Methanoxidierende Bakteriengemeinschaften in Böden und Sedimenten des sibirischen Permafrostes

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften im Department Geowissenschaften der Universität Hamburg

vorgelegt von

Uta Zimmermann

aus

Hamburg

Hamburg

2007

Als Dissertation angenommen vom Department Geowissenschaften der
Universität Hamburg

Auf Grund der Gutachten von

Prof. Dr. Eva-Maria Pfeiffer und
Prof. Dr. Walter Michaelis

Hamburg, den 29.01.2007

Prof. Dr. Kay-Christian Emeis
Leiter des Department Geowissenschaften

Danksagung

Als erstes möchte ich meiner Doktormutter Frau **Prof. Dr. Eva-Maria Pfeiffer** danken. Sie hat mir nicht nur das Thema der Arbeit gestellt, sondern mich mit viel Begeisterung an das gesamte Thema Permafrost herangeführt. Außerdem danke ich ihr für die konstruktiven Anregungen und das große Vertrauen, das sie in mich bei der Durchführung der Arbeit gesetzt hat.

Besonders danke ich auch Herrn **Prof. Dr. Walter Michaelis** für die Begutachtung der Arbeit und für die Ermöglichung von Biomarker-^{13}C-Analysen.

Dr. Christian Knoblauch hat mich mit steter Diskussionsbereitschaft und konstruktiver Kritik sehr in meiner Arbeit vorangetrieben und schließlich diese Arbeit gründlich durchgesehen. Dafür und für die gute Zusammenarbeit danke ich ihm ganz herzlich!

In den Laboren des Instituts für Bodenkunde habe ich vielfältige Unterstützung erfahren. Mein besonderer Dank gilt hier **Susanne Kopelke**, ohne die ich die zahlreichen Fettsäure-Analysen nie bewältigt hätte. Susanne leistete nicht nur eine hervorragende technische Arbeit, sondern sie war durch ihre Begeisterungsfähigkeit auch eine wichtige moralische Unterstützung. Ganz besonders danke ich auch **Lars Heling**, der mir mit seinem Engagement und Interesse eine große Unterstützung im Labor war und der mir zudem wertvolle Proben aus Sibirien mitgebracht hat. Ebenso möchte ich mich bei **Birgit Schwinge, Birgit Grabellus, Wilfried Gläseker** und **Arina Maarifat** für ihre Hilfe und die gute Stimmung im Labor bedanken.

Dr. Jörg Freytag war ein Retter in der Not! Ich danke ihm sehr für seine Hilfe in Sachen GCMS. **Dr. Henning Mangels** möchte ich herzlich danken für die GCMS-Analysen, für sein offenes Ohr bei meinen Fragen und für die nette Atmosphäre.

Bei **Dr. Martin Blumenberg** möchte ich mich bestens für die ^{13}C-PLFA Messungen, sein Interesse für diese Arbeit und die sehr fruchtbaren Diskussionen bedanken.

Dr. André Lipski sei herzlich gedankt dafür, dass er mir immer wieder wertvolle methodische Hinweise für die PLFA-Analysen gab.

Die Arbeiten während der Expedition nach Sibirien wären ohne die Hilfe von **Lutz Schirrmeister, Lars Kutzbach, Waldemar Schneider, Hanno Meyer, Victor Kunitsky, Lars Ganzert, Guido Grosse, Günter Stoof** nicht möglich gewesen. Ich danke meinen Expeditionskollegen für ihre große Unterstützung und die schöne Zeit.

Dem **Alfred-Wegener-Institut** gilt mein Dank dafür, dass es mir die Expedition in die Arktis ermöglicht hat.

Den **Mitgliedern des Instituts für Bodenkunde** danke ich für die gute Atmosphäre im Hause. Besonders danke ich meiner Zimmerkollegin **Claudia Fiencke** für die schöne Zeit – zwischenzeitlich war es sehr einsam im Büro ohne sie!

Schließlich möchte ich **Johannes Missall** für die wichtigen Anstöße zur rechten Zeit und für die Hilfe bei der Schlusskorrektur der Arbeit herzlich danken.

Diese Arbeit ist im Rahmen des vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (**BMBF**) geförderten multidisziplinären Deutsch-Russischen Verbundvorhabens „Prozessstudien zur Dynamik des Permafrostes in der Laptev-See“ entstanden. Für die bereitgestellten Mittel möchte ich an dieser Stelle danken.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung

In der von Permafrost unterlagerten arktischen Tundra nehmen Feuchtgebiete einen hohen Flächenanteil ein. Diese ausgedehnten Feuchtgebiete sind global bedeutende Quellen für das Treibhausgas Methan in der Atmosphäre. Durch die mikrobielle Methanoxidation wird die Freisetzung dieses Gases aus den Böden in unterschiedlichem Ausmaß reduziert. In der vorliegenden Arbeit wurden die methanoxidierenden Bakterien (MOB), die für diesen Umsetzungsprozess in der kalten arktischen Tundra verantwortlich sind, untersucht. Vor dem Hintergrund von prognostizierten Temperaturanstiegen – bei gleichzeitig steigenden Niederschlägen – in der Arktis war dabei von besonderer Bedeutung, welchen Einfluss die Temperatur und der Bodenwasserstand auf die Größe, Struktur und Aktivität der gegenwärtig vorhandenen MOB-Gemeinschaften hat.

Die Untersuchungen wurden im Rahmen des vom BMBF geförderten multidisziplinären Deutsch-Russischen Verbundvorhabens „Prozessstudien zur Dynamik des Permafrostes in der Laptev-See“ durchgeführt. In den arktischen Sommern der Jahre 2003 und 2004 konnten die aufgetauten Bereiche landschaftstypischer Böden in der Küstenregion der Laptev-See charakterisiert und beprobt werden. Drei der Untersuchungsstandorte lagen an jeweils unterschiedlichen Reliefpositionen eines Thermoerosionstals, ein Standort befand sich im Zentrum eines Eiskeil-Polygons. Die untersuchten Böden tauten im Sommer für ca. 3 Monate 30-50 cm tief auf, darunter folgte der mehrere 100 Meter mächtige Permafrost. Auch der Permafrost selbst wurde exemplarisch an zwei Küstenaufschlüssen beprobt.

Die Populationsgrößen methanoxidierender Bakterien wurden mittels spezifischer Phopholipid-Fettsäure (PLFA)-Biomarker quantifiziert. Als weiterer Indikator für die Größe der Populationen dienten potentielle Aktivitätsraten, anhand derer auch die Temperaturanpassungen der MOB-Gemeinschaften untersucht wurden. Über Markierungsexperimente mit ^{13}C-angereichertem Methan und anschließender ^{13}C-PLFA-Analyse wurde bestimmt, welche der beiden MOB-Familien („Typ I“ und „Typ II“) aktiv am Methanumsatz beteiligt waren. Diese beiden Familien unterscheiden sich nicht nur phylogenetisch, sondern auch in morphologischen und physiologischen Eigenschaften. Methodisch bedingt mussten die aufwändigen mikrobiellen Studien auf typische Permafroststandorte eingegrenzt werden, was bedeutet, dass nur eine eingeschränkte Probenanzahl im Rahmen dieser Arbeit analysiert werden konnte.

Gemäß der PLFA-Gesamtgehalte und dem Anteil der MOB-spezifischen PLFA-Biomasse hatten die MOB in den untersuchten nassen Tundrenböden eine ähnliche mengenmäßige Bedeutung wie in vergleichbaren hydromorphen Böden wärmerer Klimate. Die Struktur der MOB-Populationen unterschied sich dem gegenüber deutlich von wärmeren Böden: In allen untersuchten Tundrenböden waren PLFA-Biomarker, die spezifisch für die Gruppe der Typ-I-MOB sind, in weit höheren Konzentrationen vorhanden als Typ-II-Biomarker. Nach Inkubation mit ^{13}C-angereichertem Methan waren ebenfalls hauptsächlich PLFA, die charakteristisch für Typ I sind, mit ^{13}C markiert. Die daraus ableitbare Dominanz von Typ I bezüglich Biomasse und Aktivität in den Tundrenböden konnte in wärmeren Böden bislang nicht gefunden werden. Dort kommen entweder beide MOB-Typen in ähnlichen Anteilen nebeneinander vor oder Typ-II-MOB dominieren.

Inkubationsversuche deuteten darauf hin, dass die Temperatur einen starken Einfluss auf die Verteilung von Typ I und Typ II hat: Nach mehrwöchiger Inkubation bei 0°C wurde bei Markierungsexperimenten das ^{13}C – wie bei den *in situ* vorhandenen Populationen – weiterhin hauptsächlich in Typ-I-charakteristische PLFA eingebaut. Nach Inkubation bei 22°C waren dagegen auch Typ-II-PLFA verstärkt markiert. Zudem deuteten Änderungen der PLFA-Konzentrationen während der Langzeit-Inkubationen darauf hin, dass bei 0°C nur Typ I, bei 22°C dagegen nur Typ II Wachstum zeigt. Die Tatsache, dass die *in situ* dominierenden Typ-I-MOB bei 22°C offenbar nicht wachsen konnten, ist ein Hinweis darauf, dass es sich um Organismen mit psychrophilen, d.h. kälteliebenden, Wachstumseigenschaften handelt.

Darüber hinaus ist deutlich geworden, dass die untersuchten MOB-Gesamtpopulationen in ihrer Aktivität – d.h. in der Methan-Abbaugeschwindigkeit – zwar psychrotolerant, aber keineswegs psychrophil waren. Die Aktivitätsoptima lagen bei 22-28°C; erst bei ca. 42°C war keine Aktivität mehr zu beobachten. Bei 0°C erreichten die MOB-Gemeinschaften noch 5 bis 32 % ihrer Optimalaktivität.

Insgesamt waren die MOB-Populationen umso größer, je nasser der Boden war. Dies beruhte wahrscheinlich auf der verstärkten Nachlieferung des notwendigen Substrates Methan, das im anaeroben, wassergesättigten Boden gebildet wird. Die Maximalwerte der MOB-Biomarker-Konzentrationen in den einzelnen Bodenprofilen variierten zwischen 12 und 288 nmol g^{-1} C_{org}. Drei Wochen nach Beginn der Auftauperiode waren die Konzentrationen der MOB-Biomarker sowie die potentiellen Methanoxidationsaktivitäten ähnlich groß wie zu späteren

Zeitpunkten während der Auftauperiode. Dies deutet darauf hin, dass es offenbar keinen deutlichen Rückgang der Populationsgrößen während des 9-monatigen sibirischen Winters gab. Es konnte gezeigt werden, dass die MOB in wassergesättigten Böden gut an niedrige Sauerstoffkonzentrationen angepasst waren: In Proben aus mehr als 10 cm Tiefe unterhalb des Wasserstandes wurde das Methan bei niedrigen Sauerstoffkonzentrationen (ca. 0,5 % v/v) schneller umgesetzt als bei atmosphärischen Sauerstoffkonzentrationen (ca. 21 % v/v). Als Sauerstoffquelle in den wassergesättigten Böden kommen Pflanzenwurzeln in Frage, aus denen Sauerstoff in die Rhizosphäre diffundiert. In inaktiven Bodenbereichen in mehr als 20 cm Tiefe unterhalb des Wasserspiegels deuteten noch vorhandene MOB-Biomarker auf ruhende Methanoxidanten hin; diese konnten nach Inkubation mit optimaler Sauerstoff- und Methanversorgung reaktiviert werden.

MOB aus mehreren 1000 Jahre alten Permafrostlagen waren nach dem Auftauen nicht spontan aktiv, konnten aber überwiegend ebenfalls reaktiviert werden. Reaktivierte MOB waren gemäß ^{13}C-PLFA-Analysen wie die Gemeinschaften der Auftauschicht von Typ-I-MOB dominiert. Die Konzentrationen der MOB-Biomarker im Permafrost waren wesentlich niedriger als in aktiven Bereichen der Auftauschicht, ähnelten aber denen in inaktiven Bereichen oberhalb der Permafrosttafel.

Insgesamt zeigen die vorgestellten Untersuchungen, dass die MOB in den untersuchten nassen Tundrenböden eine große Bedeutung haben und bezüglich Wachstum und Aktivität gut an die niedrigen *in situ* Temperaturen angepasst sind. Es wurde deutlich, dass die aktiven MOB-Gemeinschaften in der Auftauschicht das Potential haben, auf steigende Temperaturen mit Veränderung ihrer Populationsstruktur zu reagieren. Des weiteren haben ruhende MOB im ständig gefrorenen Untergrund die Fähigkeit, nach einem Auftauen wieder aktiv zu werden. Schließlich kann abgeleitet werden, dass steigende Bodenwasserstände und damit einhergehende erhöhte Methanbildungsraten auch die Bedeutung der Methanoxidanten in den Böden erhöhen: Eine erhöhte Substratversorgung mit Methan führt zu einer gesteigerten Methanoxidation. Zahlreiche auf Feldmessungen basierende Untersuchungen zeigen jedoch, dass bei steigenden Wassergehalten eine erhöhte Methanemission zu verzeichnen ist. Demnach kann auch eine vergrößerte Population von Methanoxidanten voraussichtlich nicht verhindern, dass bei steigenden Bodenwasserständen die Methanemissionen aus den Permafrostgebieten zunehmen werden.

Abkürzungsverzeichnis

C_{org}	Organischer Kohlenstoff
GC-*C*-IRMS	Gaschromatograph-*Combustion*-Isotopenmassenspektrometer
GCMS	Gaschromatograph-Massenspektrometer
FAME	Fettsäure-Methylester
FID	Flammenionisationsdetektor
FISH	Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung
GOF	Geländeoberfläche
MOB	Methanoxidierende Bakterien
NMS	Nitrat-Mineralsalz-Nährmedium
PLEL	Phospholipid-Etherlipide
PLFA	Phospholipid-Fettsäuren
TS	Trockensubstanz
WLD	Wärmeleitfähigkeitsdetektor

Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

1 Einleitung und Zielsetzung

Aerobe methanoxidierende Bakterien (MOB) spielen eine wichtige Rolle im globalen Kohlenstoffkreislauf. Besonders bedeutsam sind sie in Böden natürlicher Feuchtgebiete, wo sie das in anaeroben Bodenzonen mikrobiell gebildete Methan als Energie- und Kohlenstoffquelle oxidieren. Dadurch tragen sie erheblich zur Reduktion der natürlichen Emissionen dieses klimarelevanten Spurengases in die Atmosphäre bei. Je nach Standortbedingungen können durch die mikrobielle Methanoxidation wenige Prozente bis zu 100 % des gebildeten Methans wieder abgebaut werden (Moosavi & Crill 1998, Van der Nat & Middelburg 1998, Frenzel & Karofeld 2000, Popp et al. 2000).

In den von Permafrost unterlagerten arktischen Tundrengebieten nehmen Feuchtgebiete einen hohen Flächenanteil ein, da die Böden im Sommer nur wenige Dezimeter tief auftauen und der flachgründig anstehende Permafrost das Wasser in der Auftauschicht (*Active Layer*) staut. Diese nassen Bedingungen führen dazu, dass große Teile der anfallenden organischen Substanz unter anaeroben Bedingungen abgebaut werden und dabei beträchtliche Mengen Methan entstehen. Ingesamt gelten natürliche Feuchtgebiete – mit mehr als 20 % der gesamten globalen Methanemissionen – als bedeutendste Quelle des Methans in der Atmosphäre (IPCC 2001). Nach Schätzungen stammen dabei 15 bis 25 % des Methans aus natürlichen Feuchtgebieten aus den subarktischen und arktischen Breiten (Bartlett & Harriss 1992, Cao et al. 1996, Christensen et al. 1996). Im Zuge der globalen Klimaerwärmung muss mit erhöhten Methanemissionen aus arktischen Gebieten gerechnet werden (Wuebbles & Hayhoe 2002, Zhuang et al. 2004, Lelieveld 2006), zumal für die Arktis eine stärkere Erwärmung als im globalen Durchschnitt – bei gleichzeitig zunehmenden Niederschlägen – beobachtet wird. Modelle prognostizieren, dass sich dieser Trend in Zukunft fortsetzen wird (ACIA 2004).

Die Bodentemperatur und der Wasserstand gehören zu den wichtigsten Steuergrößen für die Methanflüsse in Feuchtgebieten (Whalen 2005), da sie die Größe, Struktur und Aktivität der beteiligten mikrobiellen Gemeinschaften am Standort stark beeinflussen. Für eine bessere Abschätzung der Auswirkungen eines Temperatur- und Niederschlagsanstiegs auf die Methanflüsse aus arktischen Feuchtgebieten sind deshalb unter anderem Kenntnisse über die gegenwärtig vorhandenen beteiligten Mikroorganismen notwendig. Das Wissen über Bodenbakterien, die das Methan in dem kalten Lebensraum Tundra oxidieren, ist noch

unzureichend. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die methanoxidierenden Gemeinschaften in verschiedenartigen Tundrenböden hinsichtlich ihrer Größe und Struktur sowie ihrer Anpassungen an das kalte Habitat Tundra untersucht.

Die Studien an den methanoxidierenden Bakterien wurden im Rahmen des vom BMBF geförderten multidisziplinären Deutsch-Russischen Verbundvorhabens „Prozessstudien zur Dynamik des Permafrostes in der Laptev-See“ durchgeführt. In den arktischen Sommern der Jahre 2003 und 2004 wurden landschaftstypische Böden und Permafrost-Sedimente in der Küstenregion der Laptev-See beprobt und die in diesen Proben vorhandenen MOB über Phospholipid-Biomarker-Analysen, ^{13}C-Markierungsexperimente sowie Aktivitätstests charakterisiert.

Im Einzelnen wurden dabei folgende Fragestellungen bearbeitet:

- Wie groß sind die Populationen der MOB in nassen Tundrenböden? Ähneln die Populationsgrößen denen in vergleichbaren Böden wärmerer Klimate? Wie sind die MOB in verschiedenartigen Tundrenböden räumlich verteilt? Durch welche Standortfaktoren werden die Populationsgrößen gesteuert? Können jahreszeitliche Schwankungen identifiziert werden?

- Welche Bedeutung haben MOB im ständig gefrorenen Untergrund der Tundrenböden? Wie unterscheiden sich die Permafrost-Populationen von denen in der Auftauschicht bezüglich Struktur und Aktivität?

- Wie sind die MOB in ihrer Aktivität an die niedrigen *in situ* Temperaturen in den Tundrenböden angepasst?

- Welche Struktur haben die MOB-Gemeinschaften in den Tundrenböden, wie sind die beiden MOB-Familien („Typ I“ und „Typ II“) in den Böden verteilt? Welchen Einfluss hat die Temperatur auf das Vorkommen der beiden Familien?

2 Grundlagen

2.1 Methan, ein klimarelevantes Spurengas in der Atmosphäre

Methan ist nach Wasserdampf und CO_2 das drittwichtigste Treibhausgas in der Atmosphäre. Ohne den natürlichen Treibhauseffekt durch diese und weitere Gase (z.B. N_2O) läge die durchschnittliche Temperatur an der Erdoberfläche bei -18°C, anstatt bei gegenwärtig +15°C.

Die Methankonzentration in der Atmosphäre ist mit 1,8 ppmv wesentlich geringer als die des CO_2 mit gegenwärtig ca. 380 ppmv. Da jedoch ein Methanmolekül eine 20- bis 30-fach höhere Effektivität im Vergleich mit CO_2 als Treibhausgas besitzt (IPCC 2001), hat das Methan trotz seiner geringen Konzentration hohe Bedeutung für das globale Klima.

Während der letzten zwei Jahrhunderte – etwa seit der Industrialisierung und exponentiellen Bevölkerungszunahme – sind die Konzentrationen vor allem des CO_2 und des Methans in der Atmosphäre stark gestiegen. In diesem Zusammenhang wird auch vom so genannten „zusätzlichen anthropogenen Treibhauseffekt“ gesprochen. Die Konzentration des atmosphärischen Methans hat sich während der letzten 200 Jahre von ca. 0,8 auf 1,8 ppmv mehr als verdoppelt, wobei sich der jährliche Anstieg der Methankonzentration seit den 1990er Jahren verlangsamt hat (IPCC 2001, Dlugokencky et al. 2003). Insgesamt wird dem Methan ein Anteil von 15 bis 20 % am zusätzlichen anthropogenen Treibhauseffekt zugeschrieben (IPCC 1994).

Quellen und Senken des atmosphärischen Methans

Mehr als 70% des Methans in der Atmosphäre ist biogenen Ursprungs (IPCC 2001). Das übrige, nichtbiogene Methan hat sich zum einen in tieferen Erdschichten bei hohen Temperaturen und Drücken aus organischer Substanz gebildet. Der überwiegende Anteil des Erdgases ist auf diese Weise entstanden. Bei der Gewinnung und des Transportes geht ein Teil des Erdgases in die Atmosphäre verloren (Crutzen 1991). Zum anderen entsteht nichtbiogenes Methan bei der unvollständigen Verbrennung von Biomasse, z.B. bei Waldbränden.

Biogenes Methan wird hauptsächlich bei der anaeroben Zersetzung von organischer Substanz durch spezialisierte Mikroorganismen, den methanogenen *Archaea*, produziert. Dies geschieht

vor allem in natürlichen Feuchtgebieten, in Nassreisfeldern, auf Mülldeponien sowie im Verdauungstrakt von Wiederkäuern und Termiten. Das Methan wird dabei vorwiegend aus Acetat oder aus Wasserstoff und CO_2 gebildet, wobei diese Ausgangssubstrate zuvor von verschiedenen Mikroorganismen beim anaeroben Abbau von organischer Substanz produziert werden. Die Methanogenese stellt den terminalen Abbauschritt in der anaeroben Nahrungskette dar. Die beiden wichtigsten Reaktionen der Methanogenese verlaufen entsprechend folgender Gleichungen:

$$4\,H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2\,H_2O$$
$$CH_3COOH \rightarrow CH_4 + CO_2$$

Erst kürzlich konnte außerdem gezeigt werden, dass nicht nur Mikroorganismen unter Sauerstoffabschluss, sondern auch Pflanzen – in Gegenwart von Sauerstoff – Methan produzieren (Keppler et al. 2006). Der genaue biochemische Prozess ist noch nicht identifiziert, Keppler et al. (2006) haben jedoch bereits hochgerechnet, dass nach ihren Untersuchungen ca. 10-30 % des global emittierten Methans von Pflanzen stammen müssen. Diese pflanzliche Methanquelle wird darüber hinaus als eine mögliche Ursache für die oben erwähnte Verlangsamung des jährlichen Anstiegs der Methanemissionen seit den 1990er Jahren diskutiert (Lowe 2006, Keppler et al. 2006), da in diesem Zeitraum in den Tropen durch Waldrodungen eine starke Reduktion der pflanzlichen Biomasse stattfand (FAO 2001).

Nach aktuellen Modellrechnungen von Bousquet et al. (2006) können Schwankungen der jährlichen Methanemissionen zu einem Großteil auf Schwankungen der Emissionen aus natürlichen Feuchtgebieten zurückgeführt werden. Insgesamt reagiert die Methanemission aus natürlichen Feuchtgebieten sehr empfindlich auf Klimaänderungen und kann auch – wenn Temperaturen und Niederschläge insgesamt steigen – in einem positiven Feedback-Mechanismus den globalen Klimawandel verstärken (Lelieveld 2006, Wuebbles & Hayhoe 2002). Dies gilt insbesondere für die in dieser Arbeit untersuchten ausgedehnten arktischen Feuchtgebiete, da für die Arktis eine raschere und stärkere Erwärmung als für die übrige Erdoberfläche beobachtet und ebenso für die Zukunft vorausgesagt wird (IPCC 2001, ACIA 2004).

Ein Methanmolekül in der Atmosphäre hat eine Lebensdauer von ungefähr 10 Jahren. Die größte Senke stellen photochemische Reaktionen mit Hydroxyl-Radikalen in der Atmosphäre dar, ca. 90 % werden so abgebaut (IPCC 2001). Neben diesem abiotischen Abbau werden

etwa 10 % des atmosphärischen Methans nach Diffusion in sauerstoffhaltige Böden durch dort lebende aerobe methanoxidierende Bakterien wieder zu CO_2 oxidiert.

2.2 Methanoxidation in Böden natürlicher Feuchtgebiete

Ein Großteil des Methans, das in anoxischen wassergesättigten Bodenbereichen gebildet wird, gelangt nicht in die Atmosphäre. Schon im Boden diffundiert es in sauerstoffhaltige Zonen und wird dort zu CO_2 oxidiert. Ebenso wie die oben genannte Oxidation des atmosphärischen Methans wird dieser Prozess von aeroben methanoxidierenden Bakterien durchgeführt. Ein wichtiger Unterschied zwischen diesen beiden Prozessen ist, dass bei der Methanoxidation in nassen Böden das Methan in hohen Konzentrationen von mehreren tausend ppmv umgesetzt wird; das Methan aus der Atmosphäre hingegen in einer sehr geringen Konzentration von ca. 1,8 ppmv.

Die mikrobielle Methanoxidation verläuft in beiden Fällen nach folgender Reaktionsgleichung:

$$CH_4 + 2\,O_2 \rightarrow CO_2 + 2\,H_2O$$

In nassen, methanreichen Böden leben die methanoxidierenden Bakterien hauptsächlich an anoxisch/oxischen Grenzschichten, wo sowohl das in den anoxischen Zonen gebildetete Methan als auch Sauerstoff aus den oxischen Bereichen vorhanden ist. Dies ist zum einen nahe des (Grund-)Wasserspiegels gegeben, zum anderen an der Oberfläche der Wurzeln von Feuchtgebietspflanzen im wassergesättigten Boden. Diese besitzen in der Regel ein hohlraumreiches Aerechymgewebe in Blättern, Sproß und Wurzeln, über das sie ihre Wurzelzellen mit Sauerstoff aus der bodennahen Luft versorgen. Dabei kann Sauerstoff aus den Wurzeln in die Rhizosphäre des Bodens diffundieren, und von dort lebenden methanoxidierenden Bakterien für den Abbau von Methan genutzt werden (Whalen 2005).

Die Menge des aus Feuchtgebieten in die Atmosphäre emittierten Methans ist die Differenz aus dem gebildeten und dem bereits im Boden oxidierten Methans.

Die aerobe mikrobielle Methanoxidation ist nicht nur in natürlichen Feuchtgebieten, sondern ebenso in anderen Methanquellen wie Nassreisböden und Deponien von großer Bedeutung.

Auch Methan, das in anoxischen marinen Sedimenten entsteht, wird zu einem großen Teil bereits vor Ort wieder oxidiert. Dieser Prozess erfolgt jedoch in Abwesenheit von Sauerstoff und wird nicht von den hier untersuchten methanoxidierenden Eubakterien durchgeführt. In marinen Sedimenten wird das Methan stattdessen anaerob von Konsortien aus methanoxidierenden Archaeen und sulfatreduzierenden Bakterien abgebaut (Boetius et al. 2002, Michaelis et al. 2002, Blumenberg et al. 2005). Die anaerobe Methanoxidation ist in terrestrischen Böden – in denen meist wesentlich geringere Mengen Sulfat als in marinen Sedimenten vorhanden sind – bislang nicht nachgewiesen worden.

2.3 Die Gruppe der methanoxidierenden Bakterien (MOB)

Aerobe methanoxidierende Bakterien können Methan als alleinige Energie- und Kohlenstoffquelle nutzen und werden daher auch als „methanotroph“ bezeichnet. Zusätzlich zu Methan können sie Methanol verwerten. Kürzlich wurde für die MOB-Gattung *Methylocella* beschrieben, dass diese nicht nur mit Methan und Methanol, sondern auch mit Multi-Kohlenstoff-Verbindungen wie z.B. Acetat, Pyruvat und Ethanol wächst (Dedysh et al. 2005). Diese fakultative Methanotrophie stellt bislang eine Ausnahme unter den methanoxidierenden Bakterien dar, alle anderen bekannten MOB-Stämme können nicht auf Substraten mit C-C-Verbindungen wachsen.

Für die Umsetzung des Methans benötigen die MOB molekularen Sauerstoff, sie können aber unter anaeroben Bedingungen ohne aktiven Methanumsatz gut überdauern: Auch nach mehrwöchiger Kultivierung ohne Sauerstoff wurde beobachtet, dass MOB innerhalb weniger Stunden wieder aktiv wurden, sobald Sauerstoff erneut zur Verfügung stand (Roslev & King 1994).

Es können zwei phylogenetische Gruppen von methanotrophen Bakterien unterschieden werden: die *Methylococcaceae*, die zu den Alpha-Proteobakterien gehören und auch als „Typ I“ Methanotrophe bezeichnet werden, sowie die *Methylocystaceae*, die zu den Gamma-Proteobakterien gehören und auch mit „Typ II“ benannt werden. Die bislang bekannten Gattungen dieser beiden Familien sind in Tab. 3 (Kap. 2.4.2) aufgelistet.

Die beiden MOB-Gruppen unterscheiden sich nicht nur phylogenetisch, sondern – mit Ausnahmen – auch morphologisch und physiologisch. So verwenden sie jeweils

unterschiedliche Stoffwechselwege bei der Assimilation des Methan-Kohlenstoffs. Die Typ-I-Organismen nutzen den Ribulose-Monophosphat-Weg, die Typ-II-Arten den Serin-Weg (Hanson & Hanson 1996, Bowman 2000). Einige der Typ-I-Gattungen (*Methylococcus* und *Methylocaldum*) besitzen allerdings zusätzlich auch Enzyme des Serin-Weges und werden in der Literatur zum Teil als „Typ X"-Methanotrophe bezeichnet (Mancinelli 1995, Hanson & Hanson 1996). Da sie durch 16S-rDNA-Analysen jedoch eindeutig den Typ-I-MOB zugeordnet werden können (Bowman 2000), werden im Folgenden nur die Bezeichnungen Typ I und II verwendet.

Ein klassisches morphologisches Unterscheidungsmerkmal der beiden Gruppen ist die Struktur von intracytoplasmatischen Membranen. Typ I besitzen Membranstapel innerhalb der Zellen, in den Typ-II-MOB sind intracytoplasmatische Membranen dagegen entlang der Zellmembranen angeordnet (Abb. 1).

