

Biodiversität methanogener Archaeen in arktischen Böden des Lena-Delta / Sibirien

Diplomarbeit

im Studienfach Diplom-Biologie der Universität Potsdam

vorgelegt von Lars Ganzert

Begutachtung:

Dr. Dirk Wagner

(Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung Potsdam,
Universität Potsdam)

Prof. Dr. Ingo Schneider

(Universität Potsdam, Institut für Biochemie und Biologie)

Oktober 2005

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	II
ZUSAMMENFASSUNG	IV
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VI
TABELLENVERZEICHNIS	VII
VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE	VIII
1 ... EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	1
2 ... GRUNDLAGEN	4
2.1 Methan und sein Einfluss auf das Klima	4
2.2 Methankreislauf in feuchten Ökosystemen	4
2.2.1 Methanproduktion	5
2.2.2 Methanoxidation	5
2.2.3 Wege der Freisetzung von Methan in Feuchtgebieten	6
2.3 Die Gruppe der methanogenen Archaeen	7
2.4 Molekularbiologische Techniken	9
2.4.1 Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction,PCR)	9
2.4.2 Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese	10
3 ... UNTERSUCHUNGSGEBIET	13
3.1 Das Lena-Delta	13
3.2 Klima	15
3.3 Die Insel Samoylov im Lena-Delta	16
3.4 Kap Mamontovy Klyk in der Küstenebene der Laptevsee	18
3.5 Lage der Untersuchungsstandorte	19
4 ... MATERIAL UND METHODEN	20
4.1 Probenmaterial und Aufbereitung	20
4.1.1 Bodenproben der Insel Samoylov und Kap Mamontovy Klyk	20
4.1.2 Anreicherungskulturen	20
4.1.3 Reinkulturen	21
4.2 Nährmedien	21
4.2.1 Medium für die Anreicherung methanogener Archaeen	22
4.2.2 Medien für die Reinkulturen	23
4.3 Bodenmikrobiologische Analysen	27
4.3.1 Bestimmung der Methanbildungsaktivitäten	27

4.3.2	Gasanalytik	28
4.4	Molekularbiologische Methoden	28
4.4.1	Lösungen und Puffer	28
4.4.2	DNA-Extraktion	31
4.4.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	32
4.4.4	Denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE)	34
4.4.5	Sequenzierung und Datenbank-Suche	35
4.5	Fremddaten	35
5 ...	ERGEBNISSE	38
5.1	Methanbildungsaktivitäten von Permafrostböden	38
5.2	Überprüfung der DNA-Extraktion	44
5.3	Überprüfung der Amplifikation des 16S rDNA-Gens	48
5.3.1	<i>Typic Aquorthel</i> der Insel Samoylov	49
5.3.2	<i>Typic Historthel</i> der Insel Samoylov	51
5.3.3	<i>Typic Aquiturbel</i> vom Mamontovy Klyk	51
5.3.4	Rein- und Anreicherungskulturen	51
5.4	Diversität methanogener Gemeinschaften in Permafrostböden	52
5.4.1	<i>Typic Aquorthel</i> der Insel Samoylov	53
5.4.2	<i>Typic Historthel</i> der Insel Samoylov	54
5.4.3	<i>Typic Aquiturbel</i> vom Kap Mamontovy Klyk	56
5.5	Phylogenie der methanogenen Gemeinschaften in Permafrostböden	57
6 ...	DISKUSSION	63
6.1	Einfluss von Temperatur und Substrat auf die Methanbildungsaktivität	63
6.2	Diversität der methanogenen Gemeinschaft innerhalb der Auftauzone	68
6.3	Vorteile und Limitationen der molekularen Methoden	75
6.4	Kritische Betrachtung und Ausblick	79
LITERATURVERZEICHNIS		81

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die **Biodiversität methanogener Archaeen in arktischen Böden des Lena-Deltas / Sibirien** unter Verwendung klassischer mikrobiologischer und molekularbiologischer Methoden untersucht. Dazu wurden die Aktivitätspotentiale der Methan bildenden Mikroorganismen in Abhängigkeit von verschiedenen Substraten und Temperaturen untersucht. Mit Hilfe der Denaturierenden Gradienten Gelelektrophorese (DGGE) und anschließender Sequenzierung einzelner DNA-Banden konnten dabei Unterschiede in der Populationszusammensetzung der methanbildenden Gemeinschaft im Tiefenprofil von Permafrostböden aufgezeigt und erklärt werden.

Es ist bekannt, dass die Methanogenese in arktischen Böden von vielen verschiedenen klimatischen und bodenspezifischen Faktoren abhängig ist. Vor allem der Gehalt an organischer Substanz hatte einen großen Einfluss auf die Methanbildung. So förderte die Zugabe von Substrat die Methanbildung meist erheblich. Dabei war mit H_2/CO_2 der höchste Anstieg zu verzeichnen. Eine Ausnahme war hier die obersten 5 cm des Profils einer Überschwemmungsebene auf der Insel Samoylov. Hier war Methanol das bevorzugte Substrat. Die Erhöhung der Temperatur hatte ebenfalls einen positiven Einfluss auf die Methanbildungsrate. Es ließ sich allerdings kein einheitliches Muster in der Methanbildungsaktivität der methanogenen Archaeen für die unterschiedlichen Bodentypen nachweisen. Für alle Profile gemeinsam war, dass eine zum Teil sehr hohe Methanbildungsrate von bis zu $270 \text{ nmol CH}_4 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ mit H_2/CO_2 als Substrat für die obersten 10 cm festzustellen war. Mit zunehmender Tiefe änderte sich das Bild. Während die Aktivität im Polygonzentrum des Standortes Kap Mamontovy Klyk stark abnahm, gab es ein zweites Aktivitätsmaximum in der Überschwemmungsebene der Insel Samoylov in der Zone der stärksten Durchwurzelung. Das untersuchte Polygonzentrum der Insel Samoylov zeigte ebenfalls ein zweites Aktivitätsmaximum, allerdings lag dieses in der Zone dicht über dem Permafrost.

Nach Analyse der Aktivitätstests, die bei verschiedenen Temperaturen und mit unterschiedlichen Substraten durchgeführt wurden, konnte bereits die Schlussfolgerung gezogen werden, dass sich die Gemeinschaft der methanogenen Archaeen in den verschiedenen Bodenhorizonten voneinander unterscheidet. Es wurde außerdem angenommen, dass die Diversität mit der Tiefe abnimmt, hervorgerufen durch die abnehmende Temperatur und den sinkenden Gehalt an organischem Kohlenstoff. Dies wurde durch die Ergebnisse der Denaturierenden Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE) nur teilweise bestätigt. Die Diversität nahm mit zunehmender Tiefe in der Auftauschicht erst zu und erreichte ihre größte Vielfalt in der Mitte der untersuchten Bodenprofile, um dann stark abzunehmen. Eine Ausnahme bildete die Überschwemmungsebene. Hier war die Diversität der methanogenen Mikroorganismen über das gesamte Profil etwa gleichbleibend. In allen der untersuchten arktischen Böden konnten Vertreter der Ordnung *Methanomicrobiales* und der Gattung *Methanosarcina* nachgewiesen werden. Desweiteren wurden auch Vertreter der Familie *Methanosaetaceae* gefunden, allerdings nur für die Überschwemmungsebene und das Polygonzentrum der Insel Samoylov.

Die aus den Ergebnissen gezogenen Schlüsse lassen die Annahme zu, dass es in diesen Habitaten psychrophile bzw. psychrotolerante methanogene Mikroorganismen gibt, die optimal an die dort herrschenden, extremen klimatischen Bedingungen angepasst sind. Dies wird durch die Tatsache gestützt, dass es bereits einige psychrophile bzw. psychrotolerante Isolate von methanogenen Archaeen gibt.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

2-1	Universeller phylogenetischer Stammbaum8
3-1	Satellitenbild des Lena-Deltas	..13
3-2	verschiedene polygonale Geländestrukturen	..15
3-3	jährlicher Temperatur- und Niederschlagsverlauf in Tiksi (Jakutien)	..16
3-4	Luftbild der Insel Samoylov	..17
3-5	Satellitenbild von Kap Mamontovy Klyk	..18
5-1	Methanbildungsaktivität eines <i>Typic Aquiturbel</i> bei 5°C	..39
5-2	Methanbildungsaktivität eines <i>Typic Aquiturbel</i> bei 18°C	..39
5-3	Methanbildungsaktivität eines <i>Typic Aquorthel</i> bei 5°C	..41
5-4	Methanbildungsaktivität eines <i>Typic Aquorthel</i> bei 18°C	..41
5-5	Methanbildungsaktivität eines <i>Typic Historthel</i> bei 5°C	..42
5-6	Methanbildungsaktivität eines <i>Typic Historthel</i> bei 18°C	..43
5-7	elektrophoretische Überprüfung des Einflusses von Ultraschall auf die Menge der extrahierten DNA	..45
5-8a-c	Überprüfung der DNA-Extraktion aus Boden	...46/47
5-9	Überprüfung der DNA-Extraktion einer Anreicherungskultur	..48
5-10	Überprüfung der PCR-Produkte	..49
5-11	Überprüfung der PCR-Wiederholung	..50
5-12	Optimierung der PCR-Konditionen	..50
5-13	Überprüfung der PCR der Anreicherungskultur	..52
5-14	DGGE-Muster eines <i>Typic Aquorthel</i>	..54
5-15	DGGE-Muster eines <i>Typic Historthel</i>	..55
5-16	DGGE-Muster eines <i>Typic Aquiturbel</i>	..56
5-17	Phylogentischer Stammbaum der erhaltenen Sequenzen	..57
5-18	Detailansicht der Ordnung <i>Methanomicrobiales</i> , Teil 1	..58
5-19	Detailansicht der Ordnung <i>Methanomicrobiales</i> , Teil 2	..58
5-20	Detailansicht der Familie <i>Methanosaetaceae</i>	..59
5-21	Detailansicht der Gattung <i>Methanosarcina</i>	..59

TABELLENVERZEICHNIS

4-1	Inkubationsbedingungen der Reinkulturen	..21
4-2	Bezeichnung und Sequenz der verwendeten Primer	..33
4-3	Profilbeschreibung des <i>Typic Historthel</i>	..36
4-4	Profilbeschreibung des <i>Typic Aquorthel</i>	..37
5-1	Klassifizierung der sequenzierten DNA-Fragmente	..60

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE

a	annum, Jahr
Abb.	Abbildung
ad	aufgefüllt auf
Aqua deion.	deionisiertes Wasser
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
bp	Basenpaare (base pairs)
bzw.	beziehungsweise
C ₁	Einkohlenstoffmolekül
CH ₄	Methan
CO ₂	Kohlendioxid
d	Tag (day)
DGGE	Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DOC	löslicher organischer Kohlenstoff
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
et al.	et alii (und weitere)
etc.	et cetera (und so weiter)
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
g	Gramm
h	Stunde
ha	Hektar
H ₂	Wasserstoff
H ₂ O	Wasser
lt.	laut
MeOH	Methanol
mM	Millimolar
min	Minute
mg	Milligramm

ml	Milliliter
µl	Mikroliter
N ₂	Stickstoff
nmol	Nanomol
O ₂	Sauerstoff
OCM	Oregon Collection of Methanogens
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der molaren Wasserstoffionen-Konzentration
ppm	Millionstel (parts per million)
RNA	Ribonukleinsäure
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
s	Sekunde
spp.	Spezies
ssDNA	einzelsträngige DNA (single strand)
t	Tonne
Tab.	Tabelle
Tg	Terragramm
u.a.	und andere
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
z.B.	zum Beispiel
%	Prozent (Hundertstel)
°C	Grad Celsius

1 EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Die vorliegende Arbeit soll zum Verständnis der Prozesse beitragen, die die Methanemission aus natürlichen Habitaten beeinflussen. In der vorliegenden Arbeit wurde dabei der Fokus auf die methanogenen Mikroorganismen gerichtet.

Methan gehört, neben Kohlendioxid, Wasserdampf, Stickoxiden, Ozon und den Fluorchlorkohlenwasserstoffen, zu den sogenannten Treibhausgasen (CICERONE & OREMLAND, 1988). Trotz der geringen Konzentration in der Atmosphäre im Vergleich zu Kohlendioxid, trägt Methan durch sein viel höheres Wärmeabsorptionsvermögen mit etwa 20% zum anthropogenen Treibhauseffekt bei (WUEBBELS & HAYHOE, 2002).

Der größte Teil des atmosphärischen Methans stammt aus biogenen Quellen, in denen unter anoxischen Bedingungen Biomasse mineralisiert wird. Arktische Feuchtgebiete, zu denen auch das untersuchte Gebiet dieser Arbeit gehört, bilden mit einem Flächenanteil von 26% die größte Gruppe der natürlichen Feuchtgebiete (MATTHEWS & FUNG, 1987). Durch Tauprozesse des Permafrostes im Sommer kommt es zu einer Wassersättigung des Bodens, dessen dadurch hervorgerufenen anaeroben Verhältnisse ideale Bedingungen für die Methanbildung schaffen.

Die Erdatmosphäre hat sich im 20. Jahrhundert um $0,6^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ erwärmt (FOLLAND et al, 2001). Im Bereich der arktischen Gebiete geht man mittlerweile davon aus, dass sich die Erwärmung dort schneller und mit einem stärkeren Temperaturanstieg vollzieht. Durch diese Erwärmung kann es in den Sommermonaten zu einem stärkeren und tieferen Auftauen des Permafrostbodens und damit zu einer erhöhten Verfügbarkeit von organischem Kohlenstoff, der im gefrorenen Boden gespeichert ist, kommen. Der Kohlenstoff kann dann von der mikrobiellen Gemeinschaft metabolisiert werden. Dieses zusätzliche Angebot kann dann in einer erhöhten Methanemission resultieren, so dass es sich um einen sich verstärkenden Kreislauf handeln würde. Allerdings hängt dies ebenfalls von anderen Faktoren ab, wie Wasserstand, Methanoxidation durch methanotrophe Bakterien und die Verwertbarkeit des aufgetauten organischen Materials.

Die Methanmenge, die letztendlich in die Atmosphäre gelangt, ist von den mikrobiellen Prozessen der Methanbildung durch methanogene Archaeen und der Methanoxidation durch methanotrophe Bakterien abhängig. Diese Prozesse wiederum stehen unter dem Einfluss von externen Faktoren wie Klima, Mikrorelief und Vegetation. Eine Vielzahl von Autoren haben Methanflüsse in arktischen Feuchtgebieten beschrieben (MORRISSEY & LIVINGSTON, 1992; WHALEN & REEBURGH, 1992; SAMARKIN et al., 1998; JOABSSON & CHRISTENSEN, 2001; WAGNER et al., 2003b). Die für die verschiedenen Standorte ermittelten Methanemissionsraten weichen dabei stark voneinander ab. MORRISSEY & LIVINGSTON (1992) haben eine Methanemission von $46 \text{ mg d}^{-1} \text{ m}^{-2}$ für ein Polygonzentrum ermittelt, während WHALEN & REEBURGH (1992) ebenfalls für ein Polygonzentrum einen Emissionsrate von $110 \text{ mg d}^{-1} \text{ m}^{-2}$ feststellten. Wagner et al. (2003) stellten für ein Polygonzentrum in der russischen Arktis fest, dass sich die Methanemission über den Messzeitraum (vier Monate im Sommer) verringerte und im Mittel $53,2 \pm 8,7 \text{ mg d}^{-1} \text{ m}^{-2}$ emittiert wurden. Um ein besseres Bild über die Methanflüsse zu erhalten, ist es daher sehr wichtig, Langzeitmessreihen durchzuführen, wie sie das Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung bereits seit 1998 im Gebiet des Lena-Deltas unternimmt.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit sind die Mikroorganismen, die für die Methanemissionen verantwortlichen sind, die methanogenen Archaeen. Die Mikroorganismen stellen hinsichtlich Temperatur, pH-Wert, Substrat und anderen Umweltbedingungen je nach Art unterschiedliche Ansprüche (GARCIA, 2000). Um eine Abschätzung der potentiellen Methanemission eines Standortes machen zu können, ist eine gute Kenntnis der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft notwendig. Um den derzeitigen Kenntnisstand zu erweitern, sollen folgende Fragen beantwortet werden:

- Gibt es Unterschiede in der Diversität der methanogenen Mikroflora innerhalb des Tiefenprofils eines Permafrostbodens?
- Sind Unterschiede in der Diversität zwischen verschiedenen Standorten zu sehen?

- Welchen Einfluss haben die Temperatur und das Substrat auf die Aktivität der methanogenen Archaeen in Permafrostböden?
- Können methanogene Mikroorganismen, die durch molekularbiologische Methoden nachweisbar sind, im Labor kultiviert werden und können möglicherweise zusätzliche methanogene Archaeen über eine Anreicherung detektiert werden?

Diese Arbeit ist in das BMBF-Verbundprojekt „Russisch-Deutsche Zusammenarbeit: System Laptev-See 2000“ eingebunden. Dafür wurden Bodenproben eines typischen arktischen Tundrangebietes des Lena-Deltas (Insel Samoylov) und des Kap Mamontovy Klyk, die während vorangegangener Expeditionen der Jahre 2000 bzw. 2003 genommen wurden, untersucht.

2 GRUNDLAGEN

2.1 Methan und sein Einfluss auf das Klima

Mit einer mittleren Konzentration von 1,75 ppm ist Methan (CH₄) die am häufigsten vorkommende organische Kohlenstoffverbindung in der Atmosphäre. Der Großteil des Methans in der Atmosphäre ist biogenen Ursprungs, wird also von Mikroorganismen gebildet. Seit dem 19. Jahrhundert hat sich die Methankonzentration durch verstärkte anthropogene Einflüsse wie Landwirtschaft (Tierhaltung, Reisanbau) und Nutzung fossiler Energieträger mehr als verdoppelt (IPCC, 2001). Durch die Fähigkeit der Absorption von langwelliger Strahlung trägt Methan zum so genannten Treibhauseffekt bei. Dabei wird die kurzwelligere Strahlung der Sonne von der Erde absorbiert und als langwellige Strahlung von der Erde reflektiert. Diese Strahlung kann wiederum von Methan und anderen Treibhausgasen wie Kohlendioxid (CO₂) absorbiert werden und erneut in Richtung Erde emittiert werden. Dabei ist Methan 24fach effektiver als das Treibhausgas CO₂ (WMO, 1999). Durch Photooxidation kann die Konzentration von Methan in der Atmosphäre reguliert werden, wobei die chemische Reaktion mit Hydroxyl-Radikalen deutlich über die der mikrobiellen Methanoxidation dominiert.

2.2 Methankreislauf in feuchten Ökosystemen

Die CH₄-Emissionen aus natürlichen Quellen betragen etwa 160 Tg/a (IPCC, 1996). Davon stammen 72% aus Feuchtgebieten (WUEBBELS & HAYHOE, 2002), die eine Größe von etwa $5,5 \cdot 10^6$ km² besitzen (ASELMANN & CRUTZEN, 1989). Ungefähr die Hälfte dieser Gebiete liegen in der Nordhemisphäre (> 50°N). Die Methanemission aus Böden ergibt sich dabei aus der Differenz von Methanbildung und Methanabbau durch hochspezialisierte Mikroorganismen, die wiederum von anderen, biotischen und abiotischen, Faktoren wie Wasserstand, Vegetation und Nährstoffgehalt des Bodens beeinflusst werden.

2.2.1 Methanproduktion

Methan (CH_4) wird von einer Gruppe hochspezialisierter Mikroorganismen, den so genannten methanogenen Archaeen, als Endprodukt im Zuge des anaeroben Abbaus komplexer organischer Materie gebildet. Sie benötigen zum Wachstum eine strikt anaerobe Umgebung, da bereits geringe Mengen an Sauerstoff (weniger als 10 ppm) zu einer irreversiblen Dissoziation ihres F_{420} -Hydrogenase-Enzymkomplexes, der Reduktionsäquivalente für die weitere Reduktion von CO_2 liefert, führt (GARCIA et al., 2000). In Permafrostgebieten werden diese anaeroben Bedingungen durch Tauprozesse im Sommer, und der daraus resultierenden Staunässe in der Auftauzone (englisch: active layer), ermöglicht. Doch auch in oxischen Böden kann es zu einer Methanbildung kommen (PETERS & CONRAD, 1995). Dies ist durch das Vorhandensein anaerober Nischen, die von mikroaerophilen oder fakultativ aeroben Bakterien geschaffen werden, zu erklären. Auch die Beschaffenheit der Bodenmatrix ist dabei von Bedeutung (WAGNER et al., 1999). Methanogene Archeen sind hochspezialisierte Organismen und können nur wenige, einfach gebaute Substrate wie H_2/CO_2 , Methanol oder Acetat für ihren Stoff- und Energiewechsel nutzen (ZINDER, 1993). Diese werden ihnen von anderen Bakterien im Zuge des anaeroben Abbaus von organischer Materie bereitgestellt. Sie stellen somit das Endglied des Kohlenstoffabbaus unter anaeroben Bedingungen dar.

2.2.2 Methanoxidation

Methan wird durch methanabbauende (methanotrophe) Bakterien mittels molekularem Sauerstoff (O_2) oxidiert. Aus dieser Reaktion beziehen sie sowohl ihren Zellkohlenstoff als auch ihre Energie. Dabei wird durch das Enzym Methan-Monooxygenase ein Sauerstoffatom des O_2 in das Substrat eingebaut, wobei Methanol entsteht. Durch dessen weitere Oxidation wird Formaldehyd als Ausgangsstoff für die Bildung von Zellmaterial gebildet, während das andere Sauerstoffatom zu Wasser reduziert wird. Dabei werden die methanotropen Bakterien nach ihrer inneren Zellstruktur und der Art der Kohlenstoffassimilierung in zwei Gruppen eingeteilt. Zum einen kann

Kohlenstoff über den Ribulosemonophosphatweg (*Typ I* - Methanoxidanten), bei dem der Zellkohlenstoff allein aus Formaldehyd aufgebaut wird, zum anderen über den Serinweg (*Typ II* - Methanoxidanten), bei dem neben Formaldehyd auch CO₂ bei der C₁-Assimilation genutzt wird, assimiliert werden. Methanotrophe Bakterien können zum Teil auch andere Einkohlenstoffverbindungen wie Methanol oder Methylamine als Substrat nutzen (HANSON & HANSON, 1996).

Da die methanotrophen Bakterien sowohl CH₄ als auch O₂ benötigen, findet man sie in der Regel an oxisch-anoxischen Grenzschichten. Sie kommen auch in anaeroben Bereichen von wassergesättigten Böden vor, sind dort aber auf den Sauerstofftransport durch aerenchymatöse Pflanzengewebe in den Wurzelbereich angewiesen. Die meisten Vertreter dieser Gruppe sind mesophile Organismen, es sind jedoch auch methanotrophe Bakterien nachgewiesen worden, die psychrophil bzw. psychrotolerant sind (TROTSENKO & KHMELENINA, 2005).

2.2.3 Wege der Freisetzung von Methan in Feuchtgebieten

Die Löslichkeit von Methan in Wasser ist gering (YAMAMOTO et al., 1976). Es kann durch Diffusion, durch Ebullition (die Bildung von Gasblasen) oder über den pflanzenvermittelten Transport in die Atmosphäre gelangen (JOABSSON & CHRISTENSEN, 2001; CHRISTENSEN et al., 2003, KUTZBACH et al., 2004). Die Diffusion von Methan erfolgt entlang eines Konzentrationsgradienten meist innerhalb der belüfteten Bodenporen, da die Diffusion von Gasen in Wasser 10⁴ mal langsamer ist als in Luft (SCHEFFER & SCHACHTSCHABEL, 1998). Da Diffusion über größere Strecken ein langsamer Prozess ist, kann bis zu 90% des Methans in der obersten aeroben Schicht der Wassersäule von Seen, überfluteten Böden oder in wasserungesättigten Böden durch methanotrophe Bakterien oxidiert werden (BASTVIKEN et al., 2002; GILMANOV & OECHEL, 1995; ROUSE et al., 1995). Allerdings kann die Oxidation auch umgangen werden, indem es beispielsweise zur Ausgasung und Blasenbildung in Folge einer Übersättigung des Porenwassers mit Methan kommt. Wenn die Blasen eine bestimmte Größe erreicht haben, steigen sie an die Oberfläche und zerplatzen. Die Abgabe von Methan durch Gasblasen kann quantitativ 40-60% der Emission betragen und ist somit eine wichtige Größe für die

Methanfreisetzung aus Feuchtgebieten (BASTVIKEN et al., 2004; CHRISTENSEN et al., 2003).

Andererseits kann Methan auch über Pflanzen aus dem Boden direkt in die Atmosphäre geleitet werden. Bestimmte Sumpf- und Wasserpflanzen bilden sogenannte Aerenchyme, mit Gas gefüllte Durchlüftungsgewebe, durch die Sauerstoff in die Wurzeln der anaeroben Bodenbereiche geleitet wird. Diese Leitbahnen können aber auch als Transportweg für Methan dienen. Ist die Methanproduktion im Boden sehr hoch, insbesondere in den Bereichen mit der höchsten Wurzeldichte, kommt es durch den hohen Konzentrationsgradienten zu einem Fluss von CH₄ in das Aerenchym der Pflanzen und damit zu einem direkten Transport in die Atmosphäre. Dabei kann, in Abhängigkeit mehrerer Faktoren (z.B. Vegetation, Geomorphologie etc.), zwischen 30 bis 65% des Methans über Pflanzen an die Luft abgegeben werden (CHRISTENSEN et al. 2003, KUTZBACH et al. 2004).

2.3 Die Gruppe der methanogenen Archaeen

Archaeen gehören zu der Gruppe der Prokaryoten (WOESE, 1978). Basierend auf phylogenetische Stammbäume werden die Archaeen in vier Gruppen unterteilt: die *Euryarchaeota*, zu denen auch die methanogenen Archaeen gehören, die *Crenarchaeota* und die *Korarchaeota* (Abb. 2.1). Ein neuentdecktes Phylum sind die *Nanoarchaeota* (HUBER et al., 2002).

Methanogene Archaeen sind in der Umwelt weit verbreitet. Sie kommen praktisch in allen Habitaten vor, in denen anaerobe Bedingungen herrschen. Dazu gehören neben Standorten wie Reisfelder (GROSSKOPF et al., 1998), der Gastrointestinaltrakt von Tieren (LIN et al., 1997) oder aquatischen Sedimenten (CHAN et al., 2005) auch extreme Standorte wie hydrothermale Tiefseequellen (JEANTHON et al., 1999), Permafrostgebiete (SIMANKOVA et al., 2003) oder saline Habitate (MATHRANI & BOONE, 1985).

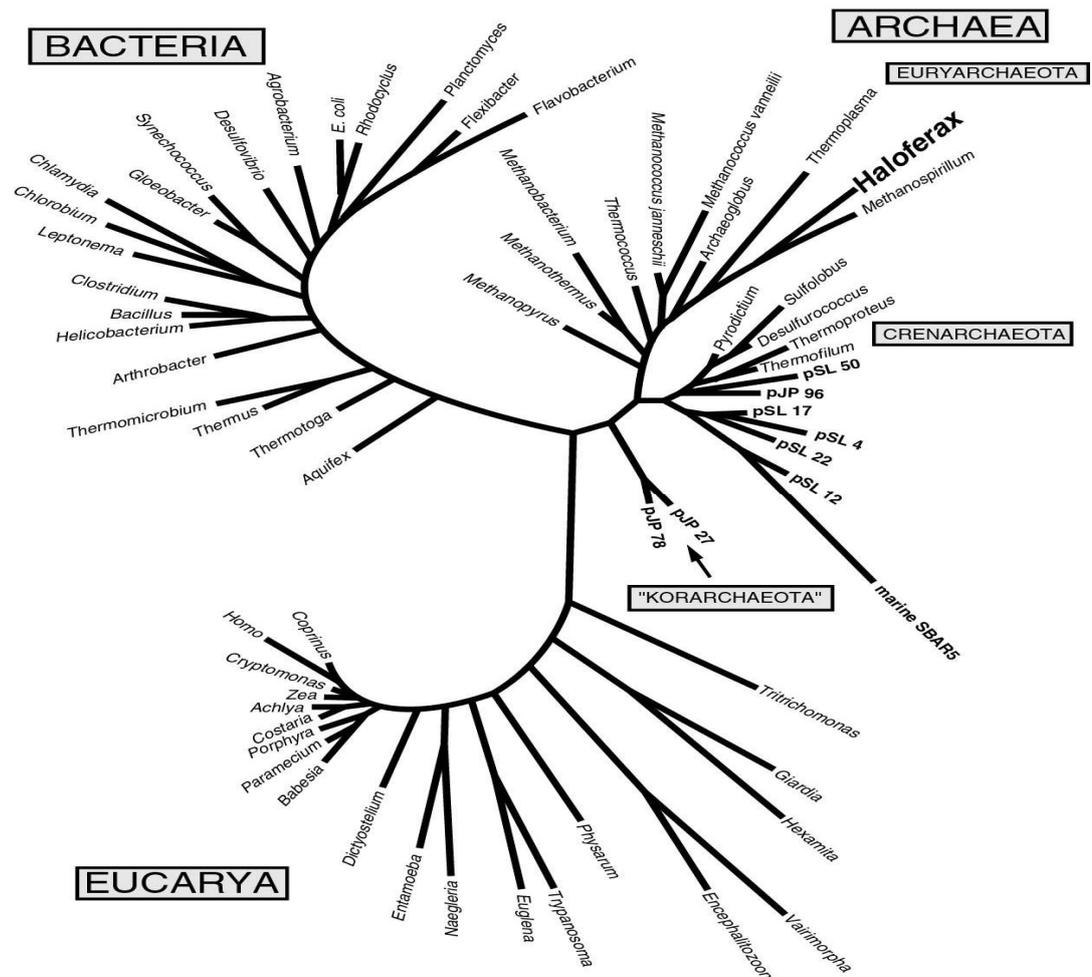


Abb. 2.1: Universeller phylogentischer Stammbaum (BARNES et al., 1996, modifiziert)

Bei den methanogenen Archaeen sind drei Hauptsubstrattypen zu unterscheiden (GARCIA et al., 2000), denen die meisten der bis jetzt beschriebenen, über siebzig Spezies angehören. Die hydrogenotrophen methanogenen Archaeen oxidieren H_2 und reduzieren CO_2 um Methan zu bilden. Zu dieser Gruppe gehören auch Vertreter, die Formiat oxidieren können. Einige dieser methanogenen Mikroorganismen können auch Alkohole als Elektronendonator für die Reduktion von CO_2 nutzen. Vertreter dieser Gruppe sind u.a. die Gattungen *Methanogenium* und *Methanomicrobium*. Die methylotrophen Substratnutzer wachsen mit Methylverbindungen wie Methanol oder methylierten Aminen. Hierzu zählt u.a. die Gattung *Methanococcoides*. Acetotrophe methanogene Archaeen hingegen nutzen Acetat zur Produktion von Methan und Zellkohlenstoff. Einige Organismen können mehrere Substrattypen verwenden und lassen sich nicht in eine bestimmte Ernährungskategorie einordnen. Obwohl die

acetotrophen methanogenen Archaeen nur 14 % der gesamten beschriebenen methanogenen Flora ausmachen, werden 2/3 des Methans durch diese Mikroorganismen gebildet (LE MER & ROGER, 2001). Zu ihnen gehören Vertreter der Gattung *Methansarcina*, die über ein breites Substratspektrum verfügen, und der Gattung *Methanosaeta*, die Acetat als einziges Substrat für die Methanbildung nutzen können.

Methanogene Mikroorganismen sind durch das Vorhandensein besonderer Enzyme und Coenzyme gekennzeichnet, die einzigartig für diese Gruppe sind. Dabei lassen sich die Coenzyme in zwei Klassen einteilen: die einen dienen als Träger der C₁-Einheiten bei der Umwandlung von Kohlendioxid zu Methan, die anderen stehen als Elektronendonoren für die Reduktion von CO₂ zu CH₄ zur Verfügung (MADIGAN et al., 2001). Dabei gewinnen die Methanogenen ihre Energie in Form von ATP nicht durch Substratphosphorylierung, sondern durch die Bildung eines Protonengradienten. Dieser Gradient wird zur Synthese von ATP durch eine ATPase genutzt. Allerdings gibt es Hinweise darauf, dass einige Methanogene auch einen Natrium-Gradienten zur Bildung von ATP nutzen können (CHEN & KONISKY, 1993; SMIGAN et al., 1994).

