown, V. K., Brussaard, L., Dangerfield, J. M., Wall, D. H. et al.** (2000) Interactions between aboveground and belowground biodiversity in terrestrial ecosystems: Patterns, mechanisms, and feedbacks. *Bioscience* **50**: 1049-1061.
- Hooper, D. U., Chapin, F. S., Ewel, J. J., Hector, A., Inchausti, P., Lavorel, S. et al.** (2005) Effects of biodiversity on ecosystem functioning: A consensus of current knowledge. *Ecological Monographs* **75**: 3-35.
- Hotelling, H.** (1933) Analysis of a complex of statistical variables into principal components. *Journal of Educational Psychology* **24**: 498-520.
- Huber, T., Faulkner, G., und Hugenholtz, P.** (2004) Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. *Bioinformatics* **20**: 2317-2319.
- Hugenholtz, P., Goebel, B. M., und Pace, N. R.** (1998a) Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology* **180**: 4765-4774.
- Hugenholtz, P., Pitulle, C., Hershberger, K. L., und Pace, N. R.** (1998b) Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. *Journal of Bacteriology* **180**: 366-376.
- Huse, S. M., Huber, J. A., Morrison, H. G., Sogin, M. L., und Mark Welch, D.** (2007) Accuracy and quality of massively parallel DNA pyrosequencing. *Genome Biology* **8**.
- Isselstein, J., Jeangros, B., und Pavlu, V.** (2005) Agronomic aspects of biodiversity targeted management of temperate grasslands in Europe - a review. *Agron. Res.* **3**: 139-151.
- Janssen, P. H.** (2006) Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 1719-1728.
- Janssen, P. H., Yates, P. S., Grinton, B. E., Taylor, P. M., und Sait, M.** (2002) Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, and *Verrucomicrobia*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 2391-2396.
- Jehmlich, N., Schmidt, F., Hartwich, M., von Bergen, M., Richnow, H. H., und Vogt, C.** (2008a) Incorporation of carbon and nitrogen atoms into proteins measured by protein-based stable isotope probing (Protein-SIP). *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **22**: 2889-2897.

- Jehmlich, N., Schmidt, F., von Bergen, M., Richnow, H. H., und Vogt, C.** (2008b) Protein-based stable isotope probing (Protein-SIP) reveals active species within anoxic mixed cultures. *Isme Journal* **2**: 1122-1133.
- Jesus, E. D., Marsh, T. L., Tiedje, J. M., und Moreira, F. M. D.** (2009) Changes in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon soils. *Isme Journal* **3**: 1004-1011.
- Jones, R. T., Robeson, M. S., Lauber, C. L., Hamady, M., Knight, R., und Fierer, N.** (2009) A comprehensive survey of soil acidobacterial diversity using pyrosequencing and clone library analyses. *Isme Journal* **3**: 442-453.
- Joseph, S. J., Hugenholtz, P., Sangwan, P., Osborne, C. A., und Janssen, P. H.** (2003) Laboratory cultivation of widespread and previously uncultured soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 7210-7215.
- Juottonen, H., Tuittila, E. S., Juutinen, S., Fritze, H., und Yrjala, K.** (2008) Seasonality of rDNA- and rRNA-derived archaeal communities and methanogenic potential in a boreal mire. *Isme Journal* **2**: 1157-1168.
- Jürgens, K. und Matz, C.** (2002) Predation as a shaping force for the phenotypic and genotypic composition of planktonic bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* **81**: 413-434.
- Kalbitz, K., Schwesig, D., Rethemeyer, J., und Matzner, E.** (2005) Stabilization of dissolved organic matter by sorption to the mineral soil. *Soil Biology & Biochemistry* **37**: 1319-1331.
- Kanagawa, T.** (2003) Bias and artifacts in multitemplate polymerase chain reactions (PCR). *Journal of Bioscience and Bioengineering* **96**: 317-323.
- Kaplan, C. W. und Kitts, C. L.** (2003) Variation between observed and true Terminal Restriction Fragment length is dependent on true TRF length and purine content. *Journal of Microbiological Methods* **54**: 121-125.
- Kennedy, N., Brodie, E., Connolly, J., und Clipson, N.** (2004) Impact of lime, nitrogen and plant species on bacterial community structure in grassland microcosms. *Environmental Microbiology* **6**: 1070-1080.
- Kent, A. D., Yannarell, A. C., Rusak, J. A., Triplett, E. W., und McMahon, K. D.** (2007) Synchrony in aquatic microbial community dynamics. *Isme Journal* **1**: 38-47.
- Kerr, J. T., Kharouba, H. M., und Currie, D. J.** (2007) The macroecological contribution to global change solutions. *Science* **316**: 1581-1584.
- Kielak, A., Pijl, A. S., van Veen, J. A., und Kowalchuk, G. A.** (2008) Phylogenetic diversity of *Acidobacteria* in a former agricultural soil. *ISME. J.*
- Kirchman, D. L., Cottrell, M. T., und Lovejoy, C.** (2010) The structure of bacterial communities in the western Arctic Ocean as revealed by pyrosequencing of 16S rRNA genes. *Environmental Microbiology* **12**: 1132-1143.
- Kishimoto, N., Kosako, Y., und Tano, T.** (1991) *Acidobacterium capsulatum* Gen-Nov, Sp-Nov - An Acidophilic Chemoorganotrophic Bacterium Containing Menaquinone from Acidic Mineral Environment. *Current Microbiology* **22**: 1-7.
- Klaus, V. H., Kleinebecker, T., Hölzel, N., Blüthgen, N., Boch, S., Müller, J. et al.** (2011) Nutrient concentrations and fibre contents of plant community biomass reflect species richness patterns along a broad range of land-use intensities among agricultural grasslands. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* **In Press**.

- Kleinsteuber, S., Müller, F. D., Chatzinotas, A., Wendt-Potthoff, K., und Harms, H.** (2008) Diversity and in situ quantification of *Acidobacteria* subdivision 1 in an acidic mining lake. *Fems Microbiology Ecology* **63**: 107-117.
- Koch, I. H., Gich, F., Dunfield, P. F., und Overmann, J.** (2008) *Edaphobacter modestus* gen. nov., sp. nov., and *Edaphobacter aggregans* sp. nov., acidobacteria isolated from alpine and forest soils. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**: 1114-1122.
- Kowalchuk, G. A., Buma, D. S., de Boer, W., Klinkhamer, P. G. L., und van Veen, J. A.** (2002) Effects of above-ground plant species composition and diversity on the diversity of soil-borne microorganisms. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* **81**: 509-520.
- Kramer, J. G. und Singleton, F. L.** (1993) Measurement of Ribosomal-RNA Variations in Natural Communities of Microorganisms on the Southeastern United-States Continental-Shelf. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 2430-2436.
- Kreder, C. A.** (1996) Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1102-1106.
- Kubartova, A., Moukoui, J., Beguiristain, T., Ranger, J., und Berthelin, J.** (2007) Microbial diversity during cellulose decomposition in different forest stands: I. Microbial communities and environmental conditions. *Microbial Ecology* **54**: 393-405.
- Kulichevskaya, I. S., Suzina, N. E., Liesack, W., und Dedysh, S. N.** (2010) *Bryobacter aggregatus* gen. nov., sp. nov., a peat-inhabiting, aerobic chemo-organotroph from subdivision 3 of the *Acidobacteria*. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**: 301-306.
- Kunin, V., Engelbrektson, A., Ochman, H., und Hugenholtz, P.** (2010) Wrinkles in the rare biosphere: pyrosequencing errors can lead to artificial inflation of diversity estimates. *Environmental Microbiology* **12**: 118-123.
- Kuo, S.** (1996) Phosphorus. S. 869-920. In: *Methods of Soil Analysis - Part 3 Chemical Methods*. Sparks, D. L., Page, A. L., Helmke, P. A., Loeppert, R. H., Soltanpour, P. N., Tabatabai, M. A. et al. (Hrsg.). SSSAJ, Madison.
- Kuramae, E. E., Gamper, H. A., Yergeau, E., Piceno, Y. M., Brodie, E. L., DeSantis, T. Z. et al.** (2010) Microbial secondary succession in a chronosequence of chalk grasslands. *Isme Journal* **4**: 711-715.
- Kuske, C. R., Barns, S. M., und Busch, J. D.** (1997) Diverse uncultivated bacterial groups from soils of the arid southwestern United States that are present in many geographic regions. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3614-3621.
- Lane, D. J.** (1991) 16S/23S rRNA sequencing. S. 115-175. In: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Stackebrandt, E. und Goodfellow, M. (Hrsg.). John Wiley and Sons, New York, N.Y.
- Lauber, C. L., Hamady, M., Knight, R., und Fierer, N.** (2009) Pyrosequencing-Based Assessment of Soil pH as a Predictor of Soil Bacterial Community Structure at the Continental Scale. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 5111-5120.
- Lauber, C. L., Strickland, M. S., Bradford, M. A., und Fierer, N.** (2008) The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. *Soil Biology & Biochemistry* **40**: 2407-2415.
- Lautenbach, S., Kugel, C., Lausch, A., und Seppelt, R.** (2011) Analysis of historic changes in regional ecosystem service provisioning using land use data. *Ecological Indicators* **11**: 676-687.
- Lee, S. H. und Cho, J. C.** (2009) Distribution Patterns of the Members of Phylum *Acidobacteria* in Global Soil Samples. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **19**: 1281-1287.

- Lee, S. H., Ka, J. O., und Cho, J. C.** (2008) Members of the phylum *Acidobacteria* are dominant and metabolically active in rhizosphere soil. *Fems Microbiology Letters* **285**: 263-269.
- Lee, S. H. und Kemp, P. F.** (1994) Single-Cell RNA-Content of Natural Marine Planktonic Bacteria Measured by Hybridization with Multiple 16S Ribosomal-RNA-Targeted Fluorescent-Probes. *Limnology and Oceanography* **39**: 869-879.
- Lee, S. H. und Cho, J. C.** (2011) Group-specific PCR primers for the phylum *Acidobacteria* designed based on the comparative analysis of 16S rRNA gene sequences. *Journal of Microbiological Methods* **86**: 195-203.
- Lee, T. K., Doan, T. V., Yoo, K., Choi, S., Kim, C., und Park, J.** (2010) Discovery of commonly existing anode biofilm microbes in two different wastewater treatment MFCs using FLX Titanium pyrosequencing. *Applied Microbiology and Biotechnology* **87**: 2335-2343.
- Liesack, W., Bak, F., Kreft, J. U., und Stackebrandt, E.** (1994) *Holophaga foetida* Gen-Nov, Sp-Nov, A New, Homoacetogenic Bacterium Degrading Methoxylated Aromatic-Compounds. *Archives of Microbiology* **162**: 85-90.
- Liesack, W., Janssen, P. H., Rainey, F. A., Ward-Rainey, N. L., und Stackebrandt, E.** (1997) Microbial diversity in soil: the need for a combined approach using molecular and cultivation techniques. S. 375-439. In: *Modern Soil Microbiology*. van Elsas, J. D., Trevors, J. T., und Wellington, E. M. H. (Hrsg.). Marcel Dekker Inc., New York, N.Y.
- Liles, M. R., Manske, B. F., Bintrim, S. B., Handelsman, J., und Goodman, R. M.** (2003) A census of rRNA genes and linked genomic sequences within a soil metagenomic library. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 2684-2691.
- Lillis, L., Doyle, E., und Clipson, N.** (2009) Comparison of DNA- and RNA-based bacterial community structures in soil exposed to 2,4-dichlorophenol. *Journal of Applied Microbiology* **107**: 1883-1893.
- Lipson, D. A. und Schmidt, S. K.** (2004) Seasonal changes in an alpine soil bacterial community in the Colorado Rocky Mountains. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 2867-2879.
- Liu, W. T., Marsh, T. L., Cheng, H., und Forney, L. J.** (1997) Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4516-4522.
- Liu, Z. Z., DeSantis, T. Z., Andersen, G. L., und Knight, R.** (2008) Accurate taxonomy assignments from 16S rRNA sequences produced by highly parallel pyrosequencers. *Nucl. Acids Res.* **36**.
- Loreau, M., Naeem, S., Inchausti, P., Bengtsson, J., Grime, J. P., Hector, A. et al.** (2001) Ecology - Biodiversity and ecosystem functioning: Current knowledge and future challenges. *Science* **294**: 804-808.
- Lozupone, C., Hamady, M., und Knight, R.** (2006) UniFrac - An online tool for comparing microbial community diversity in a phylogenetic context. *Bmc Bioinformatics* **7**.
- Ludwig, W., Bauer, S. H., Bauer, M., Held, I., Kirchhof, G., Schulze, R. et al.** (1997) Detection and in situ identification of representatives of a widely distributed new bacterial phylum. *Fems Microbiology Letters* **153**: 181-190.
- Ludwig, W., Strunk, O., Klugbauer, S., Klugbauer, N., Weizenegger, M., Neumaier, J. et al.** (1998) Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. *Electrophoresis* **19**: 554-568.
- Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar et al.** (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucl. Acids Res.* **32**: 1363-1371.

- Lueders, T. und Friedrich, M. W.** (2003) Evaluation of PCR amplification bias by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of small-subunit rRNA and *mcrA* genes by using defined template mixtures of methanogenic pure cultures and soil DNA extracts. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 320-326.
- Lueders, T., Manefield, M., und Friedrich, M. W.** (2004a) Enhanced sensitivity of DNA- and rRNA-based stable isotope probing by fractionation and quantitative analysis of isopycnic centrifugation gradients. *Environmental Microbiology* **6**: 73-78.
- Lueders, T., Pommerenke, B., und Friedrich, M. W.** (2004b) Stable-isotope probing of microorganisms thriving at thermodynamic limits: Syntrophic propionate oxidation in flooded soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 5778-5786.
- Lueders, T., Wagner, B., Claus, P., und Friedrich, M. W.** (2004c) Stable isotope probing of rRNA and DNA reveals a dynamic methylotroph community and trophic interactions with fungi and protozoa in oxic rice field soil. *Environmental Microbiology* **6**: 60-72.
- Lynch, J. M.** (1990) The Rhizosphere. John Wiley & Sons, Chichester.
- Lynd, L. R., Weimer, P. J., van Zyl, W. H., und Pretorius, I. S.** (2002) Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **66**: 506
- Manefield, M., Whiteley, A. S., Griffiths, R. I., und Bailey, M. J.** (2002a) RNA stable isotope probing, a novel means of linking microbial community function to Phylogeny. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 5367-5373.
- Manefield, M., Whiteley, A. S., Ostle, N., Ineson, P., und Bailey, M. J.** (2002b) Technical considerations for RNA-based stable isotope probing: an approach to associating microbial diversity with microbial community function. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **16**: 2179-2183.
- Mannistö, M. K., Tiirola, M., und Haggblom, M. M.** (2009) Effect of Freeze-Thaw Cycles on Bacterial Communities of Arctic Tundra Soil. *Microbial Ecology* **58**: 621-631.
- Mannistö, M. K., Rawat, S., Starovoytov, V., und Haggblom, M. M.** (2010) *Terriglobus saanensis* sp. nov., a novel *Acidobacterium* isolated from tundra soil of Northern Finland. *Int J Syst Evol Microbiol.*
- Margulies, M., Egholm, M., Altman, W. E., Attiya, S., Bader, J. S., Bembien, L. A. et al.** (2005) Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* **437**: 376-380.
- Marschner, P., Umar, S., und Baumann, K.** (2011) The microbial community composition changes rapidly in the early stages of decomposition of wheat residue. *Soil Biology & Biochemistry* **43**: 445-451.
- Matz, C., Deines, P., Boenigk, J., Arndt, H., Eberl, L., Kjelleberg, S., und Jurgens, K.** (2004) Impact of violacein-producing bacteria on survival and feeding of bacterivorous nanoflagellates. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 1593-1599.
- McKinley, V. L., Peacock, A. D., und White, D. C.** (2005) Microbial community PLFA and PHB responses to ecosystem restoration in tallgrass prairie soils. *Soil Biology & Biochemistry* **37**: 1946-1958.
- McMahon, S. K., Williams, M. A., Bottomley, P. J., und Myrold, D. D.** (2005) Dynamics of microbial communities during decomposition of carbon-13 labeled ryegrass fractions in soil. *Soil Science Society of America Journal* **69**: 1238-1247.
- Meisinger, D. B., Zimmermann, J., Ludwig, W., Schleifer, K. H., Wanner, G., Schmid, M. et al.** (2007) In situ detection of novel *Acidobacteria* in microbial mats from a chemolithoautotrophically based cave ecosystem (Lower Kane Cave, WY, USA). *Environmental Microbiology* **9**: 1523-1534.