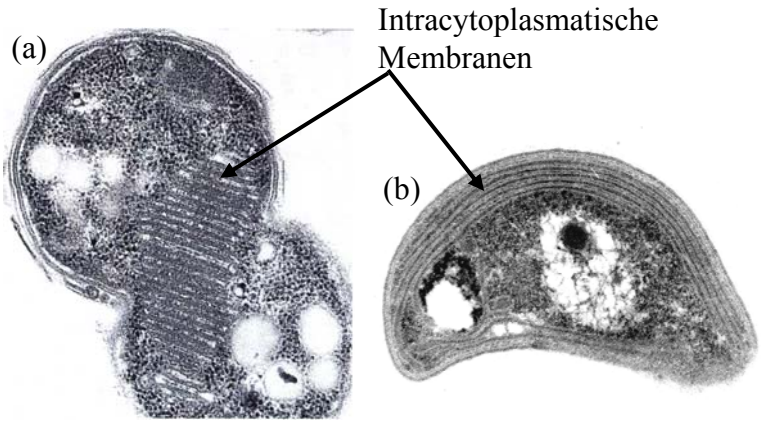

Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Bilder von methanotrophen Bakterien. (a) *Methylococcus capsulatus*, mit einem charakteristischen Typ-I-Membransystem (Foto: Ribbons), (b) *Methylocystis* sp., mit einem charakteristischen Typ-II-Membransystem (Foto: Knoblauch).

Während der letzten Jahre wurden zwei neue methanoxidierende, acidophile Gattungen entdeckt (*Methylocella* und *Methylocapsa*), die phylogenetisch den Typ-II-Organismen zugerechnet werden, die aber keine für diese Gruppe typischen Membransysteme enthalten (Dedysh et al. 2000, 2002). In *Methylocapsa* sind intracelluläre Membranen ähnlich wie in Typ-I-Stämmen gestapelt, wobei sich diese Stapel jedoch auf eine Zellhälfte konzentrieren. *Methylocella* besitzt gar keine intracytoplamatischen Membranen, sondern runde Membranvesikel, die mit der äußeren Zellmembran verbunden sind.

Ein weiteres klassisches Unterscheidungsmerkmal zwischen Typ-I- und Typ-II-MOB ist die Struktur der Membranlipide (Phospholipid-Fettsäuren, PLFA). PLFA werden in der vorliegenden Arbeit zur Charakterisierung von methanotrophen Gemeinschaften genutzt, deshalb wird dieses Merkmal im Zusammenhang mit methodischen Grundlagen (Kap. 2.4.2) ausführlich beschrieben.

Das Schlüsselenzym der methanotrophen Bakterien ist die Methan-Monooxygenase (MMO), die den ersten Schritt der Methanoxidation katalysiert. Dabei wird das Methan zu Methanol oxidiert. Es sind zwei verschiedene, evolutionär nicht miteinander verwandte Formen dieses Enzyms in MOB charakterisiert worden: die lösliche Methan-Monooxygenase (sMMO) und die membrangebundene, partikuläre Methan-Monooxygenase (pMMO). Letztere ist in allen bekannten MOB, außer *Methylocella*, vorhanden; die lösliche Form (sMMO) dagegen nur in den Typ II-Gattungen sowie in einigen der Typ-I-MOB (*Methylococcus, Methylocaldum, Methylomonas*). In den MOB, die beide Enzyme enthalten, wird die Expression der beiden Enyzmformen über die Cu^{2+}-Konzentration reguliert. Bei einer hohen Konzentration von Kupfer-Ionen wird die pMMO, die für ihre Aktivität Kupfer benötigt, exprimiert und die sMMO, die kein Kupfer enthält, reprimiert (Nielsen et al. 1997).

Alle bekannten Typ-II-Gattungen können atmosphärischen molekularen Stickstoff fixieren; unter den Typ-I-MOB ist diese Fähigkeit bislang nur bei Vertretern der Gattungen *Methylococcus, Methylomonas* sowie *Methylobacter* beobachtet worden.

2.4 Methodische Grundlagen

In dieser Arbeit wurden die Verbreitung, Struktur und Aktivität methanoxidierender Bakteriengemeinschaften über die Analyse von Phospholipid-Fettsäuren (PLFA), ^{13}C-Markierungsexperimenten und Aktivitätstests untersucht. Die Potentiale und Grenzen der Anwendbarkeit dieser Methoden werden in den nachfolgenden Kapiteln diskutiert. Zuvor soll zum Vergleich ein kurzer Überblick über weitere häufig angewendete Methoden zur Charakterisierung mikrobieller Gemeinschaften gegeben werden.

2.4.1 Überblick über gängige kultivierungsunabhängige Methoden

Klassische mikrobiologische Methoden basieren auf der Kultivierung, d.h. Anreicherung und Isolierung von Mikroorganismen. Mit diesen Techniken wird allerdings lediglich ein geringer Bruchteil der vorhandenen Populationen erfasst. So wird geschätzt, dass gegenwärtig weniger als 1 % der Mikroorganismen eines Habitats, die über direktes mikroskopisches Auszählen nachweisbar sind, auch kultiviert werden können (Amann et al. 1995). Deshalb wurden in den letzten zwei Jahrzehnten verstärkt Methoden entwickelt, welche die Zusammensetzung mikrobieller Populationen eines Habitats ohne vorherige Kultivierung bestimmen. Diese Methoden ersetzen jedoch nicht vollständig die Kultivierung von Mikroorganismen. Zum Beispiel liefern Reinkulturen Informationen über die physiologischen Eigenschaften einzelner Organismenarten. Außerdem werden aus der Untersuchung von Reinkulturen Informationen gewonnen, die die Entwicklung von kultivierungsunabhängigen Methoden erst ermöglichen.

Viele kultivierungsunabhängige Methoden basieren darauf, direkt aus Umweltproben Moleküle zu extrahieren, die als Indikatoren für bestimmte Mikroorganismen dienen. Bei den Indikatoren handelt es sich meist entweder um Nukleinsäuren (DNS, RNS) oder um Membranlipide der gesuchten Organismen. Bei den Membranlipiden werden Phospholipid-Fettsäuren (PLFA) zur Erfassung von Bakterien und Eukaryonten und Phospholipid-Etherlipide (PLEL) für die Untersuchung von Archaeen genutzt.

Für die Analyse isolierter Nukleinsäuren existiert eine Vielzahl von Methoden. In der Regel folgt der Extraktion dabei zunächst die Vervielfältigung ausgewählter Nukleinsäure-Sequenzabschnitte. Dies geschieht mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Das PCR-Produkt ist ein für die zu untersuchenden Organismen typisches Gemisch aus Nukleinsäure-Sequenzen, das nun mit verschiedenen Techniken weiter analysiert werden kann. Beispiele für diese Methoden sind die Denaturierende und Temperatur Gradienten Gel Elektrophorese (DGGE und TGGE), die (Terminale) Restriktionsfragment Längen Polymorphismus-Analyse (T-RFLP und RFLP) sowie Microarrays. Mit diesen Techniken wird ein schneller Einblick in die Diversität der Organismen in einer Probe gewonnen. Allerdings sind quantitative Aussagen über die Häufigkeit der detektierten Organismengruppen nur sehr eingeschränkt möglich. Dies ist vor allem in der ungleichmäßigen Vervielfältigung von DNS während der PCR begründet, weshalb von der Konzentration des PCR-Produktes nicht eindeutig auf die ursprüngliche DNS-Konzentration vor der Vervielfältigung geschlossen werden kann. Um

diese Schwierigkeiten zu überwinden, wurde die „Real-Time PCR“ entwickelt. Mit dieser Technik kann die Anzahl der detektierten Sequenzen in der untersuchten Probe bestimmt und damit auf die Anzahl der gesuchten Zellen geschlossen werden. Limitierungen aller genannten PCR-basierten Methoden bestehen zum einen darin, dass angesichts der großen Zahl unbekannter Mikroorganismen bei jeder PCR unbekannt ist, ob alle gewünschten Sequenzen und damit Organismen erfasst werden. Zum anderen können die Nukleinsäuren aus Umweltproben häufig nicht vollständig extrahiert werden.

Eine kultivierungsunabhängige Methode ohne die Extraktion und Vervielfältigung von Nukleinsäuren ist die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH). Hier werden die gesuchten Zellen direkt in einer Probe spezifisch angefärbt, wodurch diese unter dem Mikroskop ausgezählt werden können. Die Anfärbung geschieht über Gensonden, an die ein fluoreszierender Farbstoff gekoppelt ist. Diese Sonden binden spezifisch an ausgewählte Sequenzen der ribosomalen RNS (rRNS) der gesuchten Zellen. Es existieren Sonden für verschiedene Organismengruppen, z.B. für Eubakterien oder für Typ I- bzw. Typ II-Methanoxidanten. Es werden nur Organismen mit einer gewissen Mindestaktivität erfasst, weil für die Detektion der Zellen eine Mindestmenge an rRNS vorhanden sein muss und der rRNS-Gehalt mit abnehmender Aktivität sinkt (Bouvier & Del Giorgio 2003). Da die Nukleinsäuren nicht aus der Probe extrahiert werden, kann außerdem die räumliche Anordnung der Zellen in einer Umweltprobe ermittelt werden. Eine Schwierigkeit dieser Methode ist, dass fluoreszierende Zellen in Bodenproben teilweise schwer identifizierbar sind, da mineralische und organische Bodenbestandteile Autofluoreszenz aufweisen bzw. die Gensonden unspezifisch an die organische Substanz binden (Kobabe 2005). Deshalb ist in Bodenproben keine computergestützte Auszählung möglich, was einen hohen Zeitbedarf für derartige FISH-Analysen bedeutet. Das zuverlässige Auszählen erfordert darüber hinaus eine gewisse Mindestanzahl der gesuchten Zellen in der Probe. Dies kann die Untersuchung einzelner Organismengruppen wie z.B. der Methanoxidanten limitieren (Eller & Frenzel 2001). Eine weitere Einschränkung der FISH-Methode ist, dass nicht alle Zellen durchlässig für die mit Farbstoff gekoppelten RNS-Sonden gemacht werden können. Ähnlich wie bei den Primern der PCR ist schließlich auch bei der FISH-Technik immer unsicher, ob die Sequenz der eingesetzten Sonde tatsächlich auf alle gesuchten Organismen passt.

2.4.2 Phospholipid-Fettsäure (PLFA)-Analysen zur Untersuchung von Größe und Struktur mikrobieller Gemeinschaften

Die Zellmembranen aller lebenden Organismen enthalten Phospholipide, entweder in Form von PLFA (Abb. 2; Vorkommen in Bakterien, Eukaryonten) oder von PLEL (Phospholipid Etherlipide, Vorkommen in Archaeen).

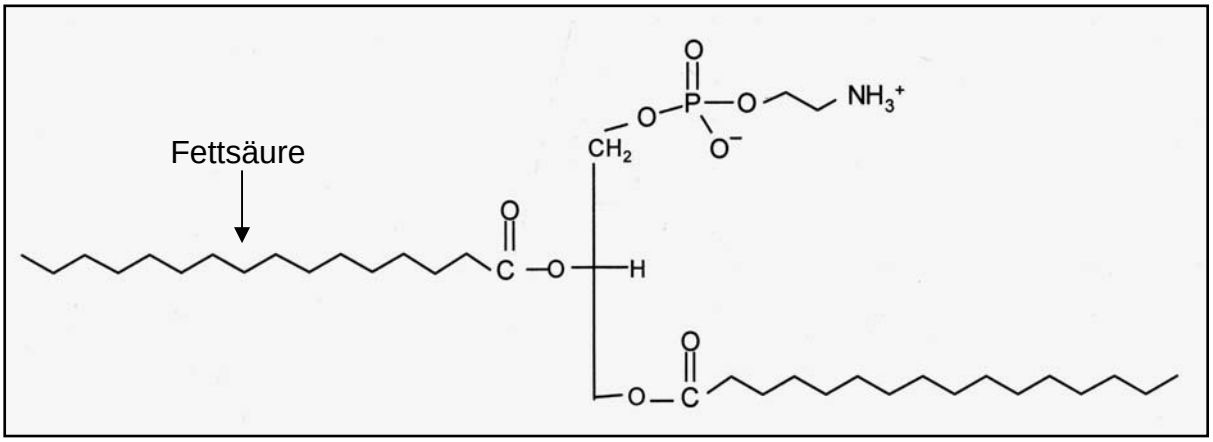

Abbildung 2: Aufbau eines Phospholipid-Moleküls.

Die Phospholipide kommen nicht als Speicherlipide vor, sie sind in relativ konstanten Konzentrationen pro Zelle vorhanden und werden nach dem Zelltod schnell durch Phospholipasen abgebaut (Pinkart et al. 2002). Die Fettsäure-Ketten in den Phospholipid-Molekülen weisen in ihrer Struktur eine hohe Diversität zwischen verschiedenen Organismen auf; eine Reihe von PLFA-Molekülen kommt zudem nach dem heutigen Stand der Untersuchungen spezifisch nur in bestimmten Organismengruppen vor. Da die Phospholipide quantitativ aus Umweltproben extrahierbar sind, eignen sie sich als Biomarker für Organismengemeinschaften (White et al. 1979, Findlay et al. 1989). Für die Untersuchung von mikrobiellen Gemeinschaften können prinzipiell vier verschiedene Arten von Informationen aus den PLFA-Profilen gewonnen werden:

a) Quantifizierung der gesamten lebenden Biomasse,
b) physiologischer Status der Mikroorganismen,
c) Fingerabdrücke ganzer mikrobieller Gemeinschaften,
d) Vorhandensein und Abundanz einzelner Mikroorganismengruppen.

Die Möglichkeiten und Grenzen von PLFA als Quelle für diese vier Informationskategorien sollen im Folgenden vorgestellt werden.

Quantifizierung der gesamten lebenden Biomasse

Die Menge aller PLFA in einer Probe spiegelt die Größe der lebenden Biomasse aus Bakterien und Eukaryonten wider. *Archaea* werden nicht erfasst, diese sind über PLEL quantifizierbar. Eukaryonten-PLFA in Bodenproben (hauptsächlich Pilze und Protozoen, ggf. auch feine Pflanzenwurzeln) bestehen vorwiegend aus mehrfach ungesättigten oder sehr langen (>20C) Fettsäuren, die wiederum in den meisten Bakterien nicht vorkommen (Zelles 1999). Dies erlaubt eine getrennte Abschätzung der Biomasse für diese beiden Gruppen.

Die PLFA-Menge in einer Probe kann immer nur als Annäherung für die Biomasse dienen. Denn die PLFA-Konzentration pro Zelle variiert mit unterschiedlichen Umweltbedingungen (Hood et al. 1986, Brinch-Iverson & King 1990) und zwischen unterschiedlichen Organismenarten (Norland et al. 1987, Findlay et al. 1989, Frostegard & Baath 1996).

Einige Autoren berechnen Zellzahlen aus den PLFA-Mengen in einer Probe. Dabei werden Umrechnungsfaktoren von $2{,}0 \times 10^4$ bis $7{,}1 \times 10^4$ Zellen pro pmol PLFA verwendet (Frostegaard & Baath 1996, Green & Scow 2000, Pinkart et al. 2002).

Physiologischer Status der Mikroorganismen

Mikroorganismen können die Zusammensetzung ihrer PLFA in Abhängigkeit von den herrschenden Umweltbedingungen modifizieren. Deshalb werden in verschiedenen Studien ausgewählte PLFA-Moleküle als Indikatoren für physiologische Zustände von mikrobiellen Gemeinschaften in Böden genutzt (Bossio & Scow 1998, Fierer et al. 2003, McKinley et al. 2005). Typische PLFA-Änderungen infolge Substratmangel sind z.B. Erhöhung des Sättigungsgrades, Cyclisierung von einfach ungesättigten Fettsäuren sowie verstärkte Bildung von trans- im Verhältnis zu cis-Isomeren einfach ungesättigter Fettsäuren (Guckert et al. 1986, Kieft et al. 1994, 1997). Weitere Verschiebungen der PLFA-Struktur können bei Austrocknung, Änderung des pH-Wertes sowie Änderung des Sauerstoffgehaltes eintreten (Knivett & Cullen 1965, Kieft et al. 1994).

Viele Mikroorganismen ändern darüber hinaus die Zusammensetzung ihrer PLFA in Abhängigkeit von der Temperatur. Dies ermöglicht die Aufrechterhaltung einer optimalen Membranfluidität (Russel 1990). In Tab. 1 sind verschiedenartige PLFA-Umstrukturierungen aufgelistet, die infolge von Temperatur-Änderungen in Reinkulturen beobachtet worden sind.

Tabelle 1: Änderungen der PLFA-Zusammensetzung in verschiedenen Reinkulturen bei Erhöhung der Temperatur (zur Nomenklatur der PLFA siehe Kap. 4.5.3).

Änderung in PLFA-Struktur	**Quelle**
Erhöhung des Sättigungsgrades → Anstieg Verhältnis gesättige / ungesättigte Fettsäuren	Jahnke 1992, Doumenq et al. 1999, Könneke & Widdel 2003
Erhöhung der Kettenlänge → Anstieg Verhältnis Σ C18 / Σ C16 oder nur Σ 18:1 / Σ 16:1 - Fettsäuren	Russel & Fukunaga 1990, Doumenq et al. 1999
Änderung der Kettenverzweigung → Anstieg Verhältnis geradkettige / verzweigte oder Anstieg Verhältnis iso / anteiso - Fettsäuren	Russel & Fukunaga 1990, Kaneda 1977, 1991
Anstieg Verhältnis trans- / cis- Isomere von einfach ungesättigten Fettsäuren	Cronan 2002

Die Interpretation von PLFA-Mustern hinsichtlich des physiologischen Zustandes einer Organismengemeinschaft ist mit großen Unsicherheiten behaftet. Die Ursache von Änderungen im PLFA-Muster kann neben physiologischen Anpassungen der vorhandenen Organismen immer auch eine Änderung der Populationszusammensetzung sein. Hinzu kommt, dass nicht alle Organismen mit den gleichen PLFA-Umstrukturierungen auf veränderte Umweltbedingungen reagieren.

Fingerabdrücke ganzer mikrobieller Gemeinschaften

Eine weit verbreitete Anwendung der PLFA-Technik ist die Erstellung von „Fingerabdrücken“ mikrobieller Gemeinschaften. Es werden hier gesamte PLFA-Profile aus Umweltproben betrachtet. Mit Hilfe von multivariaten statistischen Methoden werden die PLFA-Muster zwischen einzelnen Proben verglichen und so die jeweiligen mikrobiellen Gemeinschaften voneinander unterschieden. Es geht bei diesen Analysen weniger um den Nachweis einzelner Bakteriengruppen als um die Untersuchung von allgemeinen Populationsverschiebungen bzw. -unterschieden aufgrund von Umwelteinflüssen.

Es gibt zahlreiche Arbeiten, in denen über PLFA-Fingerabdrücke die Struktur der mikrobiellen Gemeinschaften in Böden analysiert wurde: Dabei sind in jüngeren Studien mit dieser Technik z.B. der Einfluss von verschiedenartigen Kohlenstoff-Quellen (Brant et al. 2006), von unterschiedlichen Düngervarianten (Cookson et al. 2005), von verschiedenartiger

Landnutzung (McKinley et al. 2005) sowie von Schwermetallen (Baath et al. 2005) auf die mikrobiellen Gemeinschaften in Böden untersucht worden.

Eine Unsicherheit bei der Interpretation von PLFA-Fingerabdrücken ist, dass die PLFA-Muster sich nicht nur infolge von Änderungen der Populationszusammensetzung verschieben, sondern auch infolge physiologischer Anpassungen der vorhandenen Organismen (siehe oben).

Vorhandensein und Abundanz einzelner Mikroorganismengruppen

Ein PLFA-Molekül ist ein geeigneter Biomarker, wenn alle Organismen einer bestimmten Gruppe diese Fettsäure in ähnlichen Konzentrationen enthalten und alle anderen Organismen den Biomarker nicht bilden. In diesem Falle ist eine Quantifizierung einzelner Organismengruppen innerhalb einer mikrobiellen Gemeinschaft über PLFA Biomarker möglich.

Die Einstufung einer Fettsäure als Biomarker beruht auf der Lipidanalyse von vorhandenen Reinkulturen. Da die Mehrzahl aller Mikroorganismen bislang nicht kultiviert wurde (Amann et al. 1995), sind diese Einstufungen mit Unsicherheiten behaftet – ähnlich wie die Nutzung von Primern und Gensonden bei den Nukleinsäure-basierten Methoden. Die Zuordnung von PLFA zu Organismengruppen ist weniger spezifisch als die Zuordnung von RNS-/DNS-Sequenzen. So besitzen bei weitem nicht alle Organismengruppen typische Biomarker-PLFA. Außerdem ist es nur in Ausnahmefällen möglich, über PLFA bis auf das Gattungsniveau zu bestimmen. Einige häufig verwendeten PLFA Biomarker sind in Tab. 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Häufig genutzte Biomarker für einzelne Organismengruppen (zur Nomenklatur der PLFA siehe Kap. 4.5.3).

Biomarker	**Interpretation**	**Quelle**
Geradkettig gesättigte > C20	Eukaryonten, Moose, höhere Pflanzen	Zelles 1999
Mehrfach ungesättigte Fettsäuren	Mikroeukaryonten, Cyanobakterien	Lechevalier 1977, Lechevalier & Lechevalier 1998
18:2ω6c	Pilze	Frostegard & Baath 1996
Verzweigte Fettsäuren	Gram-positive Bakterien	O'Leary & Wilkinson 1988
Zyklische und einfach ungesättigte Fettsäuren	Gram-negative Bakterien	O'Leary & Wilkinson 1988, White et al. 1996
10Me18:0	Aktinomyceten	Kroppenstedt 1985, Brennan 1988
i17:1ω7	*Desulfovibrio sp.*	Edlund et al. 1985
16:1ω8c	Typ I Methanotrophe	Bowman et al. 1993, Bowman 2000
18:1ω8c	Typ II Methanotrophe	Bowman et al. 1993, Bowman 2000, Wise et al. 2001, Kalyuzhnaya et al. 2005

Für die meisten PLFA-Biomarker existieren Ausnahmen, die deren Spezifität einschränken. Dies gilt auch die Methanotrophen-Marker. Die beiden in Tab. 2 genannten PLFA 16:1ω8c und 18:1ω8c wurden zwar bislang nur in methanotrophen Bakterien gefunden, aber gerade in jüngeren Studien wurden mehrere MOB-Gattungen ohne diese PFLA beschrieben (Tab. 3). Außer *Methylobacter* sind alle bekannten MOB, die die Biomarker nicht enthalten, allerdings an extreme Lebensbedingungen angepasst, sie sind halo-, thermo- oder acidophil (Tab. 3). Demnach sind diese MOB in vielen Böden, auch in den in dieser Arbeit untersuchten Tundrenböden mit nur leicht sauren pH-Werten, nicht zu erwarten.

Tabelle 3: Vorkommen der beiden MOB-spezifischen PLFA-Biomarker in den bekannten MOB-Gattungen.

	Gattung	16:1ω8c	18:1ω8c	Quelle	Bemerkung
Typ I					
	Methylosarcina	+	-	Wise et al. 2001; Kalyuzhnaya et al. 2005	
	Methylosphaera	+	-	Bowman 2000	
	Methylomicrobium	+	-	Bowman 2000	
	Methylomonas	+	-	Bowman 2000	
	Methylobacter	(+)*	-	Bowman 2000; Wartiainen et al. 2006	
	Methylococcus	-	-	Bowman 2000	Thermotolerant bis thermophil, bekannte Stämme wachsen nicht unter 25°C.
	Methylocaldum	-	-	Bowman 2000	Mesophil bis thermophil, aber nicht psychrotolerant, bei bekannten Stämmen Wachstum nur bei 20°C und höher.
	Methylohalobius	-	-	Heyer et al. 2005	Halophil, aus hypersalinen Seen isoliert.
	„Methylothermus“	-	-	Tsubota et al. 2005	Thermophil, aus heißen Quellen isoliert.
Typ II					
	Methylosinus	-	+	Bowman 2000	
	Methylocystis	-	+	Bowman 2000	
	Methylocella	-	-	Dedysh et al. 2000, Dunfield et al. 2003, Dedysh et al. 2004	Acidophil, aus sauren Sphagnentorfen und sauren Waldböden isoliert.
	Methylocapsa	-	-	Dedysh et al. 2002	Acidophil, aus sauren Sphagnentorfen isoliert.

* Bei Methylobacter enthalten nicht alle Gattungen den Typ-I-Biomarker.

Trotz der genannten Einschränkungen werden die Biomarker häufig für die Charakterisierung von methanotrophen Gemeinschaften genutzt, zumal die PLFA-Technik eine der wenigen Methoden darstellt, die eine grobe Quantifizierung der MOB, getrennt nach Typ I und II, erlaubt. Der Vorteil der PLFA-Methode gegenüber Nukleinsäure-basierten Methoden ist, dass

die Extraktion und Bestimmung der Lipide aus Umweltproben mit größerer Sicherheit quantitativ erfolgt als die Extraktion von Nukleinsäuren. Im Vergleich zur FISH-Methode ist die PLFA zudem wesentlich schneller durchzuführen und weniger stark limitiert durch geringe MOB-Anteile an der gesamten bakteriellen Biomasse.

Die Anteile der Biomarker an der gesamten PLFA pro Zelle liegen für die bekannten Typ-I-MOB zwischen 14 und 41%, für die Typ-II-MOB zwischen 19 und 68% (Sundh et al. 1995, Wise et al. 2001). Auf der Basis dieser Gehalte schätzen einige Autoren die Zellzahlen der Methanotrophen in Umweltproben ab (Sundh et al. 1995, Macalady et al. 2002, Costello et al. 2002, Gebert et al. 2004).

2.4.3 Potentielle Aktivitäten als Indikator für Populationsgrößen

Ein weiterer Indikator für die Größe von MOB-Populationen stellt die potentielle Methanoxidationsaktivität dar (Sundh et al. 1995, Costello et al. 2002). Diese wird im Labor durch so genannte *Batch*-Versuche bestimmt. Dabei wird der Methanabbau in Bodenproben unter sättigenden Substratkonzentrationen und einer festgelegten Temperatur gemessen. Diese Methode ist geeignet, um die Bedeutung der Methanoxidation an verschiedenen Standorten zu vergleichen. Eine Quantifizierung von Zellzahlen oder *in situ* Aktivitätsraten ist nicht möglich. Die *in situ* Aktivitäten sind stark von der Methan- und Sauerstoffkonzentration sowie von der Temperatur abhängig, die *in situ* zeitlich und kleinräumig stark schwanken und sich im Laborversuch nicht simulieren lassen. Wenn die Organismen in einer Probe spontan hohe potentielle Aktivitäten zeigen, kann allerdings davon ausgegangen werden, dass nicht nur die Populationen, sondern auch die *in situ* Raten hier vergleichsweise groß sind. Über *Batch*-Versuche kann außerdem die Abhängigkeit der Methanoxidation von einem Umweltfaktor, z.B. der Temperatur, der Sauerstoffkonzentration, der Salinität oder des pH-Wertes, bestimmt werden.

2.4.4 ^{13}C-Markierung von PLFA und weitere Methoden zur direkten Verknüpfung von Populationsstruktur und Funktion

Durch die Inkubation von Umweltproben mit Substraten, die mit stabilen Isotopen markiert sind, können diejenigen Organismen(gruppen) identifiziert werden, die aktiv am Umsatz der zugegebenen Substrate beteiligt sind. Die Markierung erfolgt meist mit den stabilen Isotopen

^{13}C oder Deuterium (^{2}H). Alle Organismen, die das zugegebene Substrat umsetzen und in ihre Zellsubstanz einbauen, reichern auch die schweren Isotope in ihren Zellen an. Die Identifizierung dieser Organismen erfolgt entweder über die Analyse von markierten Membranlipiden (PLFA, PLEL) oder von markierter DNS bzw. RNS. Somit wird es möglich, phylogenetische Informationen mit physiologischen in Umweltproben zu verknüpfen.

^{13}C-Markierung von PLFA

In dieser Arbeit werden die PLFA-Untersuchungen mit $^{13}CH_4$-Markierungsexperimenten kombiniert. Mit der ^{13}C-Technik können alle PLFA der aktiven Methanoxidanten und nicht nur die spezifischen MOB-Biomarker identifiziert werden. Viele PLFA sind innerhalb der Gruppe der Methanoxidanten typisch für Typ-I- oder Typ-II-Organismen, darüber hinaus aber auch in anderen Bakterienarten verbreitet. Ohne Markierungsexperimente könnten diese PLFA nicht zur Identifizierung von Typ-I- oder Typ-II-Methanoxidanten herangezogen werden. Durch die Ergänzung der PLFA-Technik mit ^{13}C-Markierungen werden also auch Typ I oder Typ II identifiziert, wenn sie nicht die spezifischen Biomarker enthalten.

Schon geringe ^{13}C-Anreicherungen in den einzelnen PLFA-Molekülen werden mit einem Gaschromatograph-Isotopenmassenspektrometer (GC-*C*-IRMS) präzise quantifiziert. Dadurch kann mit niedrigen Substratkonzentrationen und kurzen Inkubationszeiten gearbeitet werden. Dies vermindert das Risiko von unerwünschten Quermarkierungen von nicht-methanotrophen Organismen, die zum Beispiel entstehendes $^{13}CO_2$ assimilieren. Außerdem ist bei niedrigen Substratkonzentrationen und kurzen Inkubationszeiten die Wahrscheinlichkeit geringer, dass es zur Aktivierung von *in situ* inaktiven Zellen oder zum Wachstum von Organismen kommt – und damit nicht mehr allein die *in situ* aktive Bakteriengemeinschaft markiert wird. Ein Nachteil der ^{13}C-PLFA-Technik ist, dass nicht alle Organismengruppen spezifische PLFA-Biomarker besitzen und nicht jede markierte PLFA einer bestimmten Organismengruppe zugeordnet werden kann. Auch wenn derartige Zuordnungen nicht möglich sind, können jedoch durch unterschiedliche Markierungs-Muster in Vergleichsproben noch Verschiebungen in der Zusammensetzung von aktiven Populationen nachgewiesen werden.