2.4 Molekularbiologische Techniken

2.4.1 Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), die 1983 von Kary B. Mullis erstmalig vorgestellt wurde, ist es möglich, die DNA als Träger der Erbinformation auch außerhalb eines lebenden Zellsystems zu vervielfältigen. Dabei wird ein bestimmter Abschnitt der DNA, zum Beispiel ein Gen, ein Genabschnitt oder auch eine nichtkodierende Sequenz, durch das Enzym DNA-Polymerase kopiert und amplifiziert. Da die Vervielfältigung exponentiell ist, ist es möglich, auch Proben mit geringen DNA-Mengen bearbeiten zu können (SAIKI et al., 1988).

Eine PCR setzt sich im Allgemeinen aus drei Reaktionen zusammen. Zunächst wird der DNA-Doppelstrang (dsDNA) bei hohen Temperaturen in seine Einzelstränge aufgeschmolzen. An die einzelsträngige DNA (ssDNA) lagern sich bei Abkühlung Oligonukleotide (Primer) spezifisch an die zu

flankierende Region (Annealing). Die Annealing-Temperatur der Primer ist abhängig von deren Basenzusammensetzung und sollte zwischen 40-60°C liegen. Die Primer dienen als Startpunkt für eine thermostabile DNA-abhängige DNA-Polymerase, die die DNA-Einzelstränge mit Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTP) zu einem Doppelstrang auffüllt. Die Elongation des DNA-Stranges wird dabei solange vorangetrieben, bis die Reaktion extern abgebrochen wird oder die DNA-Polymerase von der Matrize rutscht. Diese Reaktionen werden dann meist in 20 bis 30 Zyklen wiederholt. Da es mit jedem Zyklus zu einer Verdopplung des Amplifikates kommt, steigt die Anzahl der Kopien exponentiell an. Ist die Anzahl der Zyklen zu hoch, steigt die Bildung unspezifischer Produkte oder fehlerhaft integrierter Nukleotide. Dies kann während nachfolgender Analysen zu Problemen führen.

In den Anfängen der Polymerase-Kettenreaktion wurden DNA-Polymerasen aus mesophilen Mikroorganismen genutzt, die den Nachteil hatten, dass sie bei jedem Schmelzvorgang denaturierten und deshalb für jeden Zyklus neu dazugegeben werden mussten. Dies barg natürlich ein hohes Risiko an Kontamination mit fremder DNA. Mit der Isolierung von Bakterien aus heißen Quellen (*Thermus aquaticus*, *Pyrococcus woesei*) standen bald auch DNA-Polymerasen zur Verfügung, die den Schmelzvorgang bei 95°C ohne Denaturierung überstanden. Die im Moment am häufigsten genutzte DNA-Polymerase ist die *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus*. Die *Taq*-Polymerase hat den Nachteil, dass die Fehlerquote durch den Einbau eines falschen Nukleotids recht hoch ist. Es gibt jedoch DNA-Polymerasen (z.B. *Pwo*-Polymerase aus *Pyrococcus woesei*), die über eine Korrekturlesefunktion verfügen und somit die Anzahl falsch eingebauter Nukleotide minimieren.

2.4.2 Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE)

In den letzten Jahren wurden verschiedene molekular-ökologische Methoden entwickelt, zu denen neben der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH; AMANN et al., 1995) oder Restriktionfragmentlängenpolymorphismus (RFLP; VANEECHOUTTE, 1996) auch die Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese (MUYZER et al., 1993) zählt. Diese Methoden ermöglichen

die Untersuchung der mikrobiellen Diversität kulturunabhängig in unterschiedlichsten Habitaten (WATANABE et al., 2004; ISHII et al. 2000; ØVREÅS et al., 1997; VAN DER GUCHT et al., 2005; GERDES et al., 2005).

Mit Hilfe der DGGE lassen sich DNA-Fragmente, die die gleiche Länge haben, aber in ihrer Sequenz variieren, in einem Polyacrylamidgel, welches einen linearen denaturierenden Gradienten besitzt, auftrennen (FISCHER & LERMAN, 1979, 1983). Dies war anfänglich nur bis zu einer Fragmentlänge von 500-1000 bp möglich (MYERS et al., 1985, SHEFFIELD et al., 1989). In letzter Zeit konnte die Analyse jedoch auch mit größeren Fragmenten bis ~1700 bp erfolgreich durchgeführt werden (OROS-SICHLER et al., 2005). Dabei folgt die Analyse bestimmten Schritten. Aus dem genetischen Material, das mit der DNA-Extraktion aus der zu untersuchenden Probe gewonnen wurde, wurde unter Verwendung spezifischer Primer in einer PCR-Reaktion ein Fragment des 16S rDNA-Gens amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde auf ein denaturierendes Gradientengel, welches mit einem Gradientenmischer gegossen wurde, aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Der Gradient besteht aus einem Harnstoff/Formamid-Gemisch, der eine Denaturierung, d.h. eine Aufschmelzung, der doppelsträngigen DNA verursacht. Mit zunehmenden denaturierenden Bedingungen kommt es zu einem partiellen Schmelzen der doppelsträngigen DNA, wodurch es in Folge der Formänderung (Bildung von Einzelstrangbereichen) zu einer starken Reduktion der Mobilität im Gel und damit zur Bildung distinkter DNA-Banden kommt. Das Aufschmelzen der DNA ist abhängig von der Sequenz und vollzieht sich weniger in der Art eines Reißverschlusses, als vielmehr in einem schrittweisen Prozess. Einzelne Domänen der doppelsträngigen DNA-Moleküle werden innerhalb eines engen Bereiches des denaturierenden Gradienten plötzlich einzelsträngig. Somit spielt nicht nur die direkte Sequenzabfolge der DNA-Fragmente für die Denaturierung eine Rolle, sondern auch die benachbarten DNA-Basen innerhalb einer Schmelzdomäne haben einen großen Einfluss auf das Schmelzverhalten.

Für die Untersuchung der taxonomischen Charakterisierung der methanogenen Lebensgemeinschaften ist es möglich, neben Amplifikaten des 16S rDNA-Gens auch Amplifikate anderer Gene, die einzigartig in der Gruppe der Methanbildner sind, für die Analyse zu verwenden. Um jedoch eine taxonomische Einordnung in phylogenetische Stammbäume vornehmen

zu können oder um eine bakterielle Mischgemeinschaft zu untersuchen, ist es sinnvoller, Amplifikate der 16S rRNA kodierenden Gene für die Untersuchung zu nutzen. Dieses Gen ist universell in allen Prokaryoten vorhanden und kann durch vergleichende Untersuchungen der Nukleotidsequenz als Gradmesser für die Verwandtschaftsverhältnisse dienen. Dies kann in einem phylogentischen Stammbaum (siehe Abb. 2.1) unter Verwendung verschiedener Computerprogramme dargestellt werden.

3 UNTERSUCHUNGSGEBIET

3.1 Das Lena-Delta

Das Lena-Delta gehört mit einer Größe von 32000 km² (ARE & REIMNITZ, 2000) zu einer der größten Deltalandschaften der Erde und wird durch den gleichnamigen Fluss, die Lena, gebildet. Die Lena entspringt im Baikargebirge westlich des Baikalsees, durchfließt das Mittelsibirische Bergland und mündet nach 4400 km in die nordsibirische Laptev-See. Durch den hohen Süßwasser- und Sedimenteintrag von 525 km³ a⁻¹ bzw. 21x10⁶ t a⁻¹ (RACHOLD et al., 1999) hat die Lena einen großen Einfluß auf das Ökosystem der Laptev-See und den daran grenzenden Arktischen Ozean.

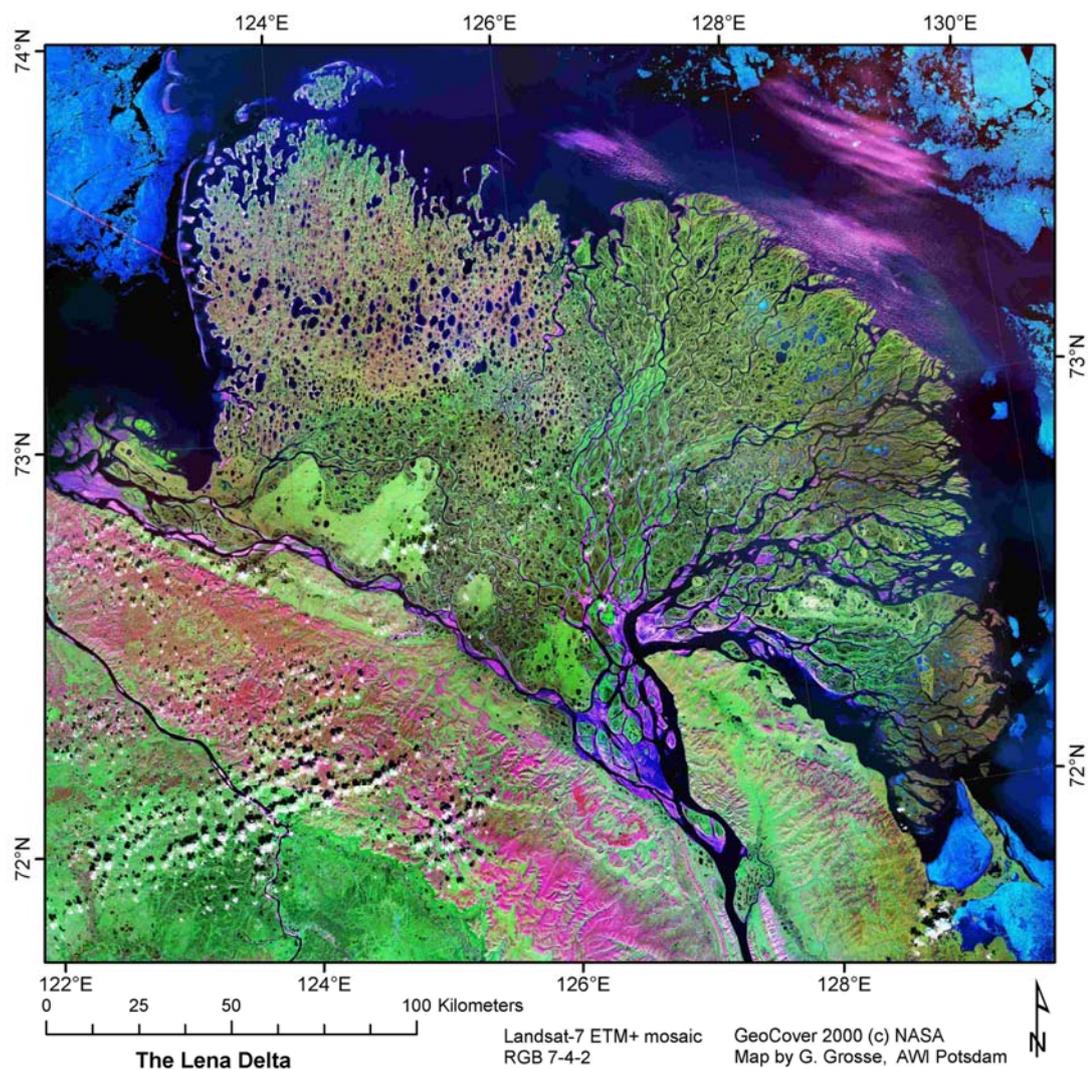


Abb. 3-1: Satellitenbild des Lena-Deltas

Das Lena-Delta lässt sich geomorphologisch in drei verschiedene Flussterrassen gliedern (SCHWAMBORN et al., 1999), die unterschiedlichen zeitlichen Ursprung sind.

Im Süden des Deltas ist die älteste Terrasse zu finden, die im mittleren bis späten Pleistozän entstanden ist. Sie macht den kleinsten Teil des Lena-Deltas aus. Hier sind bis zu 50 m hohe Eiskomplexe zu finden, die von stark organikhaltigen Sanden bzw. ganzen Torfblöcken durchzogen sind. Der nordwestliche Teil des Deltas (Insel Arga) wird von einer Flussterrasse gebildet, die im späten Pleistozän bis frühen Holozän entstanden ist. Sie unterscheidet sich vom restlichen Delta durch die Vielzahl sogenannter orientierter Seen und den groben, sandigen Sedimenten, die diese Terrasse bilden. Entlang der Küste kommt es zu gewaltigen Thermoerosionsprozessen an den dort vorhandenen Eiskomplexen, wobei die Regression bis zu 6 m pro Jahr betragen kann. Der östliche Teil des Deltas ist gekennzeichnet durch eine rezente Akkumulation von Sedimenten und ist als heutige jüngste Flussterrasse im Mittelholozän entstanden.

Das Gebiet des Lena-Deltas liegt in der Arktis, innerhalb der Zone des kontinuierlichen Permafrostes. Die Mächtigkeit des dauerhaft gefrorenen Bodens kann hier 200-600 m betragen (ERSHOV, 1991). Permafrost kann nur unter den klimatischen Bedingungen entstehen, wie sie in den Polargebieten oder in Hochgebirgen zu finden sind. Dabei muss die Jahresmitteltemperatur mindestens zwei Jahre in Folge unter 0°C liegen. Eine isolierende Schicht in Form von Eis oder Schnee sollte nicht oder nur in geringem Maße vorhanden sein. Durch Tauprozesse im Sommer kommt es zur Bildung einer Auftauzone (englisch: active layer), die je nach Standortbedingungen im Lena-Delta unterschiedliche Mächtigkeiten haben kann (bis 60 cm) und am Ende des Sommers ihre größte Tiefe erreicht. Bodenfeuchte und Vegetation spielen dabei eine wichtige Rolle. Die Vegetation, im Besonderen eine Moosbedeckung, kann der Wärmeeinstrahlung durch eine verstärkte Isolation entgegenwirken, während mit dem Schmelz- und Regenwasser Wärme in den Boden eingetragen wird und es dadurch zu verstärkten Tauprozessen kommen kann. Dies ist in den Eiskeil-Polygonzentren und in der Überschwemmungsebene zu beobachten. Die Polygonzentren sind gekennzeichnet durch eine Depression, die durch die Bildung von Eiskeilen

entsteht. Eiskeil-Polygon-Netze sind eine in Permafrostgebieten weitverbreitete Landschaftsform. Sie sind in Regionen des kontinuierlichen Permafrostes zu finden, wo im Winter durch Kältekontraktion des Bodens Frostrisse entstehen. Diese Frostrisse bilden an der Geländeoberfläche pentagonale oder hexagonale Strukturen. Im Frühjahr sickert Schmelzwasser in diese Risse und gefriert. Im Sommer dehnt sich der Permafrostkörper durch Erwärmung aus, wobei die durch Gefrier-Tau-Prozesse entstandenen Eisadern eine horizontale Ausdehnung verhindern. An den Polygonrändern kommt es dadurch zu einer langsamen Aufwölbung des Bodens. Diese Prozesse wiederholen sich alljährlich, so dass die typische Form der 'Low-Center-Polygone' mit eingesenktem Zentrum und erhöhtem Randwall entsteht (WASHBURN, 1979).

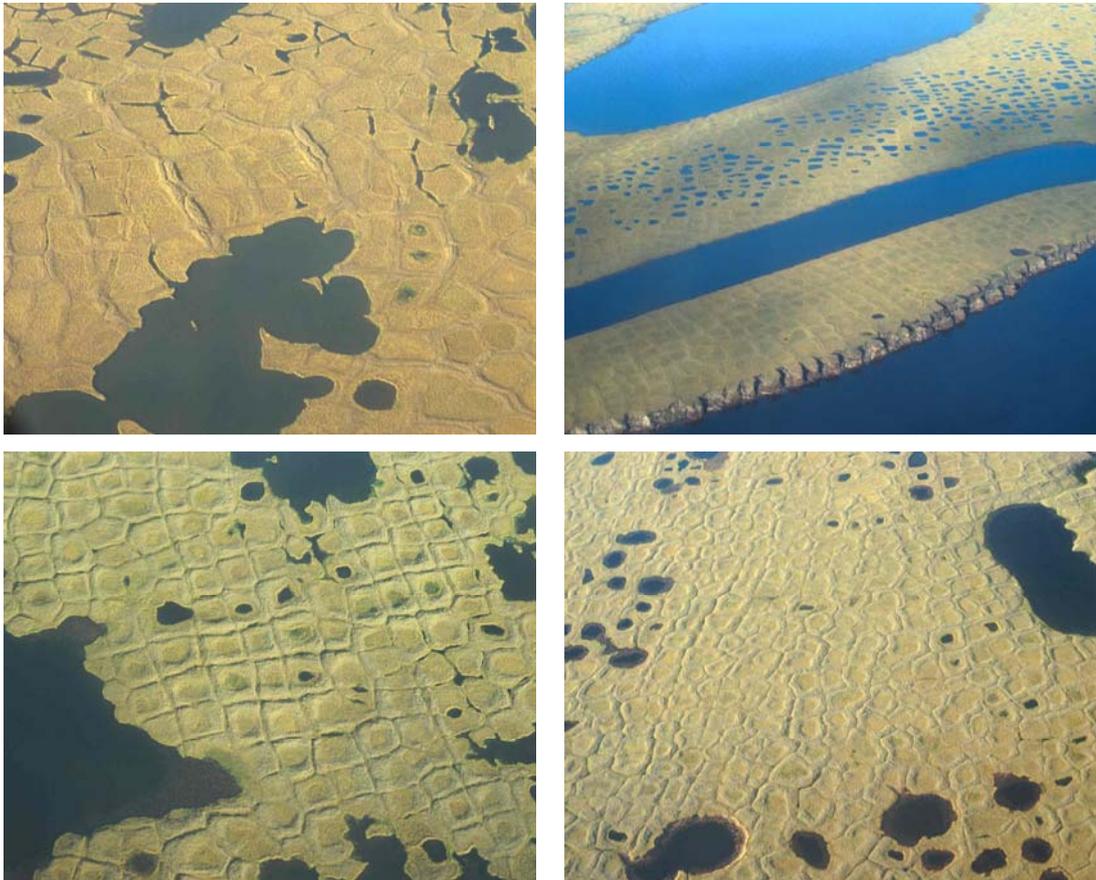


Abb. 3-2: verschiedene polygonale Geländestrukturen (Photos: H.Meyer)

3.2 Klima

Das Klima im Lena-Delta ist geprägt durch kurze, kühle Sommer, die von Mitte Juni bis Mitte August reichen und durch eine Sonnenscheindauer von

24 h, dem sogenannten Polartag, gekennzeichnet sind. Die Winter sind lang und kalt. Starke Schneestürme und eine sehr kurze Helligkeitsphase, die sogenannte Polarnacht, sind im Winter charakteristisch für diese Breitengrade.

Unter solchen extremen Bedingungen können nur verhältnismäßig wenige Pflanzenarten überdauern. Daher besteht die Vegetation meist aus Pflanzengesellschaften, die von Zwergsträuchern (*Betula*, *Salix*, *Dryas*, *Vaccinium*), Sauergräsern, Wollgräsern, Moosen und Flechten dominiert werden (Schultz, 1995). Der Großteil der Arten gehört zu den Chamaephyten und Hemikryptophyten, die an die vorherrschenden Umweltbedingungen optimal angepasst sind. Sie können bei einem Ansteigen der Temperaturen im Frühjahr sehr schnell Blätter und Blüten ausbilden, während sie unter den extremen Frostbedingungen im Winter gut durch die isolierende Schneeschicht geschützt sind.

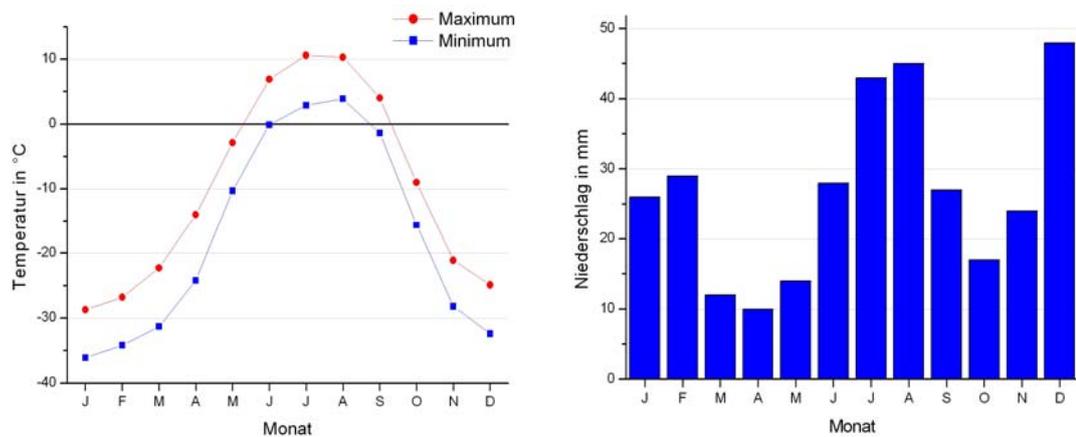


Abb. 3-3 : jährlicher Temperatur- und Niederschlagsverlauf in Tiksi (Jakutien)

3.3 Die Insel Samoylov im Lena-Delta

Die Insel Samoylov (72°22'N, 126°28'O) befindet sich im jüngsten (8000-9000 Jahre) und aktiven südlich gelegenen Teil des Deltas. Sie besitzt eine Fläche von etwa 1200 ha, der höchste Punkt befindet sich 12 m über dem Meeresspiegel.



Abb. 3-4 : Luftbild der Insel Samoylov (Photo: C.Wille)

Die Insel Samoylov lässt sich grob in zwei geomorphologische Zonen einteilen: Der östliche Teil der Insel ist durch eine mittel-holozäne Flußterrasse (Kap. 3.1) charakterisiert. Sie ist durch Torflagen mit dazwischen liegenden schluffig-sandigen Sedimentablagerungen gekennzeichnet und nimmt etwa 70% der Inselfläche ein. Die Bedeckung durch Vegetation beträgt 100%. Die Ost- und Südseite der Insel ist durch massive Erosion geformt und bildet eine 8-12 m hohe Steilküste.

Der westliche Teil dagegen ist durch Überflutung, und damit durch eine rezente Akkumulation von Sedimenten, geprägt. Hier kann man drei Ebenen verschiedener Höhe und Überflutungshäufigkeit unterscheiden. Die niedrigste Überflutungsebene wird jedes Jahr regelmäßig und vollständig überflutet. Die mittlere Ebene wird ebenfalls jährlich überschwemmt, wobei die Überflutungsdauer kürzer ist, während die höchste Ebene nur bei hohen Wasserständen erreicht wird.

Die Vegetation der Insel wird von verschiedenen Sauer- (*Carex* spp., *Eriophorum* spp.) und Süßgräsern (*Arctophila* spp., *Poa* spp., *Trisetum* spp.) dominiert. Des Weiteren findet man verschiedene Kräuter (*Saxifraga* spp., *Pedicularis* spp., *Astragalus* spp.). Die Eiskeilpolygonnetze sind weiterhin durch eine dicke Mooschicht geprägt. Als Gehölze kommen Zwergformen

von *Salix*, *Betula* und *Alnus* vor. Durch die niedrige Wuchsform sind sie an die dort vorherrschenden, harschen Klimabedingungen gut angepasst.

3.4 Kap Mamontovy Klyk in der Küstenebene der Laptevsee

Das Untersuchungsgebiet liegt in der Nähe des Flusses Nuchcha Dzhiel, ungefähr 600 km nordwestlich von Tiksi, im Küstenland zwischen der Anabar-Bucht und der Olenek-Bucht. Im Süden schließt sich der Pronchishchev-Höhenzug an, der zur Küste hin sanft abfällt. Das Küstentiefland ist geprägt durch eine hügelige Ebene, die Erhöhungen von 25 bis 35 m über dem Meeresspiegel aufweist.

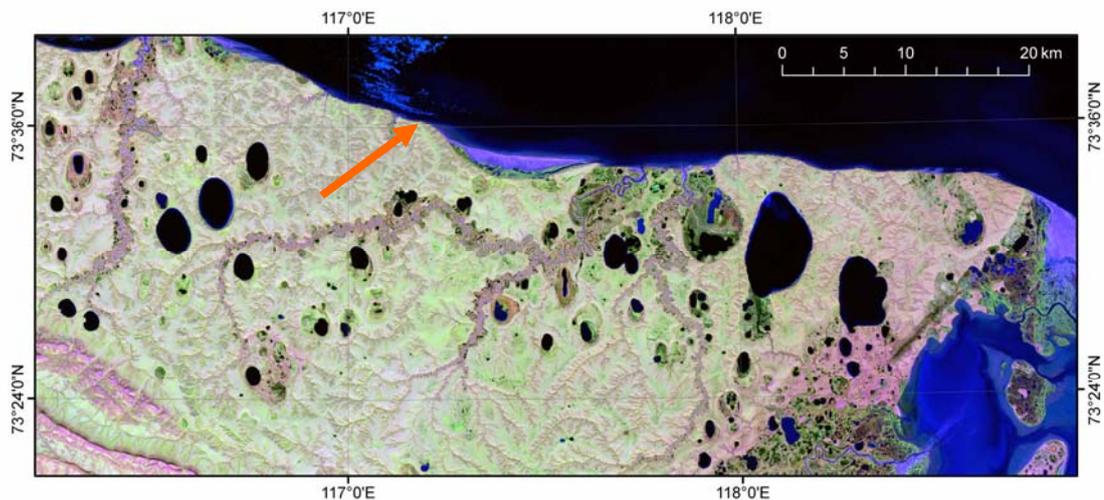


Abb. 3-5 : Satelliten-Bild von Kap Mamontovy Klyk (Landsat-7 ETM, G.Grosse)

Das Kap Mamontovy Klyk liegt in der Zone der subarktischen Tundra. Die Winter sind lang und hart und die Sommer kurz und kalt. Die mittlere Jahrestemperatur liegt bei -14°C . Im Winter beträgt die mittlere Lufttemperatur ca. -22°C , wobei es Minima von -35°C und darunter geben kann. Die mittlere Sommertemperatur liegt zwischen $+5^{\circ}\text{C}$ bis $+10^{\circ}\text{C}$. Die mittlere Niederschlagsmenge beträgt ungefähr 250 mm im Jahr, wobei der größte Teil als Regen im Sommer fällt.

3.5 Lage der Untersuchungsstandorte

Für die Untersuchung der Diversität der methanogenen Gemeinschaft wurden drei Standorte, die sich hinsichtlich der Vegetation und ihrer Lage im Gelände unterschieden, beprobt. Zwei der Untersuchungsstandorte lagen auf der Insel Samoylov, die dritte Probenreihe stammt aus dem Gebiet Kap Mamontovy Klyk, westlich des Lena-Deltas gelegen. Im Rahmen der russisch-deutschen Cooperation SYSTEM LAPTEV SEA 2000 wurden im Jahr 2002 Bodenproben von der Insel Samoylov für mikrobiologische und geochemische Untersuchungen genommen. Der erste Probenstandort ist ein typisches Low-Center-Polygonzentrum und ist durch einen hohen organischen Anteil (*Sphagnum*, *Carex*-Wurzeln) und einen hohen Wasserstand mit ausgedehnten anoxischen Verhältnissen gekennzeichnet. Der Boden wurde als *Typic Historthel* klassifiziert. Die vorherrschenden Pflanzen waren *Carex* spp. und Moose. Der zweite Probenstandort lag in einer Abflussrinne der Überschwemmungsebene im Nordwesten der Insel und ist durch die alljährliche Überflutung, feinsandige Sedimentablagerungen und einen ebenfalls hohen Grundwasserstand, und daraus resultierenden anoxischen Verhältnissen, gekennzeichnet. Der Boden wurde als *Typic Aquorthel* (Permafrost-Auengley) definiert. Die Vegetation dieses Untersuchungsstandortes war im Wesentlichen durch das Vorhandensein einer Süßgrasart (*Arctophila fulva*) geprägt.

Der Standort Kap Mamontovy Klyk wurde im Jahr 2003 im Rahmen der Expedition LENA-ANABAR 2003 beprobt. Der Probenstandort lag in einer kleinen Low-Center-Polygonebene nahe dem Ostufer des Flusses Nuchcha Dzhielo ($73^{\circ}36'N$, $117^{\circ}20'O$). Hier handelte es sich ebenfalls um ein Polygonzentrum, wobei das Probenmaterial einen deutlichen Unterschied zu dem Polygon auf der Insel Samoylov aufwies. Der Torf im Oberboden ist stärker zersetzt und vor allem in den unteren Lagen des Profils sind deutliche Sedimenteintragerungen vorhanden. Hier wuchsen vor allem *Eriophorum* spp., *Carex* spp. und, neben Süßgräsern, auch Moose.

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Probenmaterial und Aufbereitung

4.1.1 Bodenproben der Insel Samoylov und Kap Mamontovy Klyk

Das Untersuchungsmaterial der vorliegenden Arbeit waren Bodenproben aus der nordsibirischen Tundra, die von drei verschiedenen Standorten stammten. Zwei der Standorte lagen auf der Insel Samoylov, das dritte Profil stammte vom Kap Mamontovy Klyk.

An den genommenen Bodenproben wurden verschiedene bodenmikrobiologische und molekular-ökologische Analysen durchgeführt. Dies waren die Bestimmung der Methanaktivitäten in Abhängigkeit von Temperatur und Substrat, sowie die Untersuchung der Diversität der drei Untersuchungsstandorte mit Hilfe der denaturierenden Gradienten Gelelektrophorese. Die Proben des ersten Profils stammten aus einem von KUTZBACH (2000) untersuchten und beschriebenen Profil eines *Typic Historthel* (nach SOIL SURVEY STUFF, 1998) eines Polygonzentrums der Insel Samoylov. Die Probennahme wurde Anfang August 2002 im Rahmen der Expedition LENA 2002 durchgeführt (WAGNER et al., 2003). Ebenfalls im Rahmen dieser Expedition wurden Proben eines zweiten Profils genommen, das in einer Überschwemmungsebene im nördlichen Teil der Insel lokalisiert war. Dieses Profil eines *Typic Aquorthel* wurde bereits Mitte Juli beprobt. Im Rahmen der Expedition Lena-Anabar 2003 wurden Bodenproben eines Polygonzentrums (*Typic Aquiturbel*), in einer kleinen Ebene am Ostufer des Flusses Nuchcha Dzhiel (Kap Mamontovy Klyk) liegend, genommen. Alle Proben für die bodenmikrobiologischen und molekularbiologischen Analysen wurden luftdicht in NALGENE[®]-Gefäße in gefrorenem Zustand transportiert.

4.1.2 Anreicherungskulturen

Für die Anreicherungskulturen wurden 2 g homogenisiertes Bodenmaterial in einer Glove-Box (Meintrup DWS) in 120 ml Serumflaschen eingewogen, mit einem Butyl-Stopfen gasdicht verschlossen und mit einer Bördelkappe fixiert. Anschließend wurden 25 ml OCM-Medium über eine Kanüle dazugegeben,

die Proben mit Methanol bzw. Formiat (Endkonzentration 0,2, 2,0 und 20 mM) und einer Salzlösung (Endkonzentration 50 mM NaCl) versetzt und bei 18°C inkubiert.

4.1.3 Reinkulturen

Folgende Reinkulturen methanogener Archaeen wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) bezogen: *Methanosarcina barkeri* (DSMZ 8687), *Methanosarcina baltica* (DSMZ 14042), *Methanogenium frigidum* (DSMZ 16458), *Methanogenium marinum* (DSMZ 15558) und *Methanococcoides burtonii* (DSMZ 6242). Alle Archaeen wurden als aktiv wachsende Kultur geliefert und nach Ankunft in EM- bzw. MS-Medium (Kapitel 4.2.2) überimpft. Dazu wurde 1 ml Zellsuspension mittels Kanüle in 50 ml Medium überführt und unter den in Tabelle 4-1 beschriebenen Bedingungen inkubiert.

Tabelle 4-1: Inkubationsbedingungen der Reinkulturen

Reinkultur (DSMZ No.)	Medium	Inkubationstemperatur	Substrat
<i>Methanosarcina barkeri</i> (8687)	MS	28°C	20 mM Methanol
<i>Methanosarcina baltica</i> (14042)	EM	18°C	20 mM Methanol + 1 bar H ₂ /CO ₂
<i>Methanogenium frigidum</i> (16458)	EM	15°C	1 bar H ₂ /CO ₂
<i>Methanogenium marinum</i> (15558)	EM	18°C	1 bar H ₂ /CO ₂
<i>Methanococcoides burtonii</i> (6242)	EM	18°C	7 mM Trimethylamin (TMA)

4.2 Nährmedien

Die Chemikalien der verwendeten Nährmedien wurden, soweit nicht anders gekennzeichnet, bei der Firma Merck bestellt. Alle Lösungen wurden für 30 min bei 121°C im Dampfautoklaven sterilisiert. Das Medium der Anreicherung wurde in abgewandelter Form nach BOONE et al. (1989) zubereitet, während die Medien der Reinkulturen modifiziert nach der American Type Culture Collection (ATCC) angefertigt wurden.