- Mengoni, A., Tatti, E., Decorosi, F., Viti, C., Bazzicalupo, M., und Giovannetti, L.** (2005) Comparison of 16S rRNA and 16S rDNA T-RFLP approaches to study bacterial communities in soil microcosms treated with chromate as perturbing agent. *Microbial Ecology* **50**: 375-384.
- Merrill, L. und Halverson, L. J.** (2002) Seasonal variation in microbial communities and organic malodor indicator compound concentrations in various types of swine manure storage systems. *Journal of Environmental Quality* **31**: 2074-2085.
- Miller, H. G.** (1984) Dynamics of nutrient cycling in plantation ecosystems. S. 53-78. In: *Nutrition of Plantation Forest*. Boven, G. D. und Nambiar, E. K. S. (Hrsg.). Academic Press, London.
- Miller, S. R., Strong, A. L., Jones, K. L., und Ungerer, M. C.** (2009) Bar-Coded Pyrosequencing Reveals Shared Bacterial Community Properties along the Temperature Gradients of Two Alkaline Hot Springs in Yellowstone National Park. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 4565-4572.
- Moore-Kucera, J. und Dick, R. P.** (2008) Application of C-13-labeled litter and root materials for in situ decomposition studies using phospholipid fatty acids. *Soil Biology & Biochemistry* **40**: 2485-2493.
- Morris, S. A., Radajewski, S., Willison, T. W., und Murrell, J. C.** (2002) Identification of the functionally active methanotroph population in a peat soil microcosm by stable-isotope probing. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 1446-1453.
- Mummey, D., Holben, W., Six, J., und Stahl, P.** (2006) Spatial stratification of soil bacterial populations in aggregates of diverse soils. *Microbial Ecology* **51**: 404-411.
- Murphy, J. und Riley, J. P.** (1962) A Modified Single Solution Method for Determination of Phosphate in Natural Waters. *Analytica Chimica Acta* **26**: 31-&.
- Murty, D., Kirschbaum, M. U. F., McMurtrie, R. E., und McGilvray, A.** (2002) Does conversion of forest to agricultural land change soil carbon and nitrogen? a review of the literature. *Global Change Biology* **8**: 105-123.
- Muyzer, G., Dewaal, E. C., und Uitterlinden, A. G.** (1993) Profiling of Complex Microbial-Populations by Denaturing Gradient Gel-Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes-Coding for 16S Ribosomal-RNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 695-700.
- Muyzer, G., Teske, A., Wirsén, C., und Jannasch, H.** (1995) Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Archives of Microbiology* **164**: 165-172.
- Nacke, H., Thürmer, A., Wollherr, A., Will, C., Hodac, L., Herold, N. et al.** (2011a) Pyrosequencing-Based Assessment of Bacterial Community Structure Along Different Management Types in German Forest and Grassland Soils. *PLoS One* **6**.
- Nacke, H., Will, C., Herzog, S., Nowka, B., Engelhaupt, M., und Daniel, R.** (2011b) Identification of novel lipolytic genes and gene families by screening of metagenomic libraries derived from soil samples of the German Biodiversity Exploratories. *Fems Microbiology Ecology*.
- Naeem, S., Thompson, L. J., Lawler, S. P., Lawton, J. H., und Woodfin, R. M.** (1994) Declining Biodiversity Can Alter the Performance of Ecosystems. *Nature* **368**: 734-737.
- Nawrocki, E. P., Kolbe, D. L., und Eddy, S. R.** (2009) Infernal 1.0: inference of RNA alignments. *Bioinformatics* **25**: 1335-1337.
- Nawrocki, E. P. und Eddy, S. R.** (2007) Query-Dependent Banding (QDB) for Faster RNA Similarity Searches. *PLoS Comput Biol* **3**: 56.

- Neefs, J. M., Vandeppeer, Y., Hendriks, L., und Dewachter, R.** (1990) Compilation of Small Ribosomal-Subunit RNA Sequences. *Nucl. Acids Res.* **18**: 2237-2317.
- Negassa, W. und Leinweber, P.** (2009) How does the Hedley sequential phosphorus fractionation reflect impacts of land use and management on soil phosphorus: A review. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* **172**: 305-325.
- Nemergut, D. R., Anderson, S. P., Cleveland, C. C., Martin, A. P., Miller, A. E., Seimon, A., und Schmidt, S. K.** (2007) Microbial community succession in an unvegetated, recently deglaciated soil. *Microbial Ecology* **53**: 110-122.
- Neufeld, J. D., Dumont, M. G., Vohra, J., und Murrell, J. C.** (2007) Methodological considerations for the use of stable isotope probing in microbial ecology. *Microbial Ecology* **53**: 435-442.
- Nogales, B., Moore, E. R. B., Abraham, W. R., und Timmis, K. N.** (1999) Identification of the metabolically active members of a bacterial community in a polychlorinated biphenyl polluted moorland soil. *Environmental Microbiology* **1**: 199-212.
- Nubel, U., Engelen, B., Felske, A., Snaidr, J., Wieshuber, A., Amann, R. I. et al.** (1996) Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* **178**: 5636-5643.
- Nunan, N., Daniell, T. J., Singh, B. K., Papert, A., McNicol, J. W., und Prosser, J. I.** (2005) Links between plant and rhizoplane bacterial communities in grassland soils, characterized using molecular techniques. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 6784-6792.
- Nüsslein, K. und Tiedje, J. M.** (1998) Characterization of the dominant and rare members of a young Hawaiian soil bacterial community with small-subunit ribosomal DNA amplified from DNA fractionated on the basis of its guanine and cytosine composition. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 1283-1289.
- Nüsslein, K. und Tiedje, J. M.** (1999) Soil bacterial community shift correlated with change from forest to pasture vegetation in a tropical soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 3622-3626.
- Okamura, K., Kawai, A., Yamada, T., und Hiraishi, A.** (2011) *Acidipila rosea* gen. nov., sp. nov., an acidophilic chemoorganotrophic bacterium belonging to the phylum *Acidobacteria*. *Fems Microbiology Letters* **317**: 138-142.
- Olsen, G. J., Lane, D. J., Giovannoni, S. J., Pace, N. R., und Stahl, D. A.** (1986) Microbial Ecology and Evolution - A Ribosomal-RNA Approach. *Annual Review of Microbiology* **40**: 337-365.
- Pace, N. R., Stahl, D. A., Lane, D. J., und Olsen, G. J.** (1986) The Analysis of Natural Microbial-Populations by Ribosomal-RNA Sequences. *Advances in Microbial Ecology* **9**: 1-55.
- Padmanabhan, P., Padmanabhan, S., DeRito, C., Gray, A., Gannon, D., Snape, J. R. et al.** (2003) Respiration of C-13-labeled substrates added to soil in the field and subsequent 16S rRNA gene analysis of C-13-labeled soil DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 1614-1622.
- Paillet, Y., Berges, L., Hjalten, J., Odor, P., Avon, C., Bernhardt-Romermann, M. et al.** (2010) Biodiversity Differences between Managed and Unmanaged Forests: Meta-Analysis of Species Richness in Europe. *Conservation Biology* **24**: 101-112.
- Pankratov, T. A. und Dedysh, S. N.** (2010) *Granulicella paludicola* gen. nov., sp. nov., *Granulicella pectinivorans* sp. nov., *Granulicella aggregans* sp. nov. and *Granulicella rosea* sp. nov., acidophilic, polymer-degrading acidobacteria from *Sphagnum* peat bogs. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**: 2951-2959.

- Pankratov, T. A., Serkebaeva, Y. M., Kulichevskaya, I. S., Liesack, W., und Dedysh, S. N.** (2008) Substrate-induced growth and isolation of *Acidobacteria* from acidic *Sphagnum* peat. *Isme Journal* **2**: 551-560.
- Pankratov, T. A., Kirsanova, L. A., Kaparullina, E. N., Kevbrin, V. V., und Dedysh, S. N.** (2011) *Telmatobacter bradus* gen. nov., sp. nov., a cellulolytic facultative anaerobe from subdivision 1 of the *Acidobacteria* and emended description of *Acidobacterium capsulatum* Kishimoto *et al.* 1991. *Int J Syst Evol Microbiol* ijs.
- Parsley, L. C., Linneman, J., Goode, A. M., Becklund, K., George, I., Goodman, R. M. et al.** (2011) Polyketide synthase pathways identified from a metagenomic library are derived from soil *Acidobacteria*. *FEMS Microbiol. Ecol.*
- Pilloni, G., von Netzer, F., Engel, M., und Lueders, T.** (2011) Electron acceptor-dependent identification of key anaerobic toluene degraders at a tar-oil-contaminated aquifer by Pyro-SIP. *Fems Microbiology Ecology* no.
- Polz, M. F. und Cavanaugh, C. M.** (1998) Bias in Template-to-Product Ratios in Multitemplate PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 3724-3730.
- Poschlod, P., Bakker, J. P., und Kahmen, S.** (2005) Changing land use and its impact on biodiversity. *Basic and Applied Ecology* **6**: 93-98.
- Post, W. M. und Mann, L. K.** (1990) Changes in soil organic carbon and nitrogen as a result of cultivation. S. 401-407. In: *Soil and the Greenhouse Effect*. Bowman, A. F. (Hrsg.). Wiley, New York.
- Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B. M., Ludwig, W. G., Peplies, J., und Glockner, F. O.** (2007) SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucl. Acids Res.* **35**: 7188-7196.
- Qiu, X. Y., Wu, L. Y., Huang, H. S., McDonel, P. E., Palumbo, A. V., Tiedje, J. M., und Zhou, J. Z.** (2001) Evaluation of PCR-generated chimeras: Mutations, and heteroduplexes with 16S rRNA gene-based cloning. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 880-887.
- Quaiser, A., Lopez-Garcia, P., Zivanovic, Y., Henn, M. R., Rodriguez-Valera, F., und Moreira, D.** (2008) Comparative analysis of genome fragments of *Acidobacteria* from deep Mediterranean plankton. *Environmental Microbiology* **10**: 2704-2717.
- Quince, C., Lanzen, A., Curtis, T. P., Davenport, R. J., Hall, N., Head, I. M. et al.** (2009) Accurate determination of microbial diversity from 454 pyrosequencing data. *Nature Methods* **6**: 639-U27.
- Quince, C., Lanzen, A., Davenport, R. J., und Turnbaugh, P. J.** (2011) Removing Noise From Pyrosequenced Amplicons. *Bmc Bioinformatics* **12**.
- R Development Core Team** (2011) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Radajewski, S., Ineson, P., Parekh, N. R., und Murrell, J. C.** (2000) Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature* **403**: 646-649.
- Radajewski, S., Webster, G., Reay, D. S., Morris, S. A., Ineson, P., Nedwell, D. B. et al.** (2002) Identification of active methylotroph populations in an acidic forest soil by stable isotope probing. *Microbiology-Sgm* **148**: 2331-2342.
- Raich, J. W. und Schlesinger, W. H.** (1992) The global carbon dioxide efflux in soil respiration and its relationship to vegetation and climate. *Tellus* **44B**: 81-90.

- Ramette, A.** (2007) Multivariate analyses in microbial ecology. *Fems Microbiology Ecology* **62**: 142-160.
- Rao, C. R.** (1964) The use and interpretation of principal component analysis in applied research. *Sankhya A* **26**: 329-358.
- Rappe, M. S. und Giovannoni, S. J.** (2003) The uncultured microbial majority. *Annual Review of Microbiology* **57**: 369-394.
- Rasche, F., Knapp, D., Kaiser, C., Koranda, M., Kitzler, B., Zechmeister-Boltenstern, S. et al.** (2010) Seasonality and resource availability control bacterial and archaeal communities in soils of a temperate beech forest. *ISME J.*
- Rastogi, R., Wu, M., DasGupta, I., und Fox, G. E.** (2009) Visualization of ribosomal RNA operon copy number distribution. *Bmc Microbiology* **9**.
- Ricke, P., Kolb, S., und Braker, G.** (2005) Application of a newly developed ARB software-integrated tool for in silico terminal restriction fragment length polymorphism analysis reveals the dominance of a novel pmoA cluster in a forest soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 1671-1673.
- Roesch, L. F., Fulthorpe, R. R., Riva, A., Casella, G., Hadwin, A. K. M., Kent, A. D. et al.** (2007) Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *ISME J.* **1**: 283-290.
- Roh, S. W., Kim, K. H., Nam, Y. D., Chang, H. W., Park, E. J., und Bae, J. W.** (2010) Investigation of archaeal and bacterial diversity in fermented seafood using barcoded pyrosequencing. *ISME J.* **4**: 1-16.
- Ronaghi, M.** (2001) Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Research* **11**: 3-11.
- Rousk, J., Baath, E., Brookes, P. C., Lauber, C. L., Lozupone, C., Caporaso, J. G. et al.** (2010) Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *Isme Journal* **4**: 1340-1351.
- Roy, R., Kluber, H. D., und Conrad, R.** (1997) Early initiation of methane production in anoxic rice soil despite the presence of oxidants. *Fems Microbiology Ecology* **24**: 311-320.
- Rudi, K., Zimonja, M., Trosvik, P., und Naes, T.** (2007) Use of multivariate statistics for 16S rRNA gene analysis of microbial communities. *International Journal of Food Microbiology* **120**: 95-99.
- Sait, M., Davis, K. E. R., und Janssen, P. H.** (2006) Effect of pH on isolation and distribution of members of subdivision 1 of the phylum *Acidobacteria* occurring in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 1852-1857.
- Sait, M., Hugenholtz, P., und Janssen, P. H.** (2002) Cultivation of globally distributed soil bacteria from phylogenetic lineages previously only detected in cultivation-independent surveys. *Environmental Microbiology* **4**: 654-666.
- Saitou, N. und Nei, M.** (1987) The Neighbor-Joining Method - A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**: 406-425.
- Sala, O. E., Chapin, F. S., Armesto, J. J., Berlow, E., Bloomfield, J., Dirzo, R. et al.** (2000) Biodiversity - Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science* **287**: 1770-1774.
- Sambrook, J. and Russell, D. W.** (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, N.Y.
- Sanger, F., Nicklen, S., und Coulson, A. R.** (1977) DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**: 5463-5467.

- Schimel, J. P. und Gullede, J.** (1998) Microbial community structure and global trace gases. *Global Change Biology* **4**: 745-758.
- Schloss, P. D. und Handelsman, J.** (2005) Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 1501-1506.
- Schmidt, S. K., Costello, E. K., Nemergut, D. R., Cleveland, C. C., Reed, S. C., Weintraub, M. N. et al.** (2007) Biogeochemical consequences of rapid microbial turnover and seasonal succession in soil. *Ecology* **88**: 1379-1385.
- Schutte, U. M. E., Abdo, Z., Bent, S. J., Shyu, C., Williams, C. J., Pierson, J. D., und Forney, L. J.** (2008) Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes to characterize microbial communities. *Applied Microbiology and Biotechnology* **80**: 365-380.
- Semedo, L. T. A. S., Gomes, R. C., Bon, E. P. S., Soares, R. M. A., Linhares, L. F., und Coelho, R. R. R.** (2000) Endocellulase and exocellulase activities of two streptomyces strains isolated from a forest soil. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **84-6**: 267-276.
- Settele, J., Penev, L., Georgiev, T., Grabaum, R., Grobelnik, V., Hammen, V. et al.** (2010) *Atlas of Biodiversity Risk*. Pensoft, Sofia & Moscow .
- Simon, C., Wiezer, A., Strittmatter, A. W., und Daniel, R.** (2009) Phylogenetic Diversity and Metabolic Potential Revealed in a Glacier Ice Metagenome. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 7519-7526.
- Singleton, D. R., Furlong, M. A., Rathbun, S. L., und Whitman, W. B.** (2001) Quantitative comparisons of 16S rRNA gene sequence libraries from environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 4374-4376.
- Sinninghe Damste, J. S., Rijpstra, W. I., Hopmans, E. C., Weijers, J. W., Foessel, B. U., Overmann, J., und Dedysh, S. N.** (2011) 13,16-Dimethyl octacosanedioic acid (iso-diabolic acid): A common membrane-spanning lipid of *Acidobacteria* subdivisions 1 and 3. *Appl. Environ. Microbiol.*
- Slater, J. H. und Lovatt, D.** (1984) Biodegradation and the significance of microbial communities. S. 439-485. In: *Microbial degradation of organic compounds*. Gibson, D. T. (Hrsg.). Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.
- Smalla, K., Oros-Sichler, M., Milling, A., Heuer, H., Baumgarte, S., Becker, R. et al.** (2007) Bacterial diversity of soils assessed by DGGE, T-RFLP and SSCP fingerprints of PCR-amplified 16S rRNA gene fragments: Do the different methods provide similar results? *Journal of Microbiological Methods* **69**: 470-479.
- Smit, E., Leeflang, P., Gommans, S., van den Broek, J., van Mil, S., und Wernars, K.** (2001) Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 2284-2291.
- Smith, C. J., Danilowicz, B. S., Clear, A. K., Costello, F. J., Wilson, B., und Meijer, W. G.** (2005) T-Align, a web-based tool for comparison of multiple terminal restriction fragment length polymorphism profiles. *Fems Microbiology Ecology* **54**: 375-380.
- Smith, J., Wagner-Riddle, C., und Dunfield, K.** (2010) Season and management related changes in the diversity of nitrifying and denitrifying bacteria over winter and spring. *Applied Soil Ecology* **44**: 138-146.