Einen Überblick über Anwendungsmöglichkeiten und weitere technische Einzelheiten dieser Methode geben Boschker et al. (2002) sowie Evershed et al. (2006). Es existiert eine Vielzahl von Untersuchungen, in denen methanoxidierende Gemeinschaften über die ^{13}C-Markierung

von PLFA charakterisiert worden sind. So wurden beispielsweise MOB, die Methan in atmosphärischen Konzentrationen umsetzen, detektiert (Bull et al. 2000l, Knief et al. 2003, Crossman et al. 2005, Maxfield et al. 2006). Außerdem ist der Einfluss von Stickstoffverbindungen auf MOB-Gemeinschaften untersucht worden (Nold et al. 1999, Crossman et al. 2006, Mohanty et al. 2006) und es wurden die MOB in Deponie-Abdeckungen (Crossman et al. 2004) und in Feuchtgebieten der gemäßigten Klimate (Knief et al. 2006) charakterisiert. MOB in Tundrenböden sind bislang noch nicht mit dieser Methode untersucht worden.

^{13}C-Markierung von Nukleinsäuren

Die Analyse von markierter DNS hat den großen Vorteil gegenüber der ^{13}C-PLFA-Technik, dass die markierten Nukleinsäure-Sequenzen genau phylogenetischen Gruppen zugeordnet werden können. Der Nachteil ist, dass bei der DNS-Methode mit wesentlich höheren Substratkonzentrationen und längeren Inkubationszeiten gearbeitet werden muss als bei der Markierung von PLFA. Denn das ^{13}C wird nur in die DNS von sich teilenden Zellen eingebaut. Somit kann die Aktivierung inaktiver Zellen nicht ausgeschlossen werden. Zudem sind sehr hohe ^{13}C-Gehalte der Nukleinsäure-Moleküle notwendig, um nach der Inkubation die mit ^{13}C angereicherte DNS von der unmarkierten zu trennen. Diese Auftrennung geschieht über eine Dichtegradienten-Zentrifugation, bei der es zudem zur Kontamination der ^{13}C-angereichten Fraktion mit unmarkierter DNS kommen kann.

Wenn anstatt der DNS die RNS untersucht wird, kann kürzere Zeit inkubiert werden, da für den Einbau des ^{13}C in die RNS keine Zellteilung notwendig ist.

Anwendungsmöglichkeiten und weitere Erläuterungen zur Markierung von DNS und RNS mit stabilen Isotopen finden sich in den Reviews von McDonald et al. (2005), Friedrich (2006) sowie Whiteley et al. (2006). Methanotrophe Gemeinschaften wurden mit dieser Methode zum Beispiel in Moorböden (Morris et al. 2002), in Böden sauer Waldstandorte (Radajewski et al. 2002) sowie in Sedimenten von Soda-Seen (Lin et al. 2004) untersucht.

Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren

Weitere Methoden, über die der Umsatz eines Substrates direkt mit den beteiligten Organismengruppen in Verbindung gebracht werden kann, sind FISH-MAR (Fluoreszenz *in*

situ Hybridisierung – Microautoradiographie) und Isotope Arrays. Bei beiden Methoden wird eine Umweltprobe zunächst mit radioaktiv markierten Substraten inkubiert.

Für die kombinierte FISH und Mikroautoradiographie wird anschließend, wie weiter oben beschrieben, die FISH durchgeführt. Unter dem Mikroskop fluoreszieren zum einen die mit der eingesetzten RNS-Sonde gesuchten Zellen. Zum anderen werden die Zellen, die zuvor das radioaktiv markierte Substrat assimiliert haben, durch autoradiographische Visualisierung sichtbar und können über die Kombination mit der FISH identifiziert werden.

Beim Isotope Array wird dagegen die RNA aus der markierten Probe extrahiert und mit einem Fluoreszenz-Farbstoff gekoppelt. Anschließend werden über ein Mikroarray ausgewählte Sequenzen in der Probe nachgewiesen. Der Mikroarray besteht aus einer Vielzahl von Gensonden, die sich mit komplementären Sequenzen in der Probe verbinden. Die so verbundenen Sequenzen sind über ein Fluoreszenz-Signal identifizierbar. Sequenzen aus Organismen, die zuvor das radioaktiv markierte Substrat assimiliert haben, geben zusätzlich ein radioaktives Signal ab. Der Vorteil dieser Technik gegenüber der FISH-MAR ist, dass wesentlich mehr Sequenzen in kurzer Zeit detektiert werden können. Beide Methoden werden im Review von Wagner et al. (2006) näher erläutert.

3 Die Untersuchungsgebiete in der Küstenregion der Laptev-See

3.1 Lage

Die Laptev-See ist ein Randmeer des Arktischen Ozeans und befindet sich zwischen der Taimyr-Halbinsel und den Neusibirischen Inseln in Nord-Zentral-Sibirien, Russland (Abb. 3). Die Untersuchungen wurden in zwei Gebieten im Küstentiefland der Laptev-See durchgeführt. Eines der beiden Untersuchungsgebiete liegt im Lena-Delta auf der Insel Samoylov, das andere an einem Küstenabschnitt ca. 400 km weiter westlich, am Kap Mamontovy Klyk (Abb. 3 und 4).

Abbildung 3: Lage der Untersuchungsgebiete in der Küstenregion der Laptev-See in der Zone des kontinuierlichen Permafrostes (Karte: International Permafrost Association).

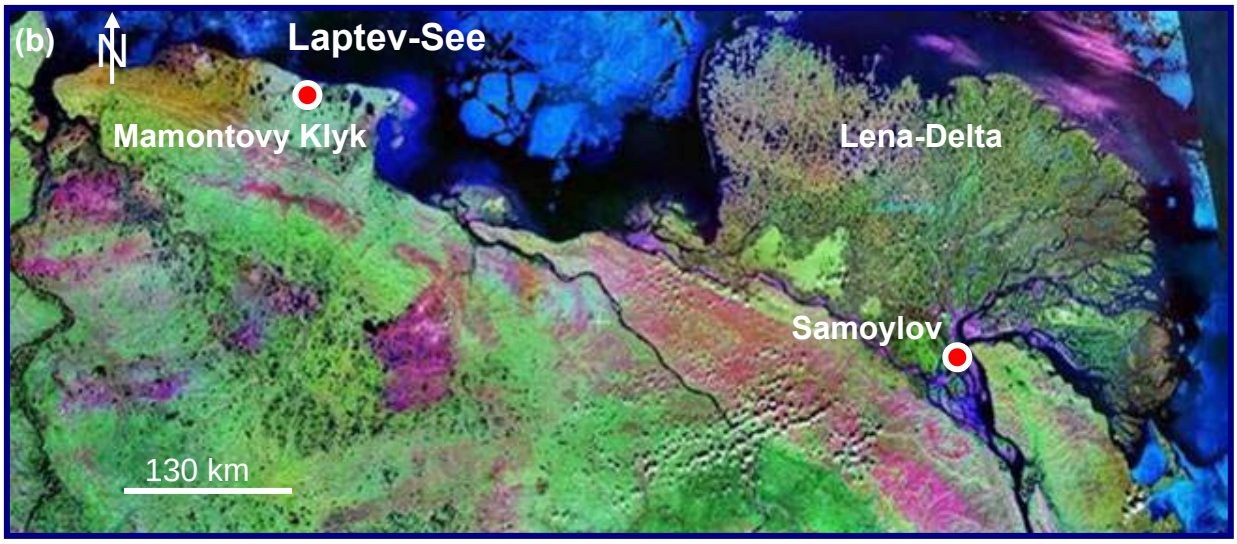

Abbildung 4: Lage der beiden Untersuchungsstandorte Mamontovy Klyk und Samoylov in der Küstenregion der Laptev-See (Satellitenbild: NASA Earthwind).

3.2 Klima

Das Klima in der Küstenregion der Laptev-See ist arktisch und kontinental, mit sehr niedrigen Temperaturen und geringen Niederschlägen. Die mittleren Jahresniederschläge liegen zwischen 230 und 315 mm, die jährlichen Durchschnittstemperaturen der Luft zwischen -12 und -14°C (Dereviagin & Kunitsky 2004, ROSHYDROMET 2004). Trotz der geringen Niederschläge ist das Klima als humid einzustufen, da die Evapotranspiration bei den niedrigen Temperaturen gering ist (Abb. 5). Die durchschnittlichen Temperaturen im Sommer und Winter liegen mehr als 40°C auseinander mit ca. +5 bis +10°C im Juli und -32 bis -36°C im Januar. Der Sommer an der Laptev-See ist kurz, Tages-Durchschnittstemperaturen über 0°C werden von ca. Mitte Juni bis Mitte September erreicht. Im Zeitraum von Anfang Mai bis Anfang August herrscht Polartag, von Mitte November bis Ende Januar Polarnacht.

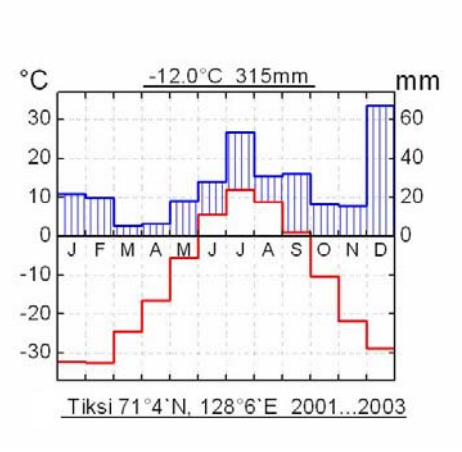

Abbildung 5: Klimadiagramm für Tiksi, ca. 150 km südöstlich vom Standort Samoylov gelegen, für die Jahre 2001-2003 (Diagramm: L. Kutzbach, auf der Basis von HMCR (2004), ROSHYDROMET (2004)).

3.3 Permafrost

Die Untersuchungsstandorte sind von kontinuierlichem Permafrost unterlagert (Abb. 3). Insgesamt nehmen die Permafrostgebiete ca. 24 % der Landoberfläche der Nordhalbkugel ein (Zhang 1999). In den Küsten-Tiefebenen der Laptev-See-Region erreicht der Permafrost Tiefen von 400-600 m (Yershov 1998), wobei derartig mächtige Permafrostlagen ein Zeichen für lang andauernde kalte und trockene Bedingungen sind. Aufgrund der niedrigen Niederschläge (siehe oben) war die Region mindestens seit der späten Saale-Kaltzeit (vor ca. 160.000 – 140.000 Jahren) nicht vergletschert und ist seitdem von kontinuierlichem Permafrost unterlagert (Svendsen et al. 2004). Auch der Küstenschelf der Laptev-See selbst ist von Permafrost unterlagert. Dieser submarine Permafrost ist entstanden, als der globale Meeresspiegel während der letzten Kaltzeiten wesentlich tiefer als heute lag. Zum Zeitpunkt des letzten Vereisungshöhepunktes vor ca. 21.000 Jahren war er ca. 120 m gegenüber dem heutigen Stand abgesenkt (Fairbanks 1989). Dies führte dazu, dass die Küstenlinie der flachen Laptev-See ca. 300-800 km weiter nördlich als heute verlief, d.h. Teile des heutigen Schelfs terrestrisch waren (Romanovskii et al. 2004). Der Permafrost, der in diesen Bereichen entstand, ist trotz Überflutung durch die Laptev-See heute noch über weite Gebiete erhalten.

3.4 Vegetation

Die Laptev-See-Region liegt in der arktischen Tundra. In dieser Vegetationszone erreichen die Pflanzen maximal eine Höhe von ca. 30 cm; für Bäume ist die Vegetationszeit mit maximal 3 Monaten zu kurz (Heinrich & Hergt 1991). An nassen Standorten dominieren Sauer- und Süßgräser (z.B. *Carex, Eriophorum, Arctagrostis, Arctophila*) sowie Moose. An trockeneren Standorten kommen zu den Gräsern und Moosen vor allem Flechten und Zwergsträucher (z.B. *Dryas, Salix*) hinzu.

3.5 Geologie und Geomorphologie

Küstenstandort Mamontovy Klyk

Das Küstentiefland am Kap Mamontov Klyk ist eine sanft geneigte Ebene mit Erhebungen von 25-55 m über dem Meeresspiegel. Die gesamte Ebene wird von einem dichten Netz aus weiten Thermoerosionstälern durchschnitten, in deren Sohlen sich wassergesättigte Böden und zum Teil kleine Teiche oder flache Bäche befinden (Abb. 6 und 7).

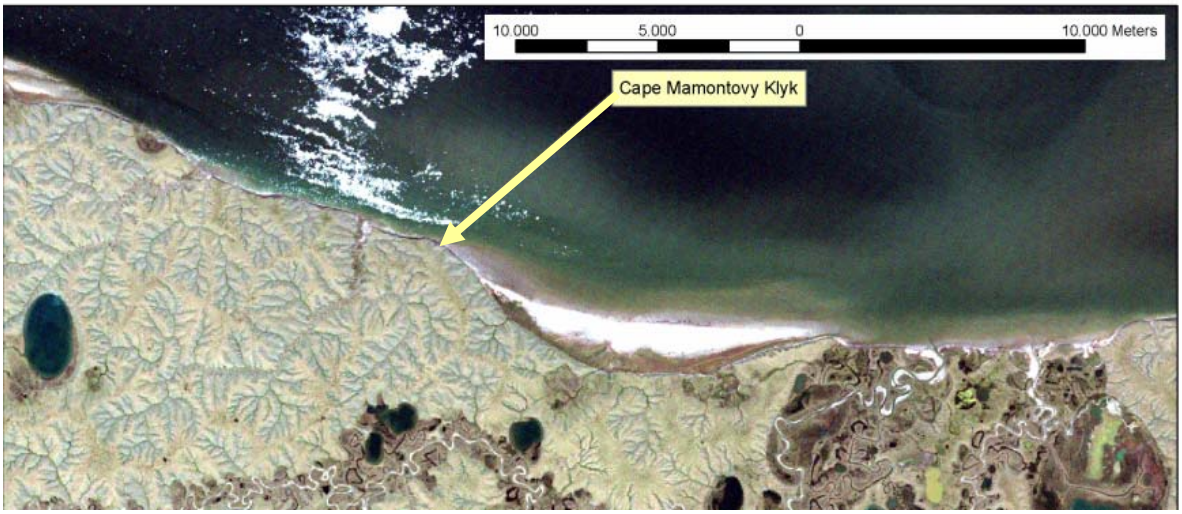

Abbildung 6: Satellitenbild (Landsat-7 vom 4. August 2000, Bandkombination 3-2-1 / Echtfarben) vom Küstentiefland am Kap Mamontovy Klyk, das von einem dichten Netz aus Thermoerosionstälern durchzogen ist (Abbildung nach G. Grosse, leicht verändert).

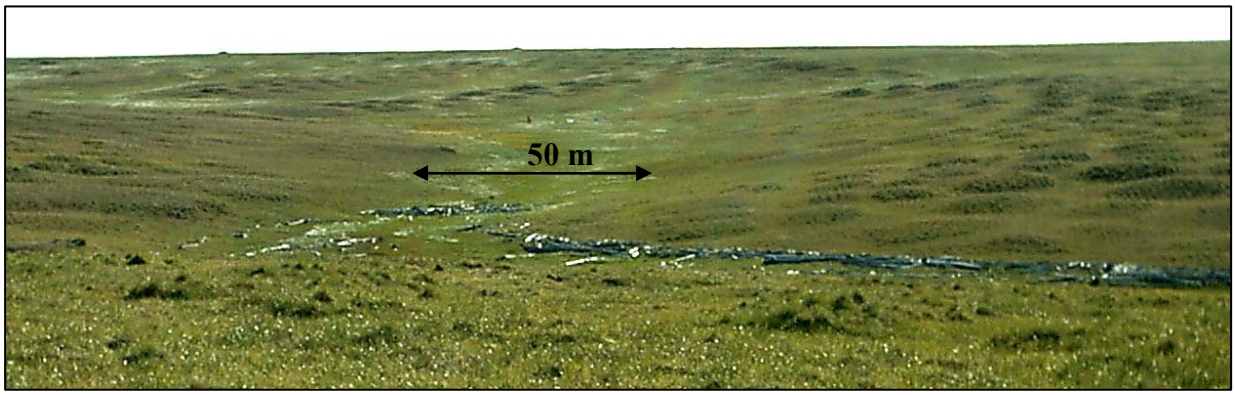

Abbildung 7: Foto eines Thermoerosionstals am Kap Mamontovy Klyk (Foto: G. Grosse). An den Hängen sind kleine Thermokarsthügel zu erkennen.

Diese Täler wurden im Holozän geformt. Die von ihnen durchschnittenen Hochebenen sind spätpleistozänen Ursprungs und bestehen aus sandig-schluffigen, extrem eisreichen Sedimenten. Diese Sedimente werden als Eiskomplex bezeichnet. Sie enthalten Eiskeile, die bis zu 5-8 m breit und bis zu 30-40 m tief sind. Eiskeile entstehen, wenn der Permafrost im Winter durch die extreme Kälte kontrahiert und sich Frostrisse an der Geländeoberfläche bilden. Diese Risse verlaufen in polygonalen Netzen. Wenn im Frühjahr der Schnee an der Bodenoberfläche taut, sickert Schmelzwasser in diese Risse und gefriert im Untergrund. Da die Böden jedes Jahr in etwa an derselben Stelle aufreißen, können die Eiskeile im Laufe der Jahrtausende bis zu den oben genannten Größen anwachsen. In Abb. 8 ist ein Küstenaufschluss aus diesen Eiskomplex-Sedimenten zu sehen. Hier sind zwischen den riesigen Eiskeilen eiförmig die schräg angeschnittenen eigentlichen Sedimente erkennbar.

Abbildung 8: Foto des Permafrost Küstenaufschlusses am Kap Mamontovy Klyk (Foto: H. Meyer).

Mit der Klimaerwärmung im Holozän begannen weit verbreitete Degradationen des Permafrostes durch Thermoerosion. Der dominierende Prozess ist die Bildung von Thermokarst. Damit werden Landschaftsformen bezeichnet, die entstehen, wenn eisreicher Permafrost lokal abtaut und sich mit dem Abschmelzen der unterirdischen Eiskörper die Landoberfläche senkt. Die Thermoerosionstäler sind entstanden, als fließendes Wasser zum einen die anstehenden Sedimente erodierte, zum anderen aber auch als Wärmequelle den gefrorenen Untergrund zum Tauen brachte. An repräsentativen Böden in einem der Thermoerosionstäler wurden in dieser Arbeit Untersuchungen zur Methanoxidation durchgeführt. Am Kap Mamontov Klyk sind nur noch ca. 22 % der Landoberfläche nicht von Permafrostdegradation geprägt (Grosse 2005). Dabei handelt es sich um die erwähnten Hochebenen aus den spätpleistozänen Eiskomplex-Sedimenten. In den Thermoerosionstälern zwischen den Hochebenen treten an den Hängen kleine Thermokarsthügel auf (Abb. 7). Diese sind weniger als 1 m hoch und haben einen Durchmesser von 2-4 m. Sie sind entstanden, als die oben beschriebenen Eiskeile oberflächlich tauten und sich die Geländeoberfläche an dieser Stelle absenkte. Das eisarme Sedimentmaterial zwischen den Eiskeilen sackte nicht und bildet heute die kleinen Thermokarsthügel.

An der Küste zur Laptev-See haben sich über weite Gebiete steile Kliffs geformt, an denen der eisreiche Permafrost starker Küstenerosion ausgesetzt ist. Nach Are (1999) weicht die Küste im Untersuchungsgebiet dadurch um durchschnittlich 2 m pro Jahr zurück. An

Sedimentproben aus einem dieser typischen Permafrost-Küstenaufschlüsse wurden Untersuchungen zur Methanoxidation durchgeführt.

Standort Samoylov im Lena-Delta

Das Lena-Delta ist mit 32.000 km^2 und ca. 1500 Inseln das größte Delta der Arktis. Es gehört zum „Naturschutzgebiet Lena-Delta und Neusibirische Inseln“. Namensgebend ist der Fluß Lena, die mit 4270 km einer der längsten Flüsse der Erde ist. Sie entspringt in der Nähe des Baikalsees und bildet an ihrer Mündung in die Laptev-See das ausgedehnte Delta.

Das Lena-Delta besteht aus drei unterschiedlich alten Flussterrassen (Schwamborn et al. 2002). Nur die jüngste spätholozäne Terrasse sowie die rezenten Überflutungsebenen gehören zu den heute noch aktiven Delta-Bereichen. Diese liegen im Zentrum und Osten des Deltas und nehmen ca. 65 % der Delta-Fläche ein.

Das engere Untersuchungsgebiet, die Insel Samoylov, befindet sich im zentralen südlichen Teil des Lena-Deltas (Abb. 9) und hat eine Fläche von 7,5 km^2. Sie ist repräsentativ für den jüngeren, aktiven Teil des Lena-Deltas. Knapp die Hälfte der Inselfläche wird von einer rezenten Überflutungsebene eingenommen, die eine Geländehöhe von 1 bis 5 m über dem Meeresspiegel aufweist und jedes Frühjahr von der Lena überschwemmt wird. Der übrige Teil der Insel besteht aus der spätholozänen Flussterrasse. Diese liegt 10 bis 16 m über dem Meeresspiegel und wird nur bei extremen Hochfluten überschwemmt. An Böden auf dieser Terrasse wurden in dieser Arbeit Untersuchungen zur Methanoxidation durchgeführt. Die Sedimente bestehen aus schluffig-sandigen Lagen, die von Torfschichten durchsetzt sind (Kutzbach et al. 2004). Die Landoberfläche ist durch Frostmuster aus Eiskeil-Polygonen geprägt, die typisch für die spätholozänen Flussterrassen des Lena-Deltas sind (Abb. 10). Das Makrorelief ist eben, mit Hangneigungen von weniger als 0,2 % (Kutzbach 2005). Durch die Entstehung der Eiskeilpolygone hat sich ein Mikrorelief mit Erhebungen von ca. 0,5 m im Abstand von wenigen Metern herausgebildet. Die Ränder der einzelnen Polygone sind wallförmig aufgewölbt; sie umgeben die niedrigeren Zentren der Polygone. Unter den erhöhten Polygonrändern verlaufen die Eiskeile, die sich seit dem Spätholozän gebildet haben und damit wesentlich jünger und kleiner als die oben beschriebenen Eiskeile der Eiskomplex-Sedimente sind. Zur Aufwölbung der Polygonränder kommt es bei der Eiskeil-Bildung, weil der Permafrostkörper sich im Sommer durch die Erwärmung ausdehnt. Die im jeweiligen Winter und Frühjahr entstandenen bzw. herangewachsenen Eiskeile (siehe oben) verhindern

dabei eine laterale Ausdehnung, weshalb sich die Böden entlang der Eiskeile langsam aufwölben (Washburn 1979).

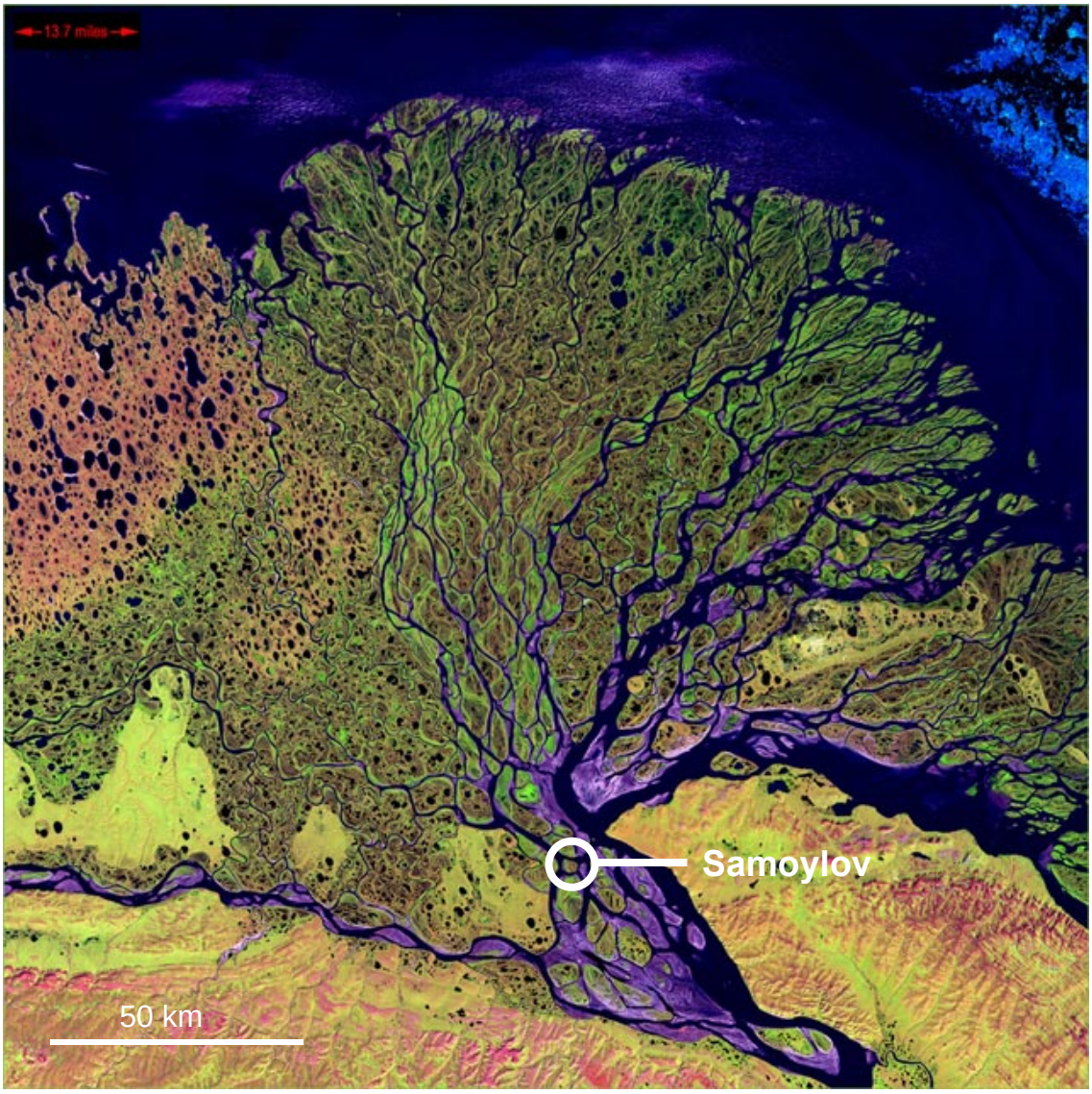

Abbildung 9: Satellitenbild des Lena Deltas mit der Insel Samoylov (Bildquelle: U.S. Geological Survey)

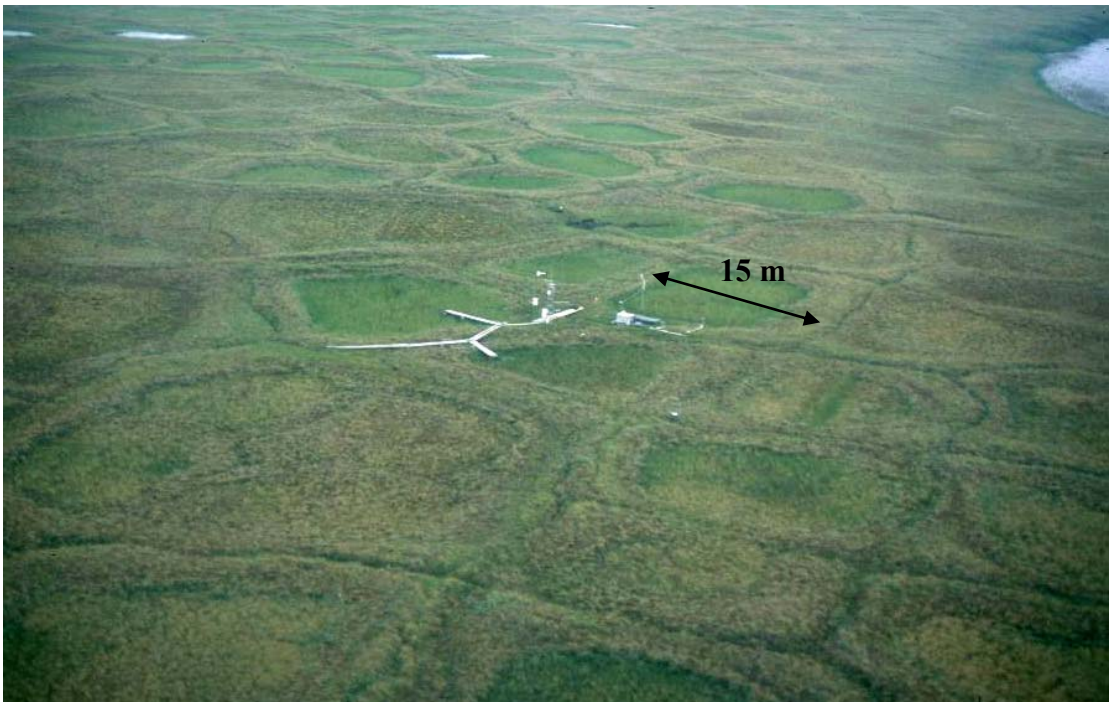

Abbildung 10: Luftbild der Eiskeil-Polygon-Landschaft auf Samoylov. In der Mitte des Fotos ist eine Klima-, Boden- und Methanemissions-Meßstation zu sehen (Foto: E.-M. Pfeiffer).

3.6 Böden

Die Böden in den terrestrischen Küstenebenen der Laptev-See tauen im Sommer ca. 30-60 cm tief auf. Diese Auftauzone (*Active Layer*) ist wie generell an permafrostbeeinflussten Standorten häufig durch hohe Wasserstände gekennzeichnet, da die Drainage der Böden durch den unterlagernden Permafrost behindert ist. In diesen nassen Böden ist der Abbau von organischer Substanz eingeschränkt, was zu einer Akkumulation von Torf führt.

Die Böden am Standort Mamontovy Klyk wurden im Rahmen der Untersuchungen zur Methanoxidation in dieser Arbeit erstmalig bodenkundlich beschrieben. Die untersuchten Böden der spätholozänen Flussterrasse auf der Insel Samoylov sind bereits von Kutzbach et al. (2004) beschrieben worden. Diese Untersuchungen können wie folgt zusammengefasst werden: Die Böden der Polygoncenter sind durch die Akkumulation von Torf geprägt, der Wasserstand liegt hier meist nahe der Geländeoberfläche, z. T. bilden sich auch kleine Teiche. Die typischen Böden sind *Typic Historthels* (nach Soil Survey Staff 2003). Die höher liegenden Böden der Polygonwälle drainieren dagegen in Richtung der Polygoncenter und sind deshalb trockener. Sie sind geprägt durch Kryoturbation, d.h. durch Verwürgung von

Bodenlagen, weil sich wie oben beschrieben der Boden entlang der Eiskeile aufwölbt. Die Bodentypen sind hier *Glacic* oder *Typic Aquiturbels* (nach Soil Survey Staff 2003).