4.2.1 Medium für die Anreicherung methanogener Archaeen

OCM-Medium nach Boone et al. (1989), modifiziert

Hefeextrakt	1,0 g
Trypticase Peptone (BD)	1,0 g
Mercaptoethansulfonsäure	0,75 g
Lösung A für OCM	15,0 ml
Spurenelement-Lösung OCM	15,0 ml
Resazurin-Lösung	3,0 ml
Aqua deion.	1380 ml

Alles wurde im Widdelkolben vereinigt, bei 121°C 15 min im Dampfdruckautoklaven sterilisiert und unter N₂/CO₂-Begasung (80:20 v/v) abgekühlt.

Anschließend wurde hinzugefügt:

Lösung B für OCM	3,0 ml
NaHCO ₃ -Lösung (8%)	69,0 ml
Na ₂ S-Lösung	15,0 ml

Nach Entfärben des Indikators und Einstellen des pH-Wertes auf 7,2 wurde das Medium unter N₂/CO₂-Begasung in die mit Bodenmaterial vorbereiteten Serumflaschen abgefüllt.

Lösung A

NH ₄ CL	100 g
MgCl ₂ * 6 H ₂ O	100 g
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	40 g
Aqua deion.	1000 ml
mit HCl auf pH 4 einstellen	

Lösung B

KH ₂ PO ₄ * 3H ₂ O	200 g
Aqua deion.	500 ml

Resazurin-Lösung

Resazurin	0,5 g
Aqua deion.	500 ml

Spurenelement-Lösung

EDTA	500 mg
CoCl ₂ * 6 H ₂ O	150 mg
MnCl ₂ * 4 H ₂ O	100 mg
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	100 mg
ZnCl ₂	100 mg
Na ₂ WO ₄ * 2 H ₂ O	30 mg
CuCl ₂ * 2 H ₂ O	35 mg
NiCl ₂ * 6 H ₂ O	30 mg
Na ₂ SeO ₃ * 5 H ₂ O	20 mg
H ₃ BO ₃	10 mg
Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O	10 mg
Aqua deion.	ad 1000 ml

mit HCl auf pH 3 einstellen

Salzlösung (5fach)

NaCl	131,49 g
MgCl ₂ * 6 H ₂ O	159,11 g
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	9,91 g

4.2.2 Medien für die Reinkulturen

Für die Reinkulturen wurden zwei Medien verwendet. *Methanosarcina baltica* (DSMZ 14042), *Methanogenium marinum* (DSMZ 15558), *Methanogenium frigidum* (DSMZ 16458) und *Methanococcoides burtonii* (DSMZ 6242) wurden in Medium für estuarine methanogene Archaeen (EM-Medium ATCC 1343) angezogen, während für *Methanosarcina barkeri* (DSMZ 8687) ein spezielles Medium (MS-Medium ATCC 1043) genutzt wurde.

EM-Medium 1343

Komplette Salzlösung	500 ml
Wolfe´s Mineralsalz-Lösung	10 ml
Hefeextrakt	2,0 g
Trypticase BD)	2,0 g
Na-Acetat (25%)	5,0 ml
Fe(NH ₄) ₂ SO ₄ (0,2%)	1,0 ml
NaCl	9,0 g
Resazurin-Lösung	1,0 ml
Aqua deion.	400 ml

Alles wurde im Widdelkolben vereinigt, bei 121°C 15 min im Dampfdruckautoklaven sterilisiert und unter N₂/CO₂-Begasung (80:20 v/v) abgekühlt.

Anschließend wurde hinzugefügt:

Wolfe´s Vitaminlösung (sterilfiltriert)	10 ml
NaHCO ₃	2,0 g
Cystein-Na ₂ S-Lösung	40 ml

Nach Entfärben des Indikators und Einstellen des pH-Wertes auf 7,0 wurde das Medium unter N₂/CO₂-Begasung in anaerobe, sterile Serumflaschen abgefüllt.

Komplette Salzlösung

KCl	0,67 g
MgC ₁₂ * 6 H ₂ O	5,50 g
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	6,90 g
NH ₄ Cl	0,50 g
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	0,28 g
K ₂ HPO ₄	0,28 g
Aqua deion.	ad 1000 ml

Cystein-Na₂S-Lösung

330 ml Aqua deion. und 30 ml NaOH (4 g in 100ml) wurde in einem 500 ml Rundkolben unter N₂-Begasung zum Sieden gebracht. 5 g L-Cystein * HCl wurden zugegeben und gelöst. Danach wurden 40 ml Na₂S-Lösung (5 g in 40 ml Aqua deion.) zugegeben, erneut mit N₂ begast und in 25 ml Serumflaschen abgefüllt. Mit einem Butylstopfen wurde die Flasche verschlossen und dieser mit einer Bördelkappe fixiert.

Wolfe´s Mineralsalz-Lösung

1,5 g Nitritriessigsäure in 500 ml Aqua deion. lösen, pH 6,5 mit KOH einstellen

FeSO ₄ * 7 H ₂ O	0,10 g
CoCl ₂ * 6 H ₂ O	0,10 g
MnSO ₄ * 4 H ₂ O	0,50 g
Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O	0,01 g
ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	0,10 g
H ₃ BO ₃	0,01 g
CuSO ₄ * 5 H ₂ O	0,01 g
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	3,00 g
Aqua deion.	ad 1000 ml

Wolfe´s Vitaminlösung

Biotin	2,0 mg
Folsäure	2,0 mg
Pyridoxinhydrochlorid	10 mg
Thiamin * HCl	5,0 mg
Nicotinsäure	5,0 mg
Calcium D-(+)pantothenat	5,0 mg
Cobalamin	0,1 mg
p-Aminobenzoessäure	5,0 mg
Liponsäure	5,0 mg
Aqua deion.	ad 1000 ml

MS-Medium 1043

K ₂ HPO ₄	348 mg
NH ₄ Cl	500 mg

MgSO ₄ * 7 H ₂ O	500 mg
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	250 mg
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	2,0 mg
Hefeextrakt	2,0 g
Casiton	2,0 g
NaCl	2,25 g
Spurenelement-Lösung SL-6	3,0 ml
Resazurin-Lösung	4,0 ml
Aqua deion.	ad 1000 ml

Alles wurde im Widdelkolben vereinigt, bei 121°C 15 min im Dampfdruckautoklaven sterilisiert und unter N₂/CO₂-Begasung (80:20 v/v) abgekühlt.

Anschließend wurde hinzugefügt:

Wolfe´s Vitaminlösung (sterilfiltriert)	10 ml
NaHCO ₃ (steril)	20 ml (850 mg in 20 ml Aqua deion. lösen)
KH ₂ PO ₄ (steril)	20 ml (227 mg in 20 ml Aqua deion. lösen)
Cystein-Na ₂ S-Lösung	20 ml

Nach Entfärben des Indikators und Einstellen des pH-Wertes auf 6,8 wurde das Medium unter N₂/CO₂-Begasung in anaerobe, sterile Serumflaschen abgefüllt.

Cystein-Na₂S-Lösung

300 mg L-Cystein HCl * H₂O bzw. 300 mg Na₂S * 9 H₂O wurden in 10 ml Aqua deion. in einer 25 ml Serumflasche gelöst. Die Flaschen wurden mit einem Butyl-Stopfen verschlossen, dieser mit einer Bördelkappe fixiert, anschließend mit N₂ begast und 15 min bei 121°C autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurden beide Lösungen unter N₂-Begasung vereinigt.

Wolfe´s Vitaminlösung

siehe EM-Medium 1343

Spurenelement-Lösung SL-6

ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	0,10 g
MnCl ₂ * 4 H ₂ O	0,03 g
H ₃ BO ₃	0,30 g
CoCl ₂ * 6 H ₂ O	0,20 g
CuCl ₂ * 2 H ₂ O	0,01 g
NiCl ₂ * 6 H ₂ O	0,02 g
Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O	0,03 g
Aqua deion.	ad 1000 ml

4.3 Bodenmikrobiologische Analysen

4.3.1 Bestimmung der Methanbildungsaktivitäten

Die Methanbildungsaktivität wurde sowohl in Abhängigkeit der Temperatur als auch des Substrates (kein Substrat, H₂/CO₂, Methanol) bestimmt. Dies wurde mit drei Parallelen je Horizont und Substrat für das gesamte Bodenprofil der drei Untersuchungsstandorte durchgeführt.

In einer Glove-Box (Meintrup DWS) wurden 5 g bzw. 10 g homogenisiertes Bodenmaterial in 15 ml bzw. 30 ml Serumflaschen überführt und mit 1,5 ml bzw. 3,0 ml sterilem Leitungswasser versetzt. Die Flaschen wurden mit einem sterilen Butyl-Stopfen gasdicht verschlossen und mit einer Bördelkappe fixiert. Den Proben, die mit Methanol inkubiert werden sollten, wurde das Substrat (20 mM) über eine Kanüle zugegeben. Nach kräftigem Schütteln (20s, Vortex) wurden alle Proben wiederholt über eine Kanüle mittels Wasserstrahlpumpe (1 min) entgast und anschließend mit N₂/CO₂ (80:20 v/v) im Durchfluss (1 min) begast. Proben mit H₂/CO₂ als Substrat wurden dann beim zweiten Mal mit H₂/CO₂ (80:20 v/v) statt mit N₂/CO₂ begast. Die Methanbildung wurde für alle Proben bei einer Inkubation von 5°C und 18°C im Verlauf einer Woche gemessen.

Innerhalb eines Zeitraumes von 0-200 Stunden wurde mehrmals der Methangehalt im Gasraum der Serumflaschen gemessen. Die Gasproben wurden dabei mit einer gasdichten Spritze (Hamilton 1750 LT, 500µl) durch den Butyl-Stopfen entnommen und an einem Gaschromatographen (Agilent 6890, Fa. Agilent Technologies) analysiert. Die Berechnung der

Methanbildung erfolgte aus dem linearen Anstieg der Methankonzentration. Die Probe wurde nach Beendigung des Versuchs getrocknet und die Werte auf das Trockengewicht der Probe bezogen.

4.3.2 Gasanalytik

Die Gasanalytik wurde im Labor an einem Gaschromatographen der Fa. Agilent Technologies (Serie Agilent, 6890) durchgeführt. Die Auftrennung der Gase erfolgte in einer Carbonplot-Säule (\varnothing 0,52 mm, Länge: 30 m) bei einem Gasfluss von 30 ml/ min. Die Methangehalte wurden mit einem Flammenionisationsdetektor (FID) gemessen. Die Temperatur des Detektors lag bei 250°C, die des Ofens und des Injektors bei jeweils 45°C. Als Trägergas diente Helium.

4.4 Molekularbiologische Methoden

4.4.1 Lösungen und Puffer

Folgende Lösungen und Puffer wurden im Rahmen der DNA-Extraktion bzw. der PCR und DGGE genutzt:

50 x TAE-Puffer (Techne AG) für Agarose- und Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zusammensetzung der 1x Pufferlösung (laut Hersteller)

Tris-Acetat	0,004 M Tris-Acetat
	0,001 M EDTA
	pH 8,0

Agarosegel 0,8% bzw. 2,0%

1x TAE-Puffer	60 ml
Agarose (Bio-Rad)	0,48 bzw. 1,20 g

10x Ladepuffer für Agarosegele

Glycerol (Sigma)	50%
Bromphenolblau (Sigma)	0,25%
Xylencyanol FF (Sigma)	0,25%
in 1x TAE-Puffer	

Die Lösung wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert.

SYBR Gold-Färbelösung

SYBR Gold (Molecular Probes)	5 µl
1x TAE-Puffer	50 ml

Die Färbelösung wurde bei 4°C in einem lichtdichten Behälter gelagert.

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion wurden 16S rDNA-Fragmente für die weiteren Untersuchungen spezifisch amplifiziert. Die Reaktion erfolgte in einem Thermocycler der Firma Bio-Rad Laboratories (iCycler). Der Reaktionsansatz betrug 50 µl in einem 200 µl PCR-Tube (Bio-Rad).

PCR-Reaktionsgemisch:

10 x PCR-Puffer (Qiagen)	5,0 µl
dNTP-Mix (SERVA, 10 mM/ Nukleotid)	1,25 µl
MgCl ₂ -Lösung (Qiagen, 25 mM)	2,0 µl
Primer GC_357F (TIB-Molbiol, 20 µM)	1,0 µl
Primer 0691R (TIB-Molbiol, 20 µM)	1,0 µl
genomische DNA (= Template)	variabel
HotStar Taq-Polymerase (Qiagen, 5U/ µl)	0,5 µl
PCR-Wasser (SERVA)	ad 50 µl

Denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE)

Mit der DGGE ist es möglich, Sequenzunterschiede der 16S rDNA von Mikroorganismen anhand der unterschiedlichen Schmelzeigenschaften darzustellen. Dazu wurden die in der PCR amplifizierten DNA-Fragmente auf ein Polyacrylamidgel mit einem denaturierenden Harnstoff-Formamid-Gradienten aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Mit Hilfe eines Gradientenmischers (Techne AG) und einer Schlauchpumpe (Ismatec, IPS 8) wurde ein 8%iges Polyacrylamidgel mit einem denaturierenden Harnstoff-Formamid-Gradienten von 30-60% gegossen.

0% denaturierende Lösung (Stammlösung 1)

Acrylamid/ Bis-Lösung, 37,5:1 (40% w/v) (SERVA)	20 ml
50x TAE-Puffer	2 ml
Aqua deion.	78 ml

100% denaturierende Lösung (Stammlösung 2)

Acrylamid/ Bis-Lösung, 37,5:1 (40% w/v) (SERVA)	20 ml
50x TAE-Puffer	2 ml
Formamid (SERVA), deionisiert	40 ml
Harnstoff	42 g
Aqua deion.	ad 100 ml

Beide Lösungen wurden 10 min entgast. Ausgefällener Harnstoff wurde durch Erwärmen und Rühren wieder gelöst. Die fertigen Lösungen konnten für etwa einen Monat bei 4°C im Dunkeln gelagert werden.

Durch das Mischen der beiden Lösungen ließ sich der benötigte Gradient herstellen. Für die zu untersuchenden Proben wurde ein denaturierender Gradient von 30-60% gewählt.

Harnstoff-Formamid-Gehalt 30%

Stammlösung 1	10,5 ml
Stammlösung 2	4,5 ml

Harnstoff-Formamid-Gradient 60%

Stammlösung 1	6 ml
Stammlösung 2	9 ml

Beide Lösungen wurden jeweils in einem Plastik-Röhrchen gründlich vermischt und mit Hilfe des Gradientenmischers und der Schlauchpumpe wurde ein linearer Harnstoff-Formamid-Gradient gegossen. Die Polymerisierung des Polyacrylamidgels erfolgte durch die Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS) und N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) und war nach etwa einer Stunde abgeschlossen.

Ammoniumpersulfat (APS) 10%

Ammoniumpersulfat (SERVA)	0,1 g
MilliQ-Wasser	1,0 ml

Die Lösung wurde bei -20°C für etwa eine Woche gelagert.

TEMED wurde von der Fa. SERVA bezogen und bei Raumtemperatur gelagert.

Vor dem Auftragen auf das Polyacrylamidgel wurden alle Proben mit 2 x DGGE-Ladepuffer vermischt.

DGGE-Ladepuffer (2fach)

2 % Bromphenolblau	0,25 ml
2% Xylencyanol FF	0,25 ml
Glycerol	7,0 ml
Aqua deion.	2,5 ml

Der DGGE-Ladepuffer wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert.

4.4.2 DNA-Extraktion

Die genomische DNA aus den Bodenproben und den Rein- bzw. Anreicherungskulturen wurde unter Verwendung des UltraClean™ Soil DNA Kit der Firma MO BIO Laboratories, Inc. nach Protokoll des Herstellers extrahiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte hierbei sowohl chemisch als auch physikalisch, die Aufreinigung und Konzentration der genomischen DNA geschah über eine Filtermembran.

Für die Extraktion der DNA aus den Reinkulturen und der Anreicherung wurden 5 ml Zellsuspension in einer Zentrifuge (Heraeus, Biofuge) für 10 min bei 8000 g zentrifugiert und die Zellen in vorbereitete 2 ml Reaktionsgefäße überführt. Vom Bodenmaterial wurden in der Glove-Box 0,75 g direkt in die 2 ml Reaktionsgefäße eingewogen und anschließend wie die Rein- bzw. Anreicherungskulturen behandelt.

Überprüfung der DNA-Extraktion

Der Erfolg der DNA-Extraktion wurde in einer Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Eine Agarosekonzentration von 0,8% wurde für die Separation der

DNA gewählt. In einem Erlenmeyerkolben wurde die Agarose (Biorad) in 1x TAE-Puffer gelöst, in einer Mikrowelle erhitzt und in einem Wasserbad auf 50°C abgekühlt. Danach wurde die flüssige Agarose in einen horizontalen Gelträger (Biorad, Wide Mini Subcell) gegossen, der mit einem Probenkamm bestückt war. Nach 30 min war das Gel ausgehärtet. Der Träger mit dem Agarosegel wurde in die Elektrophoresekammer platziert und 550 ml 1x TAE-Puffer wurde dazu gegeben. Nachdem der Probenkamm entnommen wurde, konnten die Geltaschen mit den Proben beladen werden. Dazu wurden vorher 5 µl Probe mit 0,5 µl 10x Ladepuffer vermischt. Als Mengen- und Größenreferenz diente bei jeder Elektrophorese ein DNA-Marker (Serva, EcoRI/ HindIII digested λ DNA). Die Auftrennung erfolgte für 60 bzw. 90 min bei 70 V (Biorad, PowerPac Basic).

Für die visuelle Detektion der DNA-Banden wurde das Gel in einer SYBR Gold-Lösung (Molecular Probes) für 30 min gefärbt. Das Gel wurde dann unter UV-Licht betrachtet und fotografisch dokumentiert (Syngene, GeneFlash).

Anhand der Bandenintensitäten im Gel konnte abgeschätzt werden, wieviel DNA-Extrakt für die anschließende PCR eingesetzt werden musste. Der DNA-Marker bestand aus 12 Banden, die folgende Größen besaßen: 21.226 bp, 5.148 bp, 4.973 bp, 4.268 bp, 3.530 bp, 2.027 bp, 1.904 bp, 1.584 bp, 1.375 bp, 947 bp, 831 bp und 564 bp.

Die genomische DNA sollte dabei etwa auf Höhe des größten Fragments laufen.

4.4.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

In einer PCR wird ein definiertes DNA-Fragment, in diesem Falle das des 16S rDNA-Gens, in einem automatisierten Ablauf um ein Vielfaches amplifiziert. Dabei kommt es durch Temperaturerhöhung zur Denaturierung der doppelsträngigen DNA. Nach Abkühlung auf eine bestimmte Temperatur lagern sich am 5´- und 3´- Ende des zu amplifizierenden Bereiches der DNA spezifisch bindende Oligonukleotide (Primer) an. Die Verlängerung der Primer geschieht durch den Einsatz einer hitzestabilen DNA-abhängigen DNA-Polymerase in Anwesenheit von Desoxynukleotidtriphosphaten

(dNTPs) und Primern im Überschuss. Dieser Zyklus wird dann meist bis zu 30mal wiederholt.

Für diese Arbeit wurde ein Primer-Set spezifisch für methanogene Archaeen verwendet (WATANABE et al., 2004). Dabei wurde das PCR-Programm aus der Literatur übernommen. Das DNA-Fragment, das mit diesen Primern amplifiziert wurde, hatte eine Größe von etwa 350 bp.

Eine sogenannte GC-Klammer am 5'-Ende des Primers 0357F sollte verhindern, dass es bei der anschließenden DGGE zu einer vollständigen Separation des Doppelstrangs in seine Einzelstränge kommt und das DNA-Fragment somit im Gel nicht detektierbar wäre (SHEFFIELD et al., 1989).

Tabelle 4-2: Bezeichnung und Sequenz der verwendeten Primer

Primer	Sequenz	<i>E. coli</i> Position
0357F (forward)	5' -CCC TAC GGG GCG CAG CAG- 3'	340-357
0691R (reverse)	5' -GGA TTA CAR GAT TTC AC- 3'	707-691
GC-Klammer	5' -CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G- 3'	

Die PCR-Reaktion wurde wie folgt programmiert:

Zyklus 1: (1x)	Schritt 1:	94°C	10 min (Denaturierung)
Zyklus 2: (35x)	Schritt 1:	94°C	1 min (Denaturierung)
	Schritt 2:	53°C	1 min (Reassoziation)
	Schritt 3:	72°C	2 min (Elongation)
Zyklus 3: (1x)	Schritt 1:	72°C	8 min (Elongation)

Überprüfung der PCR-Produkte

Die Amplifikate wurden in einem 2%igen Agarosegel auf die richtige Größe und Konzentration überprüft. Die Herstellung des Gels wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt. Als DNA-Standard wurde eine DNA-Leiter (SERVA, DNA Standard 100 bp ladder equalized) verwendet. Die DNA-Leiter

bildete 11 distinkte Banden, die 1.000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 150 und 100 bp entsprachen.

Für die Überprüfung auf dem Agarosegel wurden 5 µl Amplifikat mit 0,5 µl 10x Ladepuffer gemischt und aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 70 V für 60 bzw. 90 min. Das Gel wurde anschließend für 30 min in einer SYBR Gold-Lösung gefärbt und unter UV-Licht analysiert und photographisch dokumentiert (Syngene, GeneFlash).

4.4.4 Denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE)

Mit Hilfe der DGGE ist es möglich, die Diversität von mikrobiellen Gemeinschaften zu untersuchen. Dabei macht man sich das sequenzabhängige Schmelzverhalten von DNA-Fragmenten zu Nutze, die mittels PCR spezifisch amplifiziert wurden.

Für die DGGE wurde ein Gerät der Fa. Bio-Rad (DCode System) verwendet. Die Konzentration des denaturierenden Gradienten reichte von 30-60%. Nach Zugabe von 50 µl APS und 25 µl TEMED wurden beide Acrylamidlösungen in einen Gradientenmischer überführt und über eine Schlauchpumpe ein vertikales Gel (Dicke: 1 mm, Gelkamm: 16 Taschen) gegossen. Nach 2 h war das Gel auspolymerisiert. Das Gel wurde 10 min vor Auftragen der Proben in die auf 60°C temperierte Pufferkammer eingesetzt. Anschließend wurden die Geltaschen mit 1x TAE-Puffer gespült. Durch die Überprüfung der PCR im Agarosegel konnte die Menge an Produkt abgeschätzt werden, um eine ähnliche DNA-Menge je Probe auf das DGGE-Gel aufzutragen. In Abhängigkeit von der PCR wurden 3-20 µl Amplifikat eingesetzt, mit der gleicher Menge 2x DGGE-Ladepuffer vermischt und mittels Gel-Ladespitzen (Bio-Rad) auf das Gel aufgetragen. Anschließend erfolgte die Elektrophorese bei 100 V Spannung für 14 h über Nacht.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde die obere Glasplatte vorsichtig entfernt. Das Gel wurde mit SYBR Gold-Lösung bedeckt und für 20-30 min im Dunkeln gefärbt. Anschließend wurde das Gel unter UV-Licht analysiert und photographisch dokumentiert.

4.4.5 Sequenzierung und Datenbank-Suche

Für eine weitere Betrachtung der Diversität wurden einige der DNA-Banden aus den DGGE-Gelen sequenziert. Dazu wurden diese aus dem Gel geschnitten und die DNA in 30 µl Aqua deion. bei 4°C über Nacht eluiert. Nach einer anschließenden PCR wurde in einem weiteren DGGE-Lauf überprüft, ob es sich um eine Einzelbande handelte. Distinkte Banden wurde ausgeschnitten und in einer PCR unter Verwendung der Primer ohne GC-Klammer amplifiziert. Die 16S rDNA-Fragmente wurden abschließend von der AGOWA GmbH sequenziert.

Die erhaltenen Sequenzdaten wurden in eine Internetdatenbank des European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk>) eingegeben und unter Verwendung des Programms FASTA mit allen in den Datenbanken vorhandenen prokaryotischen DNA-Sequenzen verglichen. Dieses Programm sucht dabei nach Regionen mit Ähnlichkeiten zwischen den Sequenzen und berechnet die Signifikanz der Übereinstimmungen. Außerdem wurden die Sequenzen mit Hilfe des ARB-Programms (<http://www.arb-home.de>) in einen phylogenetischen Stammbaum integriert.

4.5 Fremddaten

Tabelle 4-3 wurde LIEBNER (2003) entnommen. Es stellt die Profilbeschreibung eines *Typic Historthel* der Insel Samoylov dar. Weitere Informationen zu Bodenchemie und Bodenphysik sind KUTZBACH (2000) zu entnehmen.

Tabelle 4-4 wurde ebenfalls LIEBNER (2003) entnommen. Es stellt die Profilbeschreibung eines *Typic Aquorthel* der Insel Samoylov dar. Weitere Informationen zur Bodenchemie und Bodenphysik sind LIEBNER (2003) zu entnehmen.

Die Daten zum Profil des *Typic Aquiturbel* eines Polygonzentrums vom Kap Mamontovy Klyk wurden von Frau U. Zimmermann erhoben.

Tabelle 4-3: Profilbeschreibung des *Typic Historthel* (Tundra-Moorgley; nach KUTZBACH 2000)

Ort: Samoylov, Lena-Delta		Datum der Profilaufnahme: 22.08.1999	
Koordinaten: 72° 22,2'N, 126° 28,5'O		Geländehöhe: 12,3 m über dem Meeresspiegel	
Lage im Gelände: Zentrum eines Low-Centre-Polygons			
Substrat: Flacher Laubmoostorf über Fluvisand (aus Deltasand) -og-Hf-s(GF). Flugsandbänder - a-s(Sa)			
Permafrosttiefe: 31 cm		Tiefe des Wasserspiegels: 5 cm unter GOF	
Bemerkungen: keine Kryoturbationsmerkmale, Sedimentlagen-Grenzen waagrecht und ungestört. Im gesamten Profil kein CaCO ₃			
Horizontbezeichnung		Tiefe (cm)	Eigenschaften
H	Oi	0-11	schwach zersetzter Laubmoostorf und lebende Moose
Gr-Aa	A	11-26	feinsandiger Mittelsand (mSfs), bräunlich-schwarz (10 YR 2/2), anmoorig (h6), Carex-Wurzelfilz (w6), kein Gefüge erkennbar, hoher Anteil schwach zersetzter organischer Substanz
Gr	Bg	26-31	feinsandiger Mittelsand (mSfs), Horizont entspricht mächtigem Sandband, oliv-braun (2,5 Y 4/4), mittel humos (h3), mittel durchwurzelt (w3), Einzelkorngefüge, α - α -Dipyridil-Reaktion positiv (reduziertes Fe)
P*	Bf	31-64	stark schluffiger Sand (Su3), bräunlich-schwarz (10 YR 3/2), stark humos (h4), keine Wurzeln (w0), Bänder schwach zersetzter organischer Substanz, Permafrost, Eislinsen linienförmig eingeregelt

* in der KA gibt es keine Bezeichnung für Permafrost

Tabelle 4-4: Profilbeschreibung des *Typic Aquorthel* (Permafrost-Auengley)

Ort: Samoylov, Lena-Delta		Datum der Profilaufnahme: 22.07.2002	
Koordinaten: 72° 23,11,9'N, 126° 28,54,0'O		Geländehöhe: 7,0 m über dem Meeresspiegel	
Lage im Gelände: flache Abflussrinne, Ebene			
Substrat: fluviale Auensedimente, Humusakkumulation, beginnende Gefügebildung			
Permafrosttiefe: 54 cm		Tiefe des Wasserspiegels: anstehendes Grundwasser	
Bemerkungen: Dipyridilreaktion fast im gesamten Profil positiv (reduziertes Eisen), kein CaCO ₃ im Profil			
Mittlerer Jahresniederschlag: 90 mm		Vegetation: Schachtelhalm, Wollgras	
Horizontbezeichnung		Tiefe (cm)	Eigenschaften
nach KA4	nach Soil Taxonomy(*)		
Ai	A1	0-5	einjährige Sedimentationsschicht, keine Redoxflecken schwach humos (h2), schwach durchwurzelt (w2) Kohärentgefüge, Lagerungsdichte sehr gering (LD1) gelb-graue Farbe (2,5Y3/1), sandig-lehmiger Schluff (Uls)
Ah	A2	5-9	alte Blattscheiden (2cm mächtig), Dipyridilreaktion negativ mittel humos (h3), mittelstark durchwurzelt (w3) Kohärentgefüge, geringe Lagerungsdichte (LD 1-2) gelblichgraue Farbe (2,3Y3/2), sandig-lehmiger Schluff(Uls)
Gr1	Bg1	9-18	Redoxflecken (1-2%), stark humos (h4), Wurzelfilz (w6) Kohärent-Subpolyederggefüge, geringe Lagerungsdichte grünlichgrau (5Y3/1), mittel schluffiger Sand (Su3)
Gr2	Bg2	18-20	Sandband, sehr schwach humos(h1), sehr schwach durchwurzelt (W1), Einzelkorngefüge, sehr geringe Lagerungsdichte, gelbl.grau (2,5Y3/2), mittelsandiger Feinsand(fSms)
Gr3	Bg3	20-35	Redoxflecken (1-2%), mittel humos (h3) sehr stark durchwurzelt (w5), Kohärent-Subpolyederggefüge geringe Lagerungsdichte (LD2), gelbgrau (2,5Y3/1) sandig-lehmiger Schluff (Uls)
Gr4	Bg4	35-40	schwach humos (h2), schwach durchwurzelt (w2), Kohärent-Subpolyederggef., geringe Lagerungsdichte (LD2), grünlichgrau (5Y3/1), lehmiger Schluff (Ul)
Gr5	Bg5	40-52	humusfrei (h0), sehr schwach durchwurzelt(w1), von alten organ. Bändern durchzogen, Kohärent-Subpolydergef., mittlere Lagerungsdichte (LD3), Makrogrobggefüge vorhanden, grünlichgrau (5Y3/1), mittel lehmiger Sand (Sl3)
P	Bff	>52	Permafrost, Redoxflecken (10-30%), humusfrei (h0), keine Wurzeln, Einzelkorngefüge, grüngraue Farbe Flecken gelbbraun (10YR4/6), schwach lehmiger Sand (sl2)
Soil Taxonomy:		<i>Typic Aquorthel</i>	Bodenk. KA: (Permafrost) Auengley
World Reference Base:		<i>Gleyi-Histic Cryosol (Areni-Fluvic)</i>	

(*) Symbole nach Soil Taxonomie: g-Hydromorphie, f-gefroren

5 ERGEBNISSE

5.1 Methanbildungsaktivitäten von Permafrostböden

Die Methanbildungsaktivität von Permafrostböden aus Nordsibirien wurde in Abhängigkeit von der Temperatur (5°C, 18°C) und unter verschiedenen Substratbedingungen (kein Substrat, H₂/CO₂, Methanol) für die drei verschiedenen Untersuchungsstandorte gemessen. Unterschiedliche Methanbildungsaktivitäten wurden dabei nicht nur zwischen den Standorten beobachtet, sondern auch innerhalb der Profile waren Unterschiede zu sehen (Abb. 5-1 bis 5-6).

Die Methanbildungsaktivität des Standortes Mamontovy Klyk war vor allem im torfreichen Oberboden (0 - 12 cm) sowohl bei 5°C als auch bei 18°C deutlich höher als in den darunter liegenden Horizonten (Abb. 5-1, 5-2).

Bei 5°C war die Methanbildung ohne zusätzliches Substrat in den ersten 5 cm mit 2,9 nmol CH₄ h⁻¹ g⁻¹ um das Zehnfache höher als im darunterliegenden Bodenhorizont. Ab einer Tiefe von 12 cm konnte keine Methanbildung mehr nachgewiesen werden. Bei Zugabe von H₂/CO₂ als Substrat war ein starker Anstieg der potentiellen Methanbildung in fast allen Bodenschichten zu beobachten, wobei die absoluten Werte im Oberboden mit 24 - 78 nmol CH₄ h⁻¹ g⁻¹ am höchsten waren. Im mittleren Bereich des Profils schwankte die Aktivität mit Werten von 1 - 4,5 nmol CH₄ h⁻¹ g⁻¹ in ähnlichen Größenordnungen, war jedoch deutlich geringer als im oberen Teil des Bodens. Mit Methanol als Substrat war die Methanbildung ebenfalls im Oberboden des *Typic Aquiturbels* (bis 12 cm) am höchsten, mit 4,5 - 8 nmol CH₄ h⁻¹ g⁻¹ jedoch um ein Vielfaches niedriger als mit H₂/CO₂. Die tieferliegenden Bodenhorizonte zeigten bei 5°C eine deutlich geringere Aktivität mit Werten zwischen 0,04 - 1,2 nmol CH₄ h⁻¹ g⁻¹.