- Sogin, M. L., Morrison, H. G., Huber, J. A., Mark Welch, D., Huse, S. M., Neal, P. R. et al.** (2006) Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 12115-12120.
- Sornsrivichai, P., Tillman, R. W., Syers, J. K., und Cornforth, I. S.** (1984) The Effect of Soil-pH on Olsen Bicarbonate Phosphate Values. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **35**: 257-264.
- Stackebrandt, E. und Goebel, B. M.** (1994) A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S Ribosomal-RNA Sequence-Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology* **44**: 846-849.
- Stepanauskas, R., Moran, M. A., Bergamaschi, B. A., und Hollibaugh, J. T.** (2003) Covariance of bacterioplankton composition and environmental variables in a temperate delta system. *Aquatic Microbial Ecology* **31**: 85-98.
- Stevenson, B. A., Sparling, G. P., Schipper, L. A., Degens, B. P., und Duncan, L. C.** (2004a) Pasture and forest soil microbial communities show distinct patterns in their catabolic respiration responses at a landscape scale. *Soil Biology & Biochemistry* **36**: 49-55.
- Stevenson, B. S., Eichorst, S. A., Wertz, J. T., Schmidt, T. M., und Breznak, J. A.** (2004b) New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 4748-4755.
- Stres, B., Danevcic, T., Pal, L., Fuka, M. M., Resman, L., Leskovec, S. et al.** (2008) Influence of temperature and soil water content on bacterial, archaeal and denitrifying microbial communities in drained fen grassland soil microcosms. *Fems Microbiology Ecology* **66**: 110-122.
- Sun, H. Y., Deng, S. P., und Raun, W. R.** (2004) Bacterial community structure and diversity in a century-old manure-treated agroecosystem. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 5868-5874.
- Suzuki, M. T. und Giovannoni, S. J.** (1996) Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 625-630.
- Swift, M. J., Heal, O. W., and Anderson, J. M.** (1979) Decomposition in terrestrial ecosystems. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.
- Tarlera, S., Jangid, K., Ivester, A. H., Whitman, W. B., und Williams, M. A.** (2008) Microbial community succession and bacterial diversity in soils during 77,000 years of ecosystem development. *Fems Microbiology Ecology* **64**: 129-140.
- Tate, R. L.** (2000) Soil Microbiology. Tate, R.L. (Hrsg.). John Wiley, Chichester, UK.
- Tebbe, C. C. und Vahjen, W.** (1993) Interference of Humic Acids and DNA Extracted Directly from Soil in Detection and Transformation of Recombinant-DNA from Bacteria and A Yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 2657-2665.
- ter Braak, C. J. F. and Smilauer, P.** (2011) CANOCO Reference Manual and CanoDraw for Windows User's Guide: Software for Canonical Community Ordination (version 4.5). Microcomputer Power, Ithaca, NY.
- Thomson, B., Ostle, N., McNamara, N., Bailey, M., Whiteley, A., und Griffiths, R.** (2010) Vegetation Affects the Relative Abundances of Dominant Soil Bacterial Taxa and Soil Respiration Rates in an Upland Grassland Soil. *Microbial Ecology* **59**: 335-343.
- Torsvik, V. und Ovreas, L.** (2002) Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* **5**: 240-245.
- Umarov, M. M.** (2001) The role of soil microorganisms in the turnover of chemical elements in terrestrial ecosystems. *Eurasian Soil Science* **34**: S74-S81.

- van der Heijden, M. G. A., Bardgett, R. D., und van Straalen, N. M.** (2008) The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters* **11**: 296-310.
- Wagner, M., Loy, A., Nogueira, R., Purkhold, U., Lee, N., und Daims, H.** (2002) Microbial community composition and function in wastewater treatment plants. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* **81**: 665-680.
- Wakelin, S. A., Macdonald, L. M., Rogers, S. L., Gregg, A. L., Bolger, T. P., und Baldock, J. A.** (2008) Habitat selective factors influencing the structural composition and functional capacity of microbial communities in agricultural soils. *Soil Biology & Biochemistry* **40**: 803-813.
- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., und Cole, J. R.** (2007) Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 5261-5267.
- Wang, W. J., Baldock, J. A., Dalala, R. C., und Moody, P. W.** (2004) Decomposition dynamics of plant materials in relation to nitrogen availability and biochemistry determined by NMR and wet-chemical analysis. *Soil Biology & Biochemistry* **36**: 2045-2058.
- Ward, N. L., Challacombe, J. F., Janssen, P. H., Henrissat, B., Coutinho, P. M., Wu, M. et al.** (2009) Three Genomes from the Phylum *Acidobacteria* Provide Insight into the Lifestyles of These Microorganisms in Soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 2046-2056.
- Wardle, D. A., Bardgett, R. D., Klironomos, J. N., Setälä, H., van der Putten, W. H., und Wall, D. H.** (2004) Ecological linkages between aboveground and belowground biota. *Science* **304**: 1629-1633.
- Wawrik, B., Kudiev, D., Abdivasievna, U. A., Kukor, J. J., Zystra, G. J., und Kerkhof, L.** (2007) Biogeography of actinomycete communities and type II polyketide synthase genes in soils collected in New Jersey and Central Asia. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 2982-2989.
- Webb, C. O., Ackerly, D. D., und Kembel, S. W.** (2008) Phylocom: software for the analysis of phylogenetic community structure and trait evolution. *Bioinformatics* **24**: 2098-2100.
- Weisse, T.** (2002) The significance of inter- and intraspecific variation in bacterivorous and herbivorous protists. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* **81**: 327-341.
- Wessen, E., Hallin, S., und Philippot, L.** (2010) Differential responses of bacterial and archaeal groups at high taxonomical ranks to soil management. *Soil Biology & Biochemistry* **42**: 1759-1765.
- Whitby, C. B., Hall, G., Pickup, R., Saunders, J. R., Ineson, P., Parekh, N. R., und McCarthy, A.** (2001) C-13 incorporation into DNA as a means of identifying the active components of ammonia-oxidizer populations. *Letters in Applied Microbiology* **32**: 398-401.
- Will, C., Thürmer, A., Wollherr, A., Nacke, H., Herold, N., Schrumpf, M. et al.** (2010) Horizon-specific bacterial community composition of German grassland soils as revealed by pyrosequencing-based analysis of 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* AEM.
- Wilson, E. O.** (2001) *The diversity of life* . Penguin Press Science , London.
- Wintzingerode, V., Gübel, U. B., und Stackebrandt, E.** (1997) Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *Fems Microbiology Reviews* **21**: 213-229.
- Wirth, S. und Ulrich, A.** (2002) Cellulose-degrading potentials and phylogenetic classification of carboxymethyl-cellulose decomposing bacteria isolated from soil. *Systematic and Applied Microbiology* **25**: 584-591.

- Woese, C. R.** (1987) Bacterial Evolution. *Microbiological Reviews* **51**: 221-271.
- Woese, C. R.** (2000) Interpreting the universal phylogenetic tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 8392-8396.
- Wold, H.** (1966) Estimation of principal components and related models by iterative least squares. S. 391-420. In: *Multivariate Analysis*. Krishnaiah, P. R. (Hrsg.). Academic Press, New York.
- Wolters, V., Bengtsson, J., und Zaitsev, A. S.** (2006) Relationship among the species richness of different taxa. *Ecology* **87**: 1886-1895.
- Yin, C. T., Jones, K. L., Peterson, D. E., Garrett, K. A., Hulbert, S. H., und Paulitz, T. C.** (2010) Members of soil bacterial communities sensitive to tillage and crop rotation. *Soil Biology & Biochemistry* **42**: 2111-2118.
- Zak, D. R., Holmes, W. E., White, D. C., Peacock, A. D., und Tilman, D.** (2003) Plant diversity, soil microbial communities, and ecosystem function: Are there any links? *Ecology* **84**: 2042-2050.
- Zimmermann, J., Gonzalez, J. M., Saiz-Jimenez, C., und Ludwig, W.** (2005) Detection and phylogenetic relationships of highly diverse uncultured acidobacterial communities in altamira cave using 23S rRNA sequence analyses. *Geomicrobiology Journal* **22**: 379-388.
- Zogg, G. P., Zak, D. R., Ringelberg, D. B., MacDonald, N. W., Pregitzer, K. S., und White, D. C.** (1997) Compositional and functional shifts in microbial communities due to soil warming. *Soil Science Society of America Journal* **61**: 475-481.
- Zul, D., Denzel, S., Kotz, A., und Overmann, J.** (2007) Effects of plant biomass, plant diversity, and water content on bacterial communities in soil lysimeters: Implications for the determinants of bacterial diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 6916-6929.
- Zuur, A. F., Ieno, E. N., und Elphick, C. S.** (2010) A protocol for data exploration to avoid common statistical problems. *Methods in Ecology and Evolution* **1**: 3-14.

6. Anhang

Tabelle 1. ‚Accession numbers‘ der 2031 acidobakteriellen 16S rRNA-Gen-Sequenzen der Klonbibliotheken AEG, HEG, SEG, AEW, HEW und SEW (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>)

Klonbibliothek	Accession-Numbers
AEG	HQ597043 - HQ597396
HEG	HQ597397 - HQ597542
	HQ597544 - HQ597731
	HQ597733 - HQ597739
	HQ597741
	HQ597743 - HQ597754
	HQ597756 - HQ597759
	HQ597761 - HQ597762
	HQ597764 - HQ597768
	HQ597771 - HQ597774
	HQ597776 - HQ597786
	HQ597788 - HQ597893
	HQ597796 - HQ597817
	HQ597819 - HQ597823
	HQ597825 - HQ597826
	HQ597829 - HQ597835
	HQ597837 - HQ597846
	HQ597848 - HQ597850
	HQ597852 - HQ597859
	HQ597864 - HQ597868
	HQ597870 - HQ597871
	HQ597873 - HQ597874
	HQ597876 - HQ597880
	HQ597882
	HQ597884 - HQ597886
	HQ597888 - HQ597889
SEG	HQ597893 - HQ597900
	HQ597902 - HQ597904
	HQ597906 - HQ597917
	HQ597920 - HQ597923
	HQ597925 - HQ597926
	HQ597930
	HQ597932
	HQ597934 - HQ597936
	HQ597939 - HQ597942
	HQ597944 - HQ597950
	HQ597952 - HQ597964
	HQ597967
	HQ597969
	HQ597972
	HQ597974
	HQ597977
	HQ597979 - HQ597980
	HQ597982
	HQ597984
	HQ597986
	HQ597988
	HQ597990 - HQ597991
	HQ597993
	HQ597996 - HQ597997
	HQ729774 - HQ729915
AEW	HQ598095 - HQ598414
HEW	HQ598415 - HQ598744
SEW	HQ598745 - HQ598871
	HQ598873 - HQ599092

Tabelle 2. Kovarianz zwischen Boden- und Standortparametern. Signifikant korrelierte Parameter mit Spearman's Rank-Korrelationskoeffizient $Rho > 0.6$ und > -0.6 sind fett hervorgehoben. Abkürzungen: pH – pH, Corg – organischer Kohlenstoff, N – Stickstoff, CN – Kohlenstoff/Stickstoffverhältnis, SM – Bodenfeuchte, ST – Bodentemperatur, SR – Bodenatmung, Am – Abundanz der Amöben, FI – Abundanz der Flagellaten, Ci – Abundanz der Ciliaten, VP- Anzahl vaskulären Pflanzenarten, LUI – Landnutzungsintensität, G – Grünland, W – Wald, NH4 - Ammonium, NO3 - Nitrat, P – Phosphor.

	pH	Corg	N	CN	SM	ST	SR	Am	FI	Ci	VP	G	LUI	W	NH4	NO3	P
pH	1																
Corg	0,556	1															
N	0,686	0,957	1														
CN	-0,840	-0,467	-0,667	1													
SM	0,266	0,371	0,453	-0,447	1												
ST	0,497	0,239	0,367	-0,449	-0,109	1											
SR	0,669	0,481	0,631	-0,670	0,158	0,801	1										
Am	0,539	0,438	0,577	-0,661	0,517	0,176	0,475	1									
FI	0,088	0,206	0,166	-0,084	0,252	-0,229	-0,097	0,479	1								
Ci	0,373	0,492	0,560	-0,397	0,198	0,417	0,550	0,260	-0,172	1							
VP	-0,051	0,029	-0,034	0,142	0,179	-0,351	-0,215	0,005	0,145	-0,143	1						
LUI	G -0,087	0,035	0,088	-0,359	0,013	-0,015	0,109	0,510	0,259	-0,058	-0,316	1					
W	0,176	0,064	0,112	-0,081	-0,073	0,061	0,020	-0,112	0,026	0,109	-0,196		1				
NH4	-0,765	-0,387	-0,552	0,745	-0,389	-0,377	-0,565	-0,397	0,026	-0,507	0,060	-0,024	-0,139	1			
NO3	0,342	0,499	0,557	-0,420	0,296	0,182	0,307	0,352	0,115	0,181	-0,168	0,281	0,231	-0,272	1		
P	0,760	0,597	0,718	-0,807	0,291	0,310	0,562	0,650	0,282	0,303	-0,040	0,424	-0,203	-0,623	0,339	1	

Tabelle 3. Anzahl und Verteilung der 414 OTUs auf die 6 Klonbibliotheken.

Anzahl der Klonbibliotheken	Vorkommen	Anzahl der OTUs	
6	AEG+HEG+SEG+AEW+HEW+SEW	2	2
5	AEG+HEG+SEG+AEW+HEW	14	15
	AEG+SEG+AEW+HEW+SEW	1	
4	AEG+HEG+SEG+AEW	2	24
	AEG+HEG+SEG+HEW	8	
	AEG+HEG+AEW+HEW	6	
	AEG+SEG+AEW+HEW	3	
	AEG+AEW+HEW+SEW	1	
	SEG+AEW+HEW+SEW	4	
	AEG+HEG+SEG	9	
3	AEG+HEG+AEW	6	72
	AEG+HEG+HEW	7	
	AEG+SEG+AEW	1	
	AEG+SEG+HEW	1	
	HEG+SEG+AEW	3	
	HEG+SEG+HEW	2	
	AEG+AEW+HEW	13	
	HEG+AEW+HEW	3	
	SEG+AEW+HEW	3	
	SEG+AEW+SEW	3	
	SEG+HEW+SEW	2	
	AEW+HEW+SEW	19	
	2	AEG+HEG	
AEG+SEG		6	
AEG+AEW		2	
AEG+HEW		5	
AEG+SEW		1	
HEG+SEG		12	
HEG+AEW		2	
HEG+HEW		3	
SEG+AEW		1	
SEG+HEW		7	
SEG+SEW		1	
AEW+HEW		12	
AEW+SEW		7	
HEW+SEW		10	
1		AEG	19
	HEG	23	
	SEG	109	
	AEW	21	
	HEW	16	
	SEW	29	

Tabelle 4. Ergebnisse der *in silico* T-RF-Analyse (*T-RF-cut-tool* in ARB) der 16S rRNA-Gen-Sequenzen der Klonbibliotheken AEG, HEG, SEG, AEW, HEW, SEW. T-RFs in fett dominierten in der entsprechenden Untergruppe. Zuordnungen zu *in vivo* T-RFs wurden ausgehend von *in silico* T-RFs ± 3 bp berechnet.