3.7 Methanemissionen und Bodentemperaturen

Für ausgewählte Polygone auf der Insel Samoylov bestehen seit 1998 Dauermessfelder, in denen Methanemissionen, Bodentemperaturen, Auftautiefen sowie Bodenwasserstände regelmäßig bestimmt werden. Für das Jahr 1999 wurden zum Beispiel im wärmsten Monat Juli in 5 cm Bodentiefe Temperaturen zwischen 5 und 13°C gemessen; in 15 cm Tiefe erreichten die Bodentemperaturen nur noch 2 bis 6°C (Wagner et al. 2003). Die Bodenoberfläche hat sich hier durch Sonneneinstrahlung zeitweilig bis auf ca. 25°C erwärmt.

Die durchschnittlichen Methanemissionen im nassen Polygoncenter lagen im Jahre 1999 für den Zeitraum von Juni bis September bei 53,2 ± 8,7 mg CH_4 m^{-2} d^{-1} und damit mehr als 10-mal so hoch wie im trockeneren Polygonwall. Hier wurden lediglich Werte von 4,7 ± 2,5 mg CH_4 m^{-2} d^{-1} bestimmt (Wagner et al. 2003).

Die Methanemissionen aus den Böden am Standort Mamontovy Klyk wurden in dieser Arbeit erstmalig untersucht.

3.8 Der gemäßigte Vergleichsstandort in der norddeutschen Elbmarsch (Assel)

Als Vergleich zu den Tundrenböden wurde zusätzlich ein Boden der Elbmarsch in Niedersachsen untersucht. Der Boden befand sich im Schilfgürtel des „Asseler Sandes“ und wurde nach der US Soil Taxonomy als *Typic Fluvaquent* klassifiziert; nach der deutschen Klassifikation handelte es sich um eine Flusskalkmarsch aus kalkhaltigen, schluffig-tonigen, perimarinen Sedimenten (Knoblauch 1994). Die gemittelten Methanemissionen über das gesamte Jahr lagen im Zeitraum von 1991 bis 1995 bei 52 mg CH_4 m^{-2} d^{-1} (Min = 0, Max = 333 mg CH_4 m^{-2} d^{-1}) (Pfeiffer 1998). Weitere Informationen zum Boden und zu den Methanflüssen sowie zu methanotrophen und methanogenen Mikroorganismen an diesem Standort finden sich bei Knoblauch (1994), Wagner (1998) und Pfeiffer (1998).

4 Material und Methoden

4.1 Feldarbeiten

4.1.1 Probennahme und bodenkundliche Standortaufnahme im Feld

Die Probennahmen fanden in den Sommermonaten der Jahre 2003 und 2004 statt. Vor Ort wurden die untersuchten Böden bodenkundlich beschrieben und anschließend beprobt. Dabei wurde die Bodenfarbe anhand der Farbtafel nach Munsell (1975), die Durchwurzelungsdichte nach Ad-hoc-AG Boden (2005), reduzierende Bedingungen über den Nachweis von Fe(II)-Ionen durch α-α-Dipyridil-Lösung und der Kalkgehalt über die Zugabe von 10%iger HCl-Lösung bestimmt. Außerdem wurden die Bodentemperaturen in verschiedenen Tiefen mit einem Temperaturfühler (Greisinger GTH 1100/2 mit NiCr-Ni Sensor) gemessen. Die Klassifizierung der Böden erfolgte nach der *US Soil Taxonomy* (Soil Survey Staff 2003) sowie nach der *World Reference Base for Soil Resources* (FAO 1998). Die Böden wurden horizontweise beprobt, dabei Horizonte mit Mächtigkeiten von mehr als 10 cm in Lagen von 5 bis 8 cm aufgeteilt.

Proben aus dem ständig gefrorenen Untergrund wurden an Permafrost Küstenaufschlüssen entnommen. An den Probennahme-Punkten wurde zunächst getautes Material und eine mindestens 20 cm mächtige Lage des am Kliff anstehenden gefrorenen Materials entfernt. Die Proben wurden aus dem dahinter liegenden ungestörten Material entnommen. Die Küstenaufschlüsse verlieren während der Sommermonate fortwährend Material durch Thermoerosion. Deshalb wurde davon ausgegangen, dass die beprobten Bereiche nicht zeitweilig im Sommer aufgetaut und auch nicht mit jüngerem Material verunreinigt waren.

4.1.2 Methanemissionen

Die Messung von Methanemissionen aus den Böden erfolgte mit geschlossenen Haubensystemen. Die Hauben bestanden aus transparentem PVC, deckten jeweils eine Fläche von 0,25 m^2 ab und hatten ein Volumen von 12,5 l. An den untersuchten Standorten wurden jeweils drei Rahmen aus PVC installiert, die 15 cm tief in den Boden ragten. Auf den Rahmen befanden sich flache Rinnen, in die die Hauben während der Emissionsmessung gesetzt wurden. Diese Rinnen wurden dabei mit Wasser gefüllt, das als gasdichte Abdichtung zwischen Rahmen und Haube diente. Für die Messung der Methanemissionen wurden die

Hauben für 30 Minuten auf den Rahmen gesetzt. Die Messkammern waren jeweils über gasdichte Schläuche mit einer Membranpumpe verbunden, die das Gas unter der Haube umwälzte. Während des Messzeitraums von 30 Minuten wurden 4 Gasproben entnommen. Die Methanemissionen wurden aus dem linearen Anstieg der Methankonzentration in den Messkammern berechnet.

Da die Gasproben am Standort Kap Mamontovy Klyk (Thermoerosionstal) nicht vor Ort analysiert werden konnten, wurden diese in gasdichten Glasröhrchen zwischengelagert. Diese wurden zuvor vollständig mit gesättigter NaCl-Lösung befüllt. Über einen Gummistopfen wurden die Gasproben injiziert und über eine zweite Kanüle gleichzeitig verdrängte NaCl-Lösung abgelassen. Die Röhrchen wurden mit dem Stopfen nach unten gelagert, um eine eventuelle Gasdiffusion durch den Verschluss zu minimieren. Das NaCl verminderte dabei die Löslichkeit des Methans im Wasser. Nach ca. einem Monat Lagerung wurde die Methangehalte der Gasproben im Feldlabor im Lena Delta bestimmt.

4.1.3 Methankonzentration im Porenwasser

Es wurden zwei Methoden für die Bestimmung der Methankonzentration in der Bodenlösung angewendet:

Bei der ersten Methode wurde Porenwasser über eine 10-ml-Spritze beprobt. Die Spritze war mit einem 1,5 mm dünnen Kapillarröhrchen verbunden, mit dem Wasser aus verschiedenen Tiefen des ungestörten Bodens entnommen werden konnte. 5 ml der entnommenen Wasserproben wurden anschließend über einen gasdichten Stopfen in 16-ml-Glasröhrchen injiziert. Über eine zweite Kanüle wurde gleichzeitig verdrängtes Gas abgelassen. In den Glasröhrchen befand sich soviel festes NaCl, dass bei Zugabe des Bodenwassers eine gesättigte NaCl-Lösung entstand. Das Röhrchen wurde anschließend kräftig geschüttelt, um das im Bodenwasser gelöste Methan auszutreiben. Das NaCl verminderte dabei die Löslichkeit des Methans im Wasser. Die Methankonzentration im Kopfgasraum wurde gaschromatographisch gemessen und das Volumen des Kopfgasraumes anschließend durch Zugabe und Auswiegen von Wasser bis zum Rand des Glasröhrchens bestimmt. Für die Berechnung der Methankonzentration im Porenwasser wurde die Methankonzentration der Umgebungsluft (ca. 1,8 ppm) von den gemessenen Methangehalten im Kopfgasraum abgezogen.

Bei der zweiten Methode wurde das Methan aus entnommenen Bodenproben extrahiert. Dazu wurden ca. 40 g Boden direkt nach der Probennahme in gasdichte 130-ml-Flaschen gegeben, in die zuvor 70 ml gesättigte NaCl-Lösung gefüllt worden war. Nach kräftigem Schütteln der Proben wurde das ausgetriebene Methan im Kopfgasraum gaschromatographisch gemessen. Das Volumen des Kopfgasraums wurde durch Zugabe und Auswiegen von Wasser bis zum Rand der Flaschen bestimmt. Der Wassergehalt der Proben ist an Parallelproben ermittelt worden.

4.2 Gasanalytik

Die Bestimmung von Gaskomponenten erfolgte an drei Gaschromatographen:

- Messung von Methanemissionen, Methankonzentrationen im Porenwasser, Methanoxidationsaktivitäten im Feldlabor: Chrompack Typ CP 9003, FID-Detektor zur Bestimmung von Methan.
- Messung von Methanoxidationsaktivitäten im Labor, Institut für Bodenkunde, Hamburg: Shimadzu GC-14A gekoppelt mit GC-14B, FID-Detektor zur Messung von Methan und WLD-Detektor zur Messung von CO_2.
- Messung der Methanoxidationsaktivität in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration: Agilent 6890N, FID-Detektor zur Messung von Methan und WLD-Detektor zur Messung von CO2 und Sauerstoff.

4.3 Bodenchemische und –physikalische Laboruntersuchungen

Ausgewählte Bodenparameter wurden mit den in Tab. 4 aufgeführten bodenkundlichen Standardverfahren bestimmt.

Tabelle 4: Methoden der bodenkundlichen Laboranalytik.

Parameter	Analyseverfahren
Korngrößenverteilung	• Kombiniertes Sieb- und Pipettverfahren nach Köhn nach DIN 18123 (1983), DIN 19683-1 und 19683-2 (1973). • Bei organischen Kohlenstoffgehalten von >1 % Humusbefreiung mit H_2O_2 vor der Korngrößenanalyse.
pH-Wert	• In 0,01 M $CaCl_2$ nach DIN 19684-1 (1977). • Abweichend vom Verfahren nach DIN Verwendung von feldfeuchten statt luftgetrockneten Proben, um eine Absenkung der pH-Werte während der Trocknung durch Oxidation von reduzierten Substanzen zu vermeiden.
C und N gesamt	• Elementaranalysator (Elementar VarioMAX) mit Wärmeleitfähigkeitsdetektor; Verbrennung bei 900°C.
Pflanzenverfügbares P und K	• Doppellactat (DL)-Auszug nach VDLUFA (1991). • Messung von Phosphor am Photometer (DR Lange CADAS 100). • Messung von Kalium am Atomemissionsspektrometer (Perkin-Elmer 1100).

4.4 Aktivität methanoxidierender Bakterien

4.4.1 Potentielle Methanoxidationsraten in der Auftauschicht

Um neben den PLFA-Gehalten einen zweiten Indikator für die Größe der MOB-Populationen zu erhalten, wurden Tiefenprofile der potentiellen Methanoxidationsaktivitäten bestimmt.

Aus logistischen Gründen konnte die Aktivität nur für ein Bodenprofil direkt nach der Probennahme vor Ort im Feldlabor auf der Insel Samoylov, Lena Delta, gemessen werden. Alle anderen Proben wurden nach Lagerung unter Luftabschluss im gekühlten (<10°C, bis maximal 3 Wochen) oder gefrorenen Zustand analysiert. Um den Einfluss der tiefgekühlten Lagerung auf die Methanoxidationsaktivität zu bestimmen, wurde in einem Vorversuch ein Aktivitäts-Tiefenprofil vor und nach 4-monatiger Lagerung bei -20°C erstellt.

Während der Messung von potentiellen Aktivitäten kann es trotz ausreichend Sauerstoff und Methan im Kopfgasraum zu Substratlimitierungen vor allem in wassergesättigten Proben kommen, da die Diffusionsgeschwindigkeit der Substrate Sauerstoff und Methan im Wasser wesentlich geringer als im Gasraum ist. Deshalb wurden folgende zwei Inkubationsvarianten getestet: In der ersten Variante wurden 20 g frische Probe mit 20 ml sterilem Wasser aus der zugehörigen Profilgrube in gasdichte 130-ml-Flaschen eingewogen. Um eine Substratlimitierung zu vermeiden, wurden die Proben während der Inkubation mit 200 Upm geschüttelt. In der zweiten Variante wurden 4 g frische Probe in flache 50-ml-Flaschen eingewogen. Die Proben wurden als Standkultur inkubiert. Um eine Substratlimitierung zu vermeiden, wurde das Probenmaterial hier auf dem Glasboden in dünner Schicht (ca. 2-3 mm) ausgebreitet. Für diese Versuche wurden Proben aus der niedersächsischen Elbmarsch verwendet (Standort Assel).

Alle Aktivitätsmessungen an Proben aus der sibirischen Tundra wurden mit Standkulturen durchgeführt. Im Einzelnen war der Ablauf folgendermaßen:

Aus den Proben wurden zunächst grobe organische Reste entfernt (Durchmesser >2 mm) und das übrige Bodenmaterial zusammen mit den enthaltenen Feinwurzeln homogenisiert. Anschließend wurden 4 g Frischgewicht der Proben mit ihrem *in situ* Wassergehalt in je 3-4 parallelen Ansätzen in gasdichte Glasgefäße (130 oder 50 ml, mit Gummistopfen) eingewogen und in dünner Schicht auf dem Flaschenboden verteilt. In den Flaschen wurde über eine gasdichte Spritze eine Methankonzentration von 1 % in Raumluft eingestellt. Die Inkubation erfolgte bei Temperaturen nahe den *in situ* Werten (0°C oder 5°C) im Dunkeln als Standkultur. Die Methankonzentration im Kopfgasraum wurde in regelmäßigen Abständen gaschromatographisch gemessen. Wenn mindestens die Hälfte des Methans verbraucht war, wurde die Inkubation abgebrochen und das Trockengewicht der Proben bestimmt. Die Berechnung der Oxidationsraten erfolgte durch lineare Regression der Methanabnahme über die Inkubationszeit. Bei einigen Proben verlief der Methanabbau nicht linear, es kam zu einer Zunahme der Aktivität über die Zeit (z.B. durch Wachstum oder Reaktivierung ruhender Zellen). In solchen Fällen wurde nur der lineare Bereich zu Beginn der Inkubation ausgewertet. In den meisten Ansätzen wurde zusätzlich zur Methanmessung die Konzentrationszunahme des entstehenden CO_2 gaschromatographisch verfolgt. Dadurch wurde die Dichtigkeit der Inkubationsgefäße kontrolliert.

Es wurden folgende Abwandlungen des beschriebenen Messprinzips durchgeführt:

Für die Untersuchung der **Temperaturabhängigkeit** der Methanoxidation wurden Teilproben bei verschiedenen Temperaturen zwischen 0 und 43°C inkubiert.

Um den Einfluss der **Sauerstoffkonzentration** auf die Methanoxidation zu untersuchen, wurden die Aktivitätsraten bei ca. 21 % Sauerstoff im Kopfgasraum (atmosphärische Konzentration) mit denen bei ca. 0,5 % Sauerstoff verglichen. Für die Inkubation bei niedriger Sauerstoffkonzentration wurden die Flaschen mit den eingewogenen Proben zunächst mit Stickstoff anaerobisiert und anschließend durch Zugabe von reinem Sauerstoff eine Konzentration von ca. 0,5 % im Kopfgasraum eingestellt. Neben dem Methanabbau wurde der Konzentrationsverlauf von Sauerstoff und CO_2 gaschromatographisch verfolgt. Die Sauerstoffkonzentration wurde während der Inkubation regelmäßig durch Sauerstoffzugabe nachreguliert.

4.4.2 Aktivierung von inaktiven Methanoxidanten

Im Permafrost und in einigen Bereichen der Auftauschicht konnten keine spontanen Methanoxidationsaktivitäten gemessen werden. Für diese Proben wurde getestet, ob sich hier ruhende Methanoxidanten reaktivieren ließen.

Bei diesen Inkubationen wurde im Gegensatz zur Bestimmung der potentiellen Aktivitäten Nährmedium zugegeben. Dies diente dazu, eine eventuelle Reaktivierung zu beschleunigen. Es wurde hier außerdem unter sterilen Bedingungen gearbeitet, da bei diesem qualitativen Test auf Reaktivierbarkeit eine Verunreinigung mit wenigen Methanoxidanten schon eine Verfälschung der Ergebnisse bewirken kann.

Es wurden jeweils 1 g Frischgewicht Probe in gasdichte Flaschen eingewogen und 1 ml NMS-Nährmedium zugegeben (Zusammensetzung des Mediums s. unten). Im Kopfgasraum wurden Methankonzentrationen von 5-10 % eingestellt. Es wurden jeweils Teilproben bei 8°C und 22°C mit unverdünntem und 1:10 verdünntem NMS-Nährmedium inkubiert. Die Methan- und CO_2-Konzentrationen im Kopfgasraum wurden regelmäßig bestimmt und die Inkubation abgebrochen, sobald die Methankonzentrationen bei gleichzeitiger Zunahme der CO_2-Gehalte eindeutig abnahmen. Die Proben wurden bis zu 9 Monate lang inkubiert.

An zwei Proben vom Permafrost-Küstenaufschluss im Lena Delta (aus 5,0 und 5,5 m Tiefe), die bereits nach weniger als 2 Wochen Aktivität zeigten, wurden weitere Versuche zum Einfluss der Temperatur bzw. der Nährstoffzugabe durchgeführt:

Für den **Nährstofftest** wurden folgende Probenmengen (Frischgewicht) in jeweils 3 Parallelen in gasdichte 50-ml-Glasgefäße eingewogen:

a) 2 g Probe + 2 ml NMS-Medium unverdünnt
b) 2 g Probe + 2 ml NMS-Medium 1:10 verdünnt
c) 2 g Probe + 2 ml steriles Leitungswasser
d) 4 g Probe ohne Zugabe von Nährmedium oder Wasser.

In allen Flaschen wurde im Kopfgasraum eine Methankonzentration von 1 % eingestellt. Die Inkubation erfolgte bei 22°C. Hier wurde wie oben die Zeitdauer bis zum eindeutigen Einsetzen von Methanoxidationsaktivität bestimmt.

Für den **Temperaturtest** wurden Teilproben in jeweils 4 parallelen Ansätzen bei 0, 6, 10, 16, 22, 28, 32, 37 und 42°C inkubiert. Es wurden dazu 4 g Frischgewicht pro Ansatz in gasdichte 50-ml-Flaschen eingewogen, jeweils mit 1 ml unverdünntem NMS-Medium vermischt und schließlich eine Konzentration von 1 % Methan im Kopfgasraum eingestellt. Hier wurde die Höhe der Aktivitätsrate bestimmt, sobald Aktivität messbar war.

4.4.3 Zusammensetzung des Nährmediums

Es wurde ein modifiziertes Nitrat-Mineralsalz (NMS)-Nährmedium nach Wittenbury et al. (1970) verwendet, das folgende Zusammensetzung hatte:

Stammlösung:

KNO3	1 g l^{-1}
$NaSO_4$	0,34 g l^{-1}
$MgSO_4$ x 7 H_2O	0,15 g l^{-1}
$CaCl_2$ x 2 H_2O	0,15 g l^{-1}

in destilliertem Wasser gelöst.

Phosphatpuffer (0,5 M, pH 7):

Na_2HPO_4 x 2 H_2O	89 g l^{-1}
KH_2PO_4	68 g l^{-1}

getrennt gelöst und dann zusammengegeben bis pH 7.

Spurenelementelösung:

EDTA	500 mg
$FeSO_4$ x 7 H_2O	200 mg
$ZnSO_4$ x 7 H_2O	10 mg
$MnCl_2$ x 4 H_2O	3 mg
H_3BO_3	30 mg
$CoCl_2$ x 6 H_2O	20 mg
$CuCl_2$ x 2 H_2O	1 mg
$NiCl_2$ x 6 H_2O	2 mg
Na_2MoO_4 x 2 H_2O	3 mg

mit destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.

Die drei Lösungen wurden getrennt voneinander autoklaviert, da es sonst zu einer Ausfällung der Phosphate kommt. Nach Abkühlung wurden 980 ml Stammlösung, 20 ml Phosphatpuffer und 1 ml Spurenelementelösung steril miteinander vereint.

4.5 Phospholipid-Fettsäure (PLFA) Analysen

Die Bodenproben für die PLFA-Analytik wurden unmittelbar nach der Probennahme eingefroren, im gefrorenen Zustand transportiert, anschließend gefriergetrocknet und weiter bei -20°C gelagert.

4.5.1 Extraktion und Aufbereitung der PLFA

Lipidextraktion

Die Lipidextraktion erfolgte in modifizierter Form nach Bligh und Dyer (1959) (White et al. 1979). Es wurden 0,5 g (Torfproben) bis 4 g (mineralische Proben) gefriergetrocknetes und homogenisiertes Boden- bzw. Sedimentmaterial mit 4 ml 0,05M K_2HPO_4-Pufferlösung (pH 7,4), 5 ml Chloroform und 10 ml Methanol versetzt und zwei Stunden in einem Überkopf-Schüttler extrahiert. Anschließend wurde die Suspension über das Inertpulver Celite® (Celite 545, Merck) filtriert und das Filtrat mit 10 ml Chloroform, 5 ml Methanol sowie 9,5 ml Phosphatpuffer vermischt. Nach Phasentrennung über Nacht wurde die untere Chloroformphase abgenommen, über Na_2SO_4 zur Entwässerung filtriert und am Rotationsverdampfer auf ca. 1 ml eingeengt.

Trennung der Lipidfraktionen

Die in dem Extrakt enthaltenen Lipidfraktionen wurden über eine mit Chloroform konditionierte Silicagelsäule (2 g Füllmaterial, 12 ml Reservoir, Varian MEGA BE-SI) getrennt, dabei eluierten neutrale Lipide mit Chloroform, Glycolipide mit Aceton und die Phospholipide mit Methanol. Die neutralen und Glycolipide wurden verworfen und die Phospholipidfraktion am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingedampft.

Herstellung von Fettsäure-Methylestern (FAME)

Anschließend erfolgte eine Überführung der Phospholipide in Fettsäure-Methylester (FAME) über eine alkalische Methanolyse. Dafür wurde die eingedampfte Probe in wasserfreiem Methanol/Toluol (1:1, v/v) aufgenommen, mit 1 ml frischer 0,2M methanolischer KOH versetzt und 20 min bei 37°C inkubiert. Die entstandenen FAME wurden nach Zugabe von 2 ml *n*-Hexan/Chloroform (4:1, v/v), 2 ml bidestilliertem H_2O und 0,3 ml 1M Essigsäure extrahiert. Die Probe wurde hierzu 1 min intensiv geschüttelt und dann 5 min bei 2000 rpm zur Phasentrennung zentrifugiert. Die Hexan/Chloroformphase wurde abgenommen, der Extraktionsschritt noch zweimal mit je 1 ml Hexan/Chloroform wiederholt, die vereinten Extrakte über Na_2SO_4 filtriert und im Stickstoffstrom bis zur Trockne eingedampft. Die getrocknete Probe wurde schließlich in 500 µl eines Nonadecansäuremethylester-Standards (20 mg l^{-1}19:0 FAME in *n*-Hexan) aufgenommen und im Gaschromatograph-Massenspektrometer analysiert.

Derivatisierung von einfach ungesättigten FAME mit Dimethyl-Disulfid (DMDS)

Isomere einfach ungesättiger FAMEs sind zum Teil gaschromatographisch schwer zu trennen und ihre Fragmentierungsmuster im Massenspektrometer sehr ähnlich. Um diese Isomere mit dem Gaschromatograph/Massenspektrometer (GC-MS) zu identifizieren und zu quantifizieren, wurde eine Derivatisierung mit Dimethyldisulfid (DMDS) nach Nichols et al. (1986) durchgeführt. Dabei wird das DMDS an die Doppelbindung im FAME-Molekül addiert und führt bei der massenspektrometrischen Untersuchung zu Fragmenten charakteristischer Länge, die eine Bestimmung der Lage der Doppelbindung ermöglichen.

Zu einem Aliquot von ca. 100 µl des in Standard-Lösung aufgenommenen FAME-Extraktes wurden 200 µl *n*-Hexan sowie 1-2 Tropfen Iodlösung (60 mg Iod in 1 ml Diethylether) gegeben. Das Gemisch wurde 48 h bei 50°C inkubiert, nachfolgend mit 500 µl Hexan verdünnt und das Iod durch Schütteln mit 500 µl Natriumthiosulfat-Lösung (5 % in H_2O) aus der organischen Phase entfernt. Nach dem Abziehen der organischen Phase wurde noch zweimal mit je 500 µl *n*-Hexan extrahiert und die vereinigten organischen Extrakte über Na_2SO_4 filtriert und bis zur Trockne unter dem Stickstoffstrom verdampft. Für die Messung am GC-MS wurde die eingetrocknete Probe in ca. 150 µl *n*-Hexan aufgenommen.

4.5.2 Bestimmung der PLFA über gekoppelte Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS)

Es wurde mit zwei verschiedenen GC-MS-Gerätekombinationen gearbeitet:

a) Einem HP5890 Series II GC, der mit einem HP5971 MSD gekoppelt ist. Die Injektion erfolgte mit einem Gerstel-Autosampler (MPS1) in ein Gerstel-Kaltaufgabesystem (KAS3) im „splitless“-Modus. Für das KAS wurde folgendes Temperaturprogramm gewählt: 60°C (0min)-12°C/sec-300°C (10min).

b) Einem HP5890 Series II GC, der mit einem HP5872 MSD gekoppelt ist. Die Injektion erfolgte mit einem HP6890 Autosampler und einem HP6890 Autoinjektor bei einer Temperatur von 300°C im „splitless“-Modus. Die Analysen mit diesem Gerät wurden von Dr. Henning Mangels von der Firma Agib Laboratories GmbH Umweltanalytik, Hamburg, durchgeführt.

In beiden Geräten wurde eine HP5 Kapillarsäule (Restek RTX-5MS; Crossbond 5% diphenyl-95% dimethyl polysiloxane; 30 m; 0,25 mm Innendurchmesser; 0,25 µm Filmdicke) und Helium als Trägergas verwendet. Das GC-Temperaturprogramm war in beiden Fällen wie folgt: 60°C (3 min) – 10°C/min – 110°C (0 min) – 4°C/min – 300°C (5 min). Das Interface zum MS hatte eine Temperatur von 310°C. Die Ionisierung der Komponenten erfolgte im „electron impact"-Modus bei 70 eV. Die Messungen fanden im Scan-Modus (Scanbereich 40 bis 500 amu) statt.

Die Identifikation der PLFA-Peaks erfolgte durch Vergleich der Retentionszeiten und Massenspektren mit Standardmischungen (Supelco 37 Komponenten-FAME-Mischung und Supelco Standard für Bakterienidentifizierung (BAME)). Außerdem wurden die Spektren mit den von Christie (2006) veröffentlichten FAME-Massenspektren verglichen. Die Isomere einfach ungesättigter FAMEs wurden über ihre DMDS-Addukte identifiziert (Nichols, 1986).

Die Quantifizierung der einzelnen FAME erfolgte gegen einen internen Standard (20 mg l^{-1} 19:0 FAME). Isomere einfach ungesättigter FAME wurden über charakteristische Fragmente (ω und Δ) der DMDS-Addukte quantifiziert (Sundh et al., 1995; Macalady et al., 2002).

Die Datenaufzeichnung und -auswertung erfolgte mit der HP G1034C MS ChemStation-Software.

4.5.3 PLFA Nomenklatur

Die in dieser Arbeit verwendete Fettsäure-Nomenklatur folgt dem Prinzip A:BωC. Dabei steht A für die Anzahl der C-Atome und B für die Zahl der Doppelbindungen. C gibt die Position der Doppelbindungen an, bezogen auf das aliphatische (ω) Molekülende. Die Konfiguration der Doppelbindung wird durch ein nachgestelltes „c" (cis) oder „t" (trans) angegeben (z.B. 16:1ω8c). Eine Methylgruppen-Verzweigung wird durch vorangestellte Abkürzungen angezeigt. Dabei steht „i" für die so genannte iso- und „a" für die anteiso-Verzweigung (d.h. ein bzw. zwei C-Atome vom ω-Ende, z.B. i15:0). Weitere Positionen von Methylgruppen werden vom Carboxyl-Ende der Fettsäure gezählt (z.B. 10Me18:0). Wenn die Position der Methylgruppe unbekannt ist, werden die Buchstaben „br" (branched) vorangestellt. Das Vorhandensein eines Cyclopropyl-Ringes wird durch ein vorangestelltes „cy" angezeigt.

4.6 Markierung von PLFA mit $^{13}CH_4$

4.6.1 Inkubationen

Das Ziel der Markierungsexperimente war, über eine Inkubation mit ^{13}C-angereichertem CH_4 die PLFA aktiver Methanoxidierer zu identifizieren. Über den Anteil des ^{13}C, das in die verschiedenen PLFA eingebaut wird, können Aussagen über die Struktur der aktiv am Methanumsatz beteiligten MOB-Populationen getroffen werden.

Wie die Aktivitätstests konnten auch die Markierungsexperimente aus logistischen Gründen nur zum Teil direkt nach der Probennahme vor Ort durchgeführt werden. Deshalb wurde eine der Proben direkt nach der Entnahme und zum Vergleich nach mehrmonatiger tiefgekühlter Lagerung markiert. Damit sollte getestet werden, ob sich das ^{13}C-PLFA Markierungsmuster durch die Probenlagerung verändert, was auf eine Veränderung der Populationsstruktur aktiver MOB hindeuten würde.

Außerdem wurde getestet, ob sich die Temperatur während der Inkubation mit $^{13}CH_4$ auf das ^{13}C-PLFA Markierungsmuster auswirkt. Dazu wurde eine Probe parallel bei 0°C und 28°C markiert. Abweichende Markierungsmuster wären ein Hinweis darauf, dass bei hohen und niedrigen Temperaturen unterschiedliche Anteile der vorhandenen MOB-Populationen das Methan umsetzen. In diesem Fall könnten zudem Markierungsmuster unterschiedlicher Proben, wenn sie bei verschiedenen Temperaturen erstellt worden sind, nicht miteinander verglichen werden.