Nach Inkubation bei 18°C stieg die Methanbildung im Vergleich zu den Proben bei 5°C vor allem in den oberen 12 cm des Profils deutlich an. Dies traf sowohl auf die unbehandelten Proben als auch auf die Proben mit Substratzugabe zu. Nach Substratzugabe waren die Aktivitäten mit Werten von 167 - 285 nmol CH₄ h⁻¹ g⁻¹ für H₂/CO₂ bzw. 35 - 105 nmol CH₄ h⁻¹ g⁻¹ für Methanol etwa zehnmal höher als ohne Substrat. Der mineralisch geprägte Bodenabschnitt ab einer Tiefe von 12 cm zeigte dagegen eine deutlich

geringere Methanbildung als der an organischem Kohlenstoff reiche Oberboden. Im Allgemeinen nahm die Methanbildung mit der Tiefe weiter ab. Für die naturbelassenen Proben war die Methanbildung unabhängig von der Temperatur mit Werten von 0 - 0,1 nmol CH₄ h⁻¹g⁻¹ auf einem durchgängig sehr niedrigen Niveau.

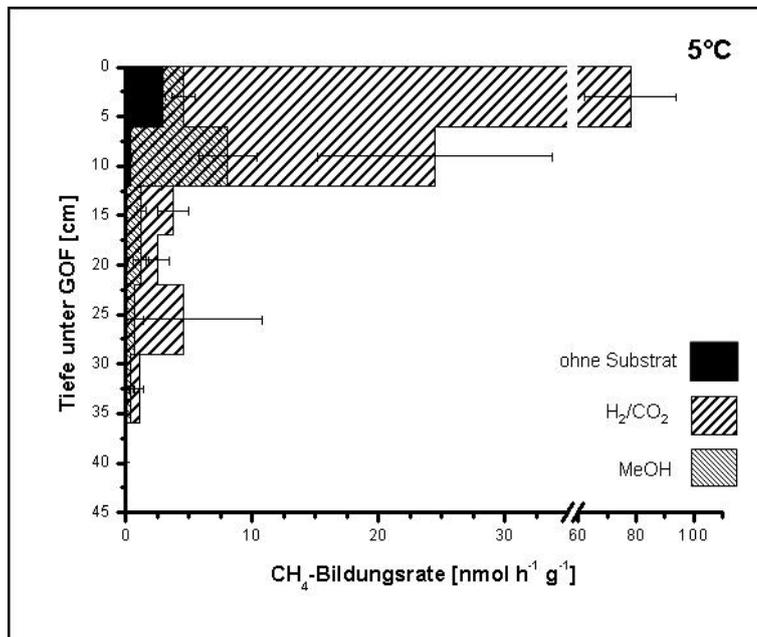


Abb. 5-1: Methanbildungsaktivität eines *Typic Aquiturbel* Kap Mamontovy Klyk bei 5°C

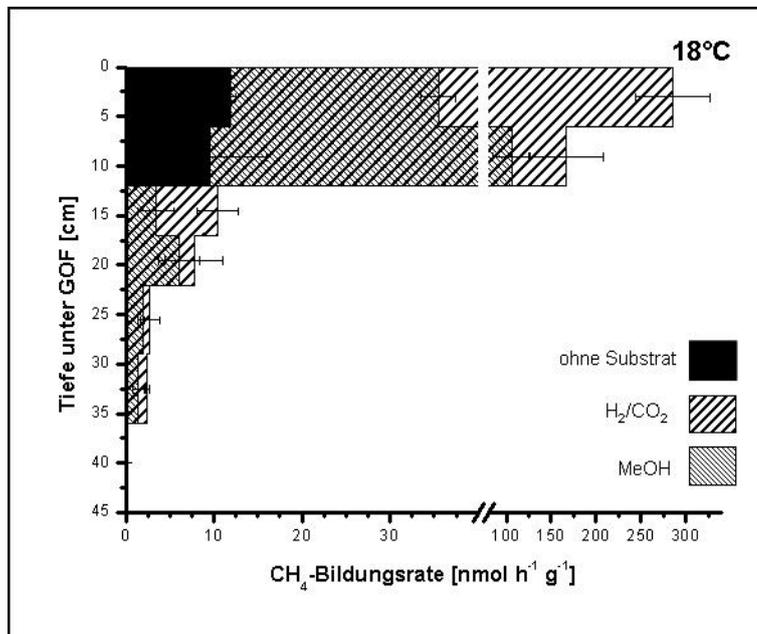


Abb. 5-2: Methanbildungsaktivität eines *Typic Aquiturbel* Kap Mamontovy Klyk bei 18°C

Mit H₂/CO₂ als Substrat zeigten die Bodenproben aus den Horizonten von 12 - 17 cm bzw. 17 - 22 cm Tiefe bei 18°C mit 10,4 nmol CH₄ h⁻¹g⁻¹ bzw. 7,8 nmol CH₄ h⁻¹g⁻¹ eine etwa dreifach höhere Methanbildungsaktivität als bei

5°C. Die Aktivität sank mit zunehmender Tiefe stetig ab und erreichte im Horizont direkt über der Permafrosttafel die niedrigsten Werte. Mit Methanol als Substrat war die Methanbildungsaktivität bei 18°C ab 12 cm ebenfalls wie bei H₂/CO₂ deutlich geringer als in den beiden obersten Bodenhorizonten. Den Diagrammen ist zu entnehmen (Abb. 5-1, 5-2), dass es bis 22 cm Tiefe dennoch zu einem leichten Anstieg auf 6,1 nmol CH₄ h⁻¹g⁻¹ kam und die Werte anschließend wieder abnahmen.

Die Ergebnisse des an organischem Kohlenstoff armen Bodens der Überschwemmungsebene zeigten dagegen ein völlig anderes Bild (Abb. 5-3 bzw. 5-4). Es gab zwei Maxima im Profil, die unter allen Inkubationsbedingungen auftraten. Das erste Maximum trat in den oberen 5 cm des *Typic Aquorthel*, die aus einer einjährigen Sedimentationsschicht gebildet wurden, auf. Ein zweites Maximum war im mittleren Teil des Profils in einer Tiefe von 20-35 cm vorhanden. Dieser Horizont war sehr stark durchwurzelt. In der obersten Bodenlage war die Methanbildung bei 5°C unter Verwendung von Methanol als Substrat mit 1,4 nmol CH₄ h⁻¹g⁻¹ Methan fast dreimal so hoch wie mit H₂/CO₂ als Substrat. Der Wert der Probe ohne Substrat lag noch deutlich unter der Aktivität mit H₂/CO₂ als Substrat und zeigte in den folgenden Horizonten und unter allen Inkubationsbedingungen eine meist deutlich niedrigere Methanbildungsaktivität. Im mittleren Bodenhorizont von 20-35 cm waren die Methanbildungsaktivitäten mit H₂/CO₂ und Methanol als Substrat etwa gleich und erreichte Werte um 1,0 nmol CH₄ h⁻¹g⁻¹. Mit Zunahme der Temperatur auf 18°C stieg auch die Methanbildungsaktivität in fast allen Horizonten an. In den oberen 5 cm war die Methanbildung unter Verwendung von Methanol als Substrat mit 43,3 nmol CH₄ h⁻¹g⁻¹ etwa 7mal so hoch wie mit H₂/CO₂ als Substrat und etwa 4 mal so hoch wie im mittleren Teil des Profils. Es kann festgehalten werden, dass bei 5°C trotz zusätzlicher Substratgabe die Werte der Methanbildung insgesamt nicht sehr stark anstiegen. Im oberen Teil des Bodens ist vor allem nach der Zugabe von Methanol eine Zunahme in der Methanbildungsaktivität zu verzeichnen, während im mittleren Bodenhorizont mit H₂/CO₂ und Methanol ähnliche Werte erreicht wurden. Diese lagen etwa doppelt so hoch wie die der Probe ohne Substrat. Bei 18°C zeigte ebenfalls der oberste Bodenbereich mit Methanol als Substrat die höchste Aktivität,

während das in der Tiefe von 20-35 cm mit H_2/CO_2 der Fall war. Es war zu beobachten, dass im oberen Horizont mit Methanol als Zusatz die Werte höher lagen als im Vergleich zum mittleren Bodenhorizont. Bei H_2/CO_2 als Substrat war das genau umgekehrt. Hier war die potentielle Methanbildung im stark durchwurzelten Bereich etwa doppelt so hoch wie mit Methanol als Substrat.

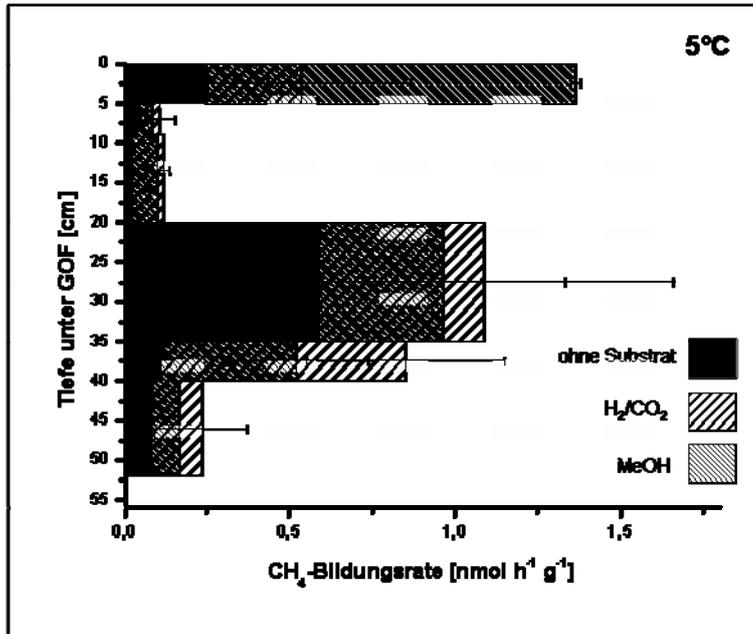


Abb. 5-3: Methanbildungsaktivität eines *Typic Aquorthel* auf der Insel Samoylov bei 5°C

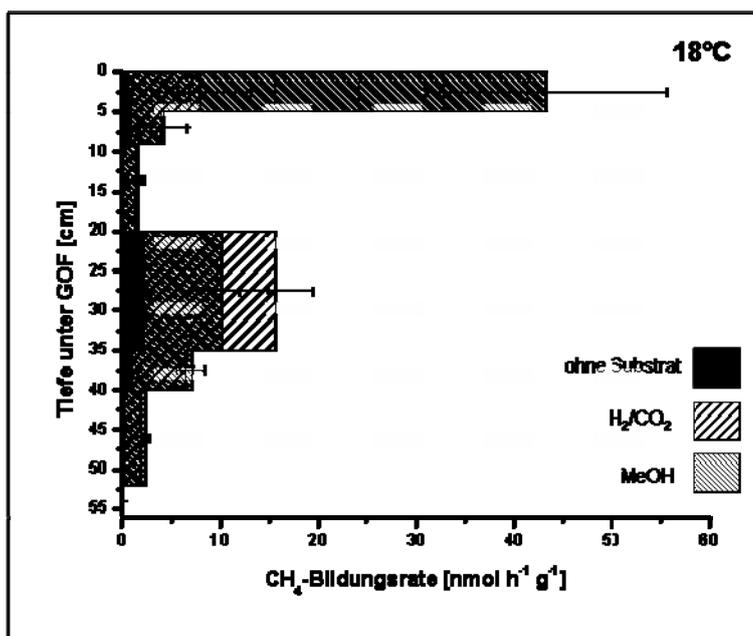


Abb. 5-4: Methanbildungsaktivität eines *Typic Aquorthel* auf der Insel Samoylov bei 18°C

Für das untersuchte Polygonzentrum auf der Insel Samoylov (Abb. 5-5 bzw. 5-6) war ebenfalls eine Zonierung der potentiellen Methanbildungsaktivität im Bodenprofil zu beobachten.

Der Bodenhorizont von 5-10 cm Tiefe zeigte ohne Substrat eine relativ hohe Methanbildungsaktivität. Diese nahm in den folgenden Horizonten zum Teil stark ab und stieg dann mit zunehmender Tiefe wieder an. Die Inkubation mit H_2/CO_2 als Substrat zeigte allerdings ein etwas anderes Bild. Bei $5^\circ C$ wurde der höchste Wert mit $3,1 \text{ nmol } CH_4 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ im obersten Horizont gemessen. Die Werte fielen zunächst um etwa das Zehnfache, stiegen aber mit zunehmender Tiefe bis auf $2,1 \text{ nmol } CH_4 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ im Horizont von 30 - 35 cm an, um dann abermals zu sinken. Hier war zu erkennen, dass das zweite Maximum in einem anderen Bodenhorizont lag und nicht wie bei den Proben ohne Substrat bzw. mit Methanol direkt über der Permafrosttafel.

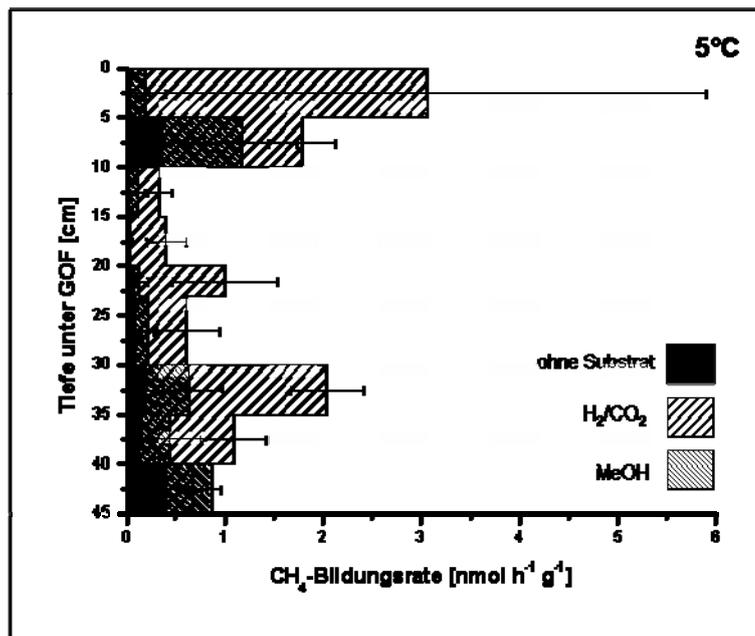


Abb. 5-5: Methanbildungsaktivität eines *Typic Historthel* auf der Insel Samoylov bei $5^\circ C$

Die Inkubation bei $18^\circ C$ zeigte ein ähnliches Bild wie bei $5^\circ C$. Mit Methanol als Substrat wurde der höchste Wert ($4,2 \text{ nmol } CH_4 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$) im untersten Horizont gemessen. Mit H_2/CO_2 als Substrat waren die Werte auch bei $18^\circ C$ höher als ohne Substrat bzw. mit Methanol. Der höchste Wert wurde bei der Bodenprobe von 5-10 cm gemessen und betrug $21,5 \text{ nmol } CH_4 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$. Im Gegensatz zur Inkubation bei $5^\circ C$ zeigte der Trend im unteren Teil des Profils mit H_2/CO_2 als Substrat ein anderes Bild. Ab 10 cm stieg die Methanbildungsaktivität von $1,9 \text{ nmol } CH_4 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ auf $6,8 \text{ nmol } CH_4 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ in

einer Tiefe von 23 cm, um im folgenden Bodenhorizont auf unter 2 nmol CH₄ h⁻¹g⁻¹ zu fallen. Zwischen 30 - 40 cm stieg die Aktivität auf Werte um 7 nmol CH₄ h⁻¹g⁻¹ und nahm im Horizont direkt über dem Permafrost um etwa die Hälfte ab.

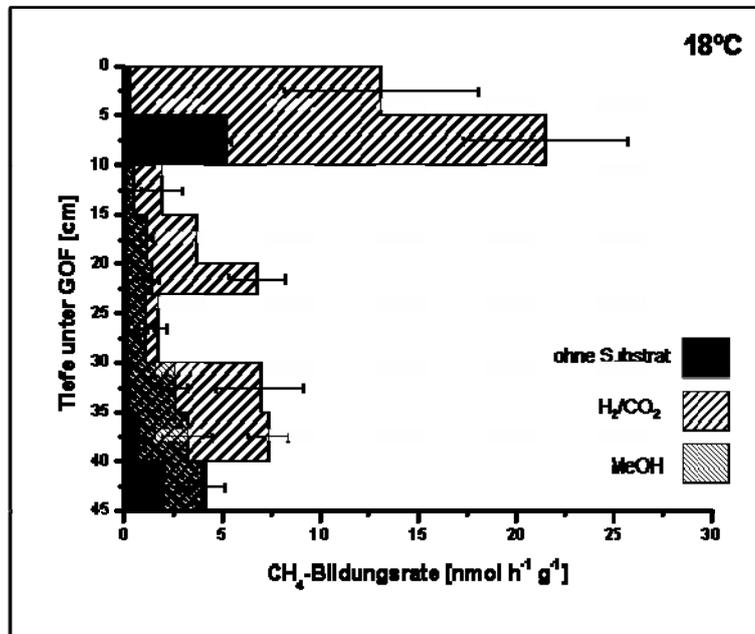


Abb. 5-6:
Methanbildungsaktivität
eines *Typic Historthel* auf
der Insel Samoylov bei
18°C

Abschließend kann gesagt werden, dass die Inkubation der Proben bei 18°C eine meist deutlich höhere Methanbildungsaktivität zeigte als bei 5°C. Der Temperaturanstieg wirkte sich dabei stärker auf die CH₄-Bildung in den oberen Bodenbereichen aus als in den tieferen Horizonten. Der Zusammenhang zwischen Temperatur und Methanbildung zeigte sich in allen Profilen. Unabhängig von Temperatur, Standort und Profiltiefe wirkte sich eine Substratgabe positiv auf die CH₄-Bildung aus. Im Allgemeinen zeigte die Inkubation mit H₂/CO₂ deutlich höhere Werte bei beiden Temperaturen als die Inkubation ohne bzw. mit Methanol als Substrat. Eine Ausnahme bildete der oberste Bodenhorizont eines Permafrost-Auengleys der Insel Samoylov. Hier war die Aktivität mit Methanol als Substrat am höchsten. Die Mikroorganismen in den Proben ohne Substratgabe zeigten dagegen eine meist deutlich geringere Aktivität im Vergleich zu den Proben mit Substrat.

5.2 Überprüfung der DNA-Extraktion

Die Beschaffenheit einer Naturprobe kann einen Einfluss auf die Menge und die Qualität an extrahierter DNA und damit auf nachfolgende molekularbiologische Versuche haben. Unterschiedliche Behandlungen der Bodenproben wurden während der DNA-Extraktion durchgeführt. Dabei wurde der Einsatz von Ultraschall und eine Variation der Aufschlusszeit getestet. Diese Tests sollten zeigen, ob dadurch mehr DNA extrahiert werden kann oder ob es Auswirkungen auf die Qualität der DNA haben kann. Die Extraktion der DNA aus den Bodenproben wurde mit Hilfe einer elektrophoretischen Auftrennung in einem 0,8%igen Agarosegel auf den Erfolg und die Qualität überprüft. Als Marker wurde ein DNA-Standard mit definierten Fragmentgrößen genutzt. Die Intensität der DNA-Leiter wurde als Anhaltspunkt für den Erfolg der Nukleinsäure-Extraktion genutzt.

An drei ausgewählten Bodenproben wurde untersucht, ob die Behandlung der Probe mit Ultraschall zu einer höheren DNA-Ausbeute bei der Extraktion führt. Es wurden Proben gewählt, die sich in ihrer Zusammensetzung optisch unterschieden. Die Probe aus 5-10 cm des Polygonzentrums der Insel Samoylov war gekennzeichnet durch eine schwache Zersetzung der Torffasern, während das verwendete Probenmaterial des Standortes Mamontovy Klyk eine wesentlich stärkere Zersetzung der Torffasern aufwies. In beiden Proben waren kaum mineralische Komponenten vorhanden. Die dritte Probe stammte aus dem untersten Horizont des Polygonzentrums der Insel Samoylov und war durch mineralische Ablagerungen und dazwischen gelagerte, schwach zersetzte Torffasern gekennzeichnet. Die Proben wurden für jeweils 20 s bzw. 60 s mit Ultraschall behandelt. Als Kontrolle wurden Proben verwendet, die unbehandelt waren. In Abbildung 5-7 ist zu sehen, dass die Behandlung mit Ultraschall einen geringen Einfluss auf die DNA-Ausbeute hatte, da alle drei Parallelen der jeweiligen Proben eine ähnliche Menge an DNA zeigten. Allerdings kann man erkennen, dass die DNA der Torfprobe vom Kap Mamontovy Klyk mit Ultraschallbehandlung diffuser im Gel aufgetrennt wurde. Somit wurde die weitere DNA-Extraktion nach Protokoll des Herstellers ohne vorherigen Ultraschall-Einsatz durchgeführt.

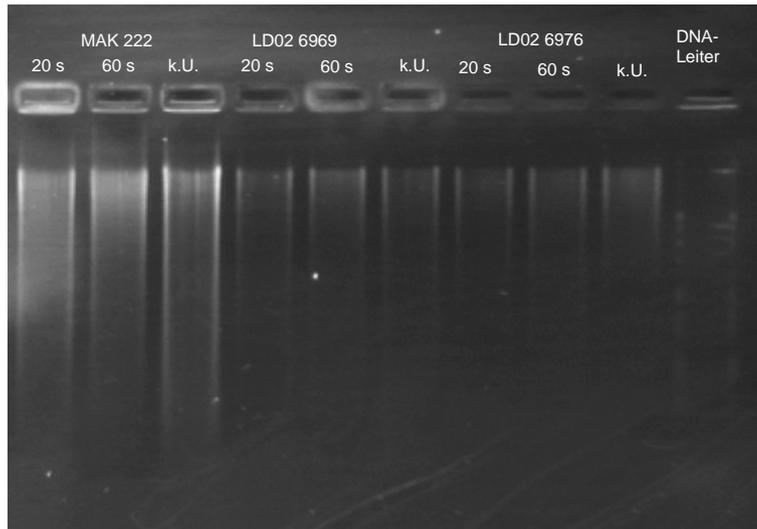


Abb. 5-7: elektrophoretische Überprüfung des Einflusses von Ultraschall auf die Menge der aus einer Bodenprobe extrahierten DNA (MAK 222 – Polygonzentrum Mamontovy Klyk, Tiefe 6-12 cm; LD02 6969 bzw. 6976 – Polygonzentrum Insel Samoylov, Tiefe 5-10 cm bzw. 40-45 cm; k.U. – kein Ultraschall, 20 s – Ultraschall für 20 s, 60 s – Ultraschall für 60 s)

DNA konnte aus fast allen Bodenproben isoliert werden, obwohl es in der Ausbeute der Extraktion große Unterschiede gab. In Abbildung 5-8a wurde extrahierte DNA von je zwei Bodenproben eines Typic Aquorthel (Permafrost-Auengley), Typic Aquiturbel (Polygonzentrum, Mamontovy Klyk) und Typic Historthel (Polygonzentrum, Samoylov) in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Hier waren die Proben dem physikalischen Aufschluss nicht 10 min, wie im Protokoll des Herstellers angegeben, sondern nur 5 min ausgesetzt. Es ist zu erkennen, dass die DNA-Ausbeute, mit zwei Ausnahmen (Permafrost-Auengley 0-5 cm, Polygonzentrum Mamontovy Klyk 36-44 cm), gering ausfiel. Da die DNA auch keine deutliche Bande im Gel bildete, sondern einen `Schlier`, der typisch für kleinere DNA-Stücke ist, wurde die DNA-Extraktion der Bodenproben genau nach Protokoll des Herstellers durchgeführt.

Die mineralischen Proben des Permafrost-Auengleys (Abb. 5-8b), mit geringem Gehalt an organischem Kohlenstoff, zeigten mit einer Ausnahme eine durchweg gute DNA-Ausbeute. Nur aus dem untersten Horizont, der durch Permafrost charakterisiert war, wurde eine geringere DNA-Ausbeute erzielt.

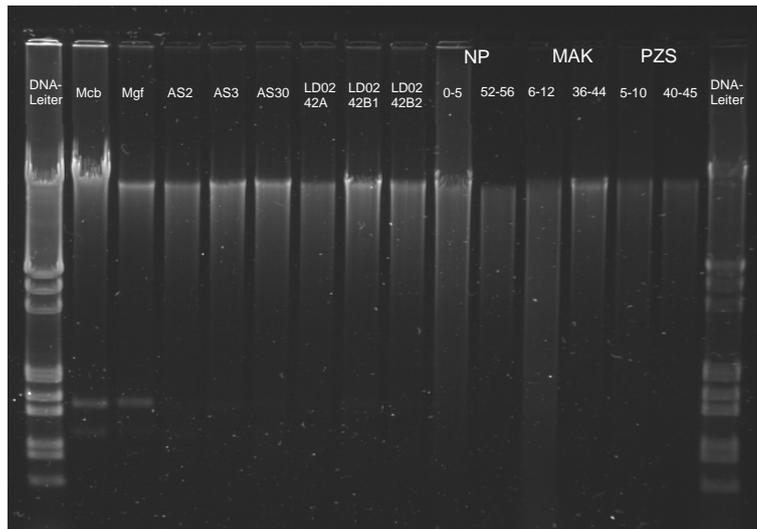


Abb. 5-8a: Überprüfung der DNA-Extraktion aus verschiedenen Bodenproben bzw. Anreicherungs- und Reinkulturen in einem 0,8%igen Agarosegel. Mcb – *Methanococcoides burtonii* (DSMZ 6242), Mgf – *Methanogenium frigidum* (DSMZ 16458), AS2, AS3, AS30, LD02 42A, LD02 42B1, LD02 42B2 – Rein- bzw. Anreicherungskulturen. NP – Permafrost-Auengley, MAK – Polygonzentrum Mamontovy Klyk, PZS – Polygonzentrum Insel Samoylov: Tiefe in cm.

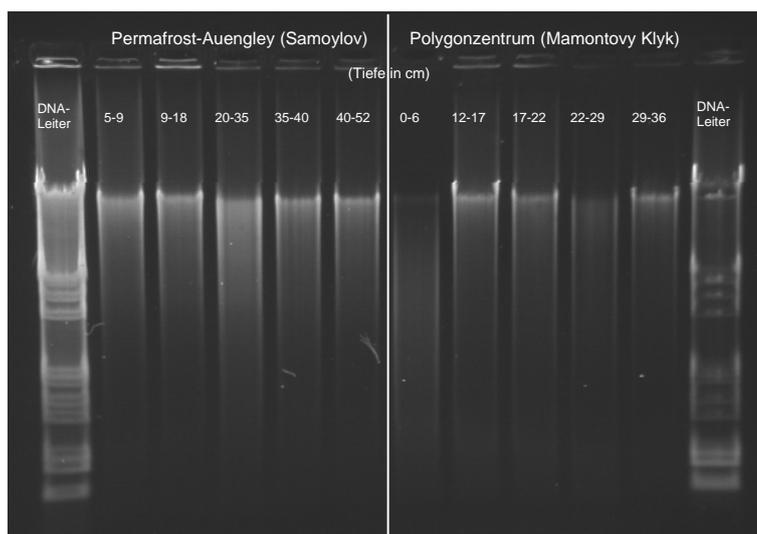


Abb. 5-8b: Überprüfung der DNA-Extraktion aus einem Permafrost-Auengley (Samoylov) bzw. eines Polygonzentrums (Mamontovy Klyk) in einem 0,8%igen Agarosegel.

Die Extraktion der Proben von Mamontovy Klyk (Abb. 5-8b) zeigte relativ viel DNA in der durch mineralische Komponenten gekennzeichneten unteren Bodenschicht. Aus den Proben des an organischem Kohlenstoff reichen Oberbodens (0-6 cm) konnte dagegen nur wenig DNA extrahiert werden, ebenso aus der Probe MAK 225 aus einer Tiefe von 22-29 cm. Im Agarosegel bildete die aus diesen Proben isolierte DNA auch keine klare Bande bei ca. 20.000 bp, sondern den für kleinere Bruchstücke typischen `Schlier`.

Die DNA-Ausbeute aus dem Profil des Polygon-Zentrums der Insel Samoylov (Abb. 5-8a bzw. 5-8c) war ebenso heterogen. Hier wurde eine gute Ausbeute für die meisten Proben bis 30 cm Tiefe erreicht. Die darunterliegenden Horizonte zeigten eine deutlich geringere Menge an extrahierter DNA, wobei die Bodenprobe aus einer Tiefe von 35-40 cm eine Ausnahme darstellte.

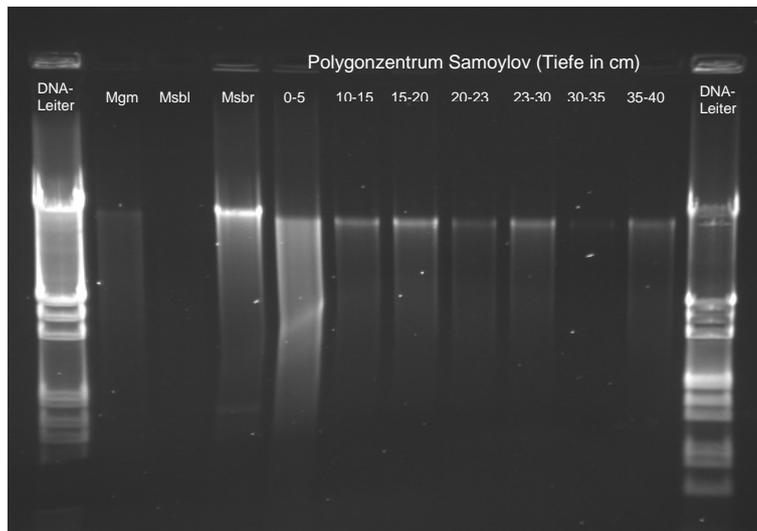


Abb. 5-8c: Überprüfung der Extraktion aus einem Polygonzentrum (Insel Samoylov) bzw. aus Reinkulturen in einem 0,8%igen Agarosegel. Mgm – *Methanogenium marinum*, Msbl – *Methanosarcina baltica*, Msbr – *Methanosarcina barkeri*.

Die DNA-Extraktion der meisten Rein- und Anreicherungskulturen war erfolgreich und zeigte mit wenigen Ausnahmen eine bessere DNA-Ausbeute als die Bodenproben. Die Rein- und Anreicherungskulturen wurden im Unterschied zu den Bodenproben nach verändertem Protokoll behandelt. Die vom Hersteller vorgeschlagene Zeit von 10 min für den physikalischen Aufschluss der Zellen durch den Einsatz von Glaskügelchen wurde auf 5 min halbiert. Hier zeigte sich, dass die extrahierte DNA durch die kürzere Behandlung weniger kleine Bruchstücke enthielt als die DNA aus den Bodenproben mit 10minütiger Behandlung. Die in der Literatur meist als leicht lysierbar bezeichneten Zellen von methanogenen Mikroorganismen zeigten allerdings quantitativ durchaus unterschiedliche Extraktionsergebnisse. Bei den Reinkulturen von *Methanosarcina barkeri* (DSMZ 8687), *Methanococcoides burtonii* (DSMZ 6242) und *Methanogenium frigidum* (DSMZ 16458) wurden gute bis sehr gute Extraktionsergebnisse erzielt. Die Überprüfung der DNA-Extraktion von *Methanogenium marinum* (DSMZ 15558) ergab dagegen eine sehr geringe DNA-Menge, während die

DNA von *Methanosarcina baltica* (DSMZ 14042) im Agarosegel nicht detektierbar war (Abb. 5-8a bzw. 5-8c).

DNA wurde ebenfalls aus den bei 18°C inkubierten Anreicherungen des Polygonzentrums der Insel Samoylov isoliert (Abb. 5-9). Die Proben, die Methanol als Substrat zugesetzt bekamen, zeigen eine höhere Ausbeute an DNA als die Proben, die mit Formiat inkubiert wurden.

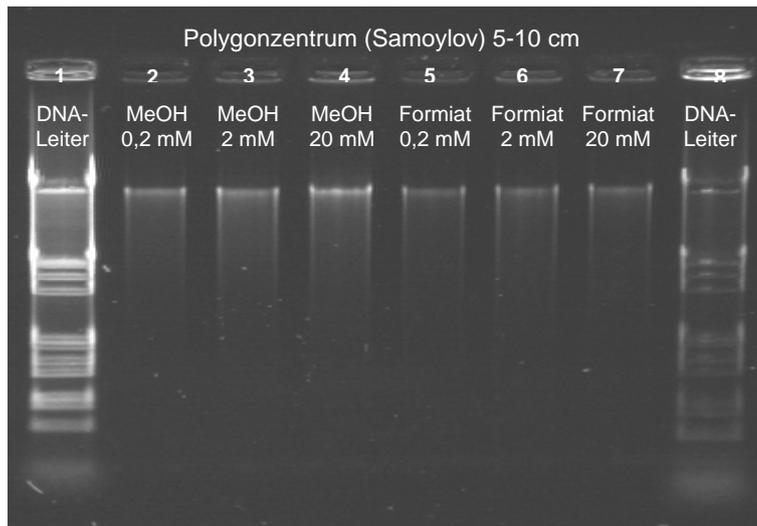


Abb. 5-9: Überprüfung der DNA-Extraktion einer Anreicherung aus 5-10 cm Tiefe eines Polygonzentrums (Insel Samoylov). Die Anreicherung wurde mit je zwei Substraten (Methanol bzw. Formiat) in je drei Konzentrationen (0,2 mM, 2 mM, 20 mM) bei 18°C inkubiert.