Untergruppe	<i>in silico</i> T-RFs	<i>in vivo</i> abundante T-RFs
Gp1	88 , 143, 144, 258 , 260	85, 256
Gp3	135, 141 , 143 , 145, 258	142
Gp4	88, 138 , 139, 276	139
Gp5	135 , 137	133
Gp6	166, 167, 191 , 193 , 194 , 195, 210, 285 , 287	189, 191, 283, 286
Gp11	462, 464	461
Gp13	90, 166	87, 163
Gp15	74	71
Gp17	133 , 135, 137, 191, 193	130
Gp18	200, 276	202, 275

Tabelle 5. Multiple lineare Regressionsanalyse des Shannon-Diversitätsindices (berechnet ausgehend von 16S rRNA-T-RFLP-Profilen 2009) und den erklärenden Variablen Exploratorium, Grünland oder Wald, Bodentyp, Jahreszeit, pH-Wert, Landnutzungstyp, Landnutzungsintensität und Düngung basierend auf einer Modellauswahl mit Hilfe des AIC. Signifikante Effekte, die einen *post-hoc*-Test mit Bonferroni-Korrektur bestanden haben, sind fett dargestellt.

Effekt	alle N= 56				Grünland N=26				Wald N=30			
	df	MS	F	p	df	MS	F	p	df	MS	F	p
Exploratorium	2	0,67	13,8	< 0,001	2	0,11	3,15	< 0,05	2	3,09	57,7	< 0,001
Bodentyp	7	0,27	5,54	< 0,001								
Jahreszeit	3	1,13	23,2	< 0,001	3	0,65	18,6	< 0,001	3	0,51	9,51	< 0,001
pH	1	6,96	143,8	< 0,001								
Landnutzungstyp									3	0,14	2,65	n. s.
R ²			0,581 ***				0,405 ***				0,580 ***	

df: Freiheitsgrade, MS: *mean of squares*, n. s.: nicht signifikant

Tabelle 6. Multiple lineare Regressionsanalyse des Shannon-Diversitätsindices (berechnet ausgehend von 16S rRNA-T-RFLP-Profilen 2009) und den erklärenden Variablen Exploratorium, Grünland oder Wald, Bodentyp, Jahreszeit, pH-Wert, Landnutzungstyp, Landnutzungsintensität und Düngung inklusive möglicher Interaktionen basierend auf einer Modellauswahl mit Hilfe des AIC. Signifikante Effekte, die einen *post-hoc*-Test mit Bonferroni-Korrektur bestanden haben, sind fett dargestellt.

Effekt	alle N=56				Grünland N=26				Wald N=30				
	df	MS	F	p	df	MS	F	p	df	MS	F	p	
Exploratorium	2	0,67	14,9	< 0,001	2	0,11	3,15	< 0,05	2	3,09	70,1	< 0,001	
Jahreszeit	3	1,13	25,2	< 0,001	3	0,65	18,6	< 0,001	3	0,51	11,5	< 0,001	
pH	1	6,96	155,9	< 0,001									
Landnutzungstyp									3	0,14	3,21	< 0,05	
pH X Exploratorium	2	0,94	21,1	< 0,001									
Jahreszeit X Exploratorium	6	0,13	2,98	< 0,01					6	0,22	4,93	< 0,001	
R ²		0,615 ***				0,405 ***				0,673 ***			

df: Freiheitsgrade, MS: *mean of squares*, , n. s.: nicht signifikant

Tabelle 7. Multiple lineare Regressionsanalyse der relativen Abundanz ausgewählter T-RFs (16S rRNA-T-RFLP-Profile 2009) und Exploratorium, Grünland oder Wald, Bodentyp, Jahreszeit, pH-Wert, Landnutzungstyp, Landnutzungsintensität (LUI) und Düngung basierend auf einer Modellauswahl mit Hilfe des AIC. Signifikante Effekte, die einen *post-hoc*-Test mit Bonferroni-Korrektur bestanden haben, sind fett dargestellt.

Effekt	alle N=56				Grünland N=26				Wald N=30			
	df	MS	F	p	df	MS	F	p	df	MS	F	p
T-RF 85												
Exploratorium									2	2,06	2,51	n. s.
Grünland/Wald	1	45,9	12,5	< 0,001								
Bodentyp	7	112,1	30,5	< 0,001	5	126,8	20,4	< 0,001				
Jahreszeit	3	29,3	8,0	< 0,001	3	50,8	8,15	< 0,001	3	2,15	2,62	n. s.
pH	1	9,20	2,50	n. s.					1	2,62	3,20	n. s.
Landnutzung									3	5,03	6,15	< 0,001
LUI					1	13,33	2,14	n. s.	1	4,43	5,42	< 0,05
R ²			0,554 ***				0,596 ***				0,270 ***	
T-RF 131												
Exploratorium	2	610,9	88,54	< 0,001					2	1006	215,9	< 0,001
Grünland/Wald	1	158,3	22,94	< 0,001								
Bodentyp	7	256,0	37,10	< 0,001	5	114,4	16,05	< 0,001				
Jahreszeit	3	30,81	4,47	< 0,01	3	19,83	2,78	< 0,05	3	16,42	3,52	< 0,05
pH	1	48,98	7,10	< 0,01					1	314,7	67,53	< 0,001
Landnutzung					2	24,81	3,48	< 0,05				
LUI					1	31,67	4,44	< 0,05	1	28,89	6,20	< 0,05
Düngung					1	37,99	5,33	< 0,05				
R ²			0,705 ***				0,556 ***				0,823 ***	
T-RF 188												
Exploratorium	2	3,18	2,69	n. s.	2	16,52	23,3	< 0,001				
Bodentyp	7	5,42	4,57	< 0,001					4	6,22	4,99	< 0,001
Jahreszeit					3	5,80	8,18	< 0,001	3	5,06	4,06	< 0,01
pH	1	100,05	84,43	< 0,001	1	14,20	20,0	< 0,001	1	2,61	2,09	n. s.
LUI					1	4,45	6,27	< 0,05				
R ²			0,373 ***				0,522 ***				0,237 ***	
T-RF 191												
Exploratorium	2	90,1	4,16	< 0,05					2	80,0	3,54	< 0,05
Grünland/Wald	1	186,9	8,62	< 0,01								
Bodentyp	7	281,3	13,0	< 0,001	5	330,3	19,7	< 0,001				
Jahreszeit	3	369,0	17,0	< 0,001	3	349,7	20,9	< 0,001	3	82,1	3,63	< 0,05
pH	1	11394	525,4	< 0,001	1	3,63	0,22	n. s.	1	3309,2	146,3	< 0,001
Düngung					1	36,8	2,20	n. s.				
R ²			0,773 ***				0,656 ***				0,595 ***	
T-RF 256												
Exploratorium	2	949,9	19,65	< 0,001					2	792,5	10,92	< 0,001
Grünland/Wald	1	107,2	2,22	n. s.								
Bodentyp	7	132,7	2,75	< 0,01	5	12,03	5,07	< 0,001				
Jahreszeit	3	144,9	3,00	< 0,05	3	20,00	8,43	< 0,001				
pH	1	30557	632,1	< 0,001	1	360,9	152,1	< 0,001	1	11899	164,0	< 0,001
Landnutzung									3	617,8	8,52	< 0,001
LUI									1	180,6	2,49	n. s.
R ²			0,777 ***				0,700 ***				0,658 ***	
T-RF 273												
Exploratorium	2	25,38	34,75	< 0,001					2	3,55	6,52	< 0,01
Grünland/Wald	1	5,43	7,44	< 0,01								
Bodentyp					5	3,37	4,92	< 0,001				
Jahreszeit	3	11,13	15,24	< 0,001	3	6,32	9,25	< 0,001	3	7,24	13,32	< 0,001
pH	1	9,36	12,82	< 0,001	1	1,34	1,96	n. s.	1	55,11	101,3	< 0,001
Landnutzung					2	3,43	5,01	< 0,01	3	1,21	2,23	n. s.
R ²			0,394 ***				0,431 ***				0,596 ***	
T-RF 281												
Exploratorium	2	105,8	12,8	< 0,001	2	167,9	25,0	< 0,001	2	70,9	9,65	< 0,001
Grünland/Wald	1	316,6	38,4	< 0,001								
Bodentyp	7	33,8	4,10	< 0,001								
Jahreszeit	3	19,1	2,31	n. s.	3	54,2	8,07	< 0,001				
pH	1	3476,8	421,5	< 0,001	1	48,6	7,23	< 0,01	1	2178,3	296,6	< 0,001
Landnutzung					2	21,4	3,19	< 0,05	3	28,3	3,85	< 0,05
LUI									1	65,7	8,95	< 0,01
R ²			0,722 ***				0,500 ***				0,752 ***	

T-RF 283												
Exploratorium	1	32,13	13,84	< 0,001	2	41,51	17,66	< 0,001	2	2,64	2,69	n. s.
Jahreszeit	3	51,14	22,03	< 0,001	3	75,41	32,09	< 0,001	3	5,57	5,67	< 0,01
pH	1	445,3	191,8	< 0,001	1	52,82	22,48	< 0,001	1	136,9	139,5	< 0,001
Landnutzung					2	15,89	6,76	< 0,01				
LUI									1	15,94	16,24	< 0,001
R ²		0,577 ***				0,656 ***				0,616 ***		
T-RF 461												
Exploratorium	2	40,39	42,93	< 0,001	2	25,59	20,87	< 0,001	2	4,46	10,07	< 0,001
Grünland/Wald	1	2,14	2,27	n. s.								
Jahreszeit	3	11,45	12,17	< 0,001	3	13,07	10,66	< 0,001	3	1,83	4,12	< 0,01
pH	1	31,83	33,84	< 0,001	1	6,10	4,98	< 0,05	1	35,63	80,42	< 0,001
Landnutzung									3	1,28	2,89	< 0,05
R ²		0,433 ***				0,467 ***				0,527 ***		

df: Freiheitsgrade, MS: *mean of squares*, n.s.: nicht signifikant

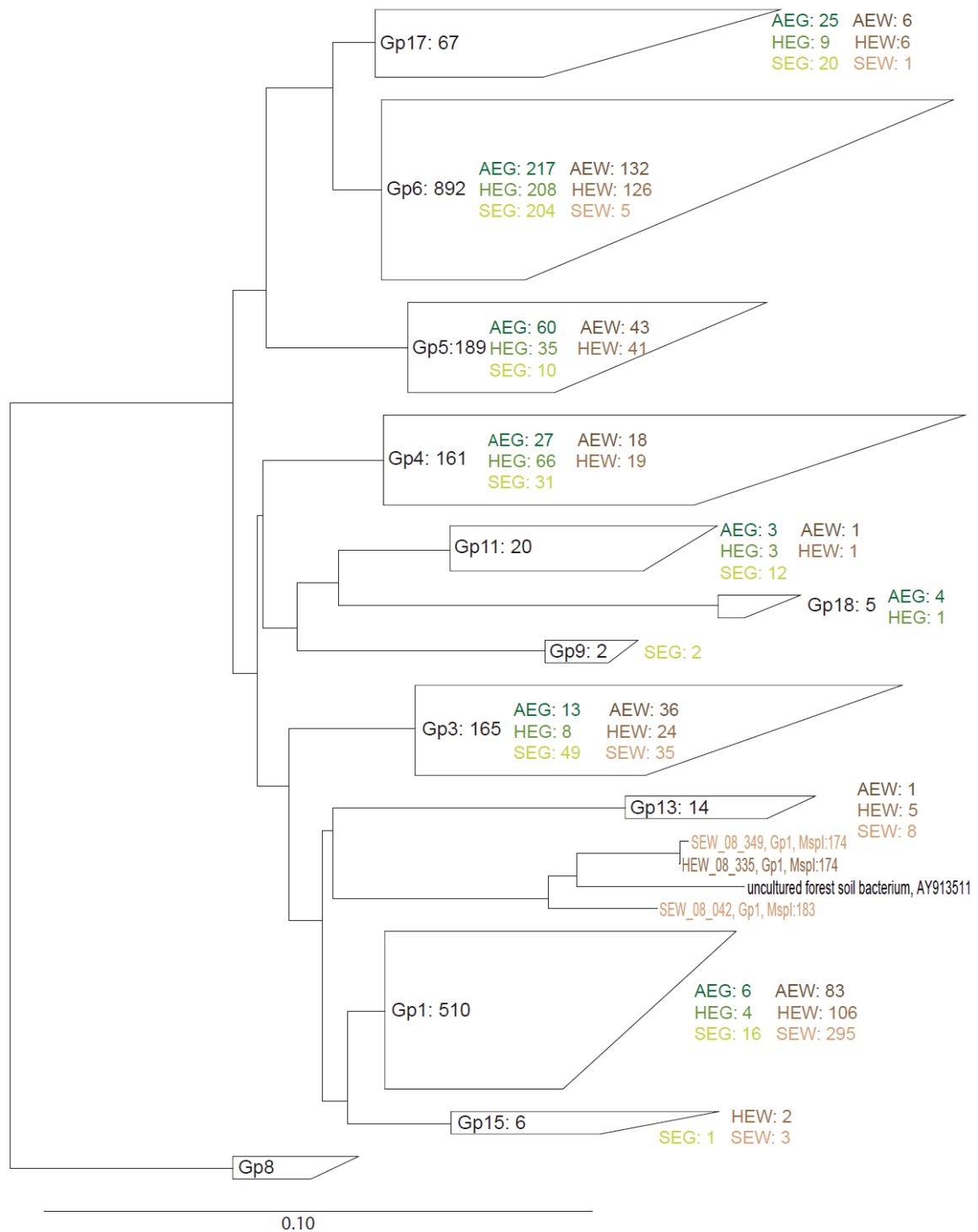


Abbildung 1. Übersichtsbaum (Neighbour-Joining) der 16S rRNA-Gen-Sequenzen der verschiedenen detektierten Untergruppen der *Acidobacteria* der Klonbibliotheken der Grünland-(G) und Waldböden (W) aller drei Untersuchungsregionen (ALB – A, HAI – H, SCH – S). Die Anzahl der Klone innerhalb der Untergruppen und für die jeweiligen Klonbibliotheken sind angezeigt. T-RF-Längen (bp) wurden mittels *in silico*-Verdau der 16S rRNA-Sequenzen mit dem Restriktionsenzym *MspI* bestimmt. Der Maßstab stellt 10% Sequenzunterschied dar, GenBank ‚accession numbers‘ der Referenzsequenzen sind angegeben.