Der Ablauf der Markierungsexperimente war wie folgt: Es wurden 4 bis 12 g Boden- bzw. Sedimentmaterial mit seinem *in situ* Wassergehalt in 50- oder 130-ml-Glasgefäße eingewogen. Anschließend wurde über einen Gummistopfen eine Konzentration von ca. 0,01 bis 0,03 % $^{13}CH_4$ (99 at % ^{13}C, Fa. Chemotrade, Leipzig) im Kopfgasraum eingestellt und die Probe im Dunkeln inkubiert. Dies geschah, wenn nicht anders angegeben, bei 0°C. Bei der Inkubation mit $^{13}CH_4$ können unerwünschte PLFA-Markierungen von Organismen auftreten, die das bei der Methanoxidation entstehende $^{13}CO_2$ in ihre Zellen einbauen. Um diesen Effekt zu minimieren, wurde unmarkiertes CO_2 im Überschuss (5 % im Kopfgasraum) zugegeben, das das entstehende $^{13}CO_2$ stark mit $^{12}CO_2$ verdünnte. Der Abbau des Methans wurde gaschromatographisch verfolgt und die Inkubation abgebrochen, nachdem mindestens die Hälfte des zugegebenen Methans umgesetzt war. Dies dauerte in Abhängigkeit von der

Aktivität der MOB 1 bis 17 Tage. Durch den Einsatz nur geringer Methanmengen (siehe oben) wurden Wachstum von MOB sowie Quermarkierungen nicht-methanoxidierender Organismen minimiert. Die Proben wurden nach der Inkubation eingefroren, gefriergetrocknet und die PLFA wie weiter oben beschrieben analysiert. Die ^{13}C-Gehalte der PLFA wurden an einem gekoppelten Gaschromatograph-*Combustion*-Isotopenmassenspektrometer (GC-*C*-IRMS) bestimmt (siehe Kap. 4.6.2). Als unmarkierte Kontrollen dienten entweder Teilproben, die parallel unter gleichen Bedingungen mit unmarkiertem Methan inkubiert wurden, oder Teilproben mit ihrem natürlichen ^{13}C-Gehalt.

4.6.2 ^{13}C-PLFA-Analysen mittels gekoppelter Gaschromatographie-*Combustion*-Isotopenmassenspektrometrie (GC-*C*-IRMS)

Die stabilen Kohlenstoffisotopen-Verhältnisse ($^{13}C/^{12}C$) der einzelnen PLFA wurden von Dr. Martin Blumenberg am Institut für Biogeochemie und Meereschemie der Universität Hamburg bestimmt. Dies geschah mit einem Thermo Trace GC 2000, gekoppelt mit einem Finnigan MAT 252 Massenspektrometer. Die Proben wurden im „splitless"-Modus bei einer Injektortemperatur von 280°C injiziert. Die einzelnen PLFA wurden im Gaschromatographen auf einer Kapillarsäule getrennt („fused silica"; DB5-MS; 0,32 mm Innendurchmesser; 0,25 µm Filmdicke; Trägergas: Helium; typisches GC-Temperaturprogramm: 80°C (3 min) – 4°C/min – 310°C (20 min)). Die Oxidation der Einzelkomponenten zu CO_2 erfolgte in einem CuO/Ni/Pt-Ofen bei 940°C. Die Standardabweichungen für wiederholte Messläufe betrugen weniger als 0,5 ‰. Für die Überprüfung der Genauigkeit des GC-*C*-IRMS wurde ein Standard-Alkan-Gemisch (*n*-C15 bis *n*-C29) mit bekannter isotopischer Zusammensetzung verwendet. Jede Probe wurde zweimal gemessen. Die Aufzeichnung und Auswertung der Messläufe erfolgte mit der Finnigan-Software ISODAT (Vs. 7.4).

Die Kohlenstoffisotopen-Verhältnisse der Einzelkomponenten wurden am GC-*C*-IRMS in der Delta-Notation ($\delta^{13}C$ ‰ *vs.* VPDB Standard) angegeben. Diese Werte wurden nach der Messung bezüglich der Isotopensignatur des bei der Methanolyse eingebauten Methanols ($\delta^{13}C$=-34,8 ‰) korrigiert (Crossman et al. 2004). Aus der PLFA-Konzentration (GC-MS-Messung) und der Differenz zwischen dem $\delta^{13}C$-Wert in der markierten Probe und in der unmarkierten Kontrolle wurde die pro PLFA eingebaute absolute ^{13}C-Menge (in nmol g^{-1} TG Boden) berechnet (Nold et al. 1999, Boschker & Middleburg 2002, Pombo et al. 2005). Schließlich wurde bestimmt, wie viel des ^{13}C anteilig in welche PLFA eingebaut wurde.

4.7 Aufbau eines Langzeit-Temperaturversuchs

Ziel des Langzeit-Temperaturversuchs war zu untersuchen, ob und wie die Struktur der MOB-Populationen von der Temperatur beeinflusst wird.

Es wurde eine Probe aus dem Oberboden (0-14 cm) vom Standort Talsohle verwendet. An Teilen dieser Probe wurde zunächst eine $^{13}CH_4$-Markierung für die ^{13}C-PLFA-Analyse durchgeführt (Durchführung wie in Kap. 4.6 beschrieben).

Für den Langzeit-Versuch wurde eine Teilprobe mit NMS-Nährmedium (s. Kap. 4.4.3) im Verhältnis 4:1 (frische Probe / Nährlösung, w/w) versehen. Durch die Zugabe von Nährlösung sollten eventuell unterschiedliche Nährstoff-Verfügbarkeiten während der Langzeitinkubation bei den verschiedenen Temperaturen ausgeglichen werden.

Der Versuch wurde bei 0 und 22°C durchgeführt. Jeweils 5 g der Mischung aus Probe und Nährlösung wurden in je drei parallelen Ansätzen pro Temperatur in gasdichte 130-ml-Glasgefäße eingewogen. Über eine gasdichte Spritze wurde eine Methankonzentration von 5 % in Raumluft eingestellt und die Proben bei 0 bzw. 22°C als Standkultur im Dunkeln für 11 Wochen inkubiert. Die Methankonzentration im Kopfgasraum wurde während des Versuchszeitraums regelmäßig gaschromatographisch überprüft und abgebautes Methan ggf. ersetzt, damit die Konzentration nicht unter 1,5 % sank. Außerdem wurden die Inkubationsflaschen regelmäßig belüftet, um eine Sauerstofflimitierung zu verhindern.

Nach 11 Wochen wurden die Proben bei 0 bzw. 22°C mit $^{13}CH_4$ markiert. Einer der jeweils drei parallelen Ansätze diente dabei als Kontrolle und wurde mit unmarkiertem Methan inkubiert.

Die Proben wurden schließlich eingefroren, gefriergetrocknet und die Konzentrationen der PLFA sowie deren ^{13}C-Gehalt wie in den Kap. 4.5 und 4.6 beschrieben bestimmt.

4.8 Altersbestimmung von Permafrostproben

Das Alter von Proben aus dem holozänen Permafrost auf Samoylov / Lena-Delta wurde durch ^{14}C-Datierung des organischen Kohlenstoffs in den Proben bestimmt. Herr Dr. Peter Becker-

Heidmann (Institut für Bodenkunde, Hamburg) führte die Analysen mittels Flüssigszintillations-Spektrometrie durch.

Die Labornummern waren wie folgt:

- HAM-3879 0,8-1,0 m Tiefe,
- HAM 3880 2,4-2,5 m Tiefe,
- HAM 3881 4,5-4,6 m Tiefe,
- HAM 3882 5,5-5,6 m Tiefe.

5 Ergebnisse

5.1 Bodenkundliche Charakterisierung der untersuchten Tundrenböden

Für die Untersuchungen zur Methanoxidation wurden Böden in zwei verschiedenartigen arktischen Landschaftseinheiten, einem Thermoerosionstal am Mamontovy Klyk und einer Eiskeil-Polygonlandschaft auf der Insel Samoylov, miteinander verglichen (s. auch Kap. Kap. 3.5). Am Standort Thermoerosionstal / Mamontovy Klyk wurden repräsentative Punkte an den drei Reliefpositionen Talsohle, Unterhang und Mittelhang ausgewählt (Abb. 11); diese unterschieden sich deutlich in der Bodenmorphologie und Vegetationszusammensetzung (s. weiter unten). Am Vergleichsstandort Polygonlandschaft / Samoylov wurde der Boden in einem Polygoncenter untersucht (Abb. 12); dieser ähnelte in der Bodenmorphologie, Vegetationszusammensetzung sowie in den Mengen des emittierten Methans (s. weiter unten) dem Boden in der Talsohle am Mamontovy Klyk. Auf Samoylov wurde darüber hinaus der Boden auf einem der erhöhten Polygonwälle für einige Teilfragestellungen zum Vergleich untersucht. Hier wurden jedoch keine quantitativen Analysen zur Populationsgröße und potentiellen Aktivität der MOB durchgeführt.

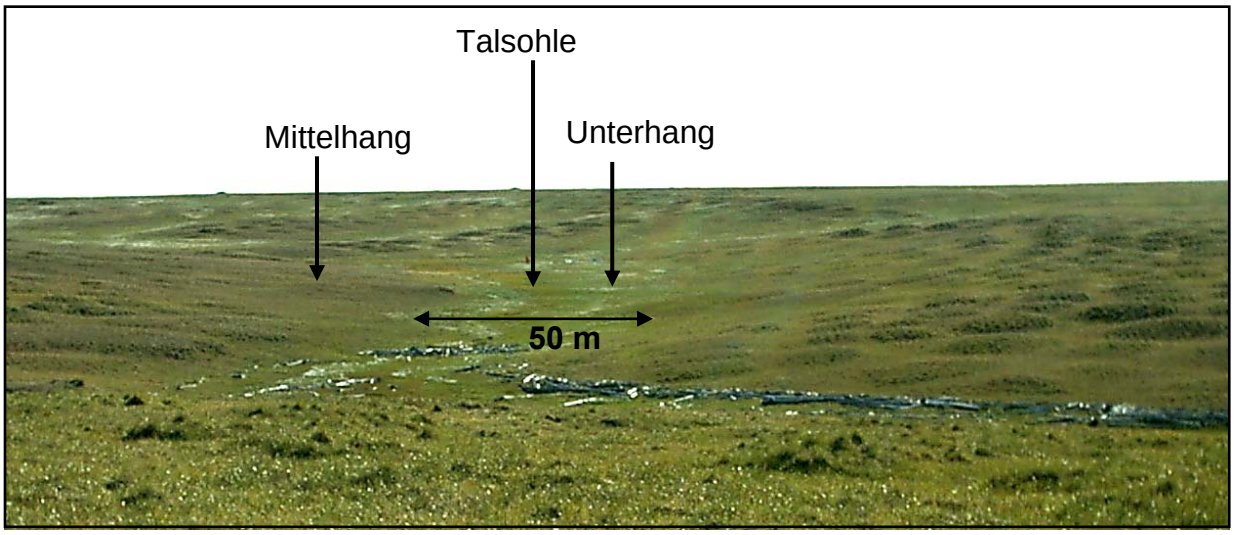

Abbildung 11: Lage der drei Untersuchungsstandorte in einem Thermoerosionstal am Mamontovy Klyk.

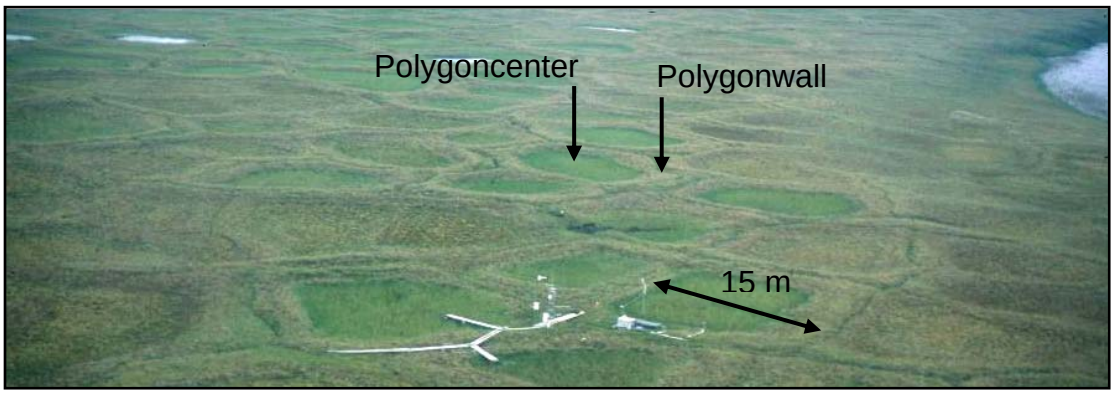

Abbildung 12: Eiskeil-Polygone auf der Insel Samoylov (Foto: E.-M. Pfeiffer).

Die vier intensiv untersuchten Böden – in der Talsohle, im Unter- und Mittelhang am Standort Mamontovy Klyk sowie im Polygoncenter am Standort Samoylov – wurden bodenkundlich wie in den Tab. 5 bis 8 beschrieben (s. auch Abb. 13 bis 16). Weitere Beschreibungen der Bodenprofile im Polygonwall und –center auf Samoylov sind darüber hinaus bei Wagner et al. (2003) und Kutzbach et al. (2004) zu finden.

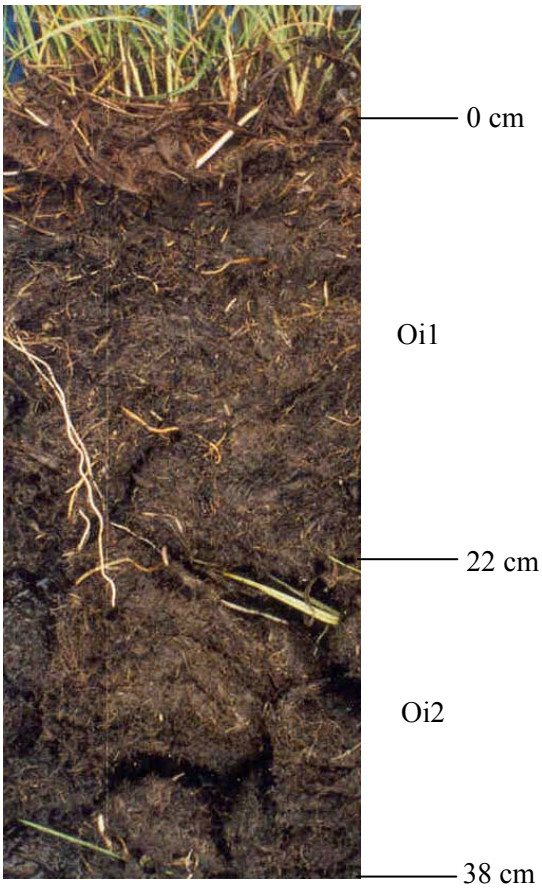

Abbildung 13: Foto vom Bodenprofil des untersuchten *Typic Fibristel* in der Talsohle des Thermoerosionstals am Mamontovy Klyk mit der Einteilung in Bodenhorizonte.

Tabelle 5: Ausgewählte Merkmale des *Typic Fibristel* in der Talsohle des Thermoerosionstals am Mamontovy Klyk.

Koordinaten: 73,60428°N, 117,133343° E.

Datum der Profilaufnahme: 25.08.2003.

Tiefe des Wasserspiegels bei Profilaufnahme: 0 cm; z.T. über Geländeoberfläche.

Auftautiefe bei Profilaufnahme: 38 cm.

Lage im Gelände: Talsohle eines Thermoerosionstals, 15 m vom Profil am Unterhang entfernt.

Vegetation (Deckungsgrade in %): Moosschicht: gesamt 55 % (übrige Oberfläche mit flachem Wasser bedeckt); Gefäßpflanzenschicht: gesamt 25 %; *Carex aquatilis* 18 %, *Arctagrostis latifolia* 4 %, *Arctophila fulva* < 0.5 %, *Caltha palustris* < 0.5 %, *Eriophorum angustifolium* < 0.5 %, andere 2 %.

Substrat: Schwach zersetzter Torf.

Horizont[a]	Tiefe (cm)	Bodenfarbe	Durchwurzelungsintensität	Fe(II)-Ionen / Reduzierende Bedingungen	Korngrößenverteilung			C_{org} (%)	N (%)	C/N	pH ($CaCl_2$)	$P_{verf.}$ (mg kg^{-1} Boden)	$K_{verf.}$ (mg kg^{-1} Boden)	Weitere Merkmale
					Sand (%)	Schluff (%)	Ton (%)							
Oi1	0-7	7,5 YR 3/2 (dunkel braungrau)	extrem stark	nicht erkennbar	n.b.	n.b.	n.b.	39	2,7	15	5,4	34	375	
	7-14				n.b.	n.b.	n.b.	28	1,7	16	5,5	17	63	
	14-22				n.b.	n.b.	n.b.	21	1,3	17	5,3	12	27	
Oi2	22-28	2,5 Y 4/2 (dunkel gelblichgrau)	stark	nicht erkennbar	n.b.	n.b.	n.b.	25	0,9	27	5,2	10	16	
	28-38				n.b.	n.b.	n.b.	18	0,9	20	5,6	12	16	

Soil Taxonomy (2003): Typic Fibristel.

World Reference Base for Soil Resources (1998): Gleyi-Histic Cryosol.

[a] Horizontsymbole nach US Soil Taxonomy (Soil Survey Staff 2003).

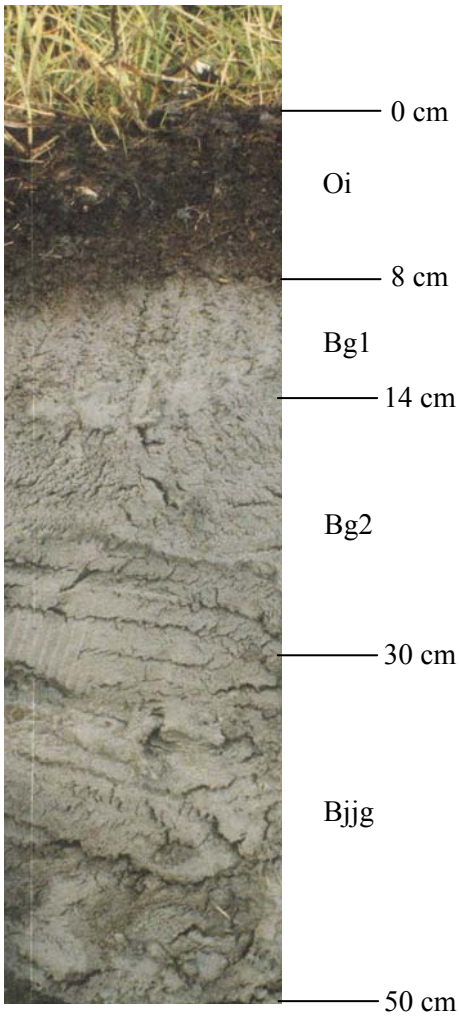

Abbildung 14: Foto vom Bodenprofil des untersuchten *Typic Aquiturbel* am Unterhang des Thermoerosionstals am Mamontovy Klyk mit der Einteilung in Bodenhorizonte.

Die beiden morphologisch ähnlichen Böden im Polygoncenter (Samoylov) und in der Talsohle (Mamontovy Klyk) zeichneten sich durch einen hohen Wasserstand aus, der im August / September 2003 in etwa an der Geländeoberfläche lag (Tab. 5 und 8). Der Boden im Polygoncenter wurde mehrfach im Zeitraum von Juli 2003 bis Juli 2004 beprobt, währenddessen der Wasserspiegel zum Teil über die Geländeoberfläche stieg. In beiden Böden war über die gesamte Profiltiefe Torf akkumuliert. Im Polygoncenter war der Torf jedoch mit wesentlich höheren Gehalten an mineralischer Substanz durchsetzt, was zu unterschiedlicher Klassifikation der beiden Böden nach *US Soil Taxonomy* führte. Der Boden im Polygoncenter – mit geringeren Gehalten an organischer Substanz – wurde als *Typic Historthel* klassifiziert, der Boden in der Talsohle als *Typic Fibristel*. Die Ursache für den höheren Mineralanteil im Polygoncenter (Samoylov) ist, dass dieser Boden gelegentlich von Hochfluten der Lena überschwemmt wird, wobei sich frisches sandiges Sediment ablagert. Dadurch wird der Torfanteil der Böden verringert.

Tabelle 6: Ausgewählte Merkmale des *Typic Aquiturbel* am Unterhang des Thermoerosionstals am Mamontovy Klyk.

Koordinaten: 73,60428°N, 117,133343° E.
Datum der Profilaufnahme: 25.08.2003.
Tiefe des Wasserspiegels bei Profilaufnahme: 2 cm unter Geländeoberfläche.
Auftautiefe bei Profilaufnahme: 50 cm.
Lage im Gelände: Unterhang eines Thermoerosionstals, 15 m vom Profil in der Talsohle entfernt.
Vegetation (Deckungsgrade in %): Moosschicht: gesamt 95 %; Gefäßpflanzenschicht: gesamt 80 %; *Eriophorum angustifolium* 40 %, *Arctagrostis latifolia* 30 %, *Carex aquatilis* 3 %, *Pedicularis sudetica* 2 %, andere 5 %.
Substrat: Flacher schwach zersetzter Torf über holozänen fluviatilen Schluffen.

Horizont[a]	Tiefe (cm)	Bodenfarbe	Durchwurzelungsintensität	Fe(II)-Ionen / Reduzierende Bedingungen	Korngrößenverteilung			C_{org} (%)	N (%)	C/N	pH ($CaCl_2$)	$P_{verf.}$ (mg kg^{-1} Boden)	$K_{verf.}$ (mg kg^{-1} Boden)	Weitere Merkmale
					Sand (%)	Schluff (%)	Ton (%)							
Oi	0-8	7,5 YR 3/2 (dunkel braungrau)	extrem stark	nicht erkennbar	n.b.	n.b.	n.b.	19	0,9	20	5,3	51	655	
Bg1	8-14	5y 3/1 (dunkel grünlichgrau)	stark	ja	29	68	29	2	0,2	11	5,6	14	35	Rostflecken (< 5 %)
Bg2	14-22	5y 3/1 (dunkel grünlich grau)	mittel	ja	28	67	28	2	0,2	12	6,0	21	72	
	22-30				21	73	21	3	0,2	13	6,5	25	97	
Bjjg	30-38	5y 3/1 (dunkel grünlich grau)	sehr schwach	ja	21	75	21	2	0,2	12	6,5	26	106	Flecken mit erhöhtem Gehalt an o.S.
	38-50				20	74	20	3	0,2	13	6,9	28	112	

Soil Taxonomy (2003): Typic Aquiturbel.
World Reference Base for Soil Resources (1998): Gleyi-Turbic Cryosol.

[a] Horizontsymbole nach US Soil Taxonomy (Soil Survey Staff 2003).

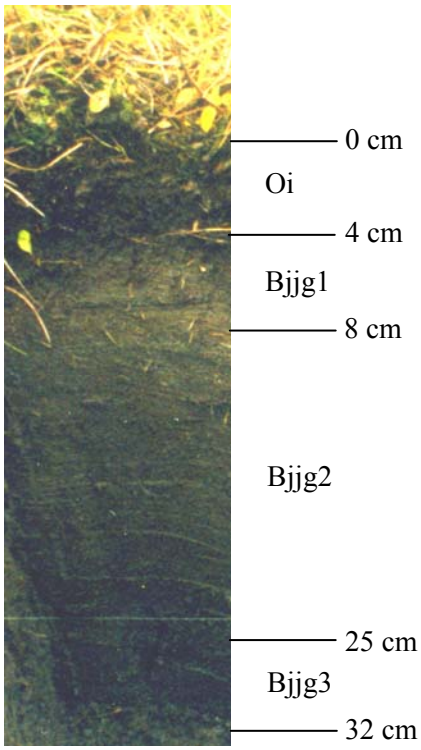

Abbildung 15: Foto vom Bodenprofil des untersuchten *Typic Aquiturbel* am Mittelhang des Thermoerosionstals am Mamontovy Klyk mit der Einteilung in Bodenhorizonte.

Der Stickstoffgehalt war in der Talsohle sowohl absolut als auch im Verhältnis zum Kohlenstoff deutlich höher als im Polygoncenter (Tab. 5 und 8). Die Gehalte an pflanzen- und damit auch bakterienverfügbarem Phosphor und Kalium waren dagegen im Polygoncenter etwas höher.

Die weiteren zwei untersuchten Böden am Unter- und Mittelhang am Mamontovy Klyk wurden nach *US Soil Taxonomy* als *Typic Aquiturbels* klassifiziert (Tab. 6 und 7). Beide Böden zeichneten sich durch Kryoturbationsmerkmale aus, d.h. durch Flecken im Unterboden mit erhöhtem Gehalt an organischer Substanz. Zudem war der Gesamtgehalt an organischer Substanz in den *Aquiturbels* niedriger als im oben beschriebenen *Historthel* und *Fibristel*. Im Boden am Unterhang lag der Wasserstand zur Zeit der Profilbeschreibung wenige Zentimeter niedriger als in Talsohle und Polygoncenter (Tab. 6). Lediglich in den oberen 8 cm hat sich hier Torf akkumuliert (Abb. 14). Mit einem scharfen Übergang folgte darunter der wassergesättigte Mineralboden, der durchgängig von dunkel grünlichgrauer Farbe war und freie Eisen(II)-Ionen enthielt. Nur im oberen Bereich (8-14cm) waren wenige Rostflecken vorhanden. Diese Merkmale lassen darauf schließen, dass der Bereich des Mineralbodens im Profil am Unterhang im Jahresverlauf fast durchgängig wassergesättigt ist.

Tabelle 7: Ausgewählte Merkmale des *Typic Aquiturbel* am Mittelhang des Thermoerosionstals am Mamontovy Klyk.

Koordinaten: 73,60428°N, 117,133343° E.

Datum der Profilaufnahme: 26.08.2003.

Tiefe des Wasserspiegels bei Profilaufnahme: 23 cm unter Geländeoberfläche.

Auftautiefe bei Profilaufnahme: 32 cm.

Lage im Gelände: Mittelhang eines Thermoerosionstals, 35 m vom Profil in der Talsohle entfernt.

Vegetation (Deckungsgrade in %): Moos- und Flechtenschicht: gesamt 95 %; Gefäßpflanzenschicht: gesamt 70 %; *Carex aquatilis* 15 %, *Dryas punctata* 15 %, *Salix sp*. 15 %, *Poaceae* 23 %, andere 2 %.

Substrat: Holozäne fluviatile Schluffe.

Horizont[a]	Tiefe (cm)	Bodenfarbe	Durchwurzelungs-intensität	Fe(II)-Ionen / Reduzierende Bedingungen	Korngrößenverteilung			C_{org} (%)	N (%)	C/N	pH ($CaCl_2$)	$P_{verf.}$ (mg kg^{-1} Boden)	$K_{verf.}$ (mg kg^{-1} Boden)	Weitere Merkmale
					Sand (%)	Schluff (%)	Ton (%)							
Oi	0-4	2,5Y 3/1 (dunkel grau)	sehr stark	nicht erkennbar	n.b.	n.b.	n.b.	34	1,6	21	6,5	141	548	
Bjjg1	4-8	10YR 4/2 (braungrau)	mittel	nein	5	68	28	6	0,4	14	5,2	14	45	Rostfleckung (> 25 %); Flecken mit erhöhtem Gehalt an o.S.
Bjjg2	8-16	10YR 4/1 (grau)	mittel	ja	5	63	32	4	0,3	13	5,1	11	40	Flecken mit erhöhtem Gehalt an o.S.
	16-25				6	61	32	5	0,4	13	5,0	14	49	
Bjjg3	25-32	10YR 3/1 (dunkel grau)	sehr schwach	ja	6	66	29	5	0,4	13	5,5	17	61	Flecken mit erhöhtem Gehalt an o.S.

Soil Taxonomy (2003): Typic Aquiturbel.

World Reference Base for Soil Resources (1998): Gleyi-Turbic Cryosol.

[a] Horizontsymbole nach US Soil Taxonomy (Soil Survey Staff 2003).

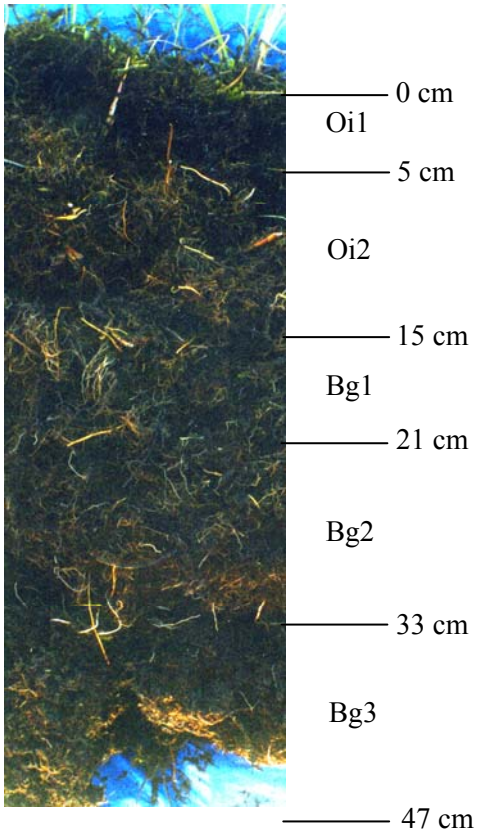

Abbildung 16: Foto vom Bodenprofil des untersuchten *Typic Historthel* im Polygoncenter eines Eiskeilpolygons mit der Einteilung in Bodenhorizonte.

Im Boden am Mittelhang lag der Wasserstand zum Zeitpunkt der Profilbeschreibung in 23 cm Tiefe (Tab. 7). Bei 4-8 cm zeigte eine starke Rostfleckung die im Jahresverlauf häufige Obergrenze des Wasserstandes bzw. des geschlossenen Kapillarraumes an. In letzterem sind alle Bodenporen durch aufsteigendes Grundwasser mit Wasser gefüllt. Unterhalb von 8 cm begann der Bereich, in dem freie Eisen(II)-Ionen nachgewiesen werden konnten und demnach häufig reduzierende Bedingungen herrschten.