5.3 Überprüfung der Amplifikation des 16S rDNA-Gens

Unter Verwendung der PCR wurde ein bestimmter Abschnitt des 16S rDNA-Gens von Mikroorganismen aus Permafrostböden der beschriebenen Standorte amplifiziert. Als Vorlage (Template) diente dabei die genomische DNA, die durch die DNA-Extraktion gewonnen wurde. Die Amplifikation der DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe eines Primer-Sets, welches spezifisch für methanogene Archaeen ist (Watanabe et al., 2004, siehe Kapitel 4). Um zu sehen, ob die PCR unter den eingestellten Konditionen erfolgreich war, wurden die Proben auf einem 2%igen Agarosegel überprüft. Die Länge des Amplifikats betrug ca. 350 bp, diese wurde mit Hilfe eines DNA-Standards verifiziert.

Abbildung 5-10 zeigt das Ergebnis der PCR für alle Bodenproben, wobei für einige Proben Wiederholungen durchzuführen waren, da es keine oder eine zu geringe Produktbildung im ersten Ansatz gab.

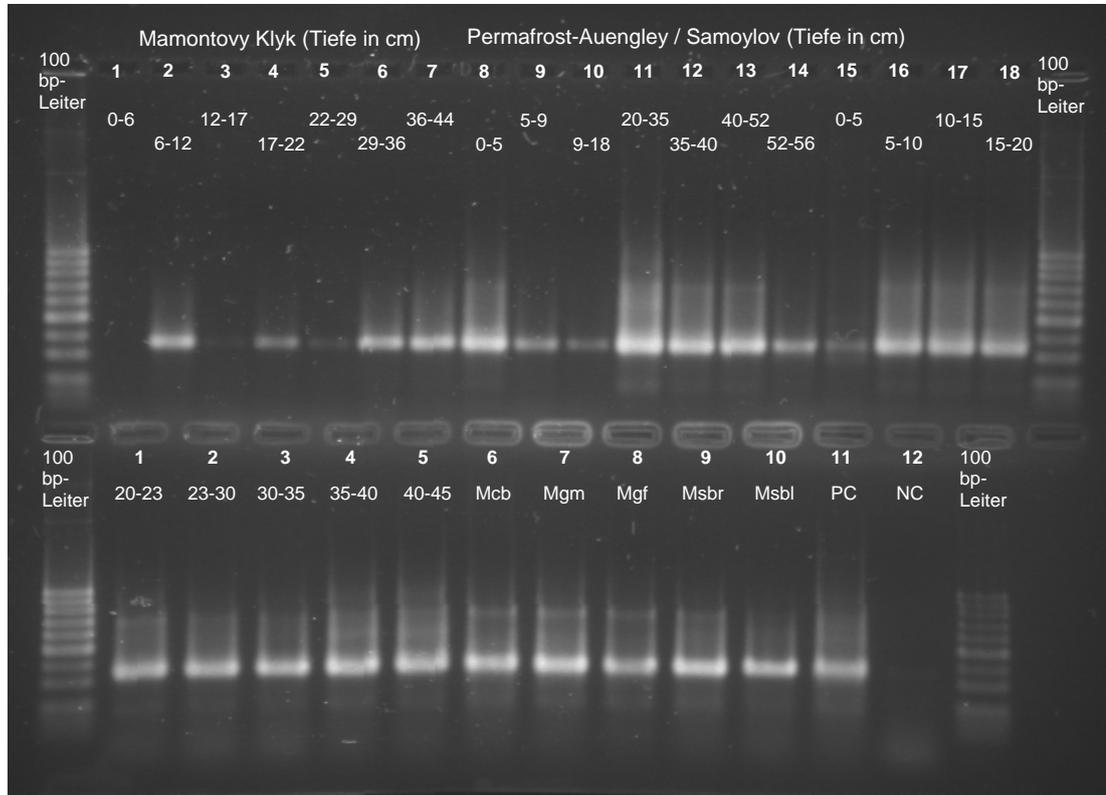


Abb. 5-10: Überprüfung der PCR-Produkte in einem 2%igen Agarosegel. Die Größe der Amplifikate beträgt etwa 350 bp, als Primer wurden GC-0357 und 0691R verwendet (WATANABE et al., 2004) als Marker diente eine 100 bp-Leiter. Mcb – *Methanococcoides burtonii*, Mgm – *Methanogenium marinum*, Mgf – *Methanogenium frigidum*, Msbr – *Methanosarcina barkeri*, Msbl – *Methanosarcina baltica*, PC – Positivkontrolle (*M. barkeri*); NC, Negativkontrolle. Tiefe der Bodenproben in cm.

5.3.1 *Typic Aquorthel* der Insel Samoylov

Die Amplifikation der Proben aus dem Permafrost-Auengley war nicht für alle Proben optimal. Die oberste Bodenprobe sowie die Proben aus einer Tiefe von 20-52 cm zeigten ein gutes Ergebnis, während die Proben von 5-18 cm und aus dem Bereich des Permafrostes (> 52 cm) eine schlechtere Amplifikation zeigten (Abb. 5-10). Daher wurden diese Proben erneut für eine PCR eingesetzt, mit dem Ziel, eine höhere Amplifikatmenge zu erhalten. Die Proben aus den oberen Bodenhorizonten zeigten dabei eine recht gute Produktbildung (Abb. 5-11).

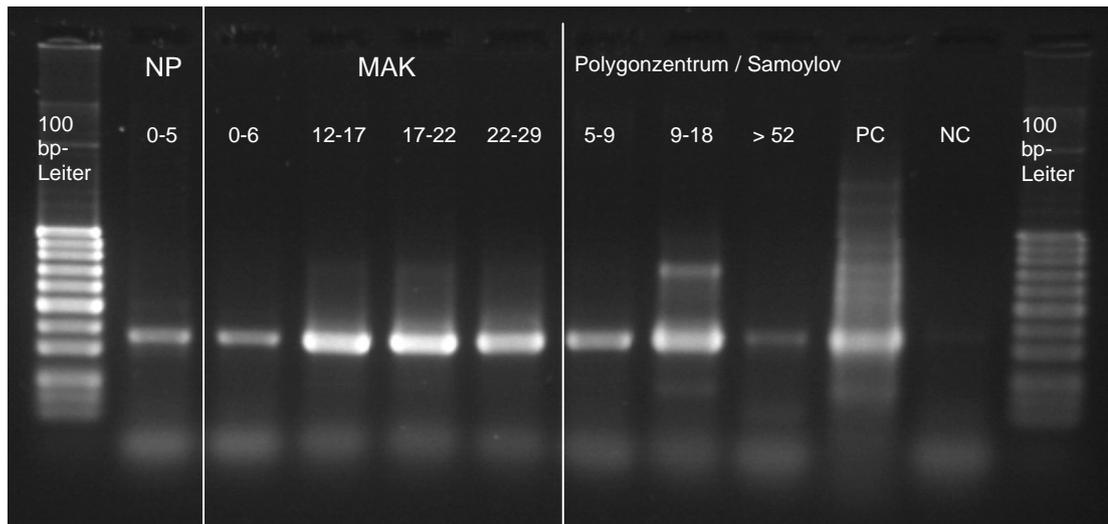


Abb. 5-11: Wiederholung der PCR mit Proben, die im ersten Anlauf keine oder eine nur sehr geringe Ausbeute zeigten. Tiefe in cm. NP – *Typic Aquorthel*, MAK – *Typic Aquiturbel*, PZS – *Typic Historthel*. PC, *M. barkeri*; NC, Negativkontrolle

Für die Probe aus dem Permafrostbereich, aus der wenig DNA isoliert werden konnte und die den geringsten organischen Kohlenstoffgehalt aufwies, wurde eine weitere PCR durchgeführt. Dabei wurden verschiedene Reaktionsparallelen mit unterschiedlichen Konzentrationen an DNA-Template vorbereitet. In Abbildung 5-12 ist zu sehen, dass die beste PCR-Ausbeute mit 1,0 µl DNA-Template erreicht wurde.

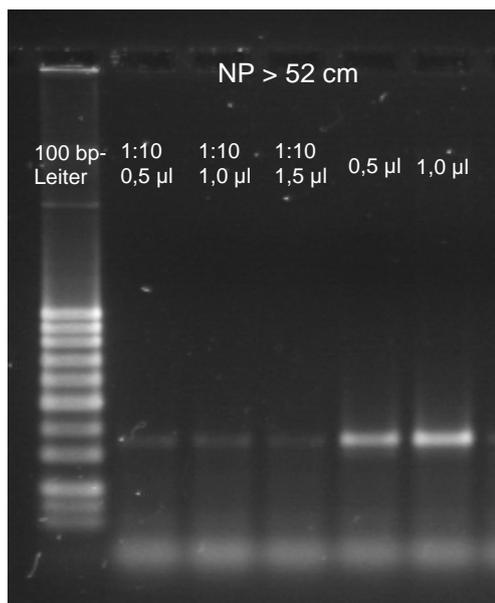


Abb. 5-12: Optimierung der Amplifikatmenge von LD02 6947 unter Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen genomischer DNA. NP – Permafrost-Auengley, 1:10 – Verdünnung der extrahierten DNA mit Aqua deion. im Verhältnis 1:10

5.3.2 *Typic Historthel* der Insel Samoylov

Wie in Abbildung 5-10 zu sehen ist, war die Amplifikation mit einer Ausnahme für alle Proben des *Typic Historthel* erfolgreich. Lediglich die Probe aus der obersten Bodenschicht, die aus lockerer, unzersetzter organischer Auflage bestand, enthielt zu wenig PCR-Produkt. Die Wiederholung der PCR mit dieser Probe kam zu einem ausreichenden Ergebnis, nachdem die DNA-Vorlage im Reaktionsansatz erhöht wurde (Abb. 5-1).

Die Tatsache, dass die DNA-Menge aus der DNA-Extraktion sehr unterschiedlich war, beeinträchtigte nicht den Erfolg der PCR. Allerdings kann festgehalten werden, dass für die oberste Bodenschicht DNA mit kleinerer Fragmentgröße isoliert wurde, und dass diese Probe eine geringere Menge an PCR-Produkt lieferte.

5.3.3 *Typic Aquiturbel* vom Kap Mamontovy Klyk

Nur die Probe des an organischer Bodensubstanz reichen, zweiten Horizonts (6-12 cm) und die beiden untersten, auf dem Permafrost aufliegenden und an organischem Kohlenstoff ärmsten Bodenschichten (29-44 cm) zeigten bei der Überprüfung der PCR eine gute Ausbeute (Abb. 5-10). Die Proben der obersten Schicht (0-6 cm) und der Bodenhorizonte aus der Mitte des Profils (12-29 cm) wurden deshalb für eine erneute PCR eingesetzt, in welcher mehr isolierte DNA als Matrize eingesetzt wurde. Dabei wurde ein gutes Ergebnis für die Proben aus der Mitte des Profils (12-29 cm) erzielt (Abb. 5-11). Obwohl die Probe des obersten Bodenhorizonts in geringerem Maße vervielfältigt werden konnte, wurde die Menge des Amplifikats für die weitere Analytik als ausreichend angesehen.

5.3.4 Rein- und Anreicherungskulturen

Die Amplifikation des 16S rDNA-Fragments der Reinkulturen war ebenfalls im ersten Ansatz erfolgreich (Abb. 5-10). Obwohl sichtbar keine DNA von *Methanosarcina baltica* (DSMZ 14042) extrahiert werden konnte, war es

möglich, ein PCR-Produkt zu erhalten. Auch bei einigen anderen Proben konnte trotz schlechter Ausbeute bei der DNA-Extraktion eine gute Amplifikation des DNA-Fragments gezeigt werden, wie beispielsweise bei *Methanogenium marinum* (DSMZ 15558) und einer Probe aus dem Polygonzentrum der Insel Samoylov (30-35 cm). Auch die Anreicherungen mit einer Probe des Polygonzentrums der Insel Samoylov zeigten im ersten PCR-Ansatz eine gute Amplifikation, wie in Abbildung 5-13 zu sehen ist.

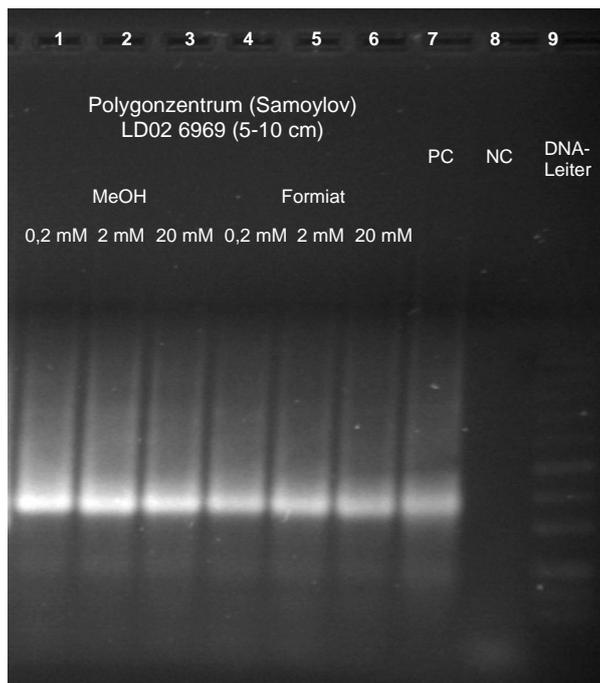


Abb. 5-13: Überprüfung der PCR-Produkte der Anreicherungskultur aus 5-10 cm Tiefe eines *Typic Historthel* (Samoylov) in einem 2%igen Agarosegel. PC – Positivkontrolle (*M. barker*), NC – Negativkontrolle.

Zusammenfassend kann man sagen, dass Proben, aus denen viel DNA extrahiert werden konnte, nicht immer eine gute Amplifikation des Markergens im ersten PCR-Ansatz zeigten. Andererseits bedeutete keine oder eine geringe Menge isolierter DNA nicht unbedingt, dass es kein oder nur eine geringe Menge an PCR-Produkt gab. Oft musste die Menge an eingesetztem Template in einem weiteren PCR-Ansatz angepasst werden. Die diffusen Banden, die sich im unteren Teil des Agarosegels befinden, stellen überschüssige Primer mit einer Länge von 20 bp bis 50 bp dar.

5.4 Diversität methanogener Gemeinschaften in Permafrostböden

Nach erfolgreicher Amplifikation der DNA erfolgte die Auftrennung der PCR-Produkte der jeweiligen Standorte in einem denaturierenden Polyacrylamid-

Gel. Mit der Auftrennung der 16S rDNA-Fragmente ist es möglich, einen Einblick in die Diversität von Mikroorganismengemeinschaften zu erhalten, in diesem Fall der methanogenen Archaeen in Permafrostböden. Das Bandenmuster im Gel ist dabei abhängig von den in der Probe vorkommenden Sequenzen der durch die PCR amplifizierten Markergene. In diesen Versuchen wurde das 16S rDNA-Gen als Markergen verwendet.

5.4.1 *Typic Aquorthel* der Insel Samoylov

Abbildung 5-14 zeigt das Bandenmuster der methanogenen Mikrobengemeinschaft des Tiefenprofils eines Permafrost-Auengleys (*Typic Aquorthel*). Die Spur 1 stellt die oberste Schicht der Auftauschicht dar, während die Spur 7 den Horizont direkt über der Permafrosttafel markiert. Als Referenz wurden fünf Reinkulturen (Spur 8-12) auf das Gel geladen.

Das Muster des DGGE-Gels zeigt für jede Probe vier bis acht gut definierte Banden. Davon sind zwei Banden im gesamten Profil präsent. Die Banden auf der Höhe von LD02 6942a und auf der Höhe von LD02 6945a bzw. 6947c unterscheiden sich dabei in ihrer Intensität. Während die Banden auf Höhe von LD02 6945a in ihrer Intensität über die Tiefe in etwa gleich bleiben (Ausnahme ist hier die Bande im Bereich von 9-18 cm, da hier weniger DNA aufgetragen werden konnte), nimmt die Intensität der Banden auf Höhe von LD02 6942a ab der Tiefe von 40 cm ab. Eine mit der Tiefe abnehmende Anzahl der Banden ist in diesem Muster nicht feststellbar. Allerdings gibt es Banden, die nur in einer bestimmten Tiefe im Profil zu finden sind oder in einem bestimmten Horizont eine starke Intensität aufweisen und ansonsten nur sehr schwach im Bodenprofil zu sehen sind. Ersteres ist in dem Horizont von 9-18 cm, der sehr stark durchwurzelt war, mit der Bande LD02 6943a zu sehen. Die DNA-Bande LD02 6947a ist dagegen im Bereich des Permafrosts von starker Intensität und undeutlich auch in den obersten 5 cm des Profils und im Bodenhorizont direkt über dem Permafrost zu sehen.

Die DNA-Banden, die numeriert und mit einem Pfeil gekennzeichnet sind, wurden anschließend sequenziert. Dies gilt auch für die in den folgenden Abbildungen gekennzeichneten Banden.

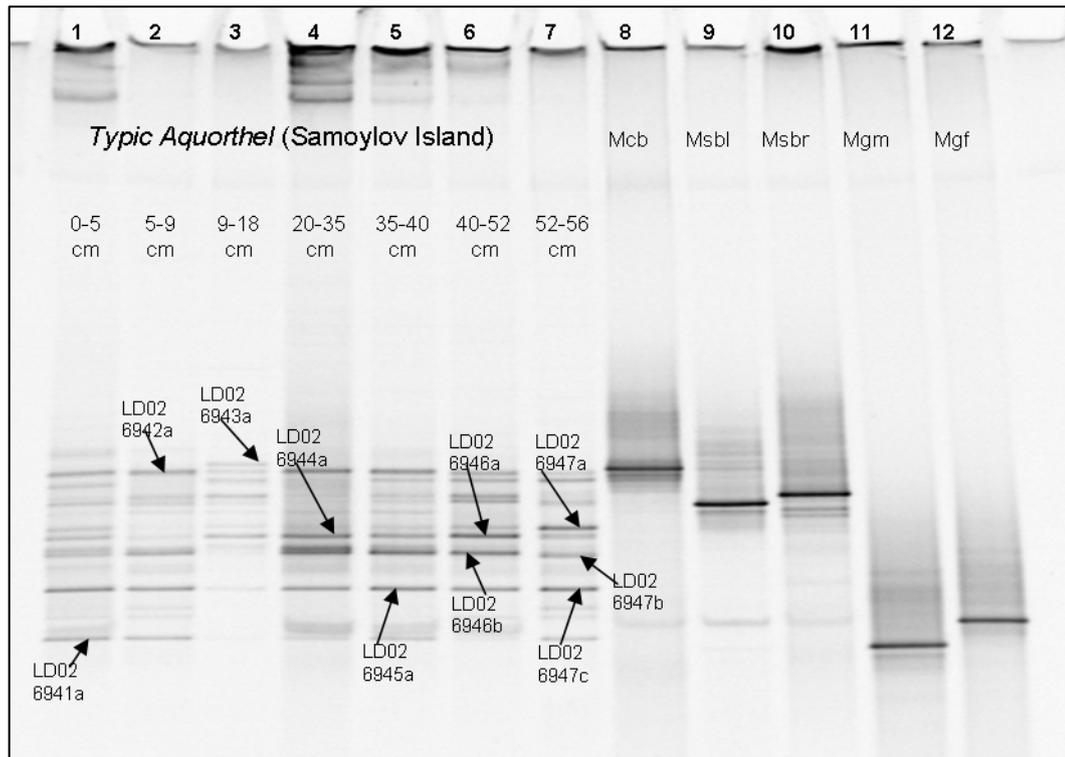


Abb. 5-14: DGGE-Muster eines *Typic Aquorthels* sowie methanogener Reinkulturen. Die Amplifikation erfolgte mit einem Primersatz spezifisch für methanogene Archaeen. Der denaturierende Gradient betrug 30-60%.

5.4.2 *Typic Historthel* der Insel Samoylov

Das Muster der DNA-Banden für den Standort des Polygonzentrums (*Typic Historthel*) zeigt eine deutlich sichtbare Verschiebung der Diversität mit zunehmender Tiefe (Abb. 5-15). Die Anzahl der gut definierten Banden nimmt bis zu einer Tiefe von 23 cm (Spur 5) zu, um dann mit zunehmender Tiefe wieder abzunehmen. Im untersten Horizont (Spur 9) deutet die Anzahl der Banden auf eine geringere Diversität hin. Auch bei diesem Probenstandort sind Banden erkennbar, die mit zunehmender Tiefe in der Intensität zunehmen bzw. abnehmen, aber nicht über das gesamte Profil verteilt sind. Dies sind die Banden, die auf Höhe von LD02 6969b bzw. 6971b in einer Tiefe von 0-40 cm detektierbar sind und mit zunehmender Tiefe schwächer werden. Ebenso die Bande LD02 6971a, die von 5-23 cm (Spur 2 bis 5) im Gel zu erkennen ist und mit der Tiefe an Intensität zunimmt. Auch die Banden LD02 6972c zwischen 0-23 cm und LD02 6974a zwischen 10-45 cm nehmen mit der Tiefe an Intensität zu. Es ist weiterhin zu erkennen, dass es Amplifikate gibt, die nur in einem Horizont zu finden sind, wie LD02 6970a (Spur 3), LD02 6972b (Spur 5) oder LD02 6972d (Spur 5).

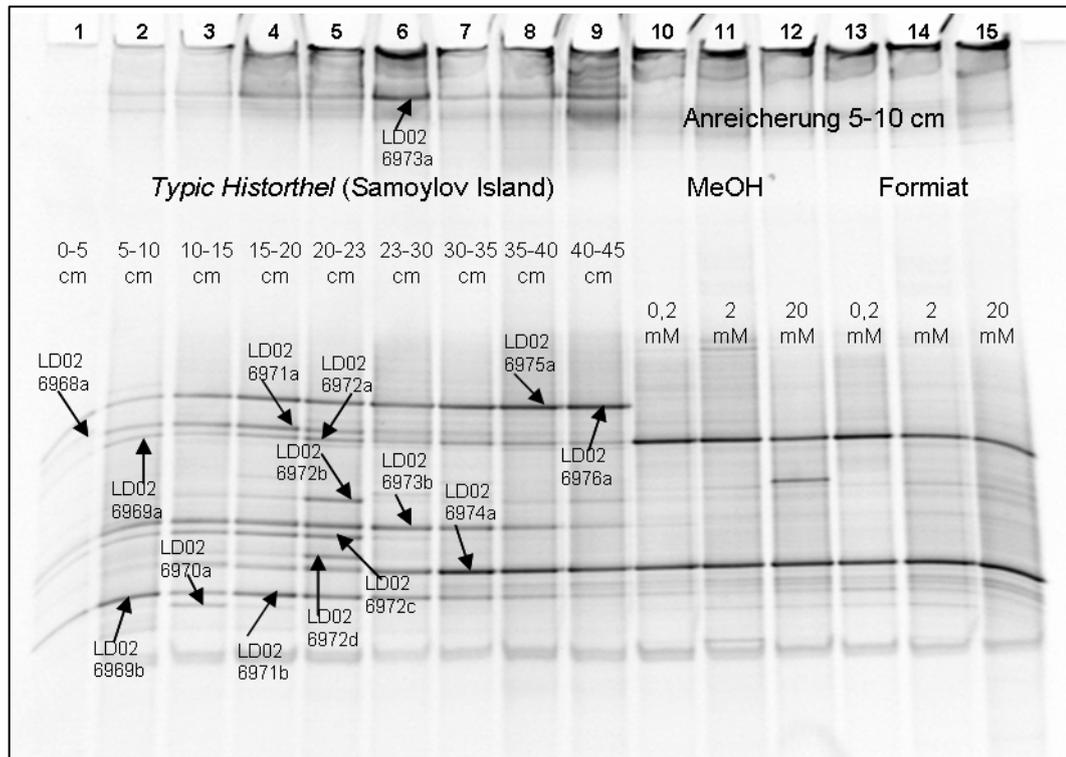


Abb. 5-15: DGGE-Muster eines *Typic Historthels* sowie einer Anreicherungskultur. Der denaturierende Gradient betrug 30-60%.

Die Anreicherung aus dem Bodenbereich von 5-10 cm unter verschiedenen Substratbedingungen zeigte zwei klare Banden für jeden Ansatz, ausgenommen die Probe, die mit 20 mM Methanol inkubiert wurde. Diese zeigt im DGGE-Muster drei Banden. Die erste Bande der Anreicherungen lief auf der Höhe von Bande LD02 6972a, während die beiden anderen DNA-Banden der Anreicherung in der Bodenprobe im DGGE-Gel nicht detektierbar waren. Eine DNA-Bande läuft dabei auf der Höhe von LD02 6974a, die in den oberen 10 cm nicht im Gel zu sehen ist und mit steigender Tiefe an Intensität zunimmt. Das dritte Amplifikat, das nur in der Probe mit 20 mM MeOH gefunden wurde, ist im Muster der für die Anreicherung verwendeten Bodenprobe visuell nicht auszumachen. Hinzu kommt auch, dass diese DNA-Bande im gesamten Bodenprofil nicht detektiert werden konnte.

Dadurch, dass die Probe des ersten Horizonts (Spur 1) bei der PCR nur wenig Produkt ergab, konnte nur eine geringe Menge an DNA aufgetragen werden. Die Intensität der Banden im DGGE-Gel war dadurch geringer. Am Rand des Gels war der chemische Gradient nicht optimal und es kam zur Ausbildung von verzerrten DNA-Banden (Spur 1+2).

5.4.3 *Typic Aquiturbel* vom Kap Mamontovy Klyk

Wie in Abbildung 5-16 zu sehen ist, ist die Diversität anhand des Bandenmusters mit vier bis fünf gut definierten Banden in den oberen Horizonten bis 29 cm etwa gleichbleibend, während sie in den beiden unteren Horizonten (Spur 6+7) niedriger ist. Wie im Gel zu sehen, ist nur eine Bande (MAK 222a bzw. 226a) in allen Bodenhorizonten zu finden. Auch in diesem Profil eines Permafrostbodens (*Typic Aquiturbel*) gibt es DNA-Banden, die nur in bestimmten Tiefen vorhanden sind. Die Bande MAK 223a kommt in der, an organischem Kohlenstoff reichen, oberen Bodenprofilhälfte vor. Die DNA-Bande MAK 225b ist in der unteren Hälfte des Profils zu finden, in der die Kohlenstoffgehalte deutlich geringer sind. Im obersten Bodenhorizont konnten zwei DNA-Banden erfasst werden, die in keinem anderen Tiefenbereich zu finden waren (MAK 221a und 221b), ebenso in der Tiefe von 22-29 cm (MAK 225a).

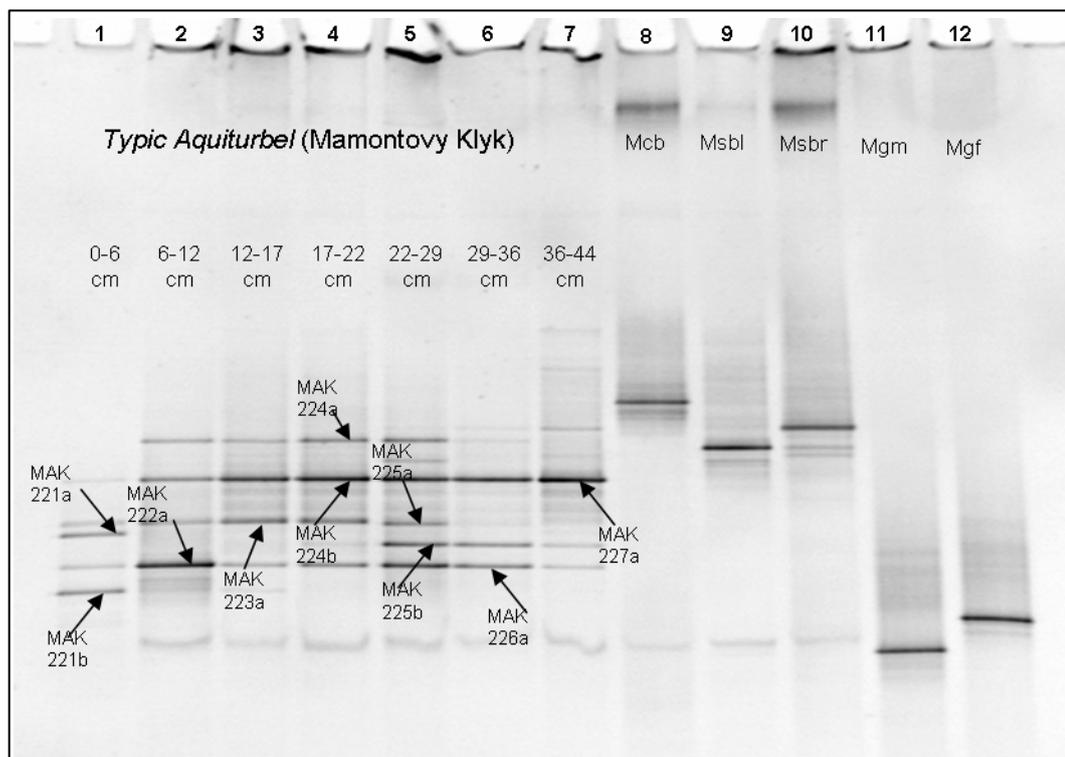


Abb. 5-16: DGGE-Muster eines *Typic Aquiturbel*. Der denaturierende Gradient betrug 30-60%.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Diversität der methanogenen Gemeinschaft im Polygonzentrum der Insel Samoylov und

Mamontovy Klyk mit der Tiefe abnimmt, während das DGGE-Muster für den Permafrost-Auengley der Insel Samoylov eine in etwa gleichbleibende Diversität anzeigt. Desweiteren finden sich in einigen Bodenhorizonten DNA-Banden, die in keinem der anderen Horizonte des jeweiligen Profils visuell erfasst werden konnten, wie LD02 6943a, LD02 6970a oder MAK 221a.

5.5 Phylogenie der methanogenen Gemeinschaft in Permafrostböden

Um die Informationen der DGGE-Methode besser nutzen zu können, wurden einige ausgewählte DNA-Banden aus dem DGGE-Gel ausgeschnitten, reamplifiziert und die Sequenz der Fragmente ermittelt. Die Sequenzen von 25 DNA-Banden wurden mit Hilfe des ARB-Programmes in einen phylogenetischen Stammbaum eingegliedert (Abb.: 5-17 bis 5-21).