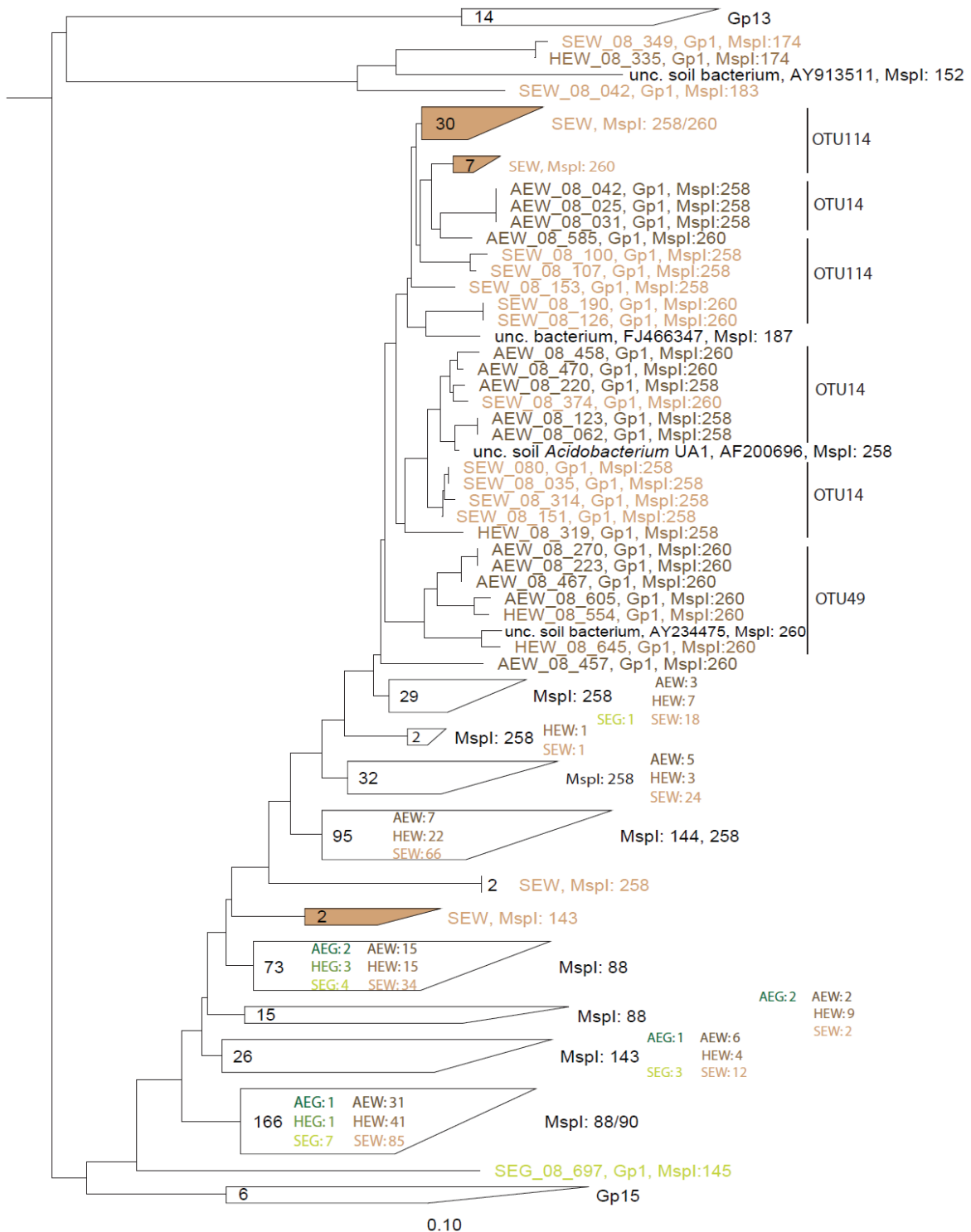


Abbildung 2. Neighbour-Joining-Baum der 16S rRNA-Gen-Sequenzen der Untergruppe Gp1 der *Acidobacteria* in den sechs Klonbibliotheken der Grünland-(G) und Waldböden (W) aller drei Untersuchungsregionen (ALB – A, HAI – H, SCH – S). T-RF-Längen (bp) wurden mittels *in silico*-Verdau der 16S rRNA-Sequenzen mit dem Restriktionsenzym *MspI* bestimmt. OTUs mit > 5 Sequenzen sind angegeben. Der Maßstab stellt 10% Sequenzunterschied dar, GenBank ‚accession numbers‘ der Referenzsequenzen sind angegeben.

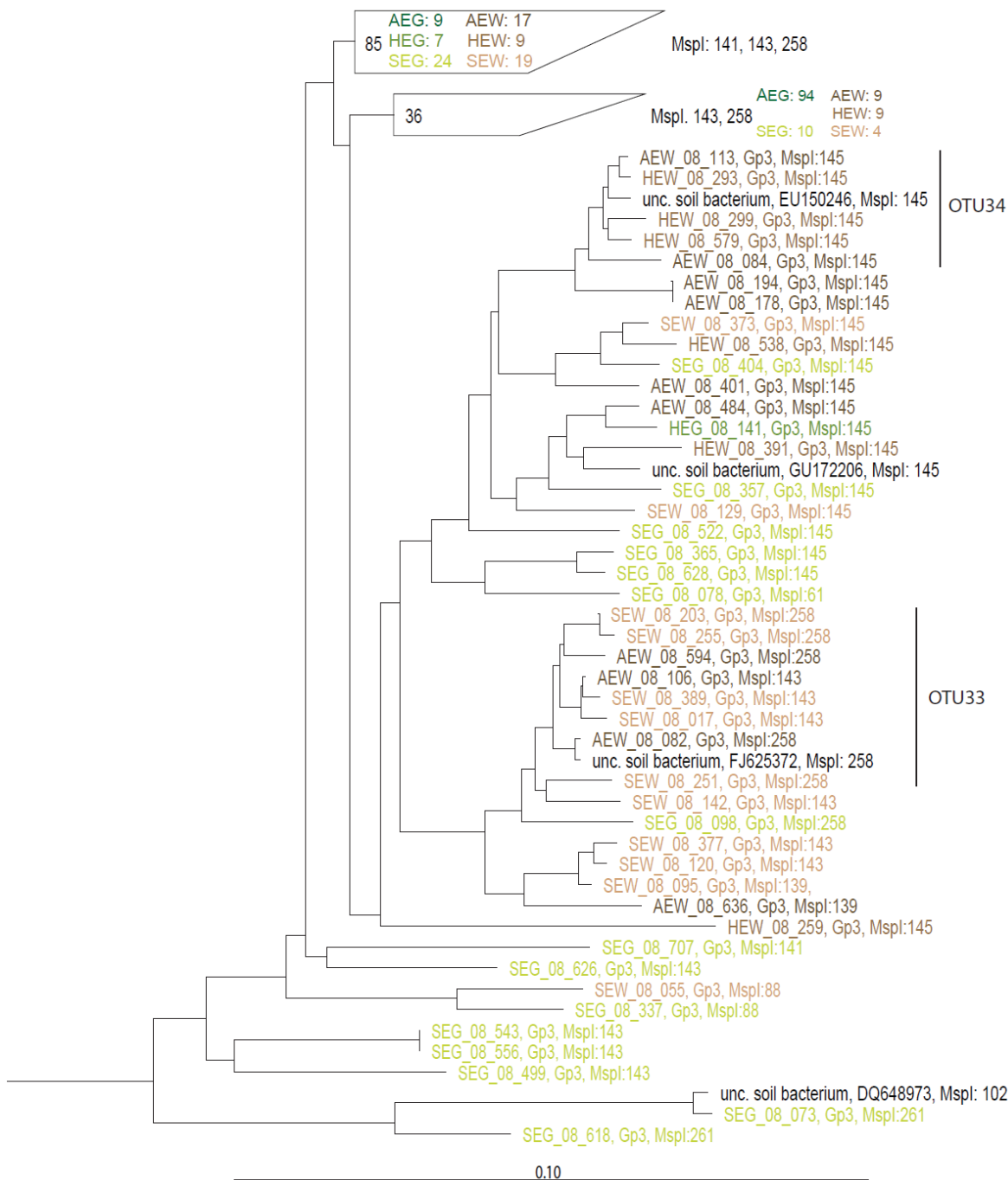


Abbildung 3. Neighbour-Joining-Baum der 16S rRNA-Gen-Sequenzen der Untergruppe Gp3 der *Acidobacteria* in den sechs Klonbibliotheken der Grünland-(G) und Waldböden (W) aller drei Untersuchungsregionen (ALB – A, HAI – H, SCH – S). T-RF-Längen (bp) wurden mittels *in silico*-Verdau der 16S rRNA-Sequenzen mit dem Restriktionsenzym *MspI* bestimmt. OTUs mit > 5 Sequenzen sind angegeben. Der Maßstab stellt 10% Sequenzunterschied dar, GenBank ‚accession numbers‘ der Referenzsequenzen sind angegeben.

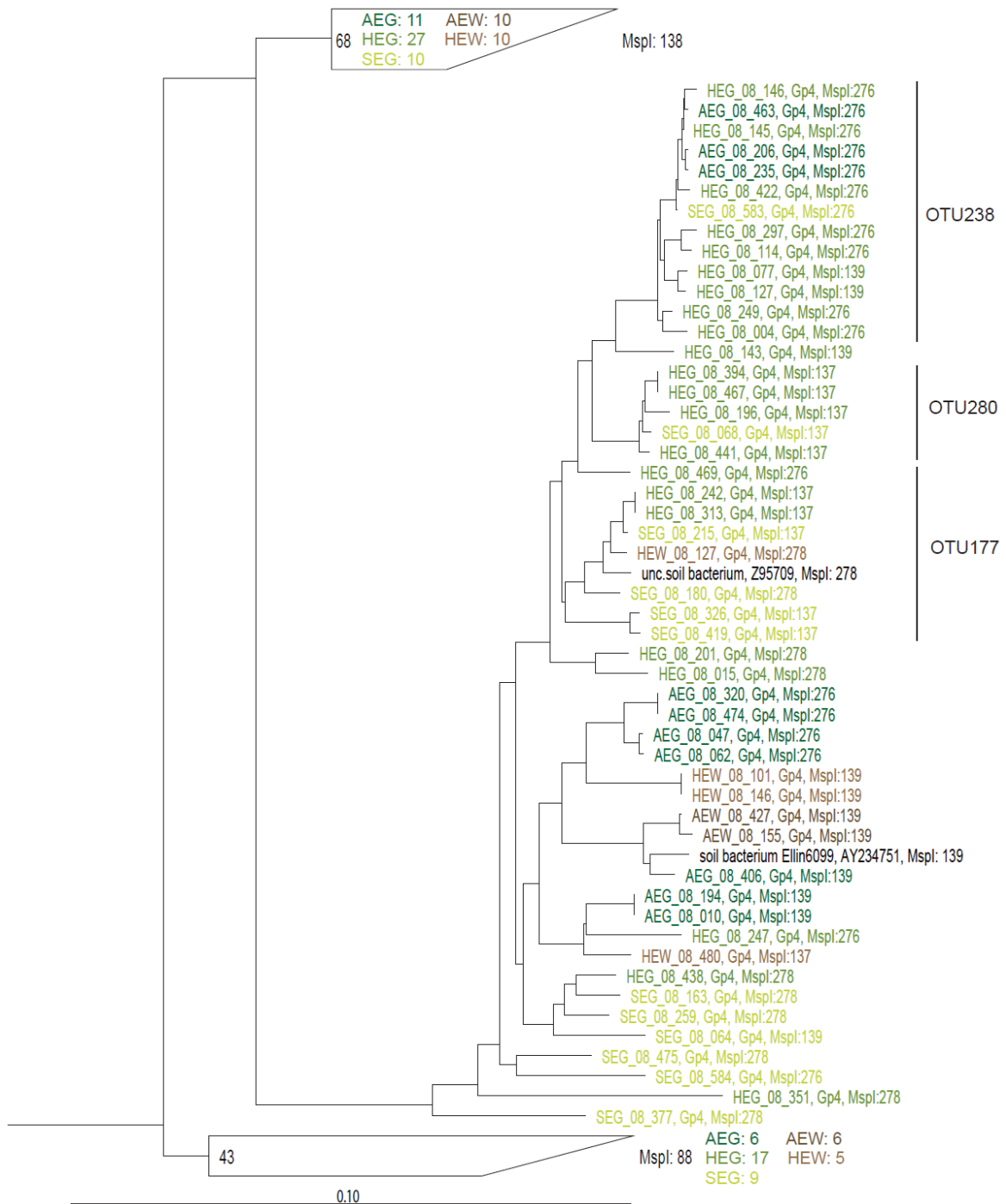


Abbildung 4. Neighbour-Joining-Baum der 16S rRNA-Gen-Sequenzen der Untergruppe Gp4 der *Acidobacteria* in den sechs Klonbibliotheken der Grünland-(G) und Waldböden (W) aller drei Untersuchungsregionen (ALB – A, HAI – H, SCH – S). T-RF-Längen (bp) wurden mittels *in silico*-Verdau der 16S rRNA-Sequenzen mit dem Restriktionsenzym *MspI* bestimmt. OTUs mit > 5 Sequenzen sind angegeben. Der Maßstab stellt 10% Sequenzunterschied dar, GenBank ‚accession numbers‘ der Referenzsequenzen sind angegeben.

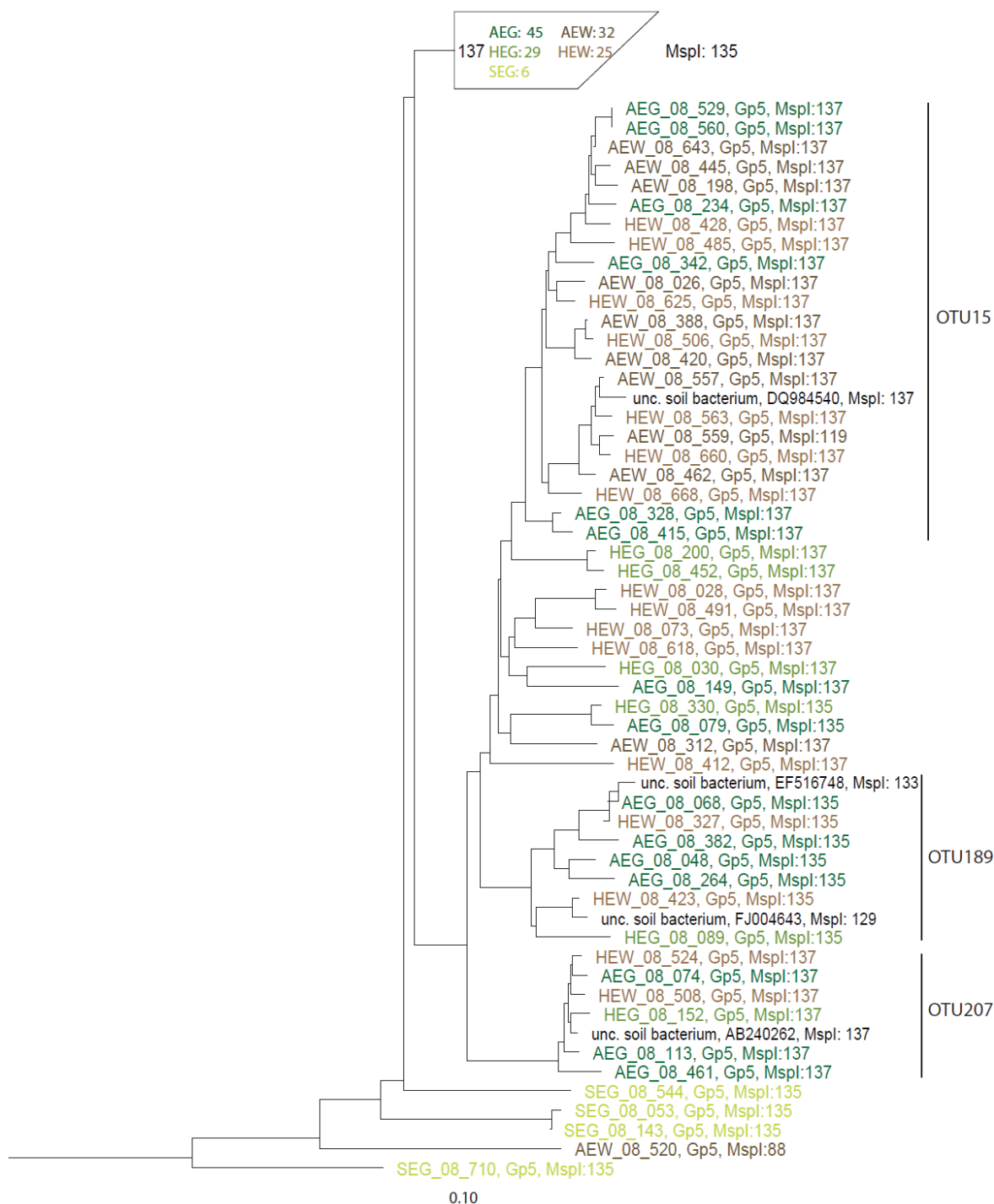


Abbildung 5. Neighbour-Joining-Baum der 16S rRNA-Gen-Sequenzen der Untergruppe Gp5 der *Acidobacteria* in den sechs Klonbibliotheken der Grünland-(G) und Waldböden (W) aller drei Untersuchungsregionen (ALB – A, HAI – H, SCH – S). T-RF-Längen (bp) wurden mittels *in silico*-Verdau der 16S rRNA-Sequenzen mit dem Restriktionsenzym *MspI* bestimmt. OTUs mit > 5 Sequenzen sind angegeben. Der Maßstab stellt 10% Sequenzunterschied dar, GenBank ‚accession numbers‘ der Referenzsequenzen sind angegeben.