An allen untersuchten Standorten waren die Oberböden sehr stark bis extrem stark durchwurzelt. In den Böden im Polygoncenter und in der Talsohle war der sehr stark durchwurzelte Bereich mit mehr als 20 cm deutlich mächtiger als in den übrigen untersuchten Böden (Tab. 5 bis 8). Alle untersuchten Profile waren kalkfrei. Die pH-Werte (in $CaCl_2$) lagen an allen Standorten im leicht sauren Bereich zwischen 5,0 und 6,5 (Tab. 5 bis 8). Die Böden im Thermoerosionstal waren deutlich feinkörniger als die Böden in der Polygonlandschaft im Lena Delta.

Tabelle 8: Ausgewählte Merkmale des *Typic Historthel* im Polygoncenter der polygonalen Tundra im Lena Delta / Samoylov. Die Korngrößenverteilung stammt von einem Polygoncenter-Boden nahe des in dieser Arbeit untersuchten Bodens, Werte aus Kobabe et al. (2004).

Koordinaten: 72° 22,198' N, 126° 28,941' E.

Datum der Profilaufnahme: 30.09.2003.

Tiefe des Wasserspiegels bei Profilaufnahme: 0 cm; z.T. über Geländeoberfläche.

Auftautiefe bei Profilaufnahme: 47 cm.

Lage im Gelände: Center eines Low-Center-Eiskeilpolygons.

Vegetation (Deckungsgrade in %): Moosschicht: gesamt 65 % (übrige Oberfläche mit flachem Wasser bedeckt); Gefäßpflanzenschicht: gesamt 35 %; *Carex aquatilis* 26 %, *Arctagrostis arundinacea* 4 %, *Pedicularis sp*. 3 %, andere 2 %.

Substrat: Flacher schwach zersetzter Torf über holozänen fluviatilen Sanden.

Horizont[a]	Tiefe (cm)	Bodenfarbe	Durchwurzelungs-intensität	Fe(II)-Ionen / Reduzierende Bedingungen	Korngrößenverteilung			C_{org} (%)	N (%)	C/N	pH ($CaCl_2$)	$P_{verf.}$ (mg kg^{-1} Boden)	$K_{verf.}$ (mg kg^{-1} Boden)	Weitere Merkmale
					Sand (%)	Schluff (%)	Ton (%)							
Oi1	0-5	5YR 2/1 (dunkel bräunlichgrau)	extrem stark	nicht erkennbar	n.b.	n.b.	n.b.	30	1,0	31	5,5	24	372	
Oi2	5-15	10YR 3/2 (dunkel grau)	extrem stark	nicht erkennbar	n.b.	n.b.	n.b.	14	0,5	28	5,0	49	336	
					n.b.	n.b.	n.b.	12	0,4	30	5,6	18	122	
Bg1	15-20	10YR 3/2 (dunkel grau)	extrem stark	ja	*77*	*15*	*8*	5	0,1	34	6,0	13	99	
Bg2	20-33	10YR 3/2 (dunkel grau)	stark	ja	*76*	*18*	*6*	3	0,1	32	5,2	10	49	
					69	*26*	*5*	5	0,2	25	5,5	9	34	
Bg3	33-47	5YR 2/1 (dunkel bräunlichgrau)	schwach	ja	*65*	*29*	*6*	5	0,2	27	5,6	9	43	

Soil Taxonomy (2003): Typic Historthel.

World Reference Base for Soil Resources (1998): Gleyi-Histic Cryosol.

[a] Horizontsymbole nach US Soil Taxonomy (Soil Survey Staff 2003).

Wegen der sehr unterschiedlichen Gehalte an organischem Kohlenstoff in den verschiedenen Böden und Tiefenlagen variierte die Bodendichte sehr stark zwischen den einzelnen Proben. Deshalb war die sonst häufig verwendete Boden-Trockenmasse als Bezugsgröße für die mikrobiologischen Analysenergebnisse wenig geeignet, um verschiedene Böden und Bodentiefenstufen zu vergleichen. Ideal wäre das Bodenvolumen als Bezugsgröße. Da die Bodendichte jedoch in den torfhaltigen Böden schon kleinräumig sehr stark variierte, mit Variationskoeffizienten von bis zu 70 % bei Parallelmessungen innerhalb eines Bodenprofils, wurde stattdessen der Gehalt an organischem Kohlenstoff als Bezugsgröße gewählt. Dies ist deshalb von Vorteil, weil der Gehalt an organischem Kohlenstoff – der einen starken Einfluss auf die Bodendichte hat – in homogenisierten Proben direkt parallel zu den mikrobiologischen Untersuchen bestimmt werden kann. Dadurch ist es möglich, jeder mikrobiologisch untersuchten Probe einen Wert für den Kohlenstoffgehalt zuzuordnen. Die Bodendichte hingegen muss an mehreren ungestörten parallelen Proben bestimmt werden, wodurch kleinräumige Unterschiede nicht direkt den mikrobiologisch untersuchten Proben zugeordnet werden können. In den Tab. 9 und 10 sind für alle mikrobiologisch untersuchten Proben deren Kohlenstoffgehalte aufgeführt.

Tabelle 9: Gehalte an organischem Kohlenstoff (C_{org}) der drei Profile im Thermoerosionstal, Mamontovy Klyk, zum Teil mit Parallelprofilen. Abstand der Parallelprofile im Gelände maximal 10 m (Probennahme Ende August 2003).

Talsohle			Unterhang			Mittelhang	
Tiefe (cm)	C_{org} (%)		Tiefe (cm)	C_{org} (%)		Tiefe (cm)	C_{org} (%)
	Standort 1	Standort 2		Standort 1	Standort 2		
0-7	38,9	29,3	0-8	18,8	38,7	0-4	33,7
7-14	28,3	24,2	8-14	1,8	n.b.	4-8	5,7
14-22	21,4	n.b.	14-22	1,9	n.b.	8-16	4,3
22-28	25,3	n.b.	22-30	2,5	n.b.	16-25	4,8
28-38	18,2	n.b.	30-38	2,3	n.b.	25-32	5,1
			38-50	2,5	n.b.		

Tabelle 10: Gehalte an organischem Kohlenstoff (C_{org}) in Parallelprofilen im Polygoncenter, Samoylov, zum Teil zu unterschiedlichen Zeitpunkten beprobt. Abstand der Parallelprofile im Gelände maximal 10 m.

Tiefe (cm)	C_{org} (%)					
	Profil 1 Juli 2003	Profil 2 Sept. 2003	Profil 3 Sept. 2003	Profil 4 Sept. 2003	Profil 5 Juni 2004	Profil 6 Juli 2004
0-5	15,9	30,2	32,2	19,9	22,5	15,5
5-10	21,1	14,1	23,2	19,8	19,4	15,9
10-15	16,6	12,4	14,0	16,6	17,3	14,3
15-20	n.b.	4,8	n.b.	n.b.	gefroren	6,8
20-25	n.b.	3,1	n.b.	n.b.		5,7
25-33	n.b.	5,3	n.b.	n.b.		gefroren
33-39	n.b.	5,4	n.b.	n.b.		

Bodentemperaturen im Active Layer

An allen untersuchten Standorten lagen die Bodentemperaturen Ende August 2003 unter 10°C. In 5 cm Tiefe wurden 6-9°C, in 15 cm Tiefe 2-5°C erreicht. Im wärmsten Monat Juli können die Temperaturen etwas höher steigen. Langzeitmessungen im Polygoncenter zeigten, dass hier in 5 cm Tiefe bis zu 13°C und in 15 cm Tiefe bis zu 6°C erreicht werden (Wagner et al. 2003; s. auch Kap. 3.7).

5.2 Beschreibung der untersuchten Permafrostlagen

Die Untersuchungen zu MOB im Permafrost konzentrierten sich auf einen Küstenaufschluss auf der Insel Samoylov im Lena Delta, der bis in eine Tiefe von 5,6 m unter Geländeoberfläche beprobt wurde. Zusätzlich wurden Vergleichsuntersuchungen an Proben aus einem Küstenaufschluss am Mamontovy Klyk durchgeführt (Abb. 8, Kap. 3.5).

Der Aufschluss im Lena Delta / Samoylov bestand aus holozänen fluviatilen Sanden, die in wechselnden Lagen unterschiedliche Anteile von Torf enthielten (Abb. 17). Damit war der Permafrost aus ähnlichen Substraten aufgebaut wie die Böden in der Auftauschicht, insbesondere in den Polygoncentern (Tab. 8). Die Kohlenstoff- und Stickstoffgehalte sowie

die pH-Werte ähnelten denen der Unterböden im Polygoncenter der Auftauschicht (Tab. 11 und 8). Für 4 von 10 untersuchten Tiefenstufen wurde das ^{14}C-Alter der Torfreste bestimmt. Danach sind die Schichten im Bereich von 0,8 bis 5,6 m Tiefe ca. 3.000 bis 4.000 Jahre alt (Tab. 11). Die Sedimentation der Sande und das Wachstum der Torfe erfolgten an dieser Stelle offenbar innerhalb weniger Jahrhunderte. Das heißt, die einzelnen Lagen befanden sich jeweils nur kurze Zeit in der sommerlichen Auftauschicht. Sie wurden schnell von jüngeren Sedimenten überdeckt und gingen daraufhin in den Permafrost über. Demnach waren die Sedimente seit ihrer Bildung durchgehend gefroren, d.h. seit 3.000 bis 4.000 Jahren.

Bei den untersuchten Proben am Küstenaufschluss am Mamontovy Klyk handelte es sich um holozäne und spätpleistozäne Sedimente. Die älteste Probe hatte ein konventionelles ^{14}C-Alter von 44310 +1260 / -1090 Jahren BP (L. Schirrmeister, unveröffentlichte Daten). Die spätpleistozänen Proben hatten zwar z.T. ein ^{14}C-Alter von über 40000 Jahren BP, sie waren jedoch möglicherweise erst nach der Überdeckung mit weiteren Permafrostsedimenten jüngeren Alters seit ca. 25000 Jahren ständig gefroren (persönliche Mitteilung L. Schirrmeister). Eingehende Beschreibungen des Kliffs sind bei Schirrmeister et al. (2004) zu finden.

Abbildung 17: Foto des untersuchten Permafrost Küstenaufschlusses auf der Insel Samoylov, Lena Delta.

Tabelle 11: Ausgewählte Merkmale der Proben aus dem Küstenaufschluss auf der Insel Samoylov, Lena Delta.

Koordinaten: 72° 22' 00,8" N, 126° 29' 10,7" E.

Datum der Probennahme: 29.08.2004.

Auftautiefe: 80 cm.

Lage im Gelände: Küstenaufschluss an der Süd-Ost-Küste der Insel Samoylov, Lena Delta.

Substrate: Torfhaltige holozäne fluviatile Sande.

Tiefe (m)	C_{org} (%)	N (%)	C/N	pH ($CaCl_2$)	Konventionelles ^{14}C-Alter[a] (BP)
0,8-1,0	8	0,4	22	5,6	3130 ± 100
1,4-1,5	10	0,3	28	5,5	
1,9-2,0	5	0,3	18	6,0	
2,4-2,5	8	0,4	21	5,8	3700 ± 80
2,9-3,0	3	0,2	18	5,5	
3,5-3,6	6	0,3	21	5,2	
3,9-4,0	4	0,2	19	6,0	
4,5-4,6	9	0,4	24	6,5	3560 ± 70
5,0-5,1	5	0,3	17	6,0	
5,5-5,6	6	0,3	22	6,4	3650 ± 210

[a] Definition des konventionellen ^{14}C-Alters siehe Stuiver & Polach (1977).

5.3 Methanemissionen

An den Standorten Polygoncenter und Polygonwall im Lena Delta / Samoylov werden seit 1998 regelmäßig Methanemissionen mit geschlossenen Haubensystemen der gemessen (s. auch Kap. 3.7). Im Thermoerosionstal am Kap Mamontov Klyk wurden dagegen die Emissionen im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal bestimmt. Dies geschah im Zeitraum vom 15.08 bis 23.08.2003 für die Standorte Talsohle und Unterhang. Die Werte für die Talsohle waren mit ca. 100 mg CH_4 d^{-1} m^{-2} ähnlich hoch wie im Polygoncenter während desselben Messzeitraums (Tab. 12). Am Unterhang mit niedrigerem Wasserstand und geringeren C_{org}-Gehalten erreichten die Emissionen nur ca. 60-70 % der Werte in der

Talsohle. Die Methanemissionen am Mittelhang des Thermoerosionstals sind nicht bestimmt worden. Der Wasserstand lag hier mehr als 20 cm unter der Geländeoberfläche und ist damit vergleichbar mit dem am Standort Polygonwall (Tab. 12). Niedrige Wasserstände führen zu geringerer Methanbildung, außerdem wird in nicht wassergesättigten Tiefenlagen ein größerer Anteil des gebildeten Methans oxidiert. Deshalb kann am Mittelhang mit wesentlich geringeren Methanemissionen als an den Standorten Talsohle, Unterhang und Polygoncenter gerechnet werden.

Tabelle 12: Methanemissionen in der Talsohle und am Unterhang am Mamontovy Klyk sowie im Polygoncenter und -wall zwischen dem 15. und 23. August 2003. Werte aus dem Polygoncenter und Polygonwall von Ganzert et al. (2004) bestimmt.

	Talsohle / Mamontovy Klyk	Unterhang / Mamontovy Klyk	*Polygoncenter / Samoylov*	*Polygonwall / Samoylov*
Methanemissionen (mg CH_4 d^{-1} m^{-2})	80-115	50-75	*60-120**	*5-10*

* Werte aus Polygonen, in denen seit 1998 ein Dauermessfeld zur Bestimmung von Methanemissionen eingerichtet ist. Ein anderes, ähnlich nasses Polygoncenter wurde in dieser Arbeit für die Charakterisierung der MOB beprobt.

5.4 Methankonzentrationen in der Bodenlösung

Im Polygoncenter wurden die Methankonzentrationen mit zwei unterschiedlichen Methoden untersucht (Abb. 18). Mit Methode 1 wurden gesamte Bodenproben entnommen und das Methan extrahiert, mit Methode 2 wurde Porenwasser mit einer Kapillare entnommen und das Methan extrahiert. Mit letzterer Methode wurden insgesamt höhere Konzentrationen bestimmt, dabei hatten die Tiefenverläufe jedoch folgende Gemeinsamkeiten: In den obersten ca. 5 cm war die Methankonzentration mit 1 – 13 µM deutlich geringer als im Restprofil. Im Bereich zwischen ca. 10 und 33 cm nahm die Konzentration nach unten hin nur geringfügig zu. In der untersten schwach durchwurzelten Lage direkt über dem gefrorenen Boden war die Methankonzentration schließlich mit bis zu 430 µM CH_4 deutlich erhöht.

Im Thermoerosionstal wurden alle Methankonzentrationen mit Methode 1 bestimmt. In der Talsohle ähnelten Tiefenverlauf und Konzentrationen dem Profil aus dem Polygoncenter, das ebenfalls mit der Methode 1 bestimmt wurde (Abb. 18). Allerdings wurden in der Talsohle nur 4 Tiefenlagen untersucht, weshalb keine Konzentrationssprünge deutlich werden konnten. Im Unterhang hingegen war wieder eine deutlich abgesetzte obere Zone mit geringeren

Methankonzentrationen zu finden. Im Boden am Mittelhang lag der Wasserstand in 23 cm Tiefe. Im wassergesättigten Bereich des Profils nahm die Methankonzentration stark zu.

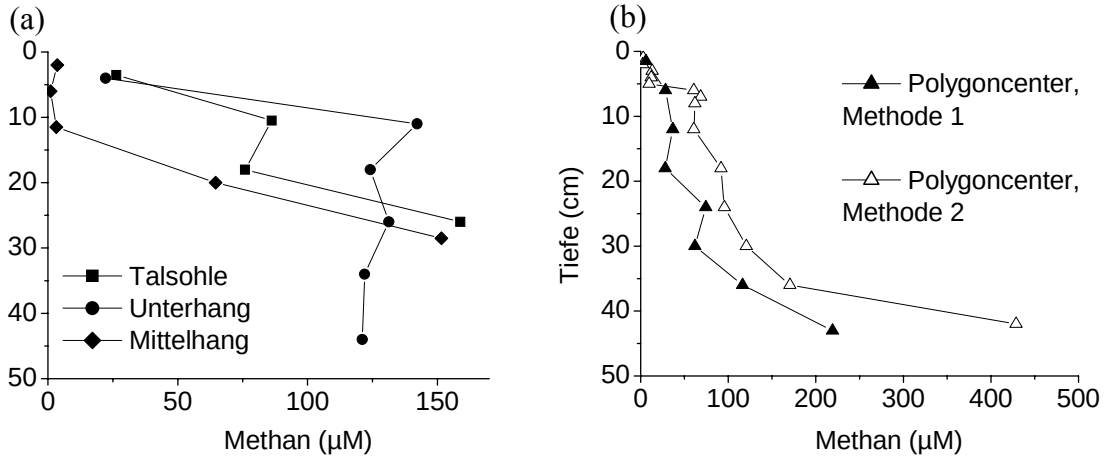

Abbildung 18: Methankonzentrations-Profile: (a) am Mamontovy-Klyk und (b) im Polygoncenter auf Samolyov. Auf Samoylov Bestimmung mit zwei Methoden, Methode 1: Gesamte Bodenprobe entnommen und Methan extrahiert; Methode 2: Porenwasser mit Kapillare entnommen und Methan extrahiert. Am Mamontovy Klyk alles mit Methode 1 bestimmt.

5.5 PLFA-Gesamtgehalte

Als Indikator für die Größe der gesamten mikrobiellen Biomasse ohne *Archaea* wurden die PLFA Gesamtgehalte in den Proben bestimmt (Pinkart et al. 2002).

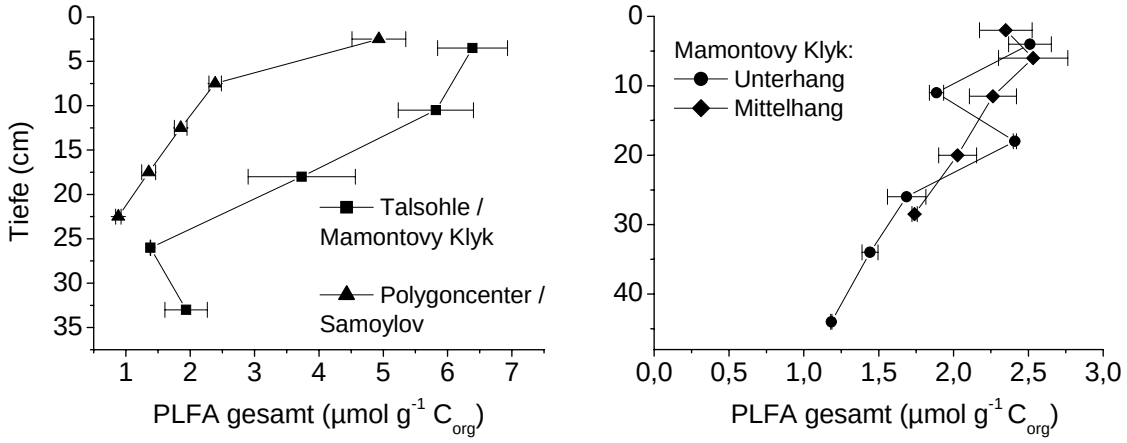

Abbildung 19: Tiefenprofile der PLFA Gesamtkonzentrationen in den untersuchten Tundrenböden (Mittelwerte mit Standardabweichungen, n=2-3).

Aus Abb. 19 sowie Tab. 13 und 14 wird deutlich, dass die PLFA-Gesamtkonzentration an den morphologisch ähnlichen Standorten Talsohle / Mamontovy Klyk und Polygoncenter / Samoylov – bei Berücksichtigung der kleinräumigen Variabilität – ähnlich hoch waren. Die kleinräumigen Unterschiede zwischen drei Profilen im Polygoncenter, die zeitgleich im September 2003 beprobt worden sind, waren dabei in etwa so groß wie die Unterschiede zwischen verschiedenen Probenahmezeitpunkten (Tab. 13). An den beiden trockeneren und weniger torfhaltigen Standorten am Unter- und Mittelhang / Mamontovy Klyk waren die PLFA-Gesamtkonzentrationen ungefähr halb so hoch wie in der Talsohle und im Polygoncenter.

Tabelle 13: PLFA-Gesamtgehalte in 6 Parallelprofilen im Polygoncenter / Samoylov, zum Teil zu unterschiedlichen Zeitpunkten beprobt (Mittelwerte; Abweichung aus Übersichtsgründen nicht dargestellt, Variationskoeffizienten maximal bei 20 %, n=2-3).

Tiefe (cm)	PLFA gesamt (µmol g-1 Corg)					
	Profil 1 Juli 2003	Profil 2 Sept. 2003	Profil 3 Sept. 2003	Profil 4 Sept. 2003	Profil 5 Juni 2004	Profil 6 Juli 2004
0-5	4,10	5,69	5,43	4,88	4,23	4,93
5-10	2,88	4,16	3,99	3,89	2,96	2,39
10-15	2,48	2,51	3,47	2,96	1,78	1,85
15-20	n.b.	2,03	n.b.	n.b.	gefroren	1,35
20-25	n.b.	2,15	n.b.	n.b.		0,88
25-33	n.b.	2,32	n.b.	n.b.		gefroren
33-39	n.b.	1,52	n.b.	n.b.		

Tabelle 14: PLFA Gesamtgehalte in den Oberböden an jeweils zwei Parallelstandorten in der Talsohle und im Unterhang am Mamontovy Klyk (Mittelwerte; Abweichung aus Übersichtsgründen nicht dargestellt, Variationskoeffizienten maximal bei 20 %, n=2-3).

Talsohle			Unterhang		
Tiefe (cm)	PLFA gesamt (µmol g-1 Corg)		Tiefe (cm)	PLFA gesamt (µmol g-1 Corg)	
	Standort 1	Standort 2		Standort 1	Standort 2
0-7	6,39	5,59	0-8	2,51	3,09
7-14	5,82	3,31			

In den verschiedenen Tiefenstufen des untersuchten Permafrost-Profils (Samoylov) waren die PLFA-Gesamtgehalte in etwa so hoch wie in den Unterböden der Auftauschicht im Polygoncenter (Abb. 20).

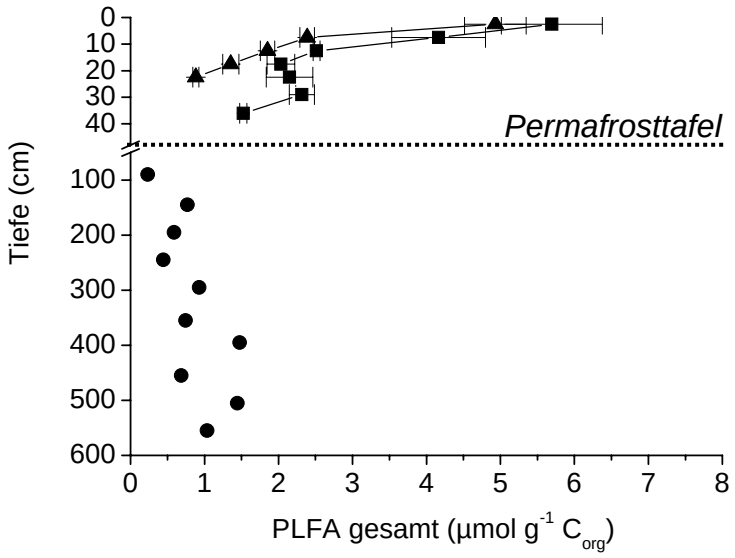

Abbildung 20: PLFA-Gesamtgehalte im holozänen Permafrost und in zwei Profilen der Auftauschicht im Polygoncenter auf Samoylov, Lena Delta.

Aus den PLFA-Konzentrationen können bakterielle Zellzahlen abgeschätzt werden. Für ein Profil im Polygoncenter / Samoylov sind diese Zellzahlen in Tab. 15 aufgelistet. Die Berechnung erfolgte unter der Annahme, dass 1 pmol PLFA 2,0 - 7,1 x 10^4 Bakterienzellen

entsprechen (Frostegard & Baath 1996, Green & Scow 2000, Pinkart et al. 2002). Für die Umrechnung in Bakterien-Zellzahlen wurden die PLFA-Summen ohne die PLFA 18:2 herangezogen, weil diese Fettsäure als Biomarker für Pilze gilt (Frostegard & Baath 1996). Die berechneten Minimal- und Maximalwerte schwanken um den Faktor 3,5; entsprechend der verwendeten minimalen und maximalen Bakterienzellzahlen pro PLFA-Menge.

Tabelle 15: Aus PLFA-Konzentrationen berechnete Bakterien-Zellzahlen im Polygoncenter, Profil 2 (Sept. 2003).

Tiefe (cm)	Bakterienzahlen			
	(Zellen g^{-1} C_{org})		(Zellen g^{-1} TS Boden)	
	Minimum[a]	Maximum[b]	Minimum	Maximum
0-5	$8{,}9 \times 10^{10}$	$3{,}2 \times 10^{11}$	$2{,}7 \times 10^{10}$	$9{,}5 \times 10^{10}$
5-10	$7{,}4 \times 10^{10}$	$2{,}62 \times 10^{11}$	$1{,}0 \times 10^{10}$	$3{,}7 \times 10^{10}$
10-15	$4{,}3 \times 10^{10}$	$1{,}52 \times 10^{11}$	$5{,}4 \times 10^{9}$	$1{,}9 \times 10^{10}$
15-20	$3{,}6 \times 10^{10}$	$1{,}3 \times 10^{11}$	$1{,}7 \times 10^{9}$	$6{,}1 \times 10^{9}$
20-25	$3{,}8 \times 10^{10}$	$1{,}3 \times 10^{11}$	$1{,}2 \times 10^{9}$	$4{,}2 \times 10^{9}$
25-33	$4{,}3 \times 10^{10}$	$1{,}5 \times 10^{11}$	$2{,}3 \times 10^{9}$	$8{,}1 \times 10^{9}$
33-39	$2{,}9 \times 10^{10}$	$1{,}0 \times 10^{11}$	$1{,}6 \times 10^{9}$	$5{,}6 \times 10^{9}$

[a] Minimum-Werte berechnet mit 1 pmol PLFA = $2{,}0 \times 10^{4}$ Bakterienzellen.
[b] Maximum-Werte berechnet mit 1 pmol PLFA = $7{,}1 \times 10^{4}$ Bakterienzellen.

5.6 Quantifizierung von MOB-spezifischen PLFA-Biomarkern

5.6.1 Mengenverhältnis zwischen Typ-I- und Typ-II-Biomarkern

Die beiden PLFA 16:1ω8c und 18:1ω8c gelten als spezifische Biomarker für Typ-I- bzw. Typ-II-MOB (Macalady et al. 2002, Costello et al. 2002, Börjesson et al. 2004, Sundh et al. 2005). Als Indikator für die Biomasse der methanotrophen Bakterien wurden diese beiden PLFA quantifiziert.

In allen untersuchten Tundra-Proben war der Marker für Typ-I-Methanoxidanten (16:1ω8c) in deutlich höheren Konzentrationen vorhanden als der Typ-II-Marker (18:1ω8c). Die spezifische Typ I Fettsäure stellte an allen Standorten mindestens 90 % der Gesamt-

Konzentration beider MOB-Biomarker. Dies deutet auf eine Dominanz der Typ-I-MOB in allen untersuchten Tundrenböden hin.

Es besteht die Möglichkeit, dass mit der PLFA-Methode nicht alle vorhandenen MOB erfasst worden sind, da einige MOB-Gattungen keinen der beiden Biomarker, sondern andere PLFA, enthalten (s. Kap. 2.4.2). Deshalb wurden zusätzlich Markierungsexperimente mit ^{13}C-angereichertem Methan durchgeführt. Mit dieser Erweiterung der PLFA-Methode kann festgestellt werden, welche PLFA in den Proben von aktiven Methanoxidanten stammen. Die Ergebnisse dazu werden in Kap. 5.8 vorgestellt.

5.6.2 Gesamtmenge der MOB-Biomarker in den verschiedenartigen Tundrenböden

Die Tundrenböden unterschieden sich zum Teil deutlich in der Gesamt-Konzentration der beiden MOB-Biomarker. Der Boden in der Talsohle / Mamontovy Klyk enthielt durchgehend wesentlich größere Mengen als die übrigen untersuchten Böden (Abb. 21). Die 6 Parallelprofile am Standort Polygoncenter / Samoylov variierten deutlich untereinander, aber die Maximalwerte lagen durchgehend unter denen am morphologisch und hydrologisch ähnlichen Standort Talsohle (Tab. 16, 17, Abb. 21). In den trockeneren und weniger torfhaltigen Böden am Unterhang und Mittelhang waren insgesamt die geringsten Biomarker-Konzentrationen zu finden (Abb. 21).

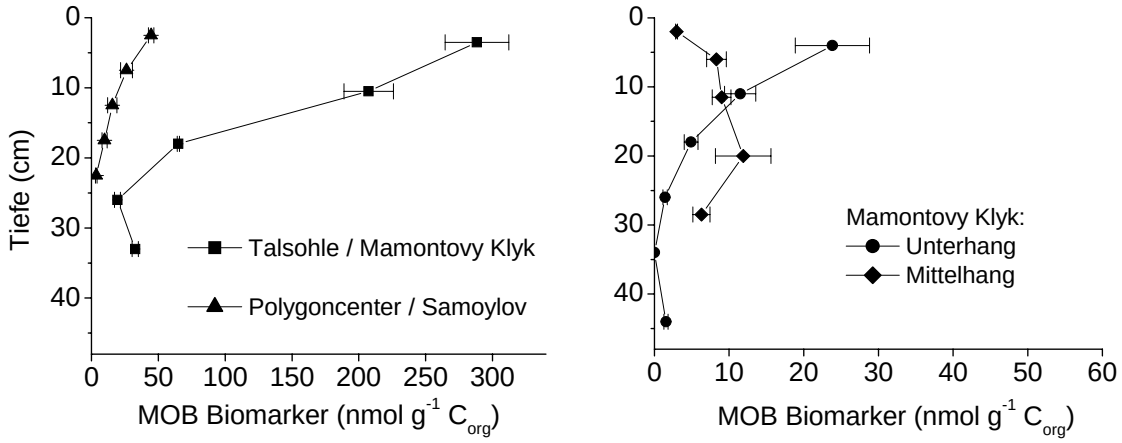

Abbildung 21: Tiefenprofile der MOB-Biomarker-Konzentrationen in den untersuchten Tundrenböden (Mittelwerte mit Standardabweichungen, n=2-3). Wasserstände in den Bodenprofilen (unter Geländeoberfläche): Talsohle: 0 cm; Polygoncenter: 0 cm; Unterhang: 2 cm; Mittelhang: 23 cm.