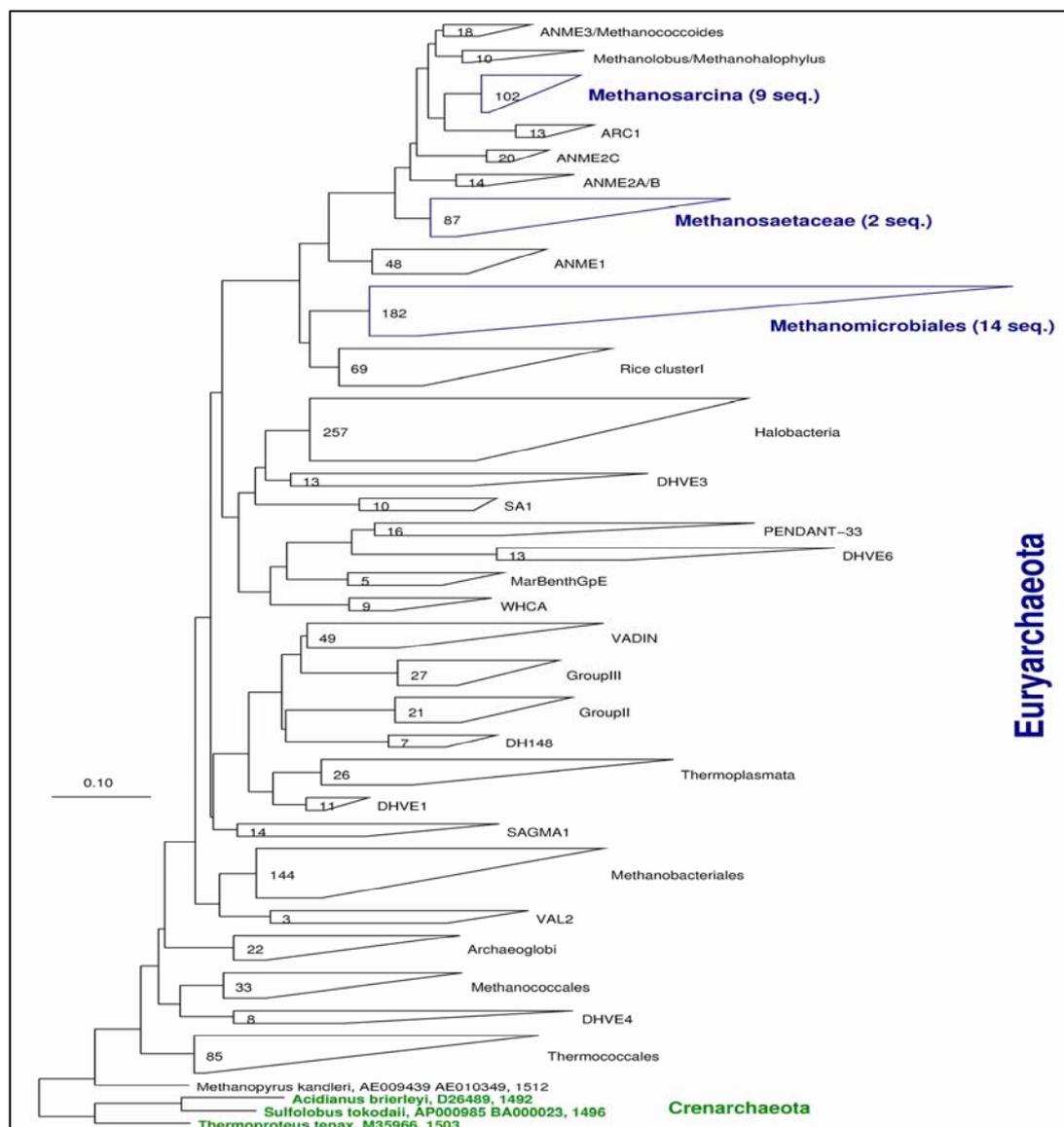


Abb. 5-17: Phylogenetische Darstellung der Verwandtschaft von 16S rDNA-Sequenzen, die mittels DGGE aus Permafrostböden Nordsibiriens gewonnen wurden. Sequenzen aus dieser Studie sind farbig. Die Skala stellt 10% Sequenzabweichung dar. FP-Permafrost-Auengley, PC-Polygonzentrum (Insel Samoylov), MAK-Polygonzentrum (Mamontovy Klyk).

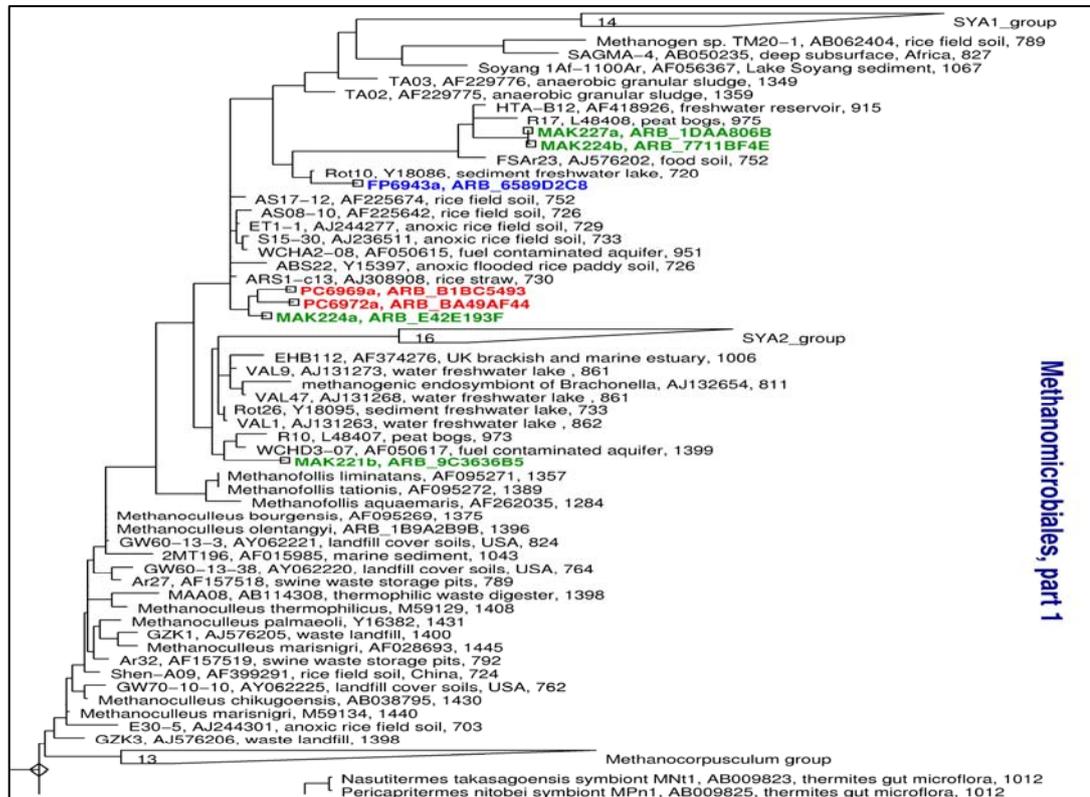


Abb. 5-18: Detailansicht der Ordnung *Methanomicrobiales*. MAK – *Typic Aquiturbel*, NP – *Typic Aquorthel*, PC – *Typic Historthel*.

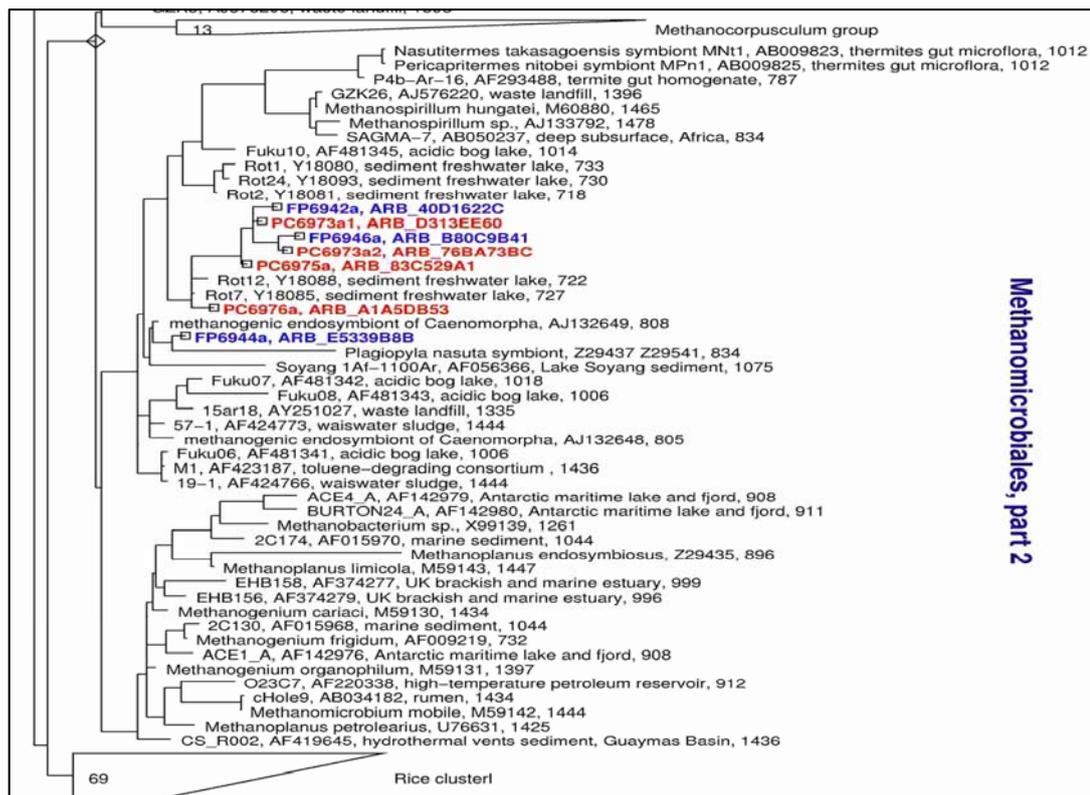


Abb. 5-19: Detailsicht der Ordnung *Methanomicrobiales*. NP – *Typic Aquorthel*, PC – *Typic Historthel*.

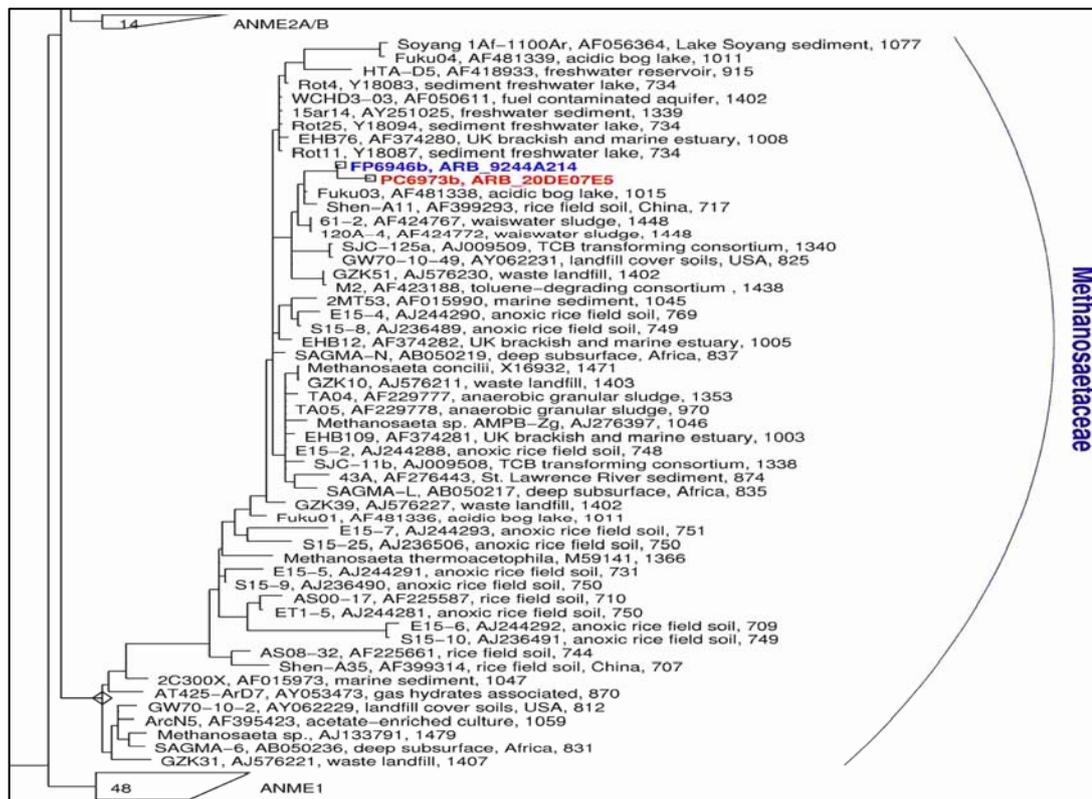


Abb. 5-20: Detailsicht der Familie *Methanosaetaceae*. NP – *Typic Aquorthel*, PC – *Typic Historthel*.

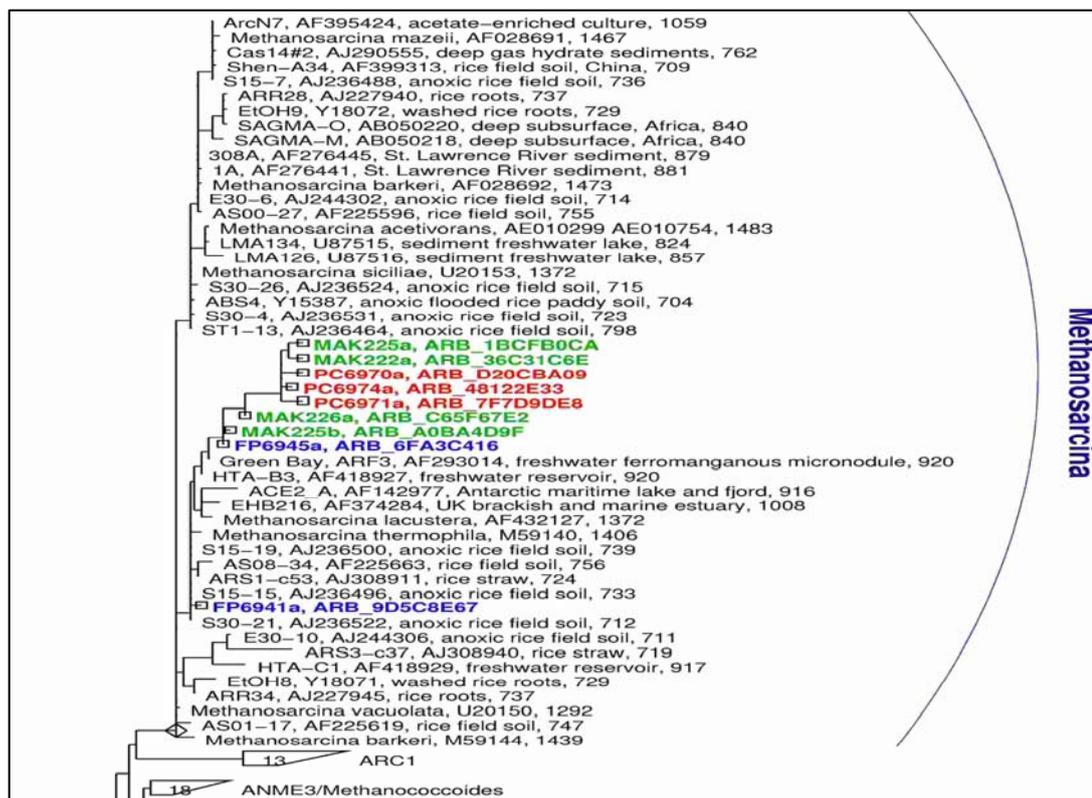


Abb. 5-21: Detailansicht der Gattung *Methanosarcina*. MAK – *Typic Aquiturbel*, NP – *Typic Aquorthel*, PC – *Typic Historthel*.

Nicht alle aus dem DGGE-Gel ausgeschnittenen DNA-Fragmente konnten sequenziert werden bzw. wurden in die Datenbanksuche einbezogen, da von einigen DNA-Fragmenten nur sehr kurze Stücke (< 100bp) sequenziert werden konnte.

Die erhaltenen Sequenzen wurden zusätzlich mit Hilfe des FASTA-Programmes des European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk>) im Internet auf die Ähnlichkeit mit bereits vorhandenen Sequenzen, die in einer Datenbank gespeichert sind, verglichen und sind hier in Tabelle 5-1 dargestellt.

Tabelle 5-1: Klassifizierung der sequenzierten Proben anhand von Datenbank-Informationen (EMBL Nucleotide Sequence Database) unter Verwendung des FASTA-Programms.

Probenstandort und -nummer	nächster Verwandter ^a	Klassifikation (lt. Datenbank ^b)	Übereinstimmung
Permafrost-Auengley (Insel Samoylov)			
LD02 6941a	<i>Methanosarcina acetivorans</i> str. C2A (AE011184)	<i>Methanosarcina</i>	96,9%
LD02 6942a	methanogenic endosymbiont of <i>Caenomorpha</i> -like sp. 1 (AJ132648)	<i>Methanomicrobiaceae</i>	93,1%
LD02 6943a	methanogenic archaeon NOBI-1 (AB162774)	<i>Methanomicrobiales</i>	92,6%
LD02 6944a	methanogenic endosymbiont of <i>Caenomorpha</i> sp. 2 (AJ132652)	<i>Methanomicrobiaceae</i>	97,7%
LD02 6945a	<i>Methanosarcina acetivorans</i> C2A (AE011184)	<i>Methanosarcina</i>	96,5%
LD02 6946a	methanogenic endosymbiont of <i>Caenomorpha</i> sp. 2 (AJ132652)	<i>Methanomicrobiaceae</i>	97,1%
LD02 6946b	anaerobic methanogenic archaeon E15-4 (AJ244290)	<i>Methanosaetaceae</i>	96,8%
LD02 6947a	<i>Methanosarcina</i> sp. (L48408)	<i>Methanosarcina</i>	92,2%
LD02 6947c	<i>Methanosarcina lacustris</i> strain MS (AY260431)	<i>Methanosarcina</i>	93,8%
Polygonzentrum (Insel Samoylov)			
LD02 6969a	anaerobic methanogenic archaeon ET1-1 (AJ244277)	<i>Methanomicrobiaceae</i>	97,5%
LD02 6970a	<i>Methanosarcina acetivorans</i> str. C2A (AE011184)	<i>Methanosarcina</i>	96,0%
LD02 6971a	<i>Methanosarcina acetivorans</i> C2A (AE011184)	<i>Methanosarcina</i>	96,8%
LD02 6972a	anaerobic methanogenic archaeon	<i>Methanomicrobiaceae</i>	98,8%

ET1-1 (AJ244277)			
LD02 6972b	<i>Methanospirillum</i> sp. (L48407)	<i>Methanospirillum</i>	98,2%
LD02 6972c	<i>Methanospirillum</i> sp. (L48407)	<i>Methanospirillum</i>	97,5%
LD02 6973a1	methanogenic endosymbiont of <i>Caenomorpha</i> sp. 2 (AJ132652)	<i>Methanomicrobiaceae</i>	94,1%
LD02 6973a2	methanogenic endosymbiont of <i>Caenomorpha</i> sp. 2 (AJ132652)	<i>Methanomicrobiaceae</i>	95,1%
LD02 6973b	anaerobic methanogenic archaeon E15-4 (AJ244290)	<i>Methanosaetaceae</i>	95,8%
LD02 6974a	<i>Methanosarcina acetivorans</i> C2A (AE011184)	<i>Methanosarcina</i>	96,2%
LD02 6975a	methanogenic endosymbiont of <i>Caenomorpha</i> sp. 2 (AJ132652)	<i>Methanomicrobiaceae</i>	94,1%
LD02 6976a	methanogenic endosymbiont of <i>Caenomorpha</i> sp. 2 (AJ132652)	<i>Methanomicrobiaceae</i>	94,1%
Polygonzentrum (Mamontovy Klyk)			
MAK 221a	methanogenic endosymbiont of <i>Caenomorpha</i> sp. (AJ132653)	<i>Methanomicrobiaceae</i>	97,4%
MAK 221b	methanogenic endosymbiont of <i>Caenomorpha</i> sp. 2 (AJ132652)	<i>Methanomicrobiaceae</i>	90,4%
MAK 222a	<i>Methanosarcina acetivorans</i> C2A (AE011184)	<i>Methanosarcina</i>	96,9%
MAK 224a	anaerobic methanogenic archaeon ET1-1 (AJ244277)	<i>Methanomicrobiaceae</i>	97,5%
MAK 224b	<i>Methanosarcina</i> sp. (L48408)	<i>Methanosarcina</i>	97,4%
MAK 225a	<i>Methanosarcina acetivorans</i> C2A (AE011184)	<i>Methanosarcina</i>	95,6%
MAK 225b	<i>Methanosarcina acetivorans</i> C2A (AE011184)	<i>Methanosarcina</i>	95,7%
MAK 226a	<i>Methanosarcina acetivorans</i> C2A (AE011184)	<i>Methanosarcina</i>	96,3%
MAK 227a	<i>Methanosarcina</i> sp. (L48408)	<i>Methanosarcina</i>	93,9%

a: Sequenz, die laut FASTA-Programm die beste Übereinstimmung zeigte.

b: Einteilung in taxonomische Gruppen nach den in der Datenbank vorhandenen Informationen.

Alle Sequenzen konnten in die Gruppe der methanogenen Archaeen eingeordnet werden. Von den insgesamt 25 Sequenzen, die in den phylogenetischen Stammbaum eingegliedert wurden, gehören 14 zu den *Methanomicrobiales*, neun können in die Gattung *Methanosarcina* eingeordnet werden und zwei Sequenzen sind mit der Gruppe *Methanosaetaceae* verwandt.

Für die Datenbank-Suche wurden neben den 25 Sequenzen, die im Stammbaum zu sehen sind, noch fünf weitere Sequenzen hinzugezogen. Diese waren kürzer (etwa 200 bp) und wurden für die Einordnung in den

phylogenetischen Stammbaum nicht verwendet. Vier Sequenzen des Permafrost-Auengleys fallen in die Gattung *Methanosarcina*, während vier Sequenzen den *Methanomicrobiaceae* bzw. *Methanomicrobiales* zuzuordnen sind. Eine weitere Sequenz konnte in die Gruppe der *Methanosaetaceae* eingeteilt werden, nachdem die Veröffentlichung von CHIN et al. (1999) zu Rate gezogen wurde.

Im Polygonzentrum der Insel Samoylov sind drei Vertreter den *Methanosarcina* und acht der Ordnung *Methanomicrobiales* zuzuordnen, davon sechs zu der Familie der *Methanomicrobiaceae* und zwei zur Gattung *Methanospirillum*. Eine Sequenz ließ sich in die Familie der *Methanosaetaceae* einordnen.

Aus dem Polygonzentrum von Mamontovy Klyk sind sechs der insgesamt neun Sequenzen mit der Gattung *Methanosarcina* verwandt. Drei weitere Sequenzen sind der Familie *Methanomicrobiaceae* zuzuordnen. Auch hier konnten, wie auch für das Polygonzentrum der Insel Samoylov, einige Sequenzen erst nach Hinzuziehen der Veröffentlichung (CHIN et al., 1999) taxonomisch eingeordnet werden.

Die Übereinstimmung der ermittelten Sequenzdaten mit den Sequenzen aus der Datenbank variierte dabei sehr stark zwischen 90,4% und 98,8%. Das ist ein zum Teil sehr geringer Verwandtschaftsgrad zwischen den ermittelten DNA-Sequenzen und ihrem nächsten Verwandten.

6 DISKUSSION

Aktivität und Diversität der methanogenen Mikroorganismen in Permafrostböden werden durch ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Umweltfaktoren beeinflusst. Neben den Einflussgrößen Temperatur und Substrat spielen auch andere Faktoren wie Wasserstand (KETTUNEN et al., 1999; KUTZBACH et al., 2004) und die daraus resultierenden Redoxbedingungen, Vegetation (KUTZBACH et al., 2004), pH (BERGMAN et al., 1998) sowie Bodenbeschaffenheit (WAGNER et al., 1999) eine bedeutende Rolle für die Methanproduktion. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Temperatur und Substrat auf die Aktivität und Struktur der methanogenen Gemeinschaft untersucht. Die in dieser Studie ermittelten Ergebnisse zeigen dabei eine deutliche Abhängigkeit der Aktivität der methanogenen Mikroorganismen sowohl von der Temperatur als auch vom Substrat. Weiterhin wirken sich diese Faktoren unterschiedlich innerhalb der Bodenprofile aus.

6.1 Einfluss von Temperatur und Substrat auf die Methanbildungsaktivität

Die mikrobiellen Gemeinschaften eines sibirischen Tundrabodens sind extremen klimatischen Bedingungen ausgesetzt. Der Permafrostboden taut nur im Sommer oberflächlich auf. Dadurch kommt es im Laufe des Jahres zu einer beträchtlichen Temperaturspanne (+25°C bis -35°C) im oberen Teil des Bodens. Im Sommer, wenn der Großteil des Methans durch die methanogenen Archaeen gebildet wird, zeigt das Tiefenprofil des aufgetauten Bereichs (active layer) einen Temperaturgradienten, wobei die Temperatur direkt über der Permafrosttafel etwa 0°C beträgt (WAGNER et al., 2003).

Ein Einfluss der Temperatur auf die Zusammensetzung und die Aktivitäten der methanogenen Gemeinschaft wurde von verschiedenen Autoren beobachtet (KOTSYURBENKO, 1993; MOORE & DALVA, 1993; HARGREAVES & FOWLER, 1998; KOBABE, 2001; CHRISTENSEN et al., 2002). Aber auch das Substrat und die Substratverfügbarkeit spielen eine wichtige Rolle für die

Methanogenese (WAGNER, 1998, WAGNER et al. 2005). Der anaerobe Abbau der organischen Substanz, an dem verschiedene Bakteriengruppen beteiligt sind, ist dabei wiederum temperaturabhängig. Die gebildeten Stoffwechsellendprodukte, die am Ende der anaeroben Nahrungskette entstehen, werden von den methanogenen Archaeen als Energie- und Substratquelle genutzt.

Permafrostböden sind durch niedrige Bodentemperaturen gekennzeichnet. Dennoch sind sie eine wichtige Quelle von Methan. Die klassischen Methoden zur Anreicherung und Isolierung von Bakterien führten bisher nicht zu einer Reinkultur psychrophiler methanogener Archaeen aus Tundrenböden. Zur Zeit sind lediglich einige psychrophile bzw. psychrotolerante Isolate bekannt (FRANZMANN et al., 1992; FRANZMANN et al., 1997; SIMANKOVA et al., 2001).

Die wichtigsten Substrate für die Methanogenese sind H_2/CO_2 , Acetat und Methanol. Acetat kann nur von den Gattungen *Methanosarcina* und *Methanosaeta* genutzt werden, während H_2/CO_2 von den meisten Arten metabolisiert werden kann (Garcia, 2000). In der Gattung *Methanosarcina* sind darüber hinaus Vertreter bekannt, die verschiedene Substrate verwenden können.

Die Methanbildungsaktivität der einzelnen Bodenprofile zeigte bei 5°C bzw. 18°C deutliche Unterschiede. Eine Erhöhung der Temperatur von 5°C auf 18°C bewirkte dabei einen starken Anstieg der Aktivität in fast allen Horizonten. Allerdings unterschieden sich die Aktivitätsmuster der methanogenen Archaeen auch innerhalb der untersuchten Bodenprofile. Im Polygonzentrum Kap Mamontovy Klyk war die Zone der höchsten Aktivität unabhängig von der Temperatur in den obersten 12 cm zu finden und nahm dann stark ab. In den untersten Schichten im Bereich des Permafrostes wurde keine oder nur sehr geringe Aktivität festgestellt. Das war auch der Fall, nachdem Substrat dazugegeben wurde. Ein Grund könnten niedrige Zellzahlen der methanogenen Mikroorganismen aus Mangel an Substrat in dieser Tiefe sein oder der Einfluss der veränderten Bodenstruktur (höherer Anteil an Sand). WAGNER et al. (1999) konnten nachweisen, dass die Bodentextur einen Effekt auf die Methanbildung hatte, wobei in Böden mit einer hohen negativ geladenen Oberfläche wie Ton die Methanbildungsrate

anstieg. Die Bodenprofile der Insel Samoylov zeigten in ihrer Aktivität ein anderes Bild. Hier wurden zwei Aktivitätsmaxima innerhalb der Profile festgestellt. Das erste Maximum lag ebenfalls im oberen Teil der untersuchten Profile. Das zweite Aktivitätsmaximum lag dagegen in tieferen Bodenschichten, in denen die Temperatur mit zunehmender Tiefe abnimmt. Es müssen also verschiedene methanogene Mikroorganismen in den einzelnen Horizonten existieren, die an die dortigen Temperatur- und Substratbedingungen optimal angepasst sind. Die Tatsache, dass die Methanbildungsaktivität auch bei 5°C hohe Werte erreichte, lässt die Aussage zu, dass es in den untersuchten Tundraböden psychrophile bzw. psychrotolerante methanogene Archaeen geben muss. So konnten SIMANKOVA et al. (2003) aus kalten terrestrischen Habitaten methanogene Archaeen isolieren, darunter auch ein Vertreter aus einem Tundraboden. WAGNER et al. (2005) beobachteten, dass unabhängig vom Temperaturgradienten, der in einem Permafrostboden herrscht, eine Methanproduktion in der gesamten Auftauzone stattfand. Diese Ergebnisse konnten in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden, da auch bei niedrigen Temperaturen (5°C) eine Aktivität der methanogenen Mikroorganismen beobachtet werden konnte. KOBABE et al. (2004) konnten selbst im Boden direkt über der Permafrosttafel, wo die Temperatur bei etwa 0°C liegt, eine hohe Zellzahl von $1,2 \times 10^8$ Zellen g^{-1} Boden beobachten. Daraus lässt sich ebenfalls ableiten, dass die dort lebenden Mikroorganismen gut an die niedrigen Temperaturen angepasst sein müssen.

Die meist deutlich niedrigeren Aktivitätswerte der unbehandelten Bodenproben sind scheinbar auf einen Mangel an verwertbarem Substrat zurückzuführen. Deshalb ist es notwendig, die Aktivität der methanogenen Archaeen nicht nur hinsichtlich der Temperatur zu betrachten, sondern auch andere Faktoren wie das Substrat zu berücksichtigen.

Allgemein kann gesagt werden, dass die Aktivität unabhängig vom Substrat in fast allen Horizonten anstieg. Selbst dort, wo die Gehalte an organischem Kohlenstoff hoch waren, wirkte sich eine zusätzliche Substratgabe positiv aus. Die Kapazität der Methanbildung dieser Böden ist somit höher anzusehen. Das lässt den Schluss zu, dass die Methanbildung in Permafrostböden substratlimitiert ist (HOGG, 1993; CHRISTENSEN et al., 1999).

WAGNER et al. (2005) stellten für einen Permafrostboden fest, dass der lösliche Kohlenstoff (DOC) in den oberen Bodenschichten eines Polygonzentrums der Insel Samoylov den höchsten Wert erreichte, der mit zunehmender Tiefe deutlich abnahm. Im Gegenzug nahm der Humifikations-Index mit wachsender Tiefe zu. Warum ist das Wachstum der Mikroorganismen, und damit die Methanbildungsaktivität, unter diesen Bedingungen substratlimitiert? Nicht nur die Quantität des organischen Kohlenstoffs ist wichtig für die mikrobielle Aktivität. Auch die Qualität des Kohlenstoffs spielt eine entscheidende Rolle. Unter den anaeroben Bedingungen, wie sie in wassergesättigten Böden der Tundragebiete vorherrschen, wird die organische Materie, die zum Großteil pflanzlichen Ursprungs ist, in Tiefen, wo Methanogenese stattfindet, nur sehr langsam abgebaut (HOGG, 1993; CHRISTENSEN et al., 1999). Die bakteriellen Stoffwechselendprodukte (Acetat, H_2/CO_2 , Formiat, Methanol) aus dem anaeroben Abbau der organischen Bodensubstanz werden von den methanogenen Archaeen als Substrat genutzt. Einen Teil des löslichen Kohlenstoffs bilden die Huminstoffe, welche in Folge ihrer komplexen Struktur nur schwer abbaubar sind und somit in geringem Maße für die Verwertung zur Verfügung stehen. Weiterhin lässt sich die Abnahme des organischen Kohlenstoffgehaltes mit der Tiefe dadurch erklären, dass das pflanzliche Material, wie Blätter und Wurzeln, nach dem Absterben nicht in tiefere Bodenschichten gelangt, da keine oder nur eine geringe Bioturbation des Bodens durch im Boden lebende Makroorganismen vorhanden ist.

Aus den Ergebnissen der Aktivitätstests kann man schließen, dass in den untersuchten Tundrenböden sowohl hydrogenotrophe als auch methylotrophe methanogene Archaeen vorhanden sein müssen, da es nach Substratzugabe mit beiden Substraten zu einem Anstieg in der Methanbildungsaktivität gekommen ist. Auch in den tieferen Horizonten ist mit H_2/CO_2 ein Anstieg der Methanbildung zu beobachten. CONRAD et al. (1989) und WAGNER (1998) zeigten, dass bei Temperaturen über $20^\circ C$ H_2/CO_2 das hauptsächlich genutzte Substrat ist, während bei tieferen Temperaturen (unter $10^\circ C$) bevorzugt Acetat für die Methanogenese verwendet wird. KOTSYURBENKO et al. (1996) konnte aus einem Permafrostboden psychrophile homoacetogene Bakterien isolieren. Acetogene Bakterien konkurrieren im Boden bei niedrigen Temperaturen mit

den methanogenen Archaeen um H_2/CO_2 . Sie können sich gegenüber letzteren durchsetzen, da die Acetogenese bei niedrigen Temperaturen bevorzugt wird (KOTSYURBENKO et al., 1993; NOZHEVNIKOVA et al., 1994; KOTSYURBENKO et al., 2001). Somit ist es möglich, dass der Anstieg der Methanbildung in den unteren Bodenschichten nicht direkt von methanogenen Archaeen verursacht wird, sondern dass acetoklastische methanogene Archaeen das von den homoacetogenen Bakterien gebildete Acetat als Substrat verwenden und es so zu einem Anstieg in der Methanbildung kommt. Das würde bedeuten, dass in den untersuchten Tundraböden auch Vertreter von *Methanosarcina* bzw. *Methanosaeta* zu finden sein müssten. Allerdings kann auch bei niedrigen Temperaturen Methan aus H_2/CO_2 gebildet werden. FRANZMANN et al. (1997) konnten ein psychrophiles methanogenes Archaeon isolieren, das H_2 verwertet. KOBABE (2001) stellte für einen Tundraboden fest, dass es auch bei niedrigen Temperaturen zu einer Substratnutzung von H_2/CO_2 durch methanogene Archaeen kommt.