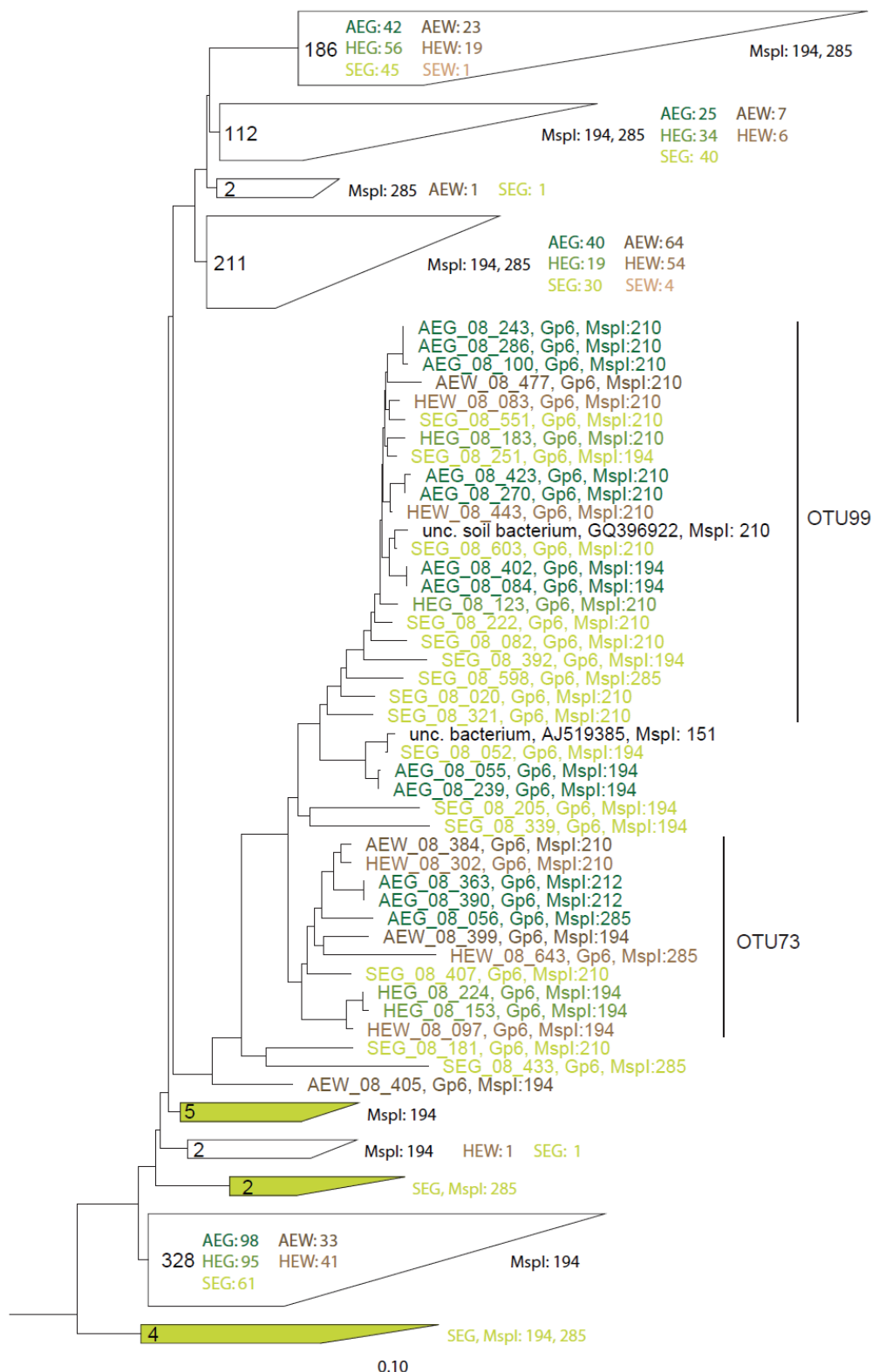


Abbildung 6. Neighbour-Joining-Baum der 16S rRNA-Gen-Sequenzen der Untergruppe Gp6 der *Acidobacteria* in den sechs Klonbibliotheken der Grünland-(G) und Waldböden (W) aller drei Untersuchungsregionen (ALB – A, HAI – H, SCH – S). T-RF-Längen (bp) wurden mittels *in silico*-Verdau der 16S rRNA-Sequenzen mit dem Restriktionsenzym *MspI* bestimmt. OTUs mit > 5 Sequenzen sind angegeben. Der Maßstab stellt 10% Sequenzunterschied dar, GenBank ‚accession numbers‘ der Referenzsequenzen sind angegeben.

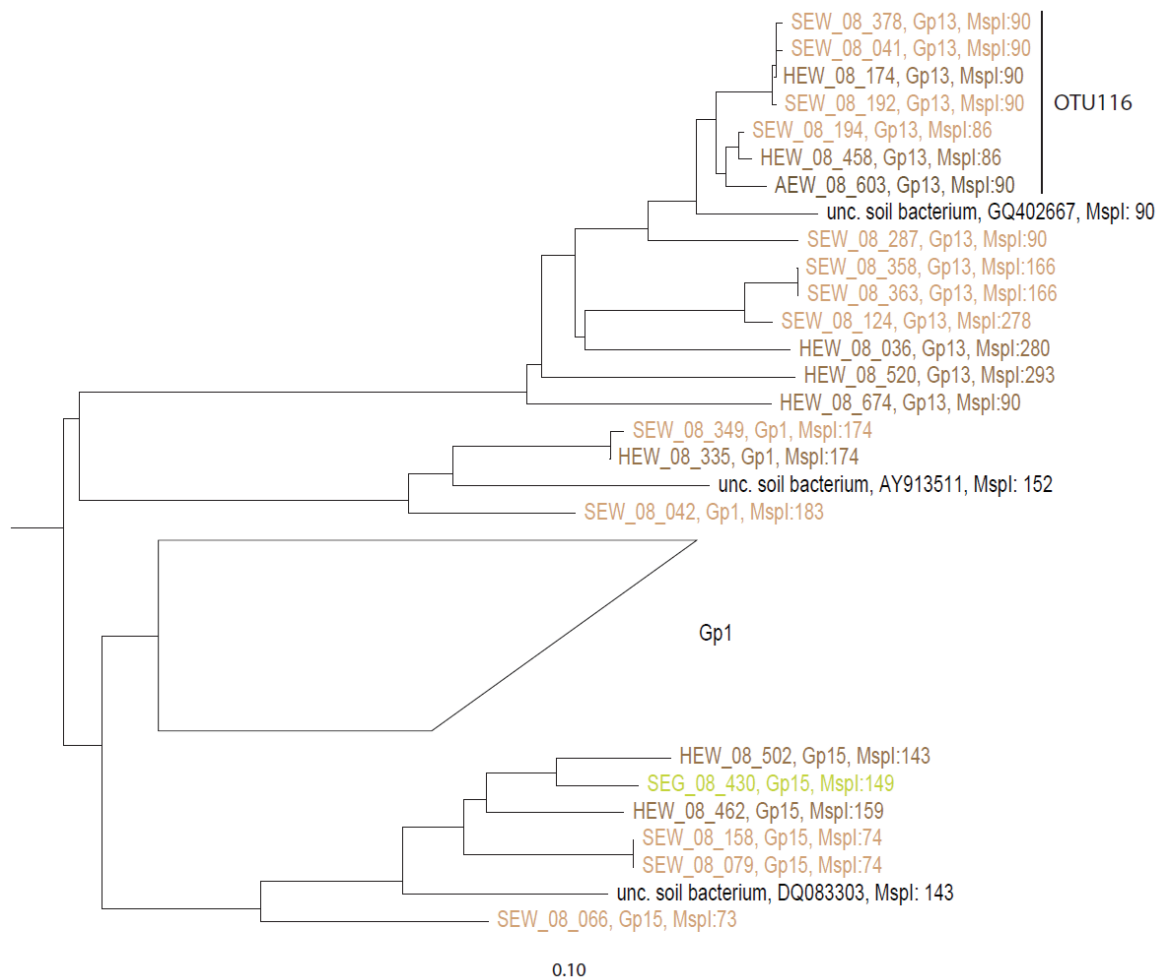


Abbildung 7. Neighbour-Joining-Baum der 16S rRNA-Gen-Sequenzen der Untergruppen Gp13 und Gp15 der *Acidobacteria* in den sechs Klonbibliotheken der Grünland-(G) und Waldböden (W) aller drei Untersuchungsregionen (ALB – A, HAI – H, SCH – S). T-RF-Längen (bp) wurden mittels *in silico*-Verdau der 16S rRNA-Sequenzen mit dem Restriktionsenzym *MspI* bestimmt. OTUs mit > 5 Sequenzen sind angegeben. Der Maßstab stellt 10% Sequenzunterschied dar, GenBank ‚*accession numbers*‘ der Referenzsequenzen sind angegeben.

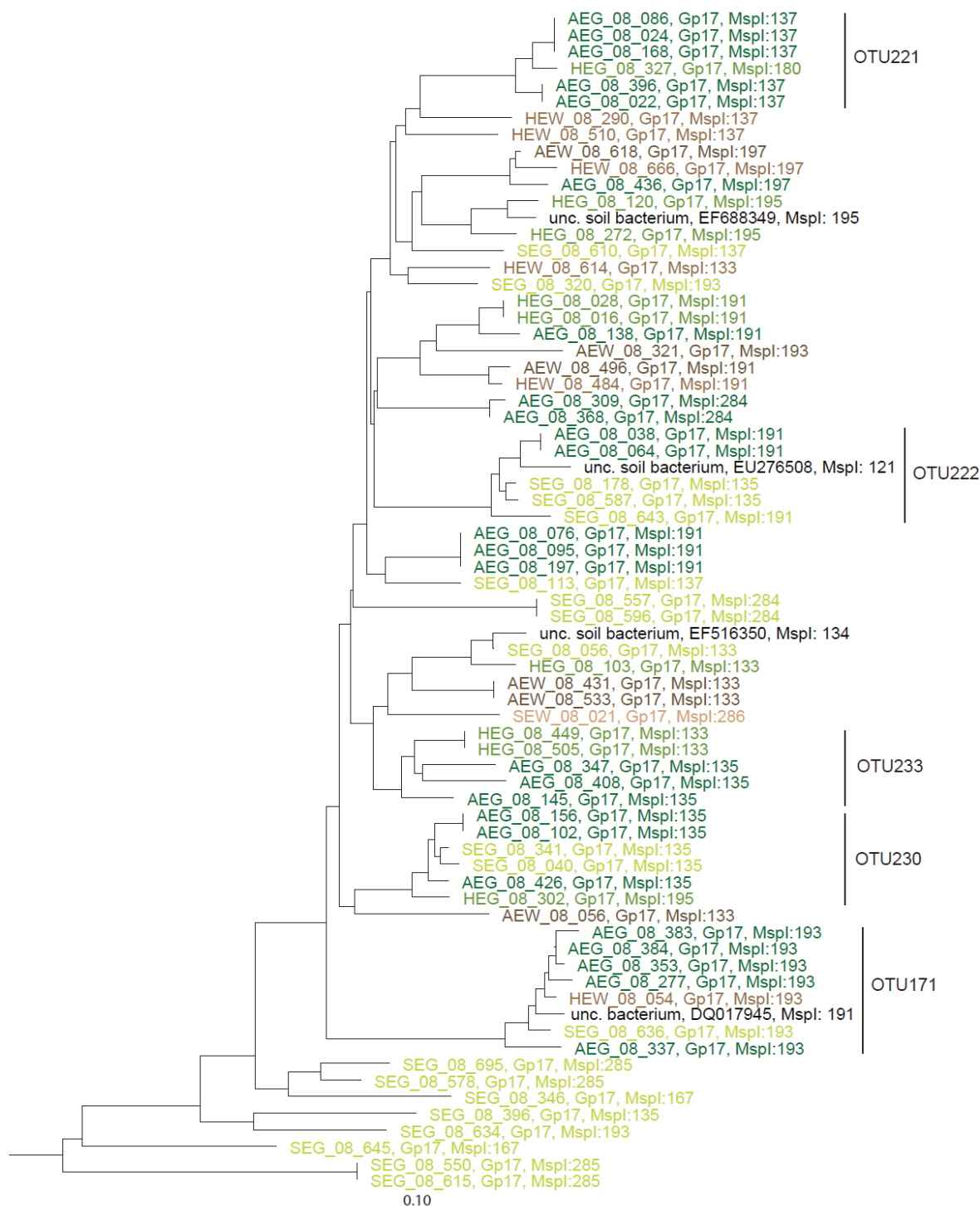


Abbildung 8. Neighbour-Joining-Baum der 16S rRNA-Gen-Sequenzen der Untergruppe Gp17 der *Acidobacteria* in den sechs Klonbibliotheken der Grünland-(G) und Waldböden (W) aller drei Untersuchungsregionen (ALB – A, HAI – H, SCH – S). T-RF-Längen (bp) wurden mittels *in silico*-Verdau der 16S rRNA-Sequenzen mit dem Restriktionsenzym *MspI* bestimmt. OTUs mit > 5 Sequenzen sind angegeben. Der Maßstab stellt 10% Sequenzunterschied dar, GenBank ‚accession numbers‘ der Referenzsequenzen sind angegeben.

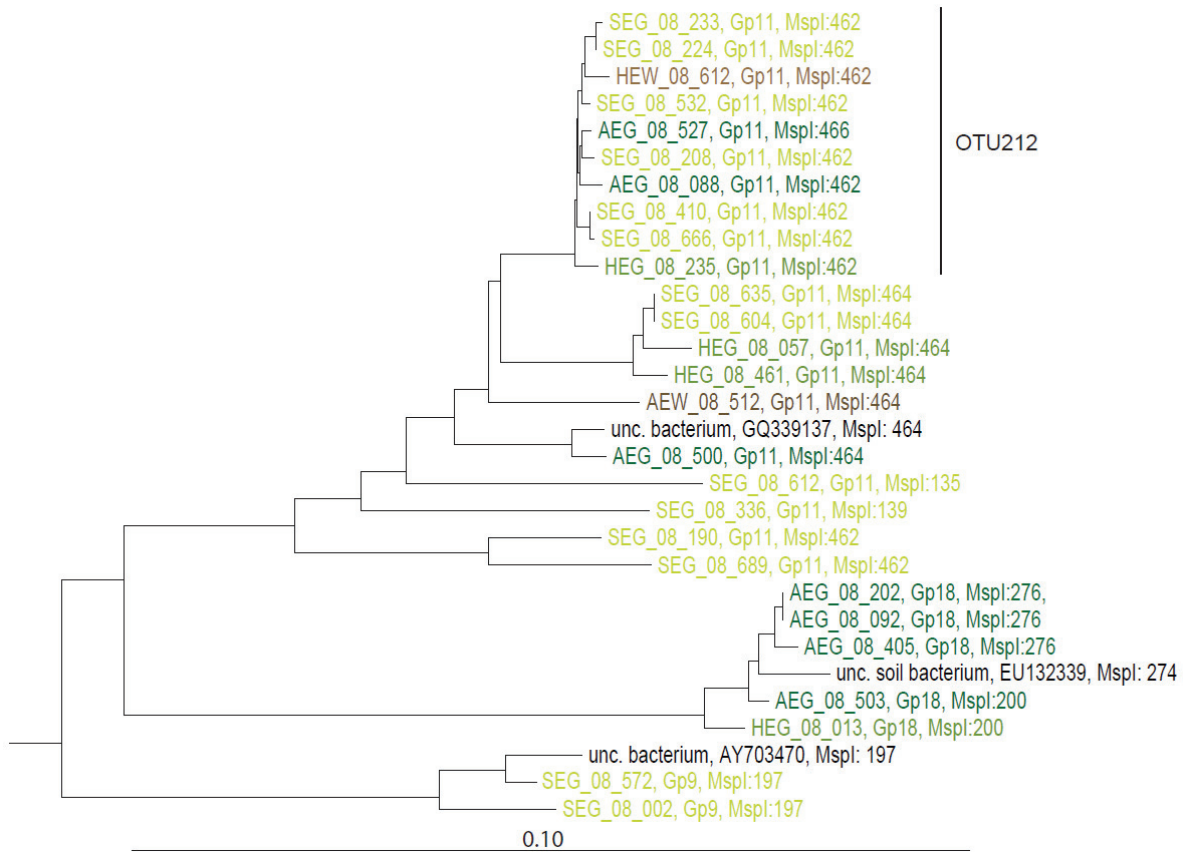
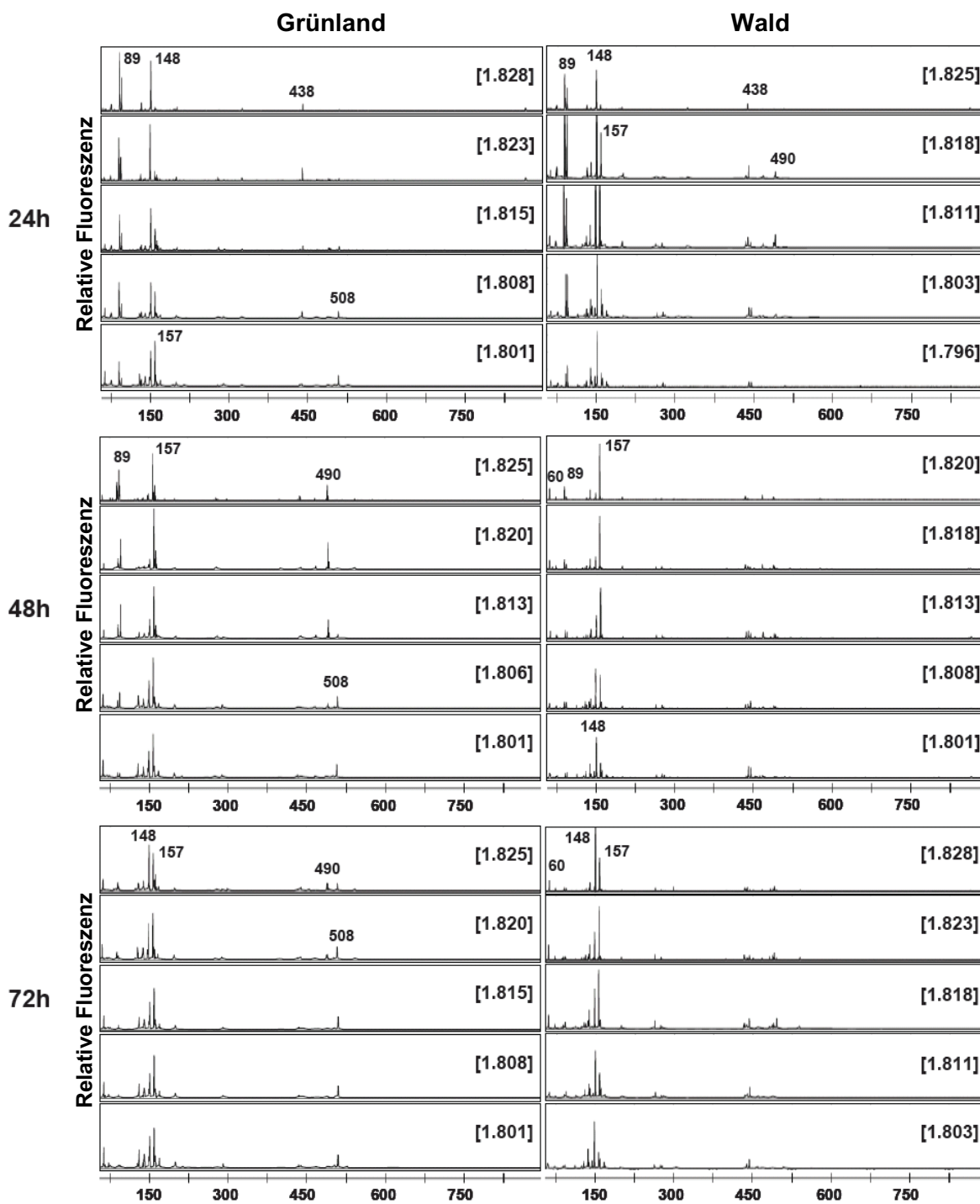