Tabelle 16: MOB-Biomarker-Konzentrationen in 6 Parallelprofilen im Polygoncenter / Samoylov, zum Teil zu unterschiedlichen Zeitpunkten beprobt (Mittelwerte; Abweichung aus Übersichtsgründen nicht dargestellt, Variationskoeffizienten maximal bei 20 % , n=2-3).

Tiefe (cm)	MOB Biomarker (nmol g^{-1} C_{org})					
	Profil 1 Juli 2003	Profil 2 Sept. 2003	Profil 3 Sept. 2003	Profil 4 Sept. 2003	Profil 5 Juni 2004	Profil 6 Juli 2004
0-5	51,73	20,02	12,08	41,45	21,22	44,56
5-10	21,8	51,26	35,82	25,93	35,44	26,16
10-15	16,67	26,45	21,68	15,31	16,75	15,54
15-20	n.b.	14,06	n.b.	n.b.	gefroren	9,7
20-25	n.b.	11,65	n.b.	n.b.		3,52
25-33	n.b.	12,81	n.b.	n.b.		gefroren
33-39	n.b.	11,15	n.b.	n.b.		

Tabelle 17: MOB-Biomarker-Konzentrationen in den Oberböden an jeweils zwei Parallelstandorten in der Talsohle und im Unterhang am Mamontovy Klyk (Mittelwerte; Abweichung aus Übersichtsgründen nicht dargestellt, Variationskoeffizienten maximal bei 20 % , n=2-3).

Talsohle			Unterhang		
Tiefe (cm)	MOB Biomarker (nmol g^{-1} C_{org})		Tiefe (cm)	MOB Biomarker (nmol g^{-1} C_{org})	
	Standort 1	Standort 2		Standort 1	Standort 2
0-7	288,39	161,78	0-8	23,84	33,65
7-14	207,36	65,6			

In allen Profilen war die Konzentration der MOB Biomarker in der Nähe des Wasserspiegels zur Zeit der Probennahme am größten, wobei dieses Maximum am trockensten Standort Mittelhang am wenigsten ausgeprägt war. Im Polygoncenter lag das Maximum der Biomarker-Konzentrationen entweder direkt an der Bodenoberfläche oder wenige Zentimeter darunter. Dies war auch bei Proben zu beobachten, die zum selben Zeitpunkt im September 2003 – bei gleichem Wasserstand – entnommen worden sind (Tab. 16). Hier spiegelt sich wider, dass die Moose im torfreichen Polygoncenter unregelmäßig aufwachsen. Dadurch entstehen kleinräumige Höhenunterschiede von mehreren Zentimetern an der Bodenoberfläche, die je nach Wasserstand unterschiedlich häufig vom Wasser bedeckt sind.

Während des gesamten Beprobungszeitraums von Juli 2003 bis Juli 2004 lag der Wasserspiegel im Polygoncenter entweder deutlich über oder ungefähr an der Geländeoberfläche. Dabei ragten einige Oberflächenbereiche über die Wasseroberfläche hinaus, andere waren vom Wasser bedeckt.

Die Maximalwerte der Biomarker-Gehalte in den Polygoncenter-Profilen lagen zwischen 36 und 52 nmol g^{-1} C_{org}. Ähnlich wie bei den PLFA Gesamtkonzentrationen war die kleinräumige Variabilität zwischen den zeitgleich beprobten Profilen in etwa so groß wie die Unterschiede zwischen den Proben, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen worden sind (Tab. 16).

In den verschiedenen Tiefenstufen des untersuchten Permafrost-Profils (Samoylov) waren die Gehalte der MOB-Biomarker mit 1,1 bis 9,4 nmol g^{-1} C_{org} in etwa so hoch wie in den Unterböden der Auftauschicht im Polygoncenter (Abb. 27, Kap. 5.7.3; Tab. 16)

Die PLFA-Untersuchungen deuten zudem darauf hin, dass auch die relative Bedeutung der MOB im Verhältnis zur gesamten mikrobiellen Biomasse in den verschiedenen Standorten sehr unterschiedlich war. Im Boden der Talsohle machten die MOB-Biomarker bis zu 4,5 % der gesamten PLFA-Menge aus, in den übrigen Profilen lag dieser Anteil bei maximal 1,3 % (Abb. 21). Im trockensten Standort Mittelhang war nicht nur die absolute Menge an MOB-Biomarkern, sondern auch deren Anteil an der PLFA-Gesamtmenge mit maximal 0,6 % am geringsten.

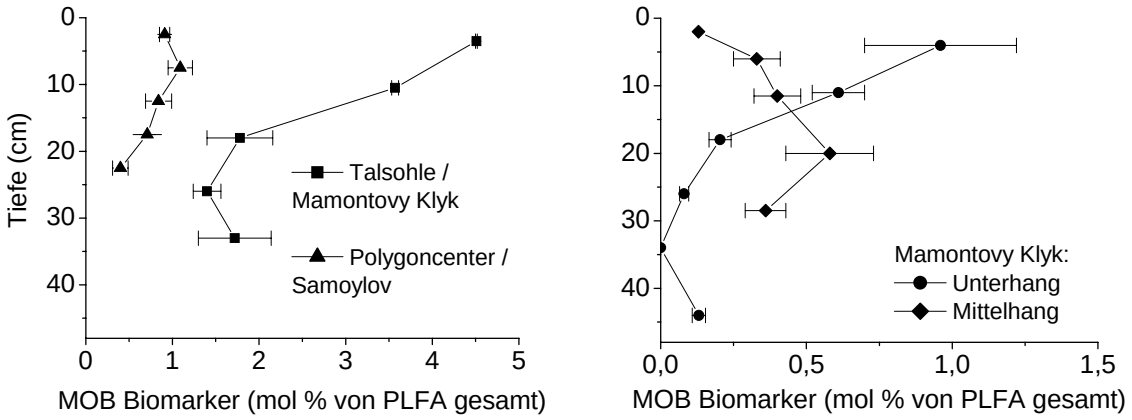

Abbildung 22: Anteile der MOB-Biomarker an der gesamten PLFA-Biomasse in den untersuchten Tundrenböden (Mittelwerte und Standardabweichungen, n=2-3). Wasserstände in den Bodenprofilen (unter Geländeoberfläche): Polygoncenter: 0 cm; Talsohle: 0 cm; Unterhang: 2 cm; Mittelhang: 23 cm.

Zum Vergleich mit den Verhältnissen in gemäßigten Klimaten wurde zusätzlich ein Flussmarschen-Boden in Norddeutschland untersucht (Standort Assel). In 65-70 cm Tiefe, der Zone mit der höchsten Methanoxidationsaktivität, lag der Anteil der MOB-Biomarker bei 2,5 %.

In den bislang bekannten MOB stellen die spezifischen Biomarker 14 - 41% (Typ I) bzw. 19 - 68% (Typ II) der gesamten PLFA-Menge in den Zellen dar (Sundh et al. 1995, Wise et al. 2001) - mit Ausnahme der MOB-Gattungen ohne Biomarker (siehe Kap. 2.4.2). Diese Anteile der Biomarker-PLFA in den MOB-Zellen sowie die oben genannten durchschnittlichen gesamten PLFA-Mengen pro Bakterienzelle können genutzt werden, um Zellzahlen von MOB abzuschätzen (Sundh et al. 1995, Macalady et al. 2002, Costello et al. 2002, Gebert et al. 2004). Für das Profil 6 im Polygoncenter sind die berechneten minimalen und maximalen methanotrophen Zellzahlen in Tab. 18 aufgeführt. Da es zwei Unsicherheitsfaktoren gibt – unterschiedliche PLFA-Gesamtmengen pro Zelle sowie unterschiedliche Anteile der spezifischen Biomarker – liegen die berechneten minimalen und maximalen Werte für eine Probe ca. um den Faktor 10 auseinander.

Tabelle 18: Berechnete MOB-Zellzahlen aus PLFA-Konzentrationen im Polygoncenter, Profil Nr. 2 (Sept.2003).

Tiefe (cm)	MOB-Zellzahlen			
	(Zellen g^{-1} C_{org})		(Zellen g^{-1} TS Boden)	
	Minimum[a]	Maximum[b]	Minimum	Maximum
0-5	$9{,}6 \times 10^{8}$	$1{,}0 \times 10^{10}$	$2{,}9 \times 10^{8}$	$3{,}0 \times 10^{9}$
5-10	$2{,}5 \times 10^{9}$	$2{,}6 \times 10^{10}$	$3{,}8 \times 10^{8}$	$3{,}6 \times 10^{9}$
10-15	$1{,}3 \times 10^{9}$	$1{,}3 \times 10^{10}$	$1{,}6 \times 10^{8}$	$1{,}6 \times 10^{9}$
15-20	$6{,}7 \times 10^{8}$	$7{,}0 \times 10^{9}$	$3{,}2 \times 10^{7}$	$3{,}4 \times 10^{8}$
20-25	$5{,}6 \times 10^{8}$	$5{,}9 \times 10^{9}$	$1{,}8 \times 10^{7}$	$1{,}8 \times 10^{8}$
25-33	$6{,}2 \times 10^{8}$	$6{,}4 \times 10^{9}$	$3{,}3 \times 10^{7}$	$3{,}4 \times 10^{8}$
33-39	$5{,}4 \times 10^{8}$	$5{,}6 \times 10^{9}$	$3{,}0 \times 10^{7}$	$3{,}1 \times 10^{8}$

[a] Minimum-Werte berechnet mit 1 pmol PLFA = $2{,}0 \times 10^{4}$ Bakterienzellen und 41 % Biomarker in Typ-I-Zellen sowie 68 % Biomarker in Typ-II-Zellen.
[b] Maximum-Werte berechnet mit 1 pmol PLFA = $7{,}1 \times 10^{4}$ Bakterienzellen und 14 % Biomarker in Typ-I-Zellen sowie 19 % Biomarker in Typ-II-Zellen.

5.7 Potentielle Methanoxidationsaktivitäten

5.7.1 Tiefenprofile der Methanoxidation in der Auftauschicht

Ein weiterer Indikator für die Größe von MOB-Populationen ist die potentielle Methanoxidationsaktivität (Sundh et al. 1995, Costello et al. 2002).

Die Messungen der potentiellen Aktivität konnten aus logistischen Gründen nur zum Teil direkt nach der Probennahme im Feldlabor durchgeführt werden. Deshalb wurde ein Vorversuch durchgeführt, um zu testen, wie sich die tiefgekühlte Probenlagerung auf die potentiellen Aktivitäten auswirkte. Die Untersuchungen an einem Profil aus dem Polygoncenter vor und nach 4-monatiger Lagerung bei -20°C zeigten, dass die potentiellen Methanoxidationsraten in diesem Zeitraum auf 75-80 % der ursprünglichen Aktivität sanken (Abb. 23). Der Verlauf des untersuchten Tiefenprofils änderte sich jedoch nicht. Deshalb wurden die Tiefenverläufe von potentiellen Aktivitäten in verschiedenen Böden auch bei unterschiedlicher Probenbehandlung verglichen, absolute Unterschiede aber nur interpretiert, wenn die Proben gleich behandelt worden sind.

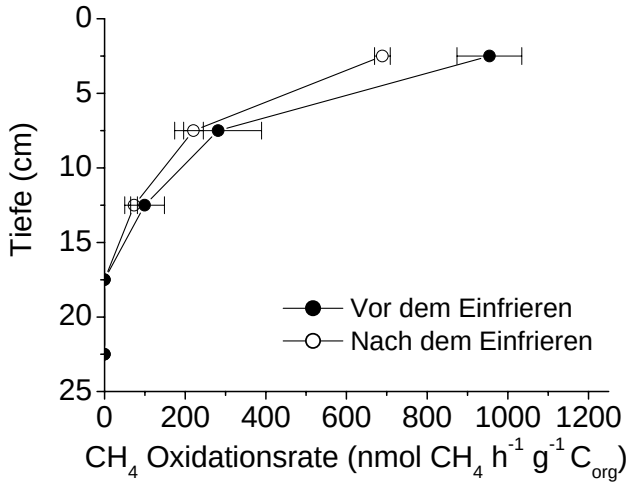

Abbildung 23: Potentielle Methanoxidation (bei 5°C) vor und nach mehrmonatiger Lagerung bei -20°C, Polygoncenter Profil Juli 2004 (Mittelwerte mit Standardabweichungen, n=3-4).

Da es während der Messung von potentiellen Aktivitäten auch bei ausreichend Sauerstoff und Methan im Kopfgasraum zu Substratlimitierungen vor allem in wassergesättigten Proben kommen kann, wurden verschiedene Inkubationsbedingungen getestet. Dies geschah mit

Proben aus der niedersächsischen Elbmarsch (Standort Assel). Zum einen wurden Bodensuspensionen hergestellt und deren Aktivität in Schüttelkulturen gemessen. Zum anderen wurden Standkulturen von Proben mit ihrem *in situ* Wassergehalt inkubiert. Hier wurde weniger Probenmaterial eingesetzt und dieses zudem in dünner Schicht (2-3 mm) in den Inkubationsgefäßen ausgebreitet, um Substratlimitierungen zu vermeiden. Die potentielle Aktivität war in den Standkulturen mit 90,1 nmol g^{-1} TS h^{-1} höher als in den Schüttelkulturen mit 77,9 nmol g^{-1} TS h^{-1}. Zudem streuten die Werte der Parallelmessungen bei den Standkulturen weniger, hier lag der Variationskoeffizient bei 7,6 % gegenüber 15,1 % in den Schüttelkulturen. Alle potentiellen Aktivitäten in den Tundrenböden wurden deshalb in Standkulturen mit geringer Probenmenge bestimmt.

Der Tiefenverlauf der potentiellen Aktivitäten korrelierte in den untersuchten Böden gut mit den Tiefenverläufen der Biomarker-Konzentrationen (Abb. 24). In den wassergesättigten Profilen im Polygoncenter und in der Talsohle konnte ab einer Tiefe von 20 – 25 cm keine Aktivität mehr nachgewiesen werden. Am Unterhang war dies schon unterhalb 8 cm der Fall (Abb. 23). Trotzdem waren in den inaktiven Lagen noch MOB-Biomarker vorhanden. Hier waren Methanoxidanten nach Langzeitinkubationen bei optimaler Sauerstoff- und Methanverfügbarkeit reaktivierbar. Im trockensten Profil am Mittelhang war in allen Tiefenstufen Methanoxidationsaktivität nachweisbar.

Bemerkenswert ist außerdem, dass offenbar die Mehrzahl der MOB den langen Winter überlebt haben. Bereits drei Wochen nach Beginn der Auftauperiode (Juni 2004) sind im Polygoncenter potentielle Aktivitäten gemessen wurden, die sogar höher waren als im untersuchten Profil vom Juli 2004.

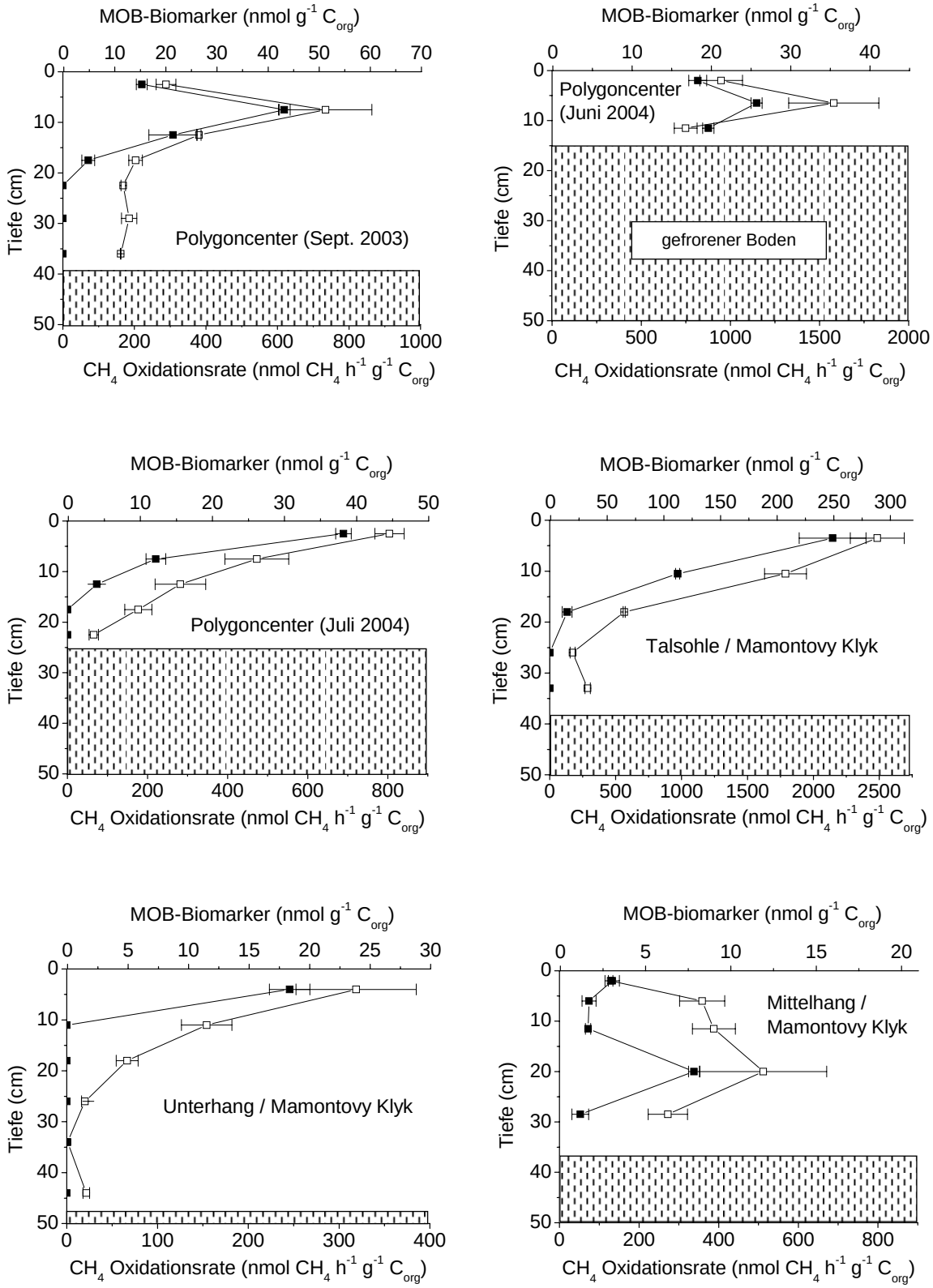

Abbildung 24: Potentielle Aktivitäten (-■-) und Konzentration der MOB-Biomarker (-□-) an den untersuchten Standorten. Bestimmung der Aktivitäten in Talsohle, Unterhang, Mittelhang sowie Polygoncenter Juni und Juli 2004 bei 5°C nach mehrmonatiger tiefgekühlter Lagerung; Polygoncenter September 2003 bei 0°C direkt nach Probennahme (Mittelwerte und Standardabweichungen, Aktivitäten: n=3-4, PLFA: n=2-3).

Aus Abb. 25 wird deutlich, dass in der Talsohle nicht nur wie oben gezeigt die Biomarker-Konzentrationen am größten waren, sondern auch die Methanoxidationsraten.

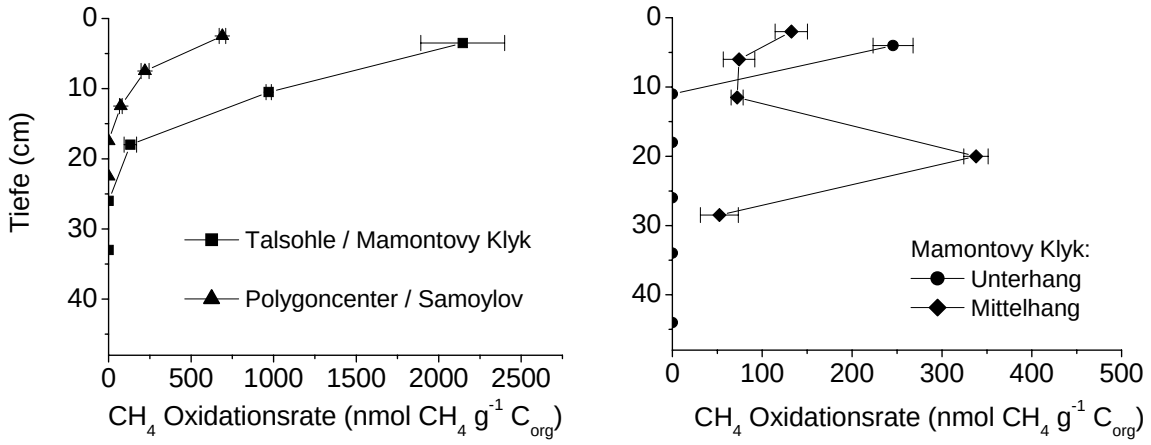

Abbildung 25: Tiefenprofile der potentiellen Methanoxidationsaktivitäten bei 5°C (Mittelwerte mit Standardabweichungen, n=3-4).

5.7.2 Sauerstoffabhängigkeit der methanotrophen Aktivität in der Auftauschicht

Viele der nachgewiesenen Methanoxidanten lebten in Bodenbereichen, die zur Zeit der Probennahme unter dem Wasserspiegel lagen. Das heißt, diesen Organismen standen *in situ* nur geringe Mengen - oder zeitweilig gar kein - Sauerstoff zur Verfügung. Inkubationsversuche mit atmosphärischen (ca. 21 % v/v) sowie niedrigeren (ca. 0,5 % v/v) Sauerstoffkonzentrationen im Kopfgasraum zeigten, dass die niedrigere Sauerstoffkonzentration keinen hemmenden Einfluss auf die MOB-Aktivität hatte. Die Population aus 10-15 cm Tiefe baute das Methan bei 0,5 % Sauerstoff sogar schneller ab als bei atmosphärischer Konzentration (Abb. 26). Bei O_2-Konzentrationen unter 0,5 % v/v sanken in beiden Tiefenlagen die Aktivitäten deutlich ab.

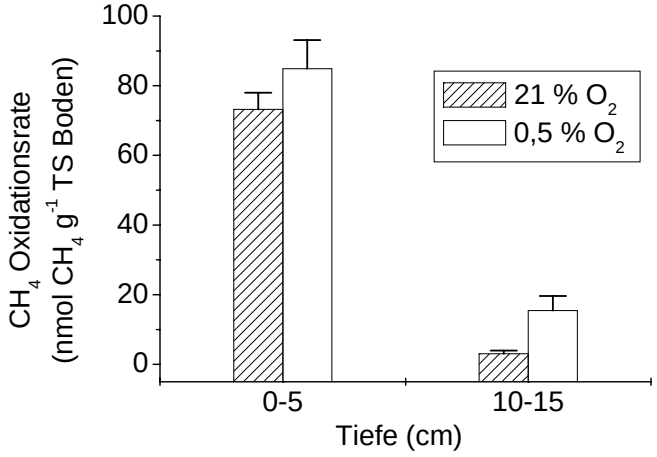

Abbildung 26: Methanoxidationsaktivität bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen im Kopfgasraum der Inkubationsflaschen in zwei Tiefen des Polygoncenters bei 5°C (Mittelwerte mit Standardabweichungen, n=4).

5.7.3 Methanoxidationsaktivität im Permafrost

In keiner der untersuchten Permafrost-Proben aus dem holozänen Küstenaufschluss auf der Insel Samoylov / Lena Delta konnte sofortige Methanoxidationsaktivität gemessen werden (Abb. 27). Die Mehrzahl der Proben konnte jedoch mit den gewählten Inkubationsbedingungen innerhalb von 9 Monaten reaktiviert werden (Tab. 19).

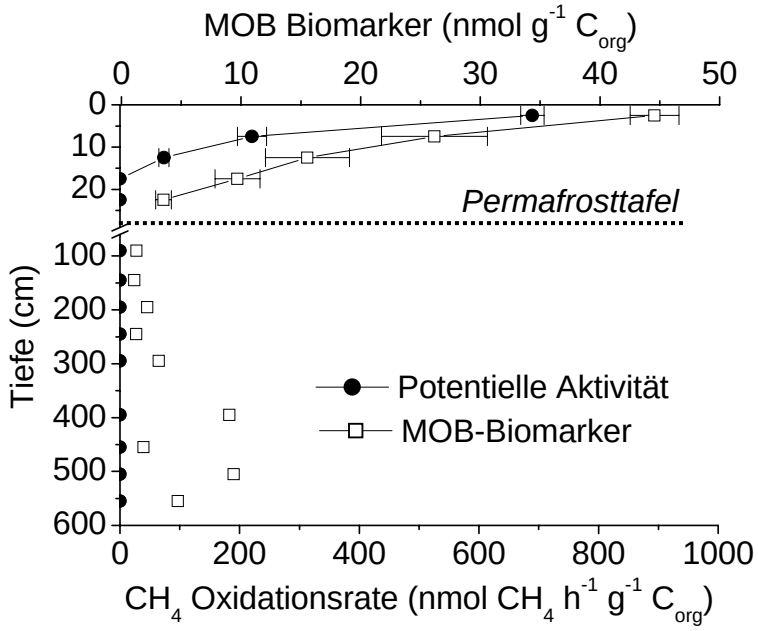

Abbildung 27: MOB-Biomarker und Methanoxidationsaktivitäten im holozänen Permafrost und in einem Profil der Auftauschicht im Polygoncenter auf Samoylov, Lena Delta.

Tabelle 19: Aktivierbarkeit der Methanoxidanten im Küstenaufschluss Samoylov / Lena Delta nach 2- bzw. 9-monatiger Inkubation, bei 22°C und 8° sowie mit unverdünntem und 1:10 verdünntem Nährmedium (NMS).

Tiefe (m)	Methanoxidations-Aktivität							
	2-monatige Inkubation				9-monatige Inkubation			
	22°C		8°C		22°C		8°C	
	NMS	NMS 1:10	NMS	NMS 1:10	NMS	NMS 1:10	NMS	NMS 1:10
0,8-1,0	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein
1,4-1,5	ja	ja	nein	nein	ja	ja	ja	ja
1,9-2,0	ja	ja	nein	nein	ja	ja	ja	ja
2,4-2,5	ja	ja	nein	nein	ja	ja	ja	ja
2,9-3,0	nein	nein	nein	nein	ja	ja	ja	ja
3,5-3,6	ja	nein	nein	nein	ja	ja	nein	nein
3,9-4,0	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein
4,5-4,6	ja	nein	nein	nein	ja	ja	ja	ja
5,0-5,1	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja
5,5-5,6	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja

Die beiden Proben aus 5,0 und 5,5 m Tiefe waren in allen getesteten Kombinationen der Inkubationsbedingungen spätestens nach 2 Monaten deutlich aktiv. Diese Proben wurden verwendet, um den Einfluss von Temperatur und Nährstoffen eingehender zu untersuchen.

Bei Temperaturen von 22-37°C waren die Methanoxidanten aus dem Permafrost am schnellsten zu reaktivieren. Weitere Ergebnisse zum Einfluss der Temperatur sind zusammen mit Ergebnissen zur Temperaturabhängigkeit der Methanoxidationsaktivität in der Auftauschicht in Kap. 5.9 dargestellt.

Die Zugabe von Nährmedium beschleunigte die Reaktivierung von MOB, die Organismen waren aber auch ohne jegliche Zugabe von Nährstoffen zu aktivieren (Abb. 28).

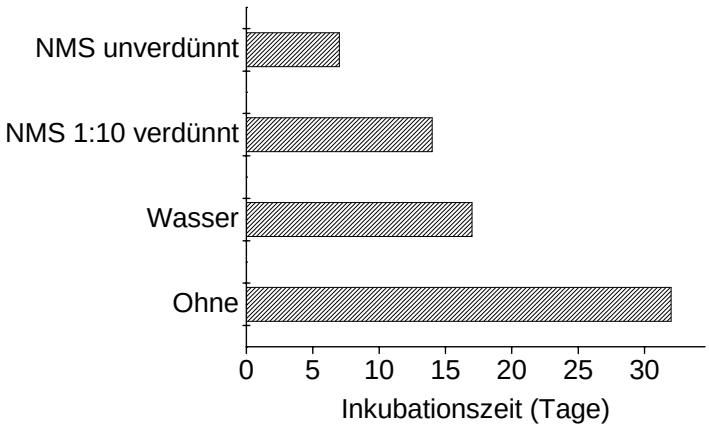

Abbildung 28: Länge der Reaktivierungsphase von MOB im Permafrost nach Zugabe von Nährmedium (NMS) und Wasser sowie ohne Zugabe von zusätzlichem Wasser oder Nährmedium. Küstenaufschluss Samoylov, 5,5 -5,6 m Tiefe (Inkubation bei 22°C).

In Proben aus dem Permafrost-Küstenaufschluss am Mamontov Klyk konnten ebenfalls Methanoxidanten reaktiviert werden. Bei den untersuchten Proben handelte es sich um holozäne und spätpleistozäne Sedimente. Nach 9-monatiger Inkubation konnte in 7 von 21 untersuchten spätpleistozänen Proben Methanoxidationsaktivität gemessen werden. Diese Proben hatten zwar zum Teil. ein ^{14}C-Alter von über 40000 Jahren BP, sie waren jedoch möglicherweise erst seit ca. 25000 Jahren ständig gefroren (persönliche Mitteilung L. Schirrmeister). Von 8 untersuchten holozänen Proben des Permafrostaufschlusses am Mamontov Klyk konnten alle nach spätestens 9 Monaten reaktiviert werden.

5.8 ^{13}C-Markierungen von PLFA

Mit den oben beschriebenen PLFA-Analysen konnte gezeigt werden, dass der spezifische PLFA-Biomarker für Typ-I-MOB (16:1ω8c) in allen Tundrenproben wesentlich höher konzentriert war als der Typ-II-Marker (18:1ω8c) (Kap. 5.6.1). Dies deutet auf eine Dominanz der Typ-I-MOB in den untersuchten Tundrenböden hin. Allerdings besteht die Möglichkeit, dass mit dieser Methode nicht alle vorhandenen MOB erfasst worden sind, da einige Gattungen keinen der beiden PLFA-Biomarker enthalten (s. Kap. 2.4.2).