Die stärkste Förderung der Methanbildung wurde mit H_2/CO_2 als Substrat erreicht. Eine Ausnahme bildete die oberste Bodenschicht der Überschwemmungsebene. Hier war Methanol das bevorzugte Substrat. Die hier lebenden methanogenen Archaeen scheinen damit hauptsächlich den methylo trophen Methanbildnern anzugehören. Dazu gehören Vertreter der Gattung *Methanosarcina*, die die unterschiedlichsten Substrate verwerten können. Durch die alljährliche Überschwemmung dieses Standortes kommt es zu einem Eintrag von Nährstoffen. Diese können von der anaeroben mikrobiellen Gemeinschaft verwertet werden. Methanol entsteht während der anaeroben Zersetzung von pflanzlichen Pektinen oder durch Demethylierung von Ligninen. Ein Teil der jährlichen Fracht der Lena macht pflanzliches bzw. erodiertes Material der Flussufer aus, so dass durch Hochwasser organisches Material ins Delta bzw. in die Laptev-See verfrachtet werden kann.

Der Standort der Überschwemmungsebene ist ebenso wie das Polygonzentrum der Insel Samoylov durch ein zweites Aktivitätsmaximum im Bodenprofil gekennzeichnet. Das bedeutet, dass es nicht wie im Profil des Polygonzentrums Kap Mamontovy Klyk zu einer steten Abnahme der Methanbildung in zunehmender Auftautiefe kommt. Die Mitte des Profils der

Überschwemmungsebene ist durch eine sehr hohe Wurzelichte der darüber wachsenden Vegetation gekennzeichnet. Es ist bekannt, dass Pflanzen niedermolekulare Kohlenstoffverbindungen wie Acetat über ihre Wurzeln in den Boden abgeben (CHANTON et al., 1995; PANIKOV, 1999; STRÖM et al., 2003). Diese haben einen positiven Effekt auf die methanogene Gemeinschaft, indem abgestorbene pflanzliche Komponenten durch andere Bakterien metabolisiert werden und die dabei entstandenen Stoffwechselprodukte von den methanogenen Archaeen als Substrat genutzt werden bzw. die pflanzlichen Ausscheidungen direkt von den methanogenen Mikroorganismen verwendet werden (JACKSON & CALDWELL, 1992; CHANTON et al., 1995, JOABSSON et al., 1999). Dieser Effekt ist im Polygonzentrum der Insel Samoylov nicht zu finden. Hier liegt das zweite Aktivitätsmaximum in der Bodenschicht direkt über dem Permafrost. Im Wurzelbereich der Polygonzentren der Insel Samoylov und Kap Mamontovy Klyk wurde dagegen keine erhöhte Aktivität gemessen. Da sich die Vegetation dieser Standorte deutlich von der der Überschwemmungsebene unterscheidet, ist es denkbar, dass die Pflanzenarten einen wichtigen Einfluss auf die Methanbildung in der Wurzelzone haben.

Die Ergebnisse zur aktuellen und potentiellen Methanbildung zeigen, dass es in Abhängigkeit von der Temperatur und der Substratverfügbarkeit mit zunehmender Bodentiefe zu einer Veränderung in der Zusammensetzung der methanogenen Gemeinschaft in der Auftauzone der untersuchten Tundrenböden kommt.

6.2 Diversität der methanogenen Gemeinschaft innerhalb der Auftauzone

Unter Verwendung eines Primer-Sets, das spezifisch für methanogene Archaeen war (WATANABE et al., 2004), wurden mit Hilfe der PCR-Reaktion die gesuchten 16S rDNA-Gen-Fragmente aus den Bodenproben amplifiziert. Kombiniert mit einer DGGE und anschließender Sequenzierung einzelner DNA-Banden konnte mit dieser Arbeit erstmals ein Überblick über Struktur und Diversität methanogener Archaeen in Permafrostböden Nordsibiriens gegeben werden. HØJ et al. (2005) untersuchten ebenfalls feuchte hocharktische Böden auf die Zusammensetzung der methanogenen

Gemeinschaft. Hier wurden nur zwei ähnliche Standorte (Torfböden) miteinander verglichen. Außerdem war die Auflösung hinsichtlich der Tiefe geringer, da nur die oberen 20 cm beprobt wurden und nicht die gesamte Auftauzone.

Die DGGE-Muster der hier untersuchten Tundrenböden Nordsibiriens zeigen einige Unterschiede innerhalb des Tiefenprofils. Jede DNA-Bande kann dabei theoretisch einem Mikroorganismus zugeordnet werden. Dass dies nicht immer der Fall ist, wird in Kapitel 6.3 näher erläutert. Die Anzahl der DNA-Banden in der Überschwemmungsebene der Insel Samoylov ist über das gesamte Bodenprofil gleichbleibend hoch. Dies steht in Kontrast zu den Ergebnissen der Polygonzentren auf der Insel Samoylov und am Kap Mamontovy Klyk, wo die Diversität mit der Tiefe deutlich abnimmt. Eine Erklärung für die hohe Diversität im Permafrostbereich der Überschwemmungsebene könnte die regelmäßige Überflutung des Areal sein. Durch die alljährlichen Sedimentablagerungen kommt es in der Überschwemmungsebene der Insel Samoylov zu einem Anstieg der Geländeoberfläche von mehreren Zentimetern im Jahr. Die Tiefe der Auftauschicht bleibt jedes Jahr aber annähernd gleich. Somit würden sich die Mikroorganismen der untersten aufgetauten Schicht des Vorjahres nach dem Winter dauerhaft in der Zone des Permafrosts befinden, da der Boden nicht mehr bis in diese Tiefe auftaut. Da dies ein langsamer Prozess ist, der mehrere Jahre benötigt, hätte die methanogene Gemeinschaft der darüberliegenden Horizonte die Möglichkeit, sich an die immer extremer werdenden Bedingungen (dauerhaft niedrige Temperatur, Substratlimitation) anzupassen. Es ist bekannt, dass es Mikroorganismen gibt, die bei Bedingungen unter 0°C metabolisch aktiv sind (CLEIN & SCHIMEL, 1995; RIVKINA et al. 2004; GILICHINSKY et al., 2005). Allerdings zeigten die methanogenen Archaeen aus dem untersten analysierten Horizont keine oder nur sehr geringe Aktivitäten selbst bei zusätzlichem Substratangebot. Hier besteht die Möglichkeit, dass das zugegebene Substrat von den dort existierenden methanogenen Archaeen nicht verwertet werden konnte. Aus kalten Habitaten ist bekannt, dass dort die Methanogenese vor allem über den acetoklastischen Weg abläuft (SCHULZ & CONRAD, 1996; WAGNER, 1998; ZEPP FALZ et al., 1999).

Eine bestimmte DNA-Bande konnte in der gesamten Auftauzone gefunden werden. Dies deutet auf einen methanogenen Mikroorganismus hin, der sowohl unter den dauerhaft kalten Bedingungen nahe der Permafrosttafel, als auch unter den im Sommer gemäßigten Temperaturbedingungen der oberen Bodenschicht existieren kann.

Im Polygonzentrum der Insel Samoylov stieg die Anzahl der DNA-Banden zunächst mit der Tiefe an und erreichte in der Zone der höchsten Wurzeldichte das Maximum, nahm dann aber mit weiterer Tiefe deutlich ab. Dies war in ähnlicher Weise im Polygonzentrum Kap Mamontovy Klyk zu beobachten. Erstaunlicherweise war die Diversität der Mikroorganismen zum Teil auch in Bodenhorizonten hoch, in denen die gemessene Aktivität eher gering war. Dies deutet darauf hin, dass viele Zellen metabolisch wenig aktiv sind. WAGNER et al. (2003) konnten einen zeitlichen Verlauf der Methanproduktion in Permafrostböden feststellen. Die Methanbildung war dabei am Beginn der Vegetationsperiode Anfang Juli fast zehnmal höher als im August. Zur gleichen Zeit verringerte sich auch der Gehalt an löslichem Kohlenstoff (DOC) im untersuchten Boden. Allerdings zeigt die hohe Anzahl an DNA-Banden in diesen Horizonten, dass die Diversität anscheinend nicht durch die Verfügbarkeit des Substrates limitiert ist. Durch eine Anpassung an verschiedene ökologische Nischen, die im komplexen System Boden auf kleinstem Raum zu finden sind, könnten so verschiedene methanogenen Archaeen nebeneinander koexistieren.

Die ansteigende Intensität einiger DNA-Banden mit zunehmender Tiefe indizieren das Vorhandensein psychrophiler bzw. psychrotoleranter methanogener Archaeen. Allerdings sollte man annehmen, dass alle in diesen Tundrenböden existierenden methanogenen Mikroorganismen psychrotolerant sind, da sie einem extremen Temperaturregime ausgesetzt sind und keine Überdauerungsformen wie Sporen oder Cysten bilden können (LANGE & AHRING, 2001). Sie müssen also auf molekularer Ebene Systeme zum Schutz vor Kälte besitzen. Anpassungen an diese extremen klimatischen Bedingungen sind die Synthese von Kälteschutzproteinen oder von kompatiblen Soluten, um eine Kältedenaturierung von Enzymen oder die Bildung von Eiskristallen innerhalb der Zelle zu verhindern (GEORLETTE et al., 2004). Eine flexiblere Struktur von kälteaktiven Enzymen ist dadurch zwar mit einer höheren Thermolabilität gekoppelt, resultiert aber in einer höherer

spezifischen Aktivität bei niedrigen Temperaturen (CAVICCHIOLI et al., 2002) Der Einbau von ungesättigten Fettsäuren in Membranen, damit diese fluid bleiben, ist ein weiterer Mechanismus, sich an Kälte zu adaptieren (NICHOLS et al., 2004).

Eine Anreicherungskultur einer Bodenprobe wurde angesetzt, um zu sehen, ob die methanogenen Archaeen, die mittels molekularer Methoden direkt im Boden nachgewiesen wurden, auch im Labor kultiviert werden können und ob es möglicherweise methanogene Mikroorganismen gibt, die mittels Kultivierung nachweisbar sind, nicht aber in der Bodenprobe selbst.

Die Anreicherungskultur aus dem Polygonzentrum der Insel Samoylov zeigte zwei bzw. drei deutliche DNA-Banden im DGGE-Gel. Obwohl zwei verschiedene Substrate mit drei unterschiedlichen Substratkonzentrationen gewählt wurden, sind mit einer Ausnahme in allen Parallelen zwei DNA-Banden zu sehen. Nur die Anreicherung, die mit 20 mM Methanol inkubiert wurde, zeigte eine dritte DNA-Bande. Dies lässt den Schluss zu, dass zwei bzw. drei methanogene Mikroorganismen aus der Bodenprobe angereichert werden konnten. Die obere DNA-Bande der Anreicherungskulturen konnte in die Familie der *Methanomicrobiaceae* eingeordnet werden. Die These, dass eine DNA-Bande einen Mikroorganismus repräsentiert, wurde für die Interpretation der nicht sequenzierten DNA-Banden aus der Anreicherung übernommen. Für Formiat ist das durchaus denkbar, da es Vertreter dieser Familie gibt, die mit Formiat als Elektronendonator wachsen können. Diese DNA-Bande ist allerdings auch in der mit Methanol inkubierten Probe zu finden ist. Bis *dato* ist kein isolierter Vertreter aus der Familie der *Methanomicrobiaceae* bekannt, der Methanol als Substrat nutzen kann (BOONE & CASTENHOLZ, 2001). Einige Vertreter der Gattung *Methanogenium* können allerdings primäre Alkohole als Elektronendonator für die Reduktion von CO₂ verwenden. Die untere DNA-Bande der Anreicherungen ließ sich in die Gattung *Methanosarcina* einordnen. Die Gattung *Methanosarcina* kann eine Vielzahl von Substraten nutzen. Vertreter dieser Gattung können H₂/CO₂, Formiat, verschiedene Methylverbindungen und Acetat als Energie- bzw. Kohlenstoffquelle verwenden. In der Ausgangsbodenprobe ist diese DNA-Bande im DGGE-Gel nicht detektierbar. Dies kann mehrere Gründe haben. So ist es denkbar, dass die Zellzahl dieses Vertreters in diesem Horizont sehr gering war. Somit waren nur sehr wenige DNA-Templates für

die PCR-Reaktion vorhanden und konnten deshalb im Verhältnis zu anderen Spezies deutlich weniger DNA-Fragmente amplifiziert werden. Die Verteilung der verschiedenen mikrobiellen Vertreter innerhalb des Bodens ist, abhängig von der Verteilung des verfügbaren organischen Kohlenstoffs, auch auf kleinem Raum sehr inhomogen (WACHINGER et al., 2000), so dass in der Bodenprobe für die DNA-Extraktion keine oder nur wenige Zellen dieses methanogenen Archaeons vorhanden waren, während für das Inokulum der Anreicherungskultur Boden mit vielen Zellen genommen wurde. Die Bedingungen der Anreicherung könnten auch deutlich besser für dieses methanogene Archaeon gewesen sein, so dass es durch schnelleres Wachstum andere im Boden befindliche methanogene Mikroorganismen verdrängen bzw. überwachsen konnte. Die mittlere Bande der Anreicherung mit 20 mM Methanol war sowohl im beprobten Horizont als auch in allen anderen Horizonten des Polygonzentrums der Insel Samoylov nicht im DGGE-Gel festzustellen. Hier könnte es sich um ein methanogenes Archaeon handeln, das nur in sehr geringer Zahl im untersuchten Boden vorkommt und somit in der PCR nicht ausreichend amplifiziert wurde. Eine andere Möglichkeit zur Erklärung dieser Bande wäre die Formation von Heteroduplex-Molekülen oder anderen artifiziellen PCR-Produkten, die sich während der PCR gebildet haben könnten und somit ein falsches Bild von der Diversität der methanogenen Archaeen wiedergeben würden. Da diese Bande in den anderen Proben nicht nachgewiesen wurde und die Reaktionsbedingungen für alle Proben gleich waren, ist diese Vermutung aber eher auszuschließen.

Alle sequenzierten DNA-Banden wurden als methanogene Archaeen identifiziert. Es wurden 25 der sequenzierten DNA-Banden in einen phylogenetischen Stammbaum unter Verwendung des ARB-Programms (STRUNK et al., 2001) eingegliedert. Diese und fünf weitere Sequenzen wurden unter Verwendung des FASTA-Programms ebenfalls in taxonomische Gruppen eingeordnet. Die DNA-Banden ließen sich den Gruppen der *Methanomicrobiales* (17 Sequenzen), *Methanosaetaceae* (zwei Sequenzen) und *Methanosarcina* (elf Sequenzen) zuordnen. Diese waren in fast allen Untersuchungsstandorten zu finden. Im Polygonzentrum Kap Mamontovy Klyk wurden keine Sequenzen der Gruppe der *Methanosaetaceae* nachgewiesen. Diese waren jedoch mit je einer Sequenz

in den beiden Bodenprofilen der Insel Samoylov vertreten. Die Vertreter der *Methanomicrobiales* und der Gattung *Methanosarcina* sind dagegen in allen Profilen zu finden. Für die Überschwemmungsebene der Insel Samoylov und dem Polygonzentrum vom Kap Mamontovy Klyk ist das Abundanzverhältnis der methanogenen Vertreter etwa gleich. Für das Polygonzentrum der Insel Samoylov dagegen ist festzuhalten, dass die Ordnung *Methanomicrobiales* stärker als die Ordnung *Methanosarcinales* vertreten ist. HØJ et al. (2005) konnten ebenfalls Vertreter von *Methanomicrobiales*, *Methanosaeta* und *Methanosarcina* in den von ihnen untersuchten Standorten feststellen. Außerdem fanden sie Sequenzen, die zu den *Methanobacteriaceae* gehörten, die in dieser Arbeit aber in keinem der untersuchten Tundrenböden detektiert werden konnte. Auch KOBABE (2001) konnte im von ihr untersuchten Boden eines Polygonzentrums Vertreter der *Methanobacteriaceae* mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) vorfinden. Dieser Unterschied zu den hier dargestellten Ergebnissen kann wiederum auf Inhomogenität von Böden selbst auf kleinem Raum beruhen.

Die Ergebnisse der Sequenzierung zeigen, dass an allen Standorten sowohl die hydrogenotrophe als auch die acetoklastische Methanogenese möglich ist. Soweit bekannt ist, wachsen Vertreter der *Methanomicrobiales* nur mit H_2/CO_2 , Formiat und einigen einfachen Alkoholen als Substrat, während die Vertreter der *Methanosaetaceae* Acetat als einziges Substrat verwerten (BOONE AND CASTENHOLZ, 2001). Doch nicht nur Vertreter der Familie der *Methanosaetaceae* können Acetat als Energie- und Kohlenstoffquelle nutzen. Die meisten Vertreter der Gattung *Methanosarcina* können ebenfalls Acetat metabolisieren (GARCIA et al., 2000). Dabei entstehen sowohl CO_2 als auch CH_4 . In Ökosystemen mit hohen Acetat-Konzentrationen zeigt die Gattung *Methanosarcina* ein schnelleres Wachstum, während bei geringen Acetat-Konzentrationen Vertreter der *Methanosaetaceae* einen Vorteil haben, da sie eine höhere Substrataffinität besitzen (JETTEN et al., 1992). Die Ergebnisse der Aktivitätstests indizieren auch das Vorhandensein von methanogenen Vertretern, die Methylverbindungen als Substrat nutzen können. Dabei kann es sich sowohl um Arten der Gattung *Methanosarcina* handeln, welche mit Hilfe der Sequenzierung auch nachgewiesen wurde, als

auch um methylo trope Vertreter anderer Gattungen wie etwa *Methanococoides*.

Die taxonomische Einordnung der Sequenzen mit Hilfe des FASTA-Programms sollte als Vergleich dienen. Außerdem sollte sie zeigen, inwiefern es möglich ist, die erhaltenen DNA-Sequenzen taxonomisch in eine phylogenetische Gruppe einzuordnen. Die Größe der hierbei genutzten Datenbank ist allerdings limitiert, so dass DNA-Sequenzen aus extremen Habitaten möglicherweise keine große Übereinstimmung mit ihrem gefundenen nächsten Verwandten aufweisen. Mit Hilfe des FASTA-Programms war es möglich, die Einordnung der erhaltenen Sequenzen in eine taxonomische Gruppe vorzunehmen. Dies war mit dem BLAST-Programm des National Center for Biotechnology Information (NCBI) nicht zu realisieren, da viele Sequenzen nur in das Taxon *Archaea* eingeteilt sind und somit die Grundlage fehlt, die Daten bestimmten phylogenetischen Gruppen zuordnen zu können. Allerdings ist die Datenbank, auf die das BLAST-Programm zurückgreift, größer als die Datenbank, die das FASTA-Programm verwendet. Somit war die prozentuale Übereinstimmung der Sequenzen (beim FASTA-Programm) zum Teil niedriger. Unabhängig davon ließen sich die Sequenzen der Umweltproben bestimmten Mikroorganismen zuordnen. Alle erhaltenen 16S rDNA-Sequenzen waren methanogene Archaeen. Die prozentuale Übereinstimmung zwischen den Sequenzen diente dabei der Einteilung in ein bestimmtes Taxon. DNA-Sequenzen, die eine Übereinstimmung von mehr als 95% besaßen, aber von weniger als 97%, wurden in die gleiche Gattung eingeordnet. DNA-Sequenzen mit weniger als 95% Übereinstimmung wurden einer Familie bzw. einer Ordnung zugeordnet. Mikroorganismen, die dagegen eine Übereinstimmung von mehr als 97% in der Gensequenz besitzen, sind einer Spezies zuzuordnen (ROSSELLO-MORA & AMANN, 2001). Die zum Teil schwachen Übereinstimmungen mit dem in der Datenbank gefundenen nächsten verwandten methanogenen Vertreter können verschiedene Gründe haben. Zum einen enthält die verwendete Datenbank nicht so viele Sequenzdaten wie die des BLAST-Programms, da hier die meisten neuen Sequenzen, vor allem aus Umweltproben, eingetragen werden. Zum anderen handelt es sich bei den hier untersuchten Tundrenböden um Habitate, die extremen Umweltbedingungen ausgesetzt sind. Damit sind auch die dort existierenden Mikroorganismen diesen

harschen Bedingungen ausgesetzt, so dass zu erwarten ist, viele neue Arten, darunter bis *dato* unbekannte methanogene Archaeen, isolieren zu können. Dies würde auch die zum Teil großen Abweichungen in der Übereinstimmung der DNA-Sequenz erklären.

6.3 Vorteile und Limitationen der molekularen Methoden

Die in dieser Arbeit verwendeten Methoden der DNA-Extraktion, der DNA-Amplifikation mit Hilfe der PCR, der elektrophoretischen Auftrennung der DNA-Fragmente in einem denaturierenden Gel und der Bestimmung bzw. Einordnung von Mikroorganismen wurden ausgewählt, weil es sich um schnelle und preiswerte Verfahren handelt, bei denen die Vorteile in Bezug auf die Fragestellung überwogen. Die verwendeten Methoden wurden hinsichtlich der Fragestellung geprüft und zum Teil für die Anwendung in Permafrostböden modifiziert.

Die DNA-Extraktion erfolgte mit Hilfe eines kommerziellen Baukastensystem (englisch: Kit). Der Zellaufschluss erfolgte sowohl chemisch mittels Detergenz als auch physikalisch mit Glaskügelchen. Damit sollte gewährleistet werden, dass Zellen, die nicht durch das Detergenz lysieren, unter starkem Schütteln durch die in der Probenlösung enthaltenen Glaskügelchen zerbrechen und somit ihre DNA freisetzen. Diese Art der DNA-Extraktion hat den Vorteil, dass sie schnell und ohne großen Aufwand betrieben werden kann. Allerdings ist es möglich, dass die genomische DNA beim physikalischen Aufschluss durch die dabei herrschenden Scherkräfte und die Glaskügelchen in zu kleine Fragmente zerbrechen. Dies könnte in den anschließenden Anwendungen zu Problemen führen, da dadurch die Wahrscheinlichkeit steigt, dass das gesuchte Gen fragmentiert ist und somit unvollständig als Matrize bei der Amplifikation zur Verfügung steht. Dieses Problem kann durch kürzere Aufschlusszeiten minimiert werden. Auch das Probenmaterial kann einen großen Einfluss auf die Extraktion der mikrobiellen DNA haben. Mikroorganismen, die sich dem direkten Zugang der Glaskügelchen entziehen (etwa durch die Besiedlung der Poren in den Bodenpartikeln), können dann nur durch Detergenzien lysiert werden. Die chemische Lysierung der Zelle mittels Detergenzien ist wiederum abhängig

vom Aufbau der Zellwand bzw. Zellmembran und von der Art der verwendeten Detergenzien.

Die Aufreinigung der extrahierten genomischen DNA spielt ebenfalls eine wichtige Rolle, da bestimmte Substanzen wie Huminstoffe oder Schwermetalle in der Probe einen negativen Einfluss auf die anschließende PCR haben können (TEBBE & VAHJEN, 1993; WILSON, 1997). NIEMI et al. (2001) zeigten, dass verschiedene Methoden der DNA-Extraktion und Aufreinigung zu unterschiedlichen Ergebnissen sowohl in der erhaltenen DNA-Menge als auch in der Fragmentation der genomischen DNA führte. Des Weiteren hatte die DNA-Extraktion bzw. Aufreinigung einen Einfluss auf das DNA-Bandenmuster im DGGE-Gel.

Die anschließende PCR bietet die Möglichkeit, einen bestimmten DNA-Abschnitt in kurzer Zeit zu vervielfältigen. Dabei ist es möglich, universelle Primer einzusetzen, um eine möglichst große Bandbreite der Mikroorganismen des zu untersuchenden Habitats zu erhalten (MOUNÉ et al., 2003). Die Spezifität der Primer kann dabei weiter erhöht werden. BANNING et al. (2005) entwickelten Primer, die spezifisch für die Ordnungen der *Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanomicrobiales* und *Methanosarcinales* aus der Klasse der *Archaea* waren. Allerdings gelten auch hier bestimmte Einschränkungen, die sich auf die Amplifikation und auf die erfassbare Diversität der Mikroorganismen negativ auswirken können. So konnten einige Proben im unverdünnten Zustand nicht amplifiziert werden. Nach einer 1:10-Verdünnung des DNA-Extrakts konnte ein PCR-Produkt im Agarosegel nachgewiesen werden. Einige DNA-Extrakte besaßen eine leicht gelblich-bräunliche Farbe, die wahrscheinlich von nicht entfernten Huminstoffen stammt. Huminstoffe sind als Inhibitoren der PCR bekannt. Durch eine Verdünnung der extrahierten DNA wurden die Kontaminationen ebenfalls verdünnt, so dass sich eine Beeinträchtigung der PCR verhindern ließ. In einer PCR mit einer Mixtur von homologen Genen kann es zu verschiedenen Fehlern und Artefakten kommen (KANAGAWA, 2003). Eine Fehlerquelle, die sich bei der späteren Analyse auswirkt, kann eine unterschiedlich starke Amplifikation des 16S rRNA-Gens sein. Dies führt dazu, dass einige Mikroorganismen in den nachfolgenden Untersuchungen (DGGE, Klonierung) unterrepräsentiert bzw. nicht detektierbar sind. Mögliche Ursachen können das Vorhandensein von mehreren rRNA-Genen auf dem

Genom eines Mikroorganismus sein, so dass bereits eine erhöhte Anzahl von DNA-Templates am Anfang der PCR in einer größeren Menge am Endprodukt resultiert (FARRELLY et al., 1995). Das konnte allerdings von POLZ & CAVANAUGH (1998) nicht bestätigt werden. Sie stellten fest, dass eine selektive Amplifikation von DNA-Templates durch eine niedrige Anzahl von PCR-Zyklen reduziert werden kann. Auch eine hohe Anfangskonzentration von DNA-Template sowie das Vermeiden von degenerierten Primern wirkten sich demnach positiv aus. HANSEN et al. (1998) fanden in ihren Untersuchungen heraus, dass die Bildung von Einzelstrangbereichen innerhalb und außerhalb des zu amplifizierenden Bereichs einen großen Einfluss auf das PCR-Produkt hat. Die dadurch hervorgerufene präferenzielle Amplifikation des DNA-Fragmentes eines Organismus konnte durch die Verwendung eines zweiten Primer-Sets reduziert werden. Niedrigere Temperaturen für die Anlagerung der Primer während der PCR kann bei unterschiedlichen Primer-Bindungsenergien in Folge eines Primer-Mismatches zu einer Optimierung und Reduzierung des Fehlers in der Amplifikation führen (ISHII & FUKUI, 2001).

Die Anwendung der DGGE zur Untersuchung der mikrobiellen Diversität in verschiedensten Habitaten ist eine weitverbreitete Methode (MUYZER et al., 1993; ISHII et al., 2000; WATANABE et al., 2004). Damit ist es möglich, einen schnellen Überblick über die mikrobielle Gemeinschaft des untersuchten Standortes zu bekommen. Durch die spezifische Amplifikation von bestimmten Mikroorganismengruppen konnte so ein Bild der methanogenen Gemeinschaft in Permafrostböden gezeigt werden. Außerdem ist es möglich, eine Verschiebung der mikrobiellen Gemeinschaftsstruktur durch veränderte Habitatbedingungen (Temperatur, Substrat etc.) darzustellen. Auch eine räumliche und/oder zeitliche Veränderung der mikrobiellen Gesellschaft eines Standortes (Boden, Sediment, Wassersäule) kann mit dieser Methode beobachtet werden. Doch nicht nur Umweltproben können Gegenstand der Untersuchung mittels DGGE sein. Der Verlauf von Anreicherungskulturen kann damit ebenso überwacht werden wie die Überprüfung von Reinkulturen auf Kontaminationen. Allerdings ist auch diese Methode nicht frei von Fehlern. Normalerweise soll eine einzelne DNA-Bande im DGGE-Gel einen Mikroorganismus repräsentieren. Die Auftrennung in einem denaturierenden Polyacrylamidgel beruht auf dem sequenzabhängige Aufschmelzen der in

einer PCR amplifizierten DNA-Fragmente. Dabei schmilzt der DNA-Doppelstrang nicht langsam wie ein Reißverschluss am Ende des Moleküls auf, sondern plötzlich in diskreten Bereichen der DNA-Doppelhelix. Durch diese Konformationsänderung kommt es zu einer reduzierten Mobilität im DGGE-Gel. So ist es möglich, dass trotz unterschiedlicher DNA-Sequenz, und damit unterschiedlichen Mikroorganismen, das Schmelzverhalten von verschiedenen DNA-Molekülen gleich ist. Das Resultat ist eine einzelne DNA-Bande im denaturierenden Polyacrylamidgel, die die DNA mehrerer, verschiedener Mikroorganismen enthält (VAN HANNEN et al., 1998; SEKIGUCHI et al., 2001). Dieses Ergebnis wirkt sich negativ auf die analysierte Diversität aus, da einige Bakterien so nicht im Gel erfasst werden und das Ergebnis verfälscht wird. Es kann aber auch sein, dass genau das Gegenteil der Fall ist und mehr DNA-Banden im DGGE-Gel zu sehen sind. So könnten einige Banden doppelt erscheinen. Dabei muss es sich nicht um zwei verschiedene Mikroorganismen handeln. In einem Versuch konnten JANSE et al. (2004) diese artifiziellen Doppelbanden durch einen verlängerten finalen Elongationsschritt während der PCR signifikant verringern.

Die Bestimmung der Taxa mit Hilfe der Datenbanksuche im Internet unter Verwendung des FASTA-Programmes war zum Teil nur bis zur Ordnung möglich, da die erhaltenen Daten keine genaueren Einordnungen zuließen oder sich die beste Übereinstimmung der Sequenzen mit nicht-kultivierten Archaeen, die in keine taxonomische Gruppe eingeteilt sind, ergab. Somit ist mit dieser Methode ein eingeschränkter Überblick über die in der Auftauschicht der einzelnen Standorte zu findenden methanogenen Mikroorganismen erhältlich, d.h. einzelne Arten konnten mit dieser Methode nicht erfasst werden. Das liegt daran, dass die Information in den Datenbanken unzureichend ist. Außerdem sind bisher nur wenige methanogene Vertreter aus kalten Ökosystemen isoliert und beschrieben worden (FRANZMANN et al., 1997). Die Diversität von Mikroorganismen in der Umwelt ist sehr groß, und man geht davon aus, dass ein Großteil der Prokaryoten unkultiviert ist (AMANN et al., 1995; TORSVIK & ØVREÅS, 2002). Mit Hilfe molekularer Methoden, wie der PCR und der DGGE mit anschließender Sequenzierung der DNA-Fragmente ist es möglich, die große Diversität der in der Umwelt vorhandenen Mikroorganismen sichtbar zu machen. Für eine Charakterisierung der Mikroorganismen sind Reinkulturen

jedoch unerlässlich. Deshalb ist die klassische Mikrobiologie nach wie vor von großer Bedeutung. Die allgemeinen Kulturbedingungen für die Isolierung von methanogenen Archaeen selektieren dabei oft bestimmte Vertreter einer Gruppe, die unter diesen Bedingungen schneller und besser wachsen können als ihre Verwandten, die speziellere Bedingungen für das Wachstum benötigen. In empirischen Versuchen, in denen Faktoren wie Substrat, Temperatur etc. variieren, können jedoch Bedingungen geschaffen werden, die methanogene Archaeen, welche in geringerer Abundanz vorkommen, für ihr Wachstum favorisieren.

Für die Einordnung von Mikroorganismen in phylogenetische Gruppen ist das 16S rRNA-Gen gut geeignet, da es in allen Mikroorganismen zu finden ist und keiner schnellen Veränderung in der Sequenz durch Mutationen unterliegt. Ein weiterer Vorteil ist das Vorhandensein von Datenbanken, in denen eine Vielzahl von 16S rRNA-Sequenzen gespeichert sind. In Verbindung mit Computerprogrammen ist es so möglich, diese Daten in einen phylogenetischen Stammbaum zu integrieren und bestehende oder nicht bestehende Verwandtschaften aufzuklären.