Abbildung 9. Neighbour-Joining-Baum der 16S rRNA-Gen-Sequenzen der Untergruppen Gp9, Gp11 und Gp18 der *Acidobacteria* in den sechs Klonbibliotheken der Grünland-(G) und Waldböden (W) aller drei Untersuchungsregionen (ALB – A, HAI – H, SCH – S). T-RF-Längen (bp) wurden mittels *in silico*-Verdau der 16S rRNA-Sequenzen mit dem Restriktionsenzym *MspI* bestimmt. OTUs mit > 5 Sequenzen sind angegeben. Der Maßstab stellt 10% Sequenzunterschied dar, GenBank ‚accession numbers‘ der Referenzsequenzen sind angegeben.



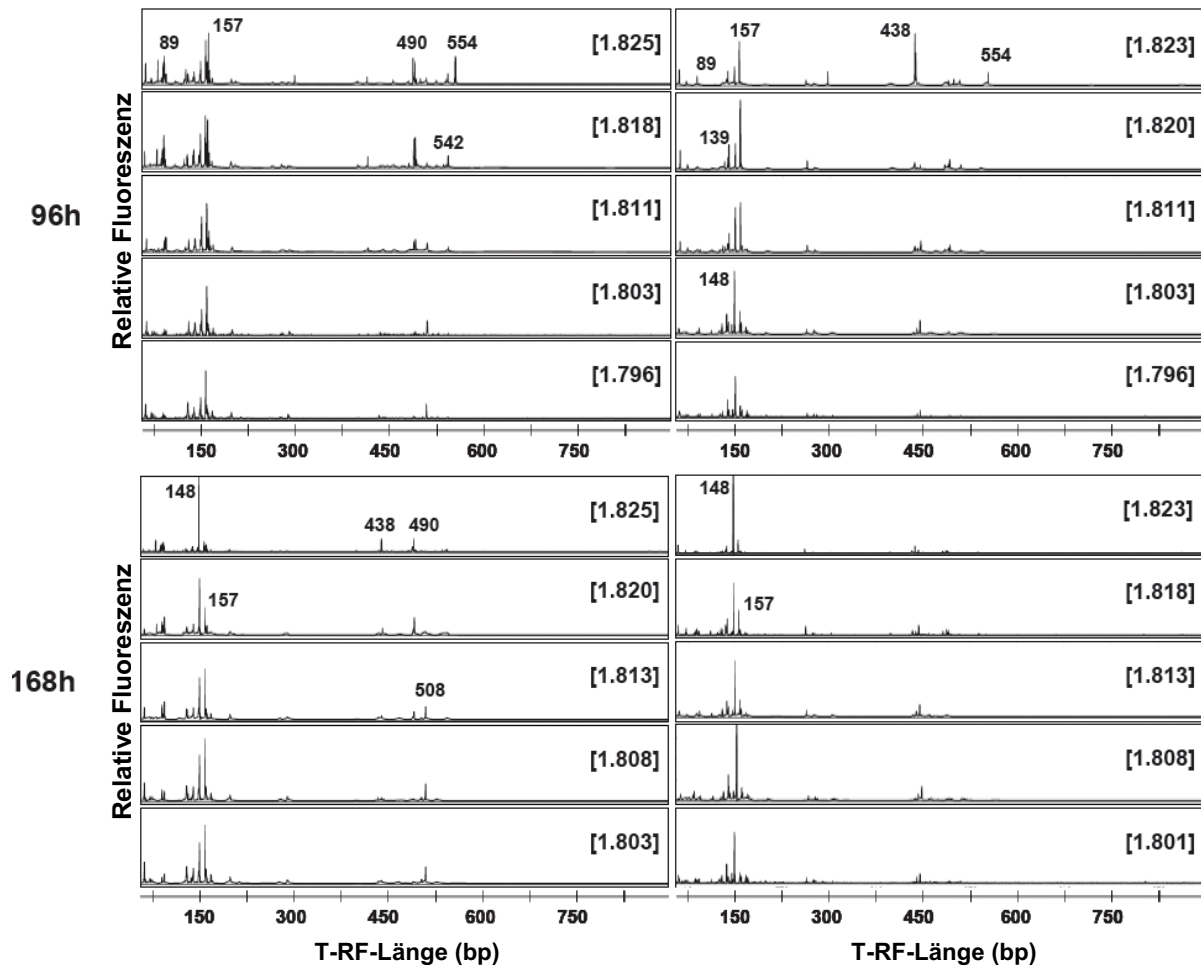


Abbildung 10. Terminale Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus-(T-RFLP)-Analysen der nach Dichte aufgetrennten bakteriellen 16S rRNA von ausgewählten ‚leichten‘ und ‚schweren‘ Cäsiumtrifluoracetat-(CsTFA)-Gradientenfractionen der mit ¹³C-markierten Weizenblättern für 24, 48, 72, 96 und 168 Stunden inkubierten Grünland- und Waldbodenmikrokosmen. Die Länge der wichtigsten T-RFs (bp) und die Dichte (g ml⁻¹) der einzelnen Fractionen ist angegeben.

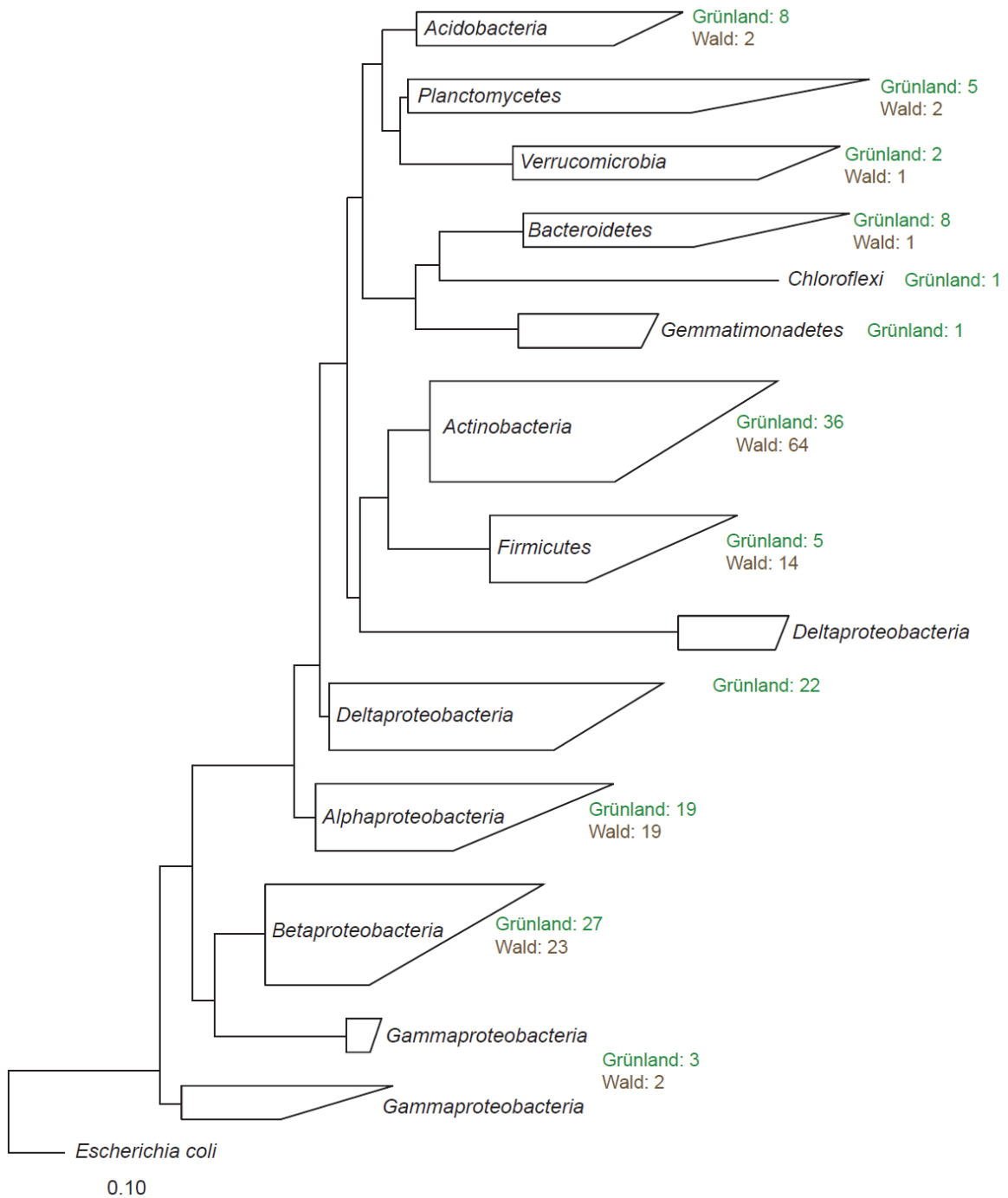


Abbildung 11. Neighbour-Joining-Baum der 16S rRNA-Sequenzen der 'schweren' Fraktion (BD 1,82 g ml⁻¹) der Grünland- (13C-HEG) und Waldboden-Inkubationen (13C-HEW) nach 72 Stunden. Der Maßstab stellt 10% Sequenzunterschied dar.

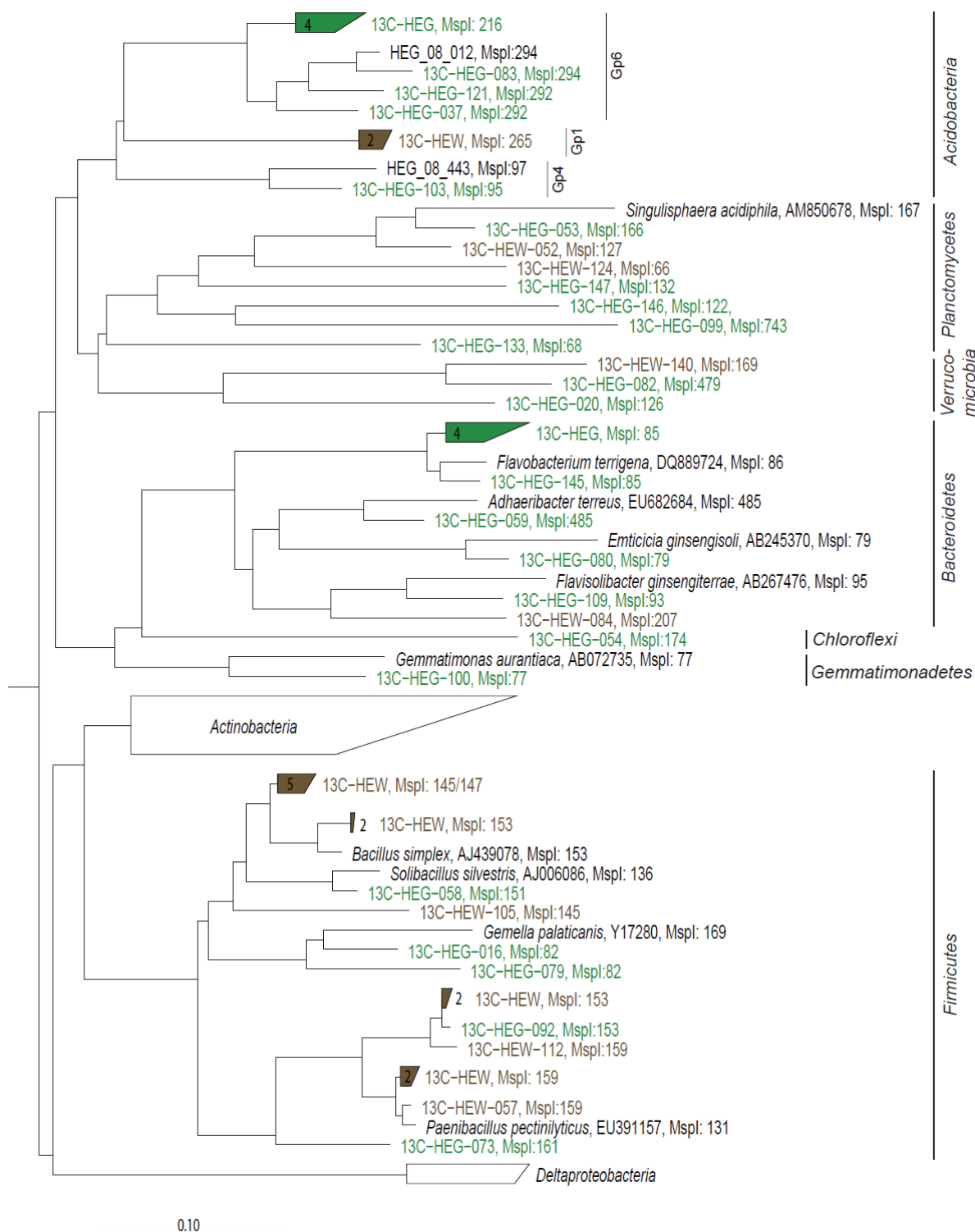


Abbildung 12. Neighbour-Joining-Baum der 16S rRNA-Sequenzen der *Acidobacteria*, *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Gemmatimonadetes* und *Firmicutes* der 'schweren' Fraktion (BD 1,82 g ml⁻¹) von Grünland- (13C-HEG) und Waldboden-Inkubationen (13C-HEW) nach 72 Stunden. T-RF-Längen (bp) wurden mittels *in silico*-Verdau der 16S rRNA-Sequenzen mit dem Restriktionsenzym *MspI* bestimmt. Der Maßstab stellt 10% Sequenzunterschied dar. GenBank 'accession numbers' der Referenzsequenzen sind angegeben.

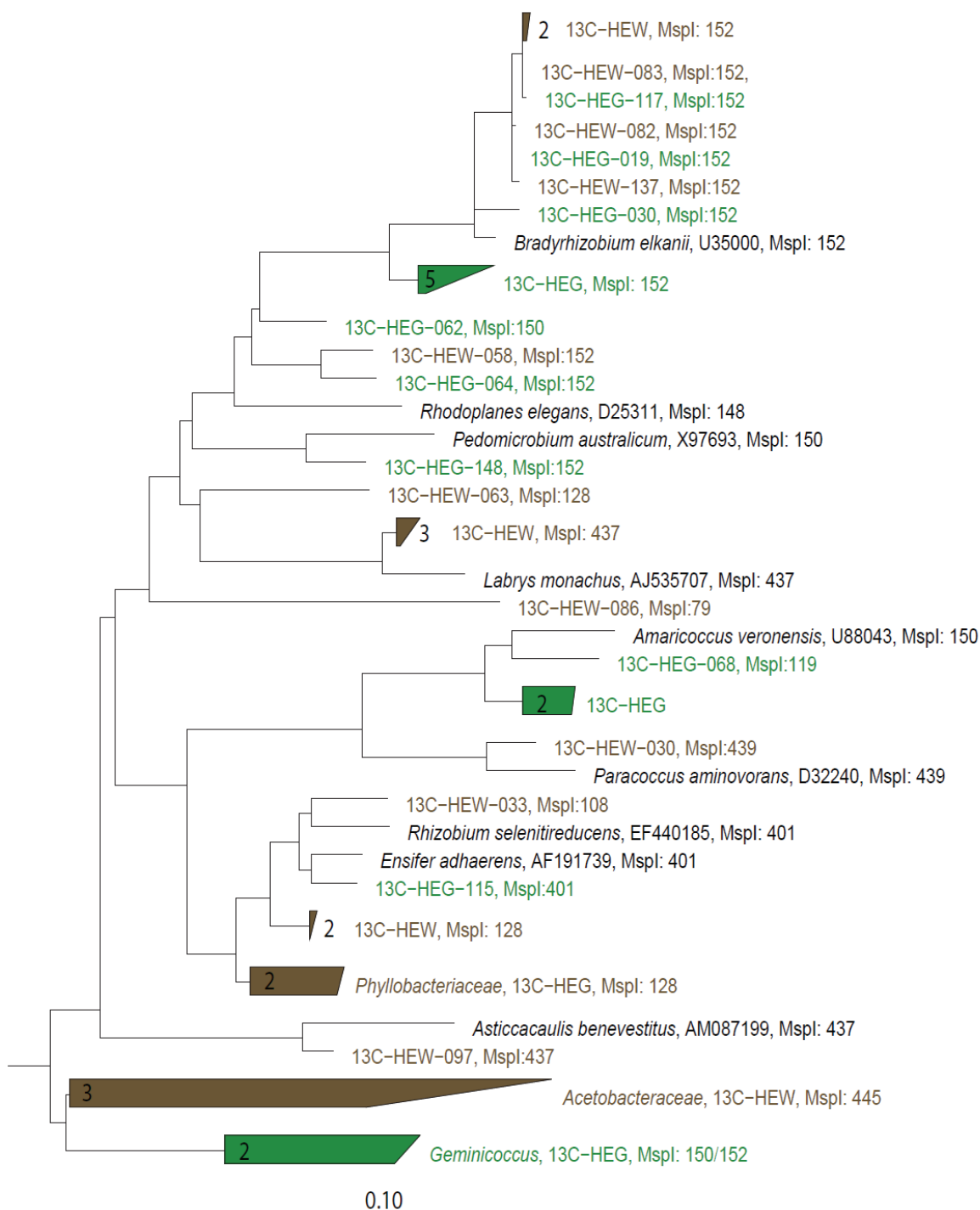


Abbildung 13. Neighbour-Joining-Baum der 16S rRNA-Sequenzen der α -Proteobacteria der 'schweren' Fraktion ($BD\ 1,82\ g\ ml^{-1}$) der Grünland- (13C-HEG) und Waldboden-Inkubationen (13C-HEW) nach 72 Stunden. T-RF-Längen (bp) wurden mittels *in silico*-Verdau der 16S rRNA-Sequenzen mit dem Restriktionsenzym *MspI* bestimmt. Der Maßstab stellt 10% Sequenzunterschied dar. GenBank 'accession numbers' der Referenzsequenzen sind angegeben.

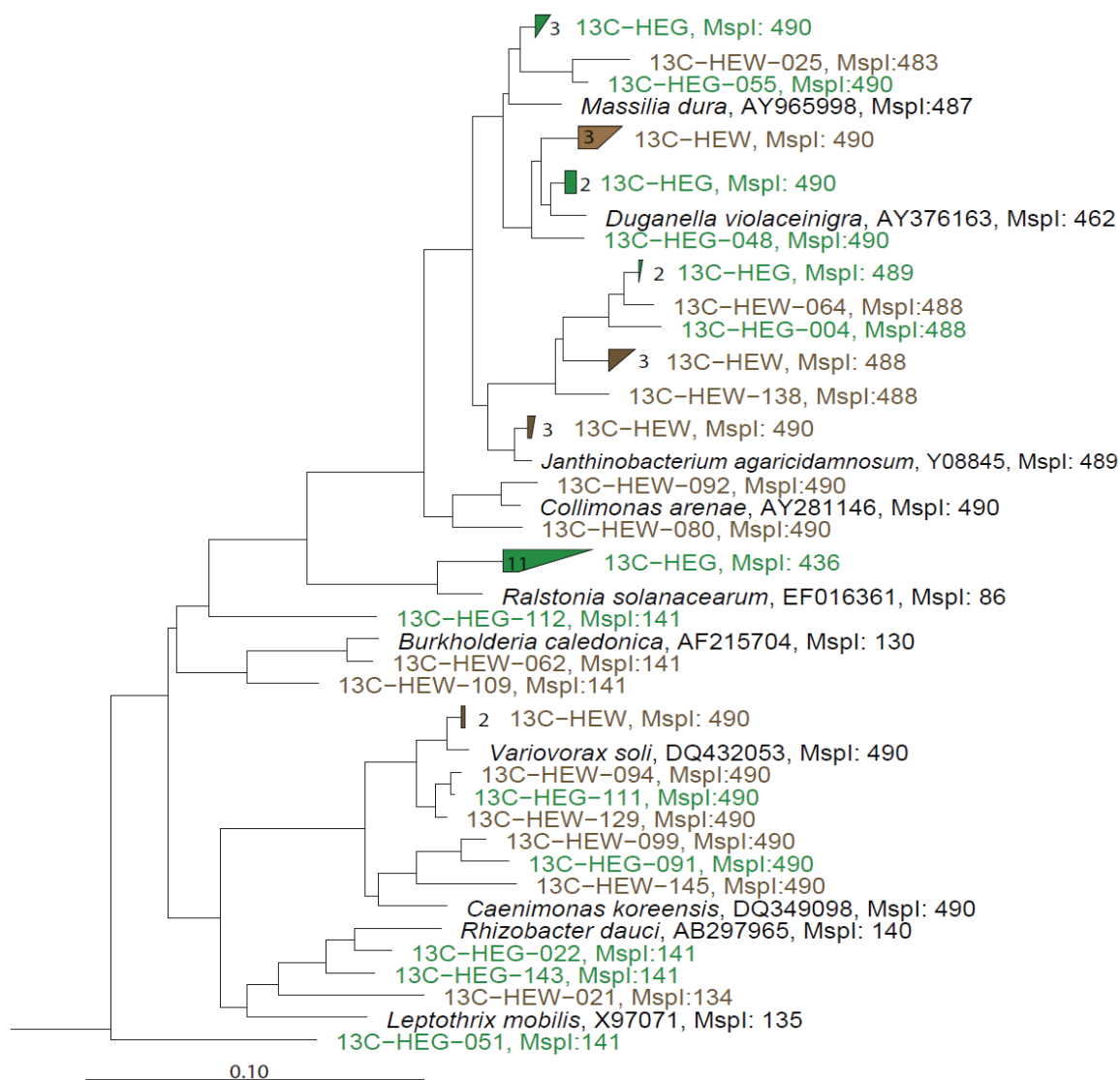


Abbildung 14. Neighbour-Joining-Baum der 16S rRNA-Sequenzen der β -Proteobacteria der 'schweren' Fraktion (BD $1,82 \text{ g ml}^{-1}$) der Grünland- (13C-HEG) und Waldboden-Inkubationen (13C-HEW) nach 72 Stunden. T-RF-Längen (bp) wurden mittels *in silico*-Verdau der 16S rRNA-Sequenzen mit dem Restriktionsenzym *MspI* bestimmt. Der Maßstab stellt 10% Sequenzunterschied dar. GenBank 'accession numbers' der Referenzsequenzen sind angegeben.

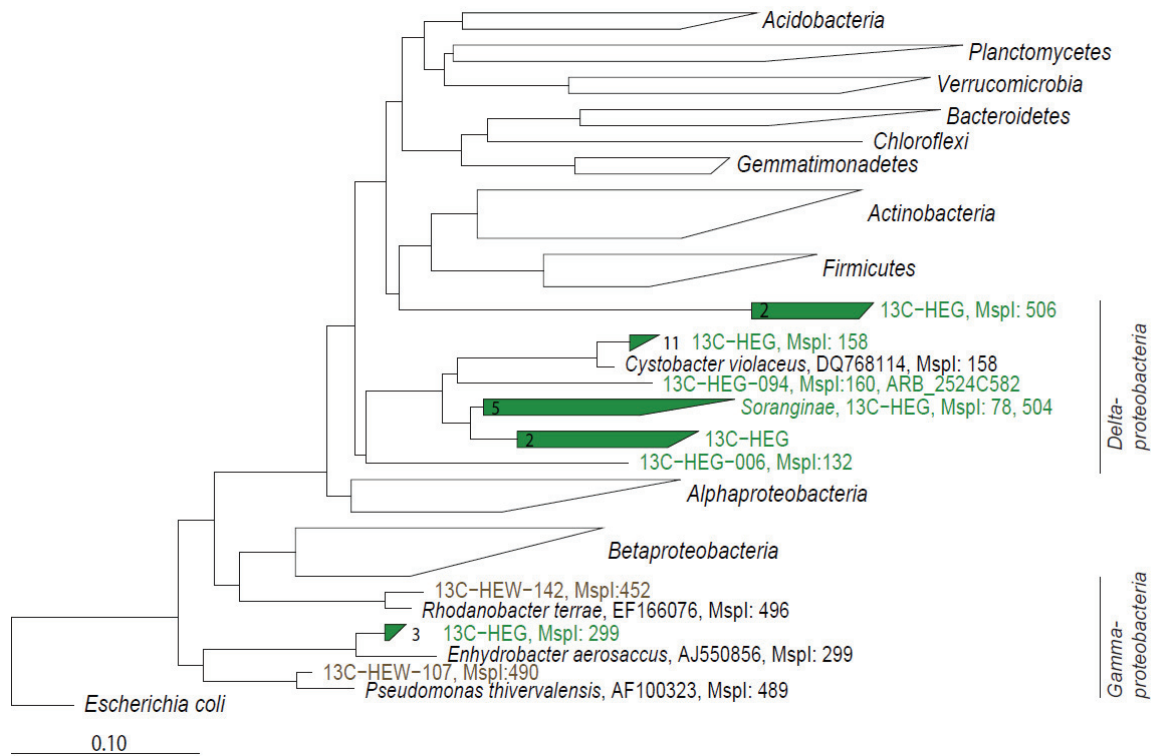


Abbildung 15. Neighbour-Joining-Baum der 16S rRNA-Sequenzen der γ - und δ -Proteobacteria der 'schweren' Fraktion (BD 1,82 g ml⁻¹) der Grünland- (13C-HEG) und Waldboden-Inkubationen (13C-HEW) nach 72 Stunden. T-RF-Längen (bp) wurden mittels *in silico*-Verdau der 16S rRNA-Sequenzen mit dem Restriktionsenzym *MspI* bestimmt. Der Maßstab stellt 10% Sequenzunterschied dar. GenBank 'accession numbers' der Referenzsequenzen sind angegeben.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Michael W. Friedrich für die Überlassung dieses spannenden Themas und die vielen hilfreichen Anregungen und Diskussionen.

Prof. Dr. Barbara Reinhold-Hurek möchte ich ganz herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens danken. Prof. Dr. Jörg Overmann, Prof. Dr. Uwe Nehls, Dr. Alexandra Müller und Ulrike Dietrich danke ich für das Einverständnis, Teil meiner Prüfungskommission zu sein.

Den derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe in Marburg und Bremen möchte ich für die wunderbare Arbeitsatmosphäre, „*special events*“ und viel Spaß innerhalb und außerhalb des Labors danken. Ein besonderer Dank geht nach Marburg an Bianca Pommerenke für die fachkundige Einarbeitung in die Molekularbiologie. Für die gemeinsamen Probenahmen und die Unterstützung bei der weiteren Bearbeitung der Bodenproben möchte ich mich bei Stephanie Hainbuch, Björn Breidenbach und Jennifer Fröb bedanken. Für die sehr gute Zusammenarbeit danke ich außerdem Christian Kirchhoff, der sich im Rahmen seiner Bachelorarbeit für die *Acidobacteria* im Hainich begeistern ließ. Ein besonders riesiges Dankeschön geht an Alex und Birgit für ihre Freundschaft, großartige Unterstützung und stetige Beratung im „Mädelslabor“. Ohne euren Humor und die ansteckenden Lachanfänge wäre die Zeit in Bremen lange nicht so schön gewesen. Alex, vielen lieben Dank für das genaue Korrekturlesen dieser Arbeit!

Dem Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie danke ich für die angenehmen ersten Monate meiner Doktorarbeit in der Abteilung Biogeochemie und die Möglichkeit auch nach dem Umzug der Arbeitsgruppe für Experimente zurückkommen zu dürfen. Dem gesamten Team der Biodiversitäts-Exploratorien, besonders allen Mitarbeitern, die die in der Arbeit verwendeten Umweltdaten erhoben haben, dem BEO und dem BExIS danke ich für die große Unterstützung und die hervorragende Infrastruktur des Projektes. Ein besonderer Dank für die gute Zusammenarbeit am Projekt ProFIL geht an Prof. Dr. Jörg Overmann und seine Arbeitsgruppe.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und Geschwistern, danke ich von ganzem Herzen für die fortwährende Unterstützung und dafür, dass sie immer für mich da sind. Ein besonderer Dank geht an meine WG, aber auch alle anderen Freunde für die aufmunternden Gespräche und Gesten sowie die vielen angenehmen Ablenkungen.

Abschließend möchte ich besonders Flo danken. Danke für deine Liebe und uneingeschränkte Unterstützung und dafür, dass du an meiner Seite bist.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Astrid Näther
Geburtsdatum: 23. Juni 1982
Geburtsort: Dresden
Staatsangehörigkeit: deutsch

Werdegang

- seit 09/2008 **Doktorarbeit**
Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg und
Universität Bremen, Fachbereich Biologie/Chemie

Thema: Phylogenetische und funktionelle Diversität von
Acidobacteria in Wald- und Grünlandböden unterschiedlicher
Landnutzung
- 07/2008 - 09/2008 **Georg-August-Universität Göttingen, Wissenschaftl. Hilfskraft**
Institut für Mikrobiologie und Genetik
- 10/2002 - 05/2008 **Georg-August-Universität Göttingen, Studium der Biologie**
06/2007 - 05/2008: Diplomarbeit zum Thema „Genregulation des
Fructoseabbaus in *Ralstonia eutropha* H16“
04/2005 - 05/2007: Hauptstudium mit Schwerpunkt Mikrobiologie
09/2004 - 03/2005: Praktikumsemester in Brasilien
10/2002 - 07/2004: Grundstudium
- 10/2001 – 07/2002 **„L’Arche Les Sapins“, Lignièeres Sonnevile/Frankreich**
Arbeit mit geistig behinderten Erwachsenen
- 08/1993 - 06/2001 Gymnasium Kreuzschule, Dresden
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Phylogenetische und funktionelle Diversität von *Acidobacteria* in Wald- und Grünlandböden unterschiedlicher Landnutzung“

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

Bremen, im September 2011

Astrid Näther