6.4 Kritische Betrachtung und Ausblick

Um die *in situ* bzw. die potentielle Methanbildungsaktivität für verschiedene Umweltbedingungen (Temperatur, Substrat) zu ermitteln, eignete sich der gewählte Versuchsansatz bedingt. Er ließ den Schluss zu, dass die Methanbildung an den untersuchten Standorten substratlimitiert ist, die Methanbildung bei höheren Temperaturen wächst und es verschiedene Zonen der Methanbildung in der Auftauzone eines Permafrostbodens gibt. Um aber zu erfassen, welche Temperatur in welchem Bereich des Bodens für die Methanbildung optimal ist, sind zwei Temperaturstufen nicht ausreichend. Außerdem wäre es von Vorteil die Wirkung von weiteren Substanzen, wie etwa Acetat, verschiedene Alkohole oder Methylverbindungen, auf die Methanbildung, zu untersuchen. Daraus könnten dann einfache Rückschlüsse auf das bevorzugte Substrat und die Zusammensetzung der methanogenen Gesellschaft in diesen Tundrenböden gezogen werden.

Die PCR-abhängige DGGE-Methode erwies sich als eine gute Möglichkeit, die Gemeinschaft methanogener Archaeen aus Permafrostböden Nordsibiriens zu untersuchen. Für eine weitere Untersuchung wäre es sicher von Vorteil, verschiedene Primer zu testen oder neue zu entwickeln. Durch einen engeren denaturierenden Gradienten wäre es vielleicht möglich, DNA-Banden, die nicht gut im Gel separiert wurden, besser zu trennen.

Um einen nahezu vollständigen Überblick über die methanogene Gemeinschaft aus Tundrenböden Nordsibiriens zu erhalten, ist die Erstellung einer Klondatenbank unumgänglich. Nur so kann man sicher sein, auch Vertreter mit einer sehr geringen Abundanz zu erfassen, die mit Methoden wie der DGGE nicht oder nur unzureichend detektiert werden. Als zu untersuchendes Gen bzw. Genprodukt würde sich hierbei wieder das 16S rDNA-Gen eignen, da die Datenbankinformationen dafür am größten sind. Allerdings können auch andere funktionelle Gene genutzt werden, die spezifisch für eine Gruppe von Mikroorganismen ist, wie das Methyl-Coenzym-M-Reduktase-Gen (*mcrA*), das nur bei methanbildenden Archaeen zu finden ist. Um zu zeigen, welche methanogenen Archaeen im Tundraboden aktiv sind, könnte man mRNA aus einer Umweltprobe extrahieren und funktionelle Genprodukte, wie das vom oben genannten *mcrA*-Gen, in cDNA transkribieren, die dann, nach Erstellen einer Klondatenbank, sequenziert werden. Für die anschließende Sequenzierung ist es dabei wichtig, dass das vollständige oder annähernd vollständige Gen in der PCR amplifiziert wurde, da es durch zu kurze DNA-Moleküle zu einem Informationsverlust für die spätere Datenbankanalyse kommt, der wiederum in fehlerhaften Interpretationen resultieren kann.

Eine Möglichkeit, Informationen über die Zellzahl und deren gruppenspezifische Einordnung erhalten zu können, ist die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) (AMANN et al., 1995). Außerdem ist es möglich, die Veränderung der mikrobiellen Gemeinschaft mit der Bodentiefe sichtbar zu machen (KOBABE et al., 2004).

Für eine umfassende Charakterisierung der dort lebenden mikrobiellen Biomasse, ist es notwendig, Reinkulturen von methanogenen Archaeen zu isolieren. Dies wäre unerlässlich für die Beschreibung neuer Enzyme oder Metabolite.

LITERATURVERZEICHNIS

AMANN, R.I., LUDWIG, W. AND SCHLEIFER, K.-H. (1995): Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.*, **59**, 143-169

ARE, F. AND REIMNITZ, E. (2000): An overview of the Lena River Delta setting: Geology, tectonics, geomorphology and hydrology. *Journal of Coastal Research*, **16(4)**, 1083-1093

A SELMAN, I. AND CRUTZEN, J. (1989): Global distribution of natural freshwater wetlands and rice paddies, their net primary productivity, seasonality and possible methane emissions. *Journal of Atmospheric Chemistry*, **8**, 307-358

BANNING, N., BROCK, F., FRY, J.C., PARKES, R.J., HORNIBROOK, E.R.C. AND WEIGHTMAN, A.J. (2005): Investigation of the methanogen population structure and activity in a brackish lake sediment. *Environ. Microbiol.*, **7**, 947-960

BARNS, S.M., DELWICHE, C.F., PALMER, J.D. AND PACE, N.R. (1996): Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 9188-9193

BASTVIKEN, D., EJLERTSSON, J. AND TRANVIK, L. (2002): Measurement of methane oxidation in lakes – A comparison of methods. *Environ. Sci. Technol.*, **36**, 3354-3361

BASTVIKEN, D., COLE, J., PACE, M. AND TRANVIK, L. (2004): Methane emissions from lakes: Dependence of lake characteristics, two regional assessments, and a global estimate. *Global Biogeochemical Cycles*, **18**, GB4009

BERGMAN, I., SVENSSON, B.H. AND NILSSON, M. (1998): Regulation of methane production in a Swedish acid mire by pH, temperature and substrate. *Soil Biol. Biochem.*, **30**, 729-741

BOONE, D.R. AND CASTENHOLZ, R. (Eds.) (2001): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany

CAVICCHIOLI, R., SIDDIQUI, K.S., ANDREWS, D. AND SOWERS, K.R. (2002): Low-temperature extremophiles and their applications. *Curr. Opin. Biotech.*, **13**, 253-261

CHAN, O.C., CLAUS, P., CASPER, P., ULRICH, A., LUEDERS, T. AND CONRAD, R. (2005): Vertical distribution of the methanogenic archaeal community in Lake Dagow sediment. *Environ. Microbiol.*, **7**, 1139-1149

CHANTON, J.P., BAUER, J.E., GLASER, P.A., SIEGEL, D.I., KELLEY, C.A. TYLER, S.C., ROMANOWICZ, E.H. AND LAZRUS, A. (1995): Radiocarbon evidence for the substrates supporting methane formation within northern Minnesota peatlands. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **59**, 3663-3668

CHEN, W. AND KONISKY, J. (1993): Characterization of a membrane-associated ATPase from *Methanococcus voltae*, a methanogenic member of the Archaea. *J. Bacteriol.*, **175**, 5677-5682

CHIN, K.-J., LUKOW, T., STUBNER, S. AND CONRAD, R. (1999): Structure and function of the methanogenic archaeal community in stable cellulose-degrading enrichment cultures at two different temperatures (15 and 30°C). *FEMS Microbiol. Ecol.*, **30**, 313-326

CHRISTENSEN, T.R., JONASSON, S., CALLAGHAN, T.V. AND HAVSTRÖM, M. (1999): On the potential CO₂ releases from tundra soils in a changing climate. *Applied Soil Ecology*, **11**, 127-134

CHRISTENSEN, T.R., LLOYD, D., SVENSSON, B., MARTIKAINEN, P.J., HARDING, R., OSKARSSON, H., FRIBORG, T., SOEGAARD, H. AND PANIKOV, N. (2002): Biogenic controls on trace gas fluxes in northern wetlands. *IGBP-Newsletter*, **51**, 9-15

CHRISTENSEN, T.R., PANIKOV, N., MASTEPANOV, M., JOABBSON, A., STEWART, A., ÖQUIST, M., SOMMERKORN, M., REYNAUD, S. AND SVENSSON, B. (2003): Biotic controls on CO₂ and CH₄ exchange in wetlands – a closed environment study. *Biogeochemistry*, **64**, 337-354

CICERONE, R. J. & OREMLAND, R.S. (1988) Biochemical aspects of atmospheric methane. *Global Biochemical Cycles*, **2**, 299-327

CLEIN, J.S. AND SCHIMEL, J.P. (1995): Microbial activity of tundra and taiga soils at sub-zero temperatures. *Soil Biology and Biochemistry*, **27**, 1231-1234

CONRAD, R., BAK, F., SEITZ, H.J., THEBRATH, B, MAYER, P.P. AND SCHÜTZ, H. (1989): Hydrogen turnover by psychrotrophic homoacetogenic and mesophilic methanogenic bacteria in anoxic paddy soil and lake sediment. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **62**, 285-294

ERSHOV, E. D. (Ed.) (1991, released 1996): Geocryological Map of the CIS (USSR); 1:2 500 000; *Moscow State University, Moscow*

FOLLAND, C.K., RAYNER, N.A., BROWN, S.J., SMITH, T.M., SHEN, S.S.P., PARKER, D.E., MACADAM, I., JONES, R.N., NICHOLLS, N. AND SEXTON, D.M.H. (2001): Global temperature change and its uncertainties since 1861. *Geophysic. Res. Letters*, **28**, 2621-2624

FARRELLY, V., RAINEY, F.A. AND STACKEBRANDT, E. (1995): Effect of genome size and *rrn* gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 2798-2801

FISHER, S.G. AND LERMAN, L.S. (1979): Length-independent separation of DNA restriction fragments in two dimensional gel electrophoresis. *Cell*, **16**, 191-200

FISHER, S.G. AND LERMAN, L.S. (1983): DNA fragments differing by single basepair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *PNAS*, **80**, 1579-1583

FRANZMANN, P.D., STRINGER, N., LUDWIG, W., CONWAY DE MACARIO, E. AND ROHDE, M. (1992): A methanogenic archaeon from Ace Lake, Antarctica: *Methanococcoides burtonii* sp. nov. *System. Appl. Microbiol.*, **15**, 573-581

FRANZMANN, P.D., LIU, Y., BALKWILL, D.L., ALDRICH, H.C. AND BOONE, D.R. (1997): Isolation and characterization of psychrophilic, H₂-using methanogen from Ace Lake, Antarctica. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **47**, 1068-1072

GARCIA, J.L., PATEL, B.K.C. AND OLLIVIER, B. (2000): Taxonomic, phylogenetic and ecological diversity of methanogenic *Archaea*. *Anaerobe*, **6**, 205-226

GERDES, B., BRINKMEYER, R., DIECKMANN, G. AND HELMKE, E. (2005): Influence of crude oil on changes of bacterial communities in Arctic sea-ice. *FEMS Microbiology Ecology*, **53**, 129-139

GEORLETTE, D., BLAISE, V., COLLINS, T., D'AMICO, S., GRATIA, E., HOYOUX, A., MARX, J.-C., SONAN, G., FELLER, G. AND GERDAY, C. (2004): Some like it cold: biocatalysis at low temperatures. *FEMS Microbiol. Rev.*, **28**, 25-42

GILICHINSKY, D., RIVKINA, E., BAKERMANS, C., SHCHERBAKOVA, V., PETROVSKAYA, L., OZERSKAYA, S., IVANUSHKINA, N., KOCHKINA, G., LAURINAVICHUIS, K., PECHERITSINA, S., FATTAKHOVA, R. AND TIEDJE, J.M. (2005): Biodiversity of cryopegs in permafrost. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **53**, 117-128

GILMANOV, T.G. AND OECHEL, W.C. (1995): New estimates of organic matter reserves and net primary productivity of the North American tundra ecosystems. *Journal of Biogeography*, **22**, 723-741

GROSSKOPF, R., JANSSEN, P.H. AND LIESACK, W. (1998): Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 960-969

HANSEN, M.C., TOLKER-NIELSEN, T., GIVSKOV, M. AND MOLIN, S. (1998): Biased 16S rDNA PCR amplification caused by interference from DNA flanking the template region. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **26**, 141-149

HARGREAVES, K.J. AND FOWLER, D. (1998): Quantifying the effects of water table and soil temperature on the emission of methane from peat wetland at the field scale. *Atmospheric Environment*, **32**, 3275-3282

HOGG, E.H. (1993): Decay potential of hummock and hollow *Sphagnum* peats at different depths in a Swedish raised bog. *Oikos*, **66**, 269-278

HØJ, L., OLSEN, R.A. AND TORSVIK, V.L. (2005): Archaeal communities in High Arctic wetlands at Spitsbergen, Norway (78°N) as characterized by 16S rRNA gene fingerprinting. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **53**, 89-101

HUBER, H., HOHN, M.J., RACHEL, R., FUCHS, T., WIMMER, V.C. AND STETTER, K.O. (2002): A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature*, **417**, 63-67

INTERGOVERNMENTAL PANEL OF CLIMATE CHANGE (1996): Climate Change 1995: The Science of Climate Change. In: Houghton, J.T., Meira Filho, L.G., Callander, B.A., Harris, N., Kattenberg, A., Maskell, K. (Eds.). *Cambridge, UK, Cambridge Univ. Press*, 572 pp.

INTERGOVERNMENTAL PANEL OF CLIMATE CHANGE (2001): Climate change 2001: The Scientific Basis. In: Houghton, J.T., Ding, Y., Griggs, D.J., Noguer, M., van der Linden, P.J., Dai, X., Maskell, K., Johnson, C.A. (Eds.). *Cambridge, UK, Cambridge Univ. Press*, 243 pp.

ISHII, K., FUKUI, M. AND TAKII, S. (2000): Microbial succession during a composting process as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Jour. Appl. Microbiol.*, **89**, 768-777

ISHII, K. AND FUKUI, M. (2001): Optimization of annealing temperature to reduce bias caused by a primer mismatch in multitemplate PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 3753-3755

JACKSON, R.B. AND CALDWELL, M.M. (1992): Shading and the capture of localized soil nutrients: nutrient contents, carbohydrates and root uptake kinetics of a perennial tussock grass. *Oecologia*, **91**, 457-462

JANSE, I., BOK, J. AND ZWART, G. (2004): A simple remedy against artifactual double bands in denaturing gradient gel electrophoresis. *J. Microbiol. Meth.*, **57**, 279-281

JEANTHON, C., L'HARIDON, S., PRADEL, N. AND PRIEUR, D. (1999): Rapid identification of hyperthermophilic methanococci isolated from deep-sea hydrothermal vents. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **49**, 591-594

JETTEN, M.S.M., STAMS, A.J.M. AND ZEHNDER, A.J.B. (1992): Methanogenesis from acetate – A comparison of the acetate metabolism in *Methanotheroxobacter* and *Methanosarcina* spp.. *FEMS Microbiol. Rev.*, **88**, 181-197

JOABSSON, A., CHRISTENSEN, T.R. AND WALLEN, B. (1999): Vascular plant controls on methane emissions from northern peatforming wetlands. *Trends in Ecology and Evolution*, **14**, 385-388

JOABSSON, A. AND CHRISTENSEN, T.R., (2001) Methane emissions from wetlands and their relationship with vascular plants: an Arctic example, *Global Change Biology*, **7**, 919-932

KANAGAWA, T. (2003): Bias and artifacts in multitemplate polymerase chain reaction (PCR). *J. of Bioscience and Bioengineering*, **96**, 317-323

KETTUNEN, A., KAITALA, V., LEHTINEN, A., LOHILA, A., ALM, J., SILVOLA, J. AND MARTIKAINEN, P.J. (1999): Methane production and oxidation potentials in

relation to water table fluctuations in two boreal mires. *Soil Biology & Biochemistry*, **31**, 1741–1749

KOBABE, S. (2001): Vergleichende Untersuchungen zu den Methanflüssen verschiedener arktischer Habitats des Lenadeltas/ Laptevsee (Sibirien). *Diplomarbeit, Universität Hamburg, Institut für Bodenkunde*.

KOBABE, S., WAGNER, D. AND PFEIFFER, E.-M. (2004): Characterisation of microbial community composition of a Siberian tundra soil by fluorescence in situ hybridisation. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **50**, 13-23

KOTSYURBENKO, O.R., NOZHEVNIKOVA, A.N. AND ZAVARZIN, G.A. (1993): Methanogenic degradation of organic matter by anaerobic bacteria at low temperature. *Chemosphere*, **27**, 1745-1761

KOTSYURBENKO, O.R., NOZHEVNIKOVA, A.N., SLOVIOVA, T.I. AND ZAVARZIN, G.A. (1996): Methanogenesis at low temperatures by microflora of tundra wetland soil. *Antonie van Leeuwenhoek*, **69**, 75-86

KOTSYURBENKO, O.R., GLAGOLEV, M.V., NOZHEVNIKOVA, A.N. AND CONRAD, R. (2001): Competition between homoacetogenic bacteria and methanogenic archaea for hydrogen at low temperature. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **38**, 153-159

KUTZBACH, L. (2000): Die Bedeutung der Vegetation und bodeneigener Parameter für die Methanflüsse in Permafrostböden. *Diplomarbeit, Universität Hamburg, Institut für Bodenkunde*

KUTZBACH, L., WAGNER, D. AND PFEIFFER, E.-M. (2004): Effect of microrelief and vegetation on methane emissions from wet polygonal tundra, Lena Delta, Northern Siberia. *Biogeochemistry*, **69**, 341-362

LANGE, M. AND AHRING, B.K. (2001) A comprehensive study into the molecular methodology and molecular biology of methanogenic Archaea. *FEMS Microbiol. Rev.*, **25**, 553-571

LE MER, J. AND ROGER, P. (2001): Production, oxidation, emission and consumption of methane by soils: A review. *Eur. J. Soil Biol.*, **37**, 25-50

LIEBNER, S. (2003): Verbreitung und Aktivität der methanotrophen Mikroflora in arktischen Böden des Lena-Deltas / Sibirien. *Diplomarbeit, Universität Potsdam, Institut für Geoökologie*

LIN, C., RASKIN, L. AND STAHL, D.A. (1997): Microbial community structure in gastrointestinal tracts of domestic animals: comparative analyses using rRNA-targeted oligonucleotide probes. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **22**, 281-294

MADIGAN, M.T. (2001): Methanogenese. In: Brock, T.D. (Begr.) *Mikrobiologie*. Berlin: *Spektrum, Akad. Verl.* 682-686

MATHRANI, I.M. AND BOONE, D.R. (1985): Isolation and characterization of a moderately halophilic methanogen from a solar saltern. *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**, 140-143

MATTHEWS, E. & FUNG, I. (1987): Methane emissions from natural wetlands: global distribution, area, and environmental characteristics of sources. *Global Biochemical Cycles*, **1**, 61-86

MOORE, T.R. AND DALVA, M. (1993): The influence of temperature and water table position on carbon dioxide and methane emissions from laboratory columns of peatland soil. *J. Soil Sci.*, **44**, 651-664

MORRISSEY, L.A. AND LIVINGSTON, G.P. (1992): Methane emission from Alaska arctic tundra: An assessment of local spatial variability. *J. Geophys. Res.*, **97**, 16661-16670

MOUNÉ, S., CAUMETTE, P., MATHERON, R. AND WILLISON, J.C. (2003): Molecular sequence analysis of prokaryotic diversity in the anoxic sediments underlying cyanobacterial mats of two hypersaline ponds in Mediterranean salterns. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **44**, 117-130

MUYZER, G., DE WAAL, E.C. AND UITTERLINDEN, A.G. (1993): Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 695-700

MYERS, R.M., FISCHER, S.G., LERMAN, L.S. AND MANIATIS, T. (1985): Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient electrophoresis. *Nucleic Acids Res.*, **13**, 3131-3145

NICHOLS, D.S., MILLER, M.R., DAVIES, N.W., GOODCHILD, A., RAFTERY, M. AND CAVICCIOLI, R. (2004): Cold adaptation in the antarctic archaeon *Methanococcoides burtonii* involves membrane lipid unsaturation. *J. Bact.*, **186**, 8508-8515

NIEMI, R.M., HEISKANEN, I., WALLENIUS, K. AND LINDSTRÖM, K. (2001): Extraction and purification of DNA in rhizosphere soil samples for PCR-DGGE analysis of bacterial consortia. *J. Microbiol. Methods*, **45**, 155-165

NOZHEVNIKOVA, A.N., KOTSYURBENKO, O.R. AND SIMANKOVA, M.V. (1994): Acetogenesis at low temperature. In: *Acetogenesis* (Drake, H.L., Ed.), 416-431. Chapman and Hall, New York.

OROS-SICHLER, M., GOMES, N.C.M., NEUBER, G. AND SMALLA, K. (2005): A new semi-nested PCR protocol to amplify large 18S rRNA gene fragments for PCR-DGGE analysis of soil fungal communities. *J. Microbiol. Meth.*, in press

ØVREÅS, L., FORNEY, L., DAAE, F.L. AND TORSVIK, V. (1997): Distribution of bacterioplankton in meromictic lake Sælevannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63** (9), 3367-3373

PANIKOV, N.S. (1999): Fluxes of CO₂ and CH₄ in high latitude wetlands: measuring, modelling and predicting response to climate change. *Polar Research*, **18**, 237-244

PETERS, V. AND CONRAD, R. (1995): Methanogenic and other strictly anaerobic bacteria in desert soil and other oxic soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 1673-1676

POLZ, M.F. AND CAVANAUGH, C.M. (1998): Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 3724-3730

RACHOLD, V., GRIGORIEV, M.N., ANTONOW, M., (1999): Modern sedimentation and environmental history of the Lena Delta. In: Rachold, V., Grigoriev, M.N. (Eds.) Russian-German Cooperation System Laptev Sea 2000: The Lena Delta 1998 Expedition. *Reports on Polar Research*, **315**, 81-82

RIVKINA, E., LAURINAVICHUIS, K., MCGRATH, J., TIEDJE, J.M., SHCHERBAKOVA, V. AND GILICHINSKY, D. (2004): Microbial life in permafrost. *Adv. Space Res.*, **33**, 1215-1221

ROSSELLÓ-MORA, R. AND AMANN, R. (2001): The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.*, **25**, 39-67

ROUSE, W.R., HOLLAND, S. AND MOORE, T.R. (1995): Variability in methane emissions from wetlands at northern treeline near Churchill, Manitoba, Canada. *Arctic and Alpine research*, **27**, 146-156

SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S.J., SCHARF, S.J., HIGUCHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K.B. AND ERLICH, H.A. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491

SAMARKIN V.A.; GUNDELWEIN, A.; PFEIFFER, E.-M. (1998) Studies of methane production and emission in relation to the microrelief of a polygonal tundra in Northern Siberia. In: *Land-Ocean Systems in the Siberian Arctic*, (Kassens; Bauch; Dmitrenko; Eicken; Hubberten; Melles; Thiede; Timokhov; Hrsg.) Springer-Verlag, 329-342

SCHULTZ, J. (1995): Die Ökozonen der Erde. 2. überarb. Aufl. *Ulmer* (Stuttgart)

SCHULZ, S. AND CONRAD, R. (1996): Influence of temperature on pathways to methane production in the permanently cold profundal sediment of Lake Constance. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **20**, 1-14

SCHWAMBORN, G., SCHNEIDER, W. AND GRIGORIEV, M. (1999): Sedimentation and environmental history of the Lena Delta. In: Rachold, V., Grigoriev, M. (Eds.) Russian-German Cooperation System Laptev Sea 2000: The Lena Delta 1998 Expedition. *Reports on Polar Research*, **315**, 94-111

SEKIGUCHI, H., TOMIOKA, N., NAKAHARA, T. AND UCHIYAMA, H. (2001): A single band does not always represent single bacterial strains in denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Biotechnol. Lett.*, **23**, 1205-1208

SCHEFFER, F. & SCHACHTSCHNABEL, P. (1998) *Lehrbuch der Bodenkunde*, 14. Auflage, *Enke Verlag*, Stuttgart

SHEFFIELD, V.C., COX, D.R., LERMAN, L.S. AND MYERS, R.M. (1989): Attachment of a 40-base-pair G+C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *PNAS*, **86**, 232-236

SIMANKOVA, M.V., PARSHINA, S.N., TOUROVA, T.P., KOLGANOVA, T.V., ZEHNDER, A.J.B. AND NOZHEVNIKOVA, A.N. (2001): *Methanosarcina lacustris* sp. nov., a new psychrotolerant methanogenic archaeon from anoxic lake sediments. *System. Appl. Microbiol.*, **24**, 362-367

SIMANKOVA, M.V., KOTSYURBENKO, O.R., LUEDERS, T., NOZHEVNIKOVA, A.N., WAGNER, B., CONRAD, R. AND FRIEDRICH, M.W. (2003): Isolation and characterization of new strains of methanogens from cold terrestrial habitats. *System. Appl. Microbiol.*, **26**, 312-318

SMIGAN, P., MAJERNIK, A. AND GREKSAK, M. (1994): Na⁺-driven ATP synthesis in *Methanobacterium thermoautotrophicum* and its differentiation from H⁺-driven ATP synthesis by rhodamine 6G. *FEBS Lett.*, **349**, 424-428

SOIL SURVEY STAFF (1998): Keys to soil Taxonomy. 8te Auflage. Lincoln, Nebraska: *USDA-The National Resources Conservation Service*.

STRÖM, L., EKBERG, A., MASTEPANOV, M. AND CHRISTENSEN, T.B. (2003): The effect of vascular plants on carbon turnover and methane emissions from a tundra wetland. *Global Change Biol.*, **9**, 1185-1192

STRUNK O, GROSS O, REICHEL B, MAY M, HERMANN S, STUCKMANN N, NONHOFF B, GINHART T, VILBIG A, LENKE M, *et al.* (2001): ARB: a software environment for sequence data. *On the World Wide Web URL: <http://www.arb-home.de>*

TEBBE, C.C. AND 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

TORSVIK, V. AND ØVREÅS, L. (2002): Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr. Opinion Microbiol.*, **5**, 240-245

TROTSENKO, Y.A. AND KHMELLENINA, V.N. (2005): Aerobic methanotrophic bacteria of cold ecosystems. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **53**, 15-26

VAN DER GUCHT, K., VANDEKERCKHOVE, T., VLOEMANS, N., COUSIN, S., MUYLAERT, K., SABBE, K., GILLIS, M., DECLERK, S., DE MEESTER, L. AND VYVERMAN, W. (2005): Characterization of bacterial communities in four freshwater lakes differing in nutrient load and food web structure. *FEMS Microbiology Ecology*, **53**, 205-220

VANEECHOUTTE, M (1996): DNA fingerprinting techniques for microorganisms. *Mol. Biotechnol.*, **6**, 115-142

VAN HANNEN, E.J., VAN AGTERVELD, M.P., GONS, H.J. AND LAANBROEK, H.J. (1998): Revealing genetic diversity of eukaryotic microorganisms in aquatic environments by denaturing gradient gel electrophoresis. *J. Phycol.*, **34**, 206-213

WACHINGER, G., FIEDLER, S., ZEPP, K., GATTINGER, A., SOMMER, M. AND ROTH, K. (2000): Variability of soil methane production on the micro-scale: spatial association with hot spots of organic material and Archaeal populations. *Soil Biology & Biochemistry*, **32**, 1121-1130

WAGNER, D. (1998): Einfluss von Temperatur, Sauerstoff und organischer Substanz auf die Methanogenese in hydromorphen Böden. *Hamburger Bodenkundliche Arbeiten*, **40**.

WAGNER, D., PFEIFFER, E.-M. AND BOCK, E. (1999): Methane production in aerated marshland and model soils: Effects of microflora and soil texture. *Soil Biology & Biochemistry*, **31**, 999-1006

WAGNER, D., KUTZBACH, L., WILLE, C., KOBABE, S., SPOTT, O., KURCHATOVA, A., GRIGORIEV, M.N., STOOF, G., SCHNEIDER, W., ABRAMOVA, E.N., MEYER, H., KUZMINA, S., WETTERICH, S., BOLSHIYANOV, D., FEDOROVA, I., TRETIAKOV, M. AND PFEIFFER, E.-M. (2003a): Ecological studies on permafrost soils and landscapes of the central Lena Delta. In: Grigoriev, M.N., Rachold, V., Bolshiyarov, D.Y., Pfeiffer, E.-M., Schirrmeyer, L., Wagner, D. and Hubberten, H.-W. (Eds.) Russian-German Cooperation SYSTEM LAPTEV SEA: The Expedition LENA 2002. *Reports on Polar and Marine Research*, **466**, 5-136

WAGNER, D., KOBABE, S., PFEIFFER, E.-M. AND HUBBERTEN, H.-W. (2003b): Microbial controls on methane fluxes from a polygonal tundra of the Lena Delta, Siberia. *Permafrost Periglac. Process.*, **14**, 173-185

WAGNER, D., LIPSKI, A., EMBACHER, A. AND GATTINGER, A. (2005): Methane fluxes in permafrost habitats of the Lena Delta: effects of microbial community structure and organic matter quality. *Environ. Microbiol.*, **7 (10)**, 1582-1592

WASHBURN, A.L. (1979): Geocryology. A survey of periglacial processes and environments. London: *Arnold*, 406 S.

WATANABE, T., ASAKAWA, S., NAKAMURA, A., NAGAOKA, K. AND KIMURA, M. (2004): DGGE method for analyzing 16S rDNA of methanogenic archaeal community in paddy field soil. *FEMS Microbiology Letters*, **232**, 153-163

WHALEN, S.C. & REEBURGH, W.S. (1992) Interannual variations in tundra methane emission: a 4-year time series at fixed sites. *Global Biochemical Cycles*, **6**, 139-159

WILSON, I.G. (1997): Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 3741-3751

WOESE, C.R., MAGRUM, L.J. AND FOX, G.E. (1978): Archaeobacteria. *J. Mol. Evol.*, **11**, 245-252

WORLD METEOROLOGICAL ORGANIZATION (1999): Scientific Assessment of Ozone Depletion: 1998. *Global Ozone and Research and Monitoring Project Report*, **44**, Geneva

WUEBBELS, D.J. AND HAYHOE, K. (2002): Atmospheric methane and global change. *Earth-Science Reviews*, **57**, 177-210

YAMAMOTO, S., ALCAUSKAS, J.B. AND CROZIER, T.E. (1976): Solubility of methane in distilled water and seawater. *J. Chem. Eng. Data*, **21**, 78-80

ZEPP FALZ, K., HOLLIGER, C., GROBKOPF, R., LIESACK, W., NOZHEVNIKOVA, A.N., MÜLLER, B., WEHRLI, B. AND HAHN, D. (1999): Vertical distribution of methanogens in the anoxic sediment of Rotsee (Switzerland). *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 2402-2408

ZINDER, S.H. (1993): Physiological ecology of methanogens. In: Ferry, J.G. (Hrsg.) *Methanogenesis: Ecology, Physiology, Biochemistry & Genetics*. New York: *Chapman & Hall*. 128-206

Mein herzlichster Dank gilt:

Dr. Dirk Wagner für die Betreuung während der Zeit am AWI, für die Möglichkeit meine erste Reise ins wilde Sibirien zu machen und dafür, mich für die Mikrobiologie begeistern zu können sowie für die Erstbegutachtung dieser Arbeit.

Prof. Dr. Ingo Schneider für die amüsanten Unterrichtseinheiten an der Uni und für die Zweitbegutachtung dieser Arbeit.

Prof. Dr. Hans W. Hubberten für die sehr guten Arbeitsbedingungen am Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung in Potsdam.

Ute Bastian, Christine Flemming und Heiko Baschek für ihre große Hilfe bei den Laboranalysen, ihrer fast grenzenlosen Geduld bei meinen vielen Fragen und den aufmunternden Worten.

Mashal Alawi vom Institut für Mikrobiologie der Universität Hamburg für die Einweihung in die Geheimnisse der DGGE, für manch fruchtbare Diskussion und Hilfe sowie für die nette Zeit in Hamburg

Uta Zimmermann vom Institut für Bodenkunde der Universität Hamburg für ihre großzügige Hilfe und der Möglichkeit Unterschlupf während der 'Hamburger Woche' zu bekommen.

Lars Kutzbach und Guido Grosse für ihre Hilfe, sei es durch interessante Gespräche oder Material für die Arbeit oder beides.

Dr. German Jurgens (der 'ARB-Meister') von der Universität Helsinki für die Unterstützung bei den molekularen Methoden sowie für sein Interesse.

Marko, mit dem ich viele interessante, wichtige und nicht so wichtige Gespräche hatte, der immer ein Ohr offen hatte für Probleme und Sorgen und für tolle Ritte über die Landstraßen.

Susanne, für ihre großartige Hilfe, dem Interesse an dieser Arbeit und vor allem für die vielen lustigen Zusammenkünfte außerhalb der Arbeit.

Steffi, Julia, Daria, Anne, Kirstin, Diana, Torsten, Mathias und der ganzen AWI-Crew für eine unglaublich schöne Zeit, für unschätzbare Diskussionen, Tipps und Hilfe und dafür, dass man mit euch soviel Spaß haben kann.

In erster Linie *meinen Eltern* für die Ermöglichung meines Studiums, vor allem aber für die uneingeschränkte Unterstützung und Liebe.

Selbständigkeitserklärung

Die vorliegende Diplomarbeit habe ich im Jahr 2005 am Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung in Potsdam fertiggestellt.

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit selbständig und unter Verwendung keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel verfasst wurde.

Lars Ganzert

Potsdam, den 09. Oktober 2005