Durch die Erweiterung der PLFA-Technik mit ^{13}C-Markierungsexperimenten kann bestimmt werden, welche MOB-Gruppen aktiv am Umsatz des Methans beteiligt sind (Boschker et al. 1998). Der große Vorteil dieser Methode ist, dass die PLFA aller aktiven Methanoxidierer in den Proben mit ^{13}C markiert werden - nicht nur die spezifischen Biomarker-PLFA. Für die

untersuchten Tundrenböden sollte mit ^{13}C-Markierungen vor allem geprüft werden, ob Typ-II-MOB tatsächlich einen so geringen Anteil der MOB-Populationen darstellten wie die PLFA-Konzentrationen vermuten ließen.

Nach Inkubation der Proben mit ^{13}C-angereichertem Methan wurde der ^{13}C-Einbau in die verschiedenen PLFA bestimmt. In Abb. 29 ist für den Oberboden in der Talsohle gezeigt, wie sich die $\delta^{13}C$-Werte vor und nach der Inkubation mit $^{13}CH_4$ unterschieden. Einzelne PLFA waren deutlich mit ^{13}C angereichert. Die Fettsäure 16:1ω5 sowie die Gruppe 16:1* hatten vor der Markierung mit -51,8 und -45,5 ‰ die negativsten $\delta^{13}C$-Werte in der Probe, d.h. sie waren stärker mit ^{13}C abgereichert als die übrigen Fettsäuren.

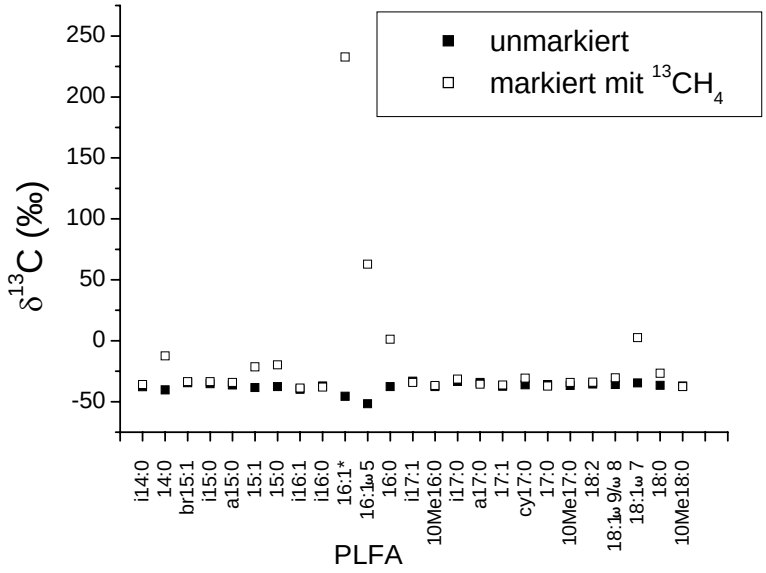

Abbildung 29: $\delta^{13}C$-Werte der PLFA im Oberboden der Talsohle am Mamontovy Klyk, vor und nach der Markierung mit $^{13}CH_4$. 16:1* = 16:1ω11,9,8,7,6.

Die $\delta^{13}C$-Werte geben das Mengenverhältnis zwischen ^{13}C und ^{12}C in den einzelnen PLFA-Molekülen an. Aus diesen Werten sowie aus den PLFA-Konzentrationen wurden die absoluten ^{13}C-Gehalte der einzelnen PLFA-Moleküle berechnet und anschließend bestimmt, wie viel des gesamten ^{13}C, das in PLFA eingebaut wurde, anteilig in welcher PLFA zu finden war. Diese Anteile sind in den Abb. 30 bis 36 für die verschiedenen untersuchten Tundrenböden dargestellt. Einige PLFA konnten im GC-*C*-IRMS chromatographisch nicht getrennt werden, so dass in diesen Abbildungen zum Teil Werte für Gruppen von PLFA-

Molekülen angegeben sind. Letzteres gilt auch für die spezifischen MOB-Biomarker 16:1ω8c und 18:1ω8c. Die 16:1ω8c ist mit mehreren 16:1 PLFA, die 18:1ω8c mit 18:1ω9 vermischt. In den unterschiedlichen Proben konnten ^{13}C-Gehalte von 16 bis 26 verschiedenen PLFA bzw. PLFA-Gruppen bestimmt werden. Die Zahl der einbezogenen PLFA variierte, weil zum Teil die Konzentrationen einzelner PLFA zu gering waren, um sichere δ^{13}C-Werte zu erhalten.

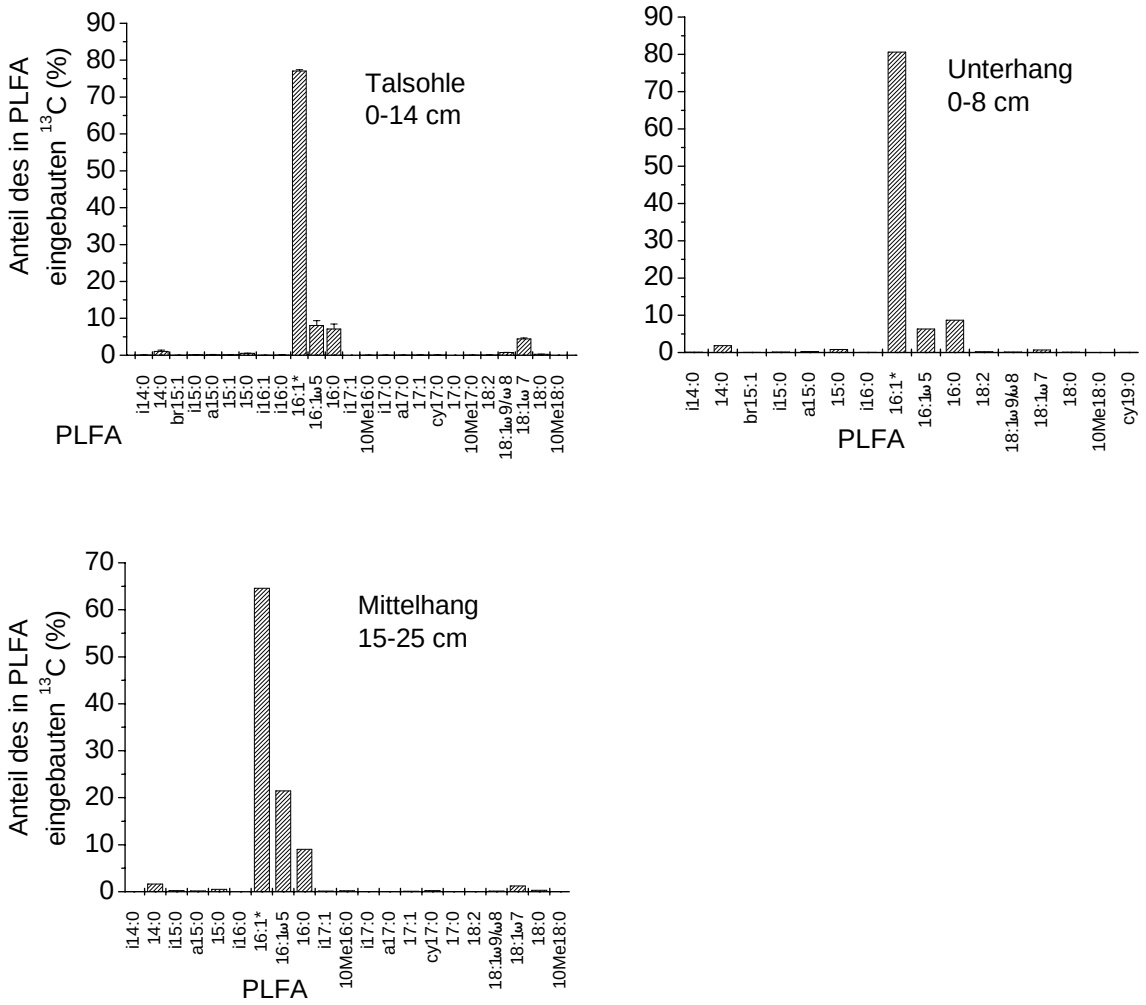

Abbildung 30: Einbau von ^{13}C in PLFA nach Markierung mit $^{13}CH_4$ in Proben aus den drei Untersuchungsstandorten am Mamontovy Klyk; an jedem Standort jeweils die Tiefenlage mit der höchsten potentiellen Aktivität und MOB-Biomarker-Konzentration. 16:1* = 16:1ω11,9,8,7,6.

Von jedem der untersuchten Böden wurden jeweils die Proben aus der Tiefenlage mit der höchsten Methanoxidations-Aktivität für die Markierungsexperimente verwendet. Am Standort Polygoncenter / Samoylov wurden außerdem alle Tiefenstufen, die sofort aktiv

waren, mit ^{13}C-Methan markiert (Abb. 31). Zum Vergleich wurde hier zusätzlich eine Probe aus dem erhöhten und trockeneren Polygonwall auf der Insel Samoylov untersucht (Abb. 32).

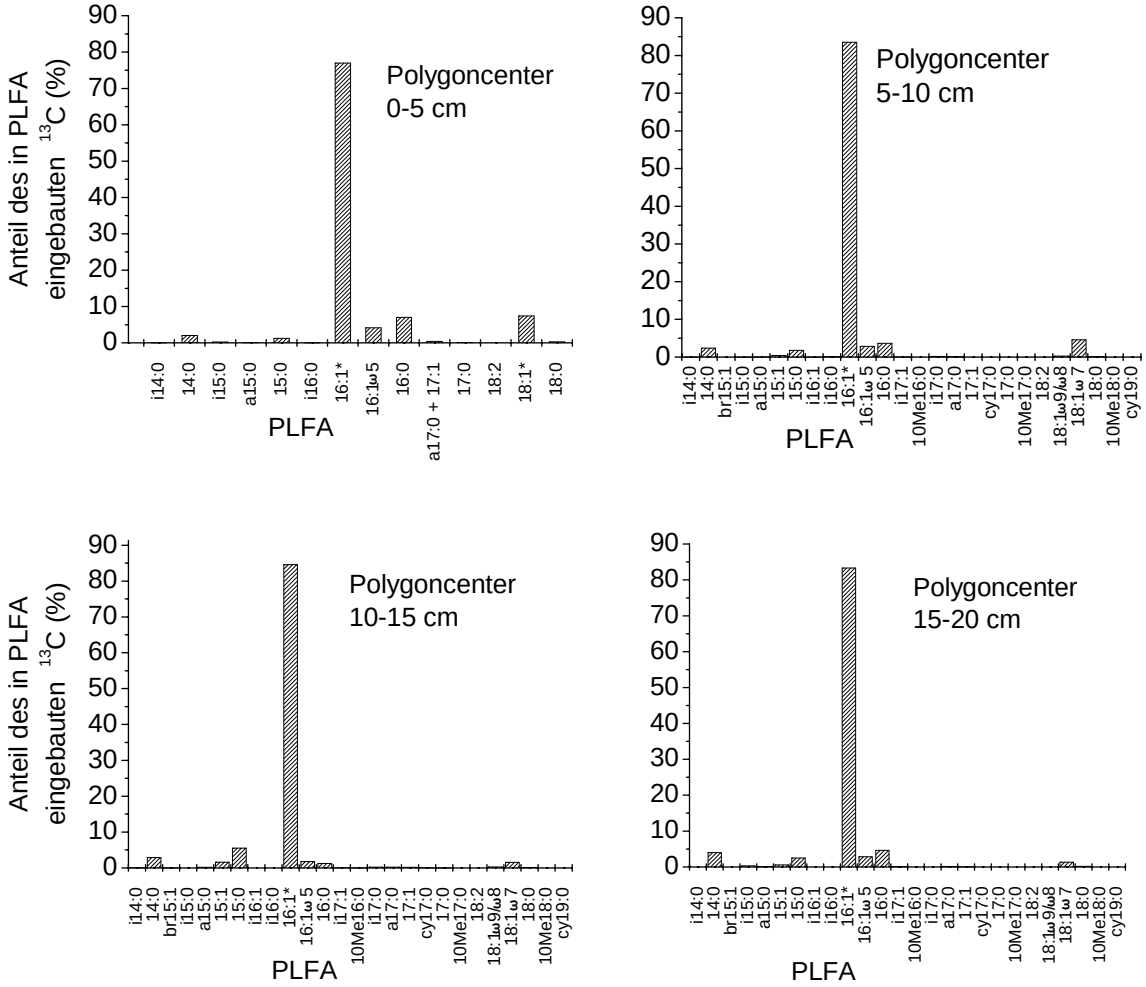

Abbildung 31: Einbau von ^{13}C in PLFA nach Markierung mit $^{13}CH_4$ im Polygoncenter in allen Tiefenstufen mit Methanoxidationsaktivität (Profil 2, Sept 2003). 16:1* = 16:1ω11,9,8,7,6. 18:1*=18:1ω7,8,9.

In allen untersuchten Tundrenböden wurde das meiste ^{13}C in eine Gruppe von 16:1 PLFA eingebaut. Eines dieser Moleküle war der spezifische Marker für Typ I MOB (16:1ω8c). Zwei weitere sind häufige Komponenten in Typ I Methanoxidanten (16:1ω7c, 16:1ω6c). Diese PLFA kommen zwar auch in anderen – nicht methanotrophen – Organismen vor, aber nicht bzw. nur in geringen Konzentrationen in bekannten Typ-II-MOB. Auch die ebenfalls in allen Proben markierte 16:1ω5 kommt unter den Methanoxidanten hauptsächlich in Typ I Organismen vor. Ein geringer Anteil des ^{13}C wurde in allen Proben in 18:1 PLFA eingebaut, die unter den Methanoxidanten typisch für Typ II sind.

Die ^{13}C-PLFA-Markierungsexperimente bestätigten also die Analysen der PLFA-Gehalte. Demnach dominierten Typ-I-Methanoxidanten in allen untersuchten Tundrenböden und waren hauptsächlich für den Methanumsatz in diesen Habitaten verantwortlich. Typ-II-Methanoxidanten kamen ebenfalls vor, spielten aber eine untergeordnete Rolle.

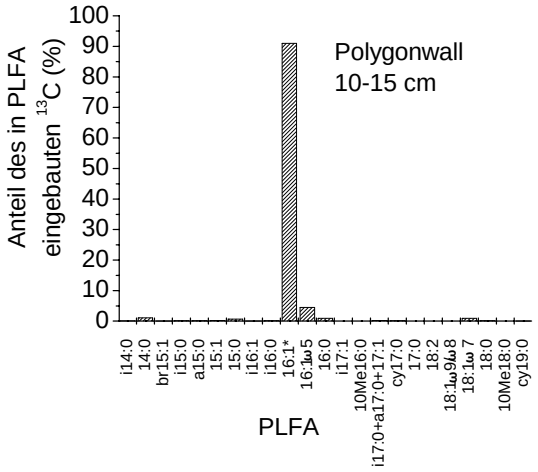

Abbildung 32: Einbau von ^{13}C in PLFA nach Markierung mit $^{13}CH_4$ in einer Probe aus dem Polygonwall in 10-15 cm Tiefe 16:1* = 16:1ω11,9,8,7,6.

Die Markierung einer Probe aus dem Permafrost auf Samoylov in 5 m Tiefe zeigte ein ähnliches Bild wie die untersuchten Proben aus der Auftauschicht. Auch hier wurde das meiste ^{13}C in 16:1 PLFA eingebaut (Abb. 33). Demnach war die reaktivierte Population aus dem Permafrost ebenfalls von Typ-I-MOB dominiert.

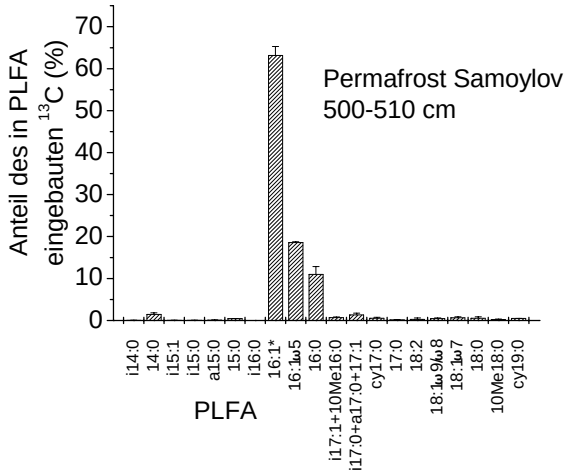

Abbildung 33: Einbau von ^{13}C nach Markierung mit $^{13}CH_4$ in einer reaktivierten Probe aus dem Permafrost auf Samoylov, 500-510 cm Tiefe. 16:1* = 16:1ω11,9,8,7,6.

Zum Vergleich wurde zusätzlich eine Probe aus einem Standort der gemäßigten Klimate in der Elbmarsch in Niedersachsen mit ^{13}C-Methan markiert. In der untersuchten Probe aus 65-70 cm Tiefe machte der spezifische Typ-I-Marker (16:1ω8c) 32 % und der Typ-II-Marker (18:1ω8c) 68 % der gesamten Menge an den beiden MOB-Biomarkern aus. Nach der ^{13}C-Markierung waren hier sowohl 16:1 als auch 18:1 PLFA stark mit ^{13}C angereichert (Abb. 34). Demnach hatten die Typ-II-MOB in diesem Boden eine wesentlich größere Bedeutung als in den untersuchten Tundrenböden.

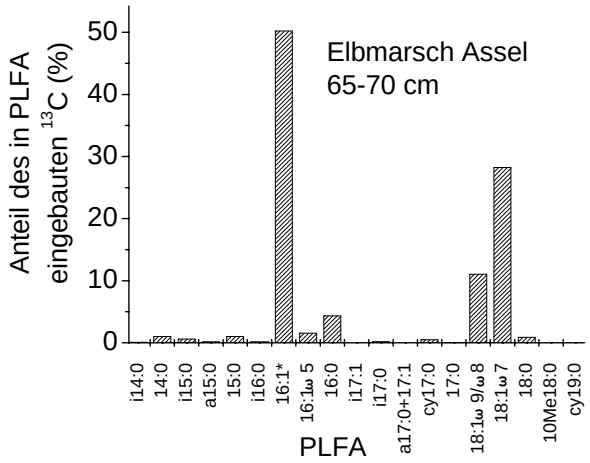

Abbildung 34: Einbau von ^{13}C in PLFA nach Markierung mit $^{13}CH_4$ in einer Probe aus dem gemäßigten Vergleichsstandort Elbmarsch in Assel, Niedersachsen, 65-70 cm Tiefe. 16:1* = 16:1ω11,9,8,7,6.

Proben aus dem Thermoerosionstal konnten im Gegensatz zu Proben aus der polygonalen Tundra auf Samoylov im Lena Delta nicht direkt nach der Probennahme markiert werden. Deshalb wurde geprüft, ob bei tiefgekühlt gelagerten Proben das ^{13}C in dieselben PLFA eingebaut wird wie bei frischen Proben direkt nach der Probennahme. Für eine Probe aus dem Polygoncenter im Lena Delta konnte festgestellt werden, dass sich die ^{13}C-Muster der PLFA bei Markierung direkt nach der Probennahme und nach mehrmonatiger Lagerung im tiefgekühlten Zustand nicht wesentlich voneinander unterschieden (Abb. 35).

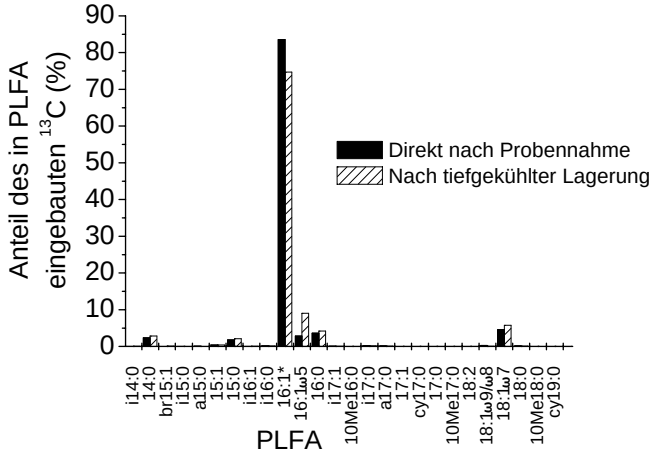

Abbildung 35: Einbau von ^{13}C in PLFA nach Markierung mit $^{13}CH_4$ direkt nach der Probennahme und nach mehrmonatiger tiefgekühlter Lagerung. Probe aus dem Polygoncenter, 5-10 cm Tiefe. 16:1* = 16:1ω11,9,8,7,6.

Außerdem wurde geprüft, ob sich das ^{13}C-PLFA-Muster unterschied, wenn eine Probe bei verschiedenen Temperaturen markiert wurde. Dazu wurde eine Probe aus dem Polygoncenter (0-5 cm Tiefe) parallel bei 0°C und 28°C mit ^{13}C-Methan markiert. Aus Abbildung 36 wird deutlich, dass es nur geringe Unterschiede im Markierungsmuster gab. Demnach scheinen die gleichen MOB bei niedrigen und hohen Temperaturen aktiv zu sein. Die hier beschriebene Markierung wurde ohne Vorinkubation durchgeführt – sie bezieht sich also auf die *in situ* vorhandene und unmittelbar aktive Population. Ob eine längerfristige Inkubation bei unterschiedlichen Temperaturen zur Selektion und Aktivität unterschiedlicher MOB-Gruppen führt, wurde ebenfalls untersucht. Die Ergebnisse zu diesem Experiment sind in Kap. 5.10 beschrieben.

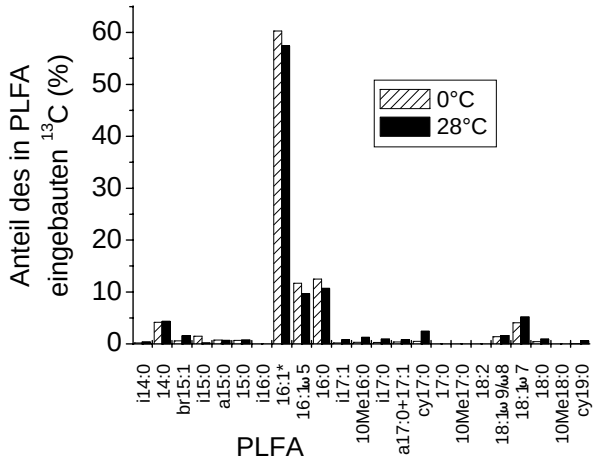

Abbildung 36: Einbau von ^{13}C in PLFA nach Markierung mit $^{13}CH_4$ bei 0 und 28°C. Probe aus dem Polygoncenter, 0-5 cm Tiefe. 16:1* = 16:1ω11,9,8,7,6.

5.9 Methanoxidationsaktivitäten in Abhängigkeit von der Temperatur

Die Temperaturabhängigkeit der Methanoxidationsaktivität wurde in Proben aus der Talsohle am Mamontovy Klyk sowie aus dem Polygoncenter, Polygonwall und dem Permafrost-Küstenaufschluss auf der Insel Samoylov / Lena Delta untersucht. Die absoluten Methanoxidationsraten waren zwischen diesen Proben nicht vergleichbar, da die Lagerungsdauer der einzelnen Proben zwischen 2 Wochen und 10 Monaten variierte. Während der Probenlagerung kam es zu einer Aktivitätsabnahme der MOB (s. Abb. 23, Kap. 5.7.1). Deshalb wurde der relative Lauf der Temperaturabhängigkeit verglichen, d.h. die Höhe der Aktivität bei einzelnen Temperaturen im Verhältnis zur Aktivität bei der Optimaltemperatur.

In allen untersuchten Proben der Auftauschicht war die potentielle Methanoxidationsaktivität bei ca. 22 bis 28 °C am höchsten (Abb. 37) und bei ca. 42°C nicht mehr nachweisbar. Bei 0°C zeigten alle Proben noch deutliche Aktivität. In der Talsohle wurden bei 0 °C noch ca. 32 % der Optimalaktivität erreicht; für die übrigen Proben der Auftauschicht lag dieser Wert lediglich zwischen 5 und 9 %.

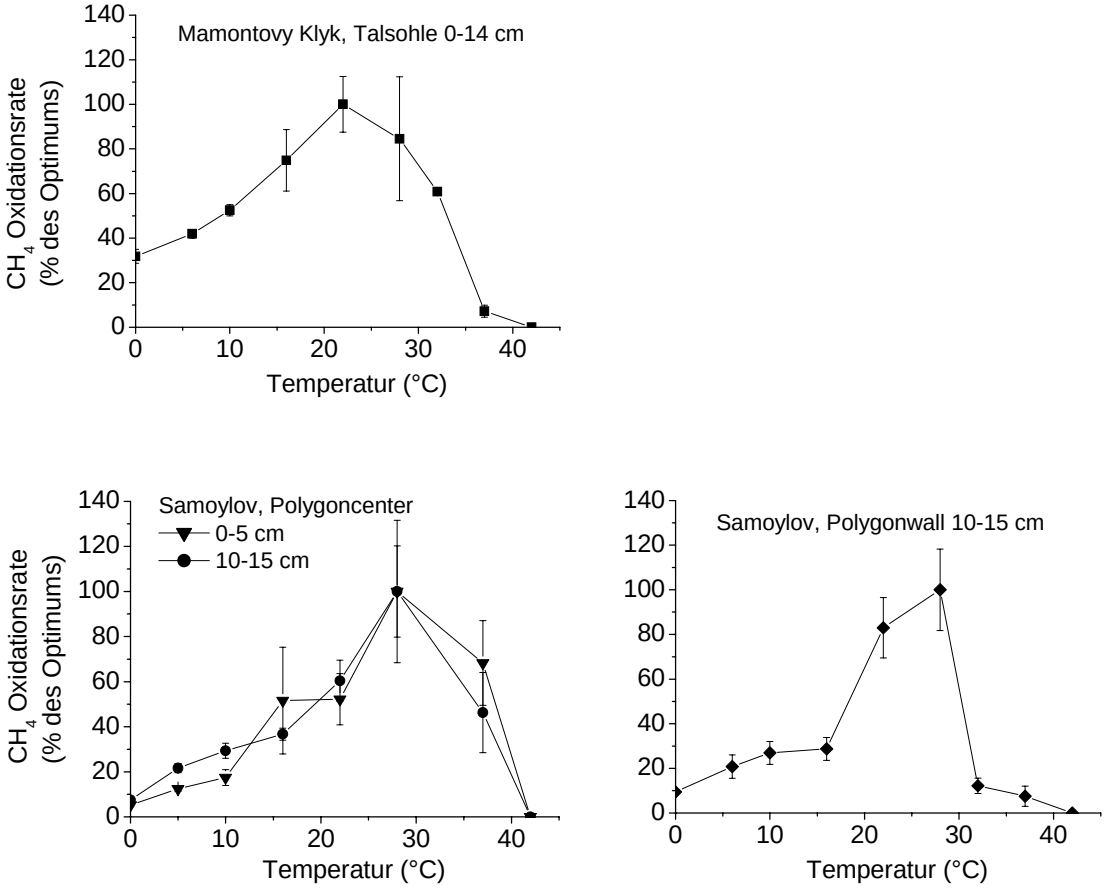

Abbildung 37: Temperaturabhängigkeit der potentiellen Methanoxidations-Raten in der Talsohle am Mamontovy Klyk sowie im Polygoncenter und –wall auf Samoylov / Lena Delta (Mittelwerte und Standardabweichungen, n=3-4). Absolute Aktivitäten bei den jeweiligen Optimaltemperaturen (in nmol CH_4 h^{-1} g^{-1} TS): Talsohle: 504,5 ± 62,9; Polygoncenter 0-5 cm: 1185,2 ± 374,5; Polygoncenter 10-15 cm: 53,0 ± 10,7; Polygonwall: 8,5 ± 1,6.

In der untersuchten Probe aus dem Permafrost begann der Methanabbau während des Aktivitätstests erst nach mehrtägiger Inkubation. Nach dieser Reaktivierungsphase konnte eine geringe initiale Methanoxidationsaktivität gemessen werden, die sich im Laufe des Aktivitätstests deutlich steigerte. Diese Aktivitätssteigerung war mit einer leichten Verschiebung der Optimaltemperatur verbunden. Beide Temperaturkurven – die zu Beginn und die am Schluss des Aktivitätstests – sind in Abb. 38 dargestellt. Die höchsten Aktivitäten waren bei 28 bzw. 37°C zu beobachten.

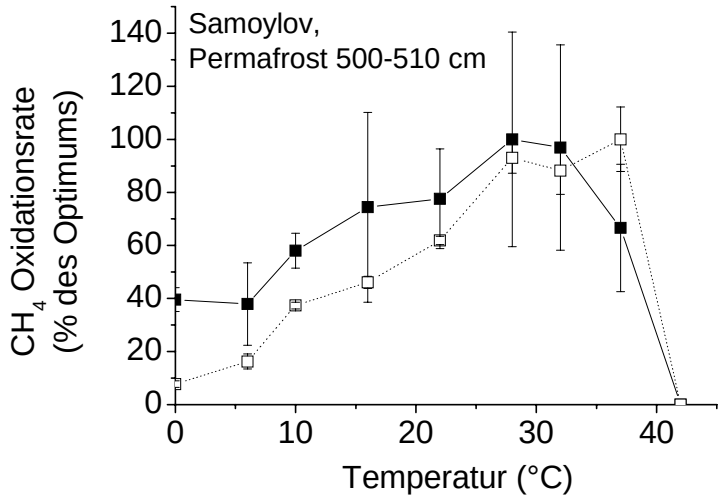

Abbildung 38: Temperaturabhängigkeit der potentiellen Methanoxidations-Raten in einer reaktivierten Probe aus dem Permafrost auf Samoylov (Mittelwerte und Standardabweichungen, n=3-4). -■- Raten bei Beginn messbarer Aktivität, -□- Raten am Ende des Aktivitätstests. Absolute Aktivitäten bei den jeweiligen Optimaltemperaturen (in nmol CH_4 h^{-1} g^{-1} TS): Beginn: 19,7 ± 8,0; Ende: 113,9 ± 13,8.

Zum Vergleich wurde die Temperaturabhängigkeit der Methanoxidation in einer Probe aus der Elbmarsch in Niedersachsen untersucht (65-70 cm Tiefe). Die Methanoxidationsaktivität war hier bei 37°C am höchsten. Bei 0°C wurden noch 6 % der Optimalaktivität beobachtet (Abb. 39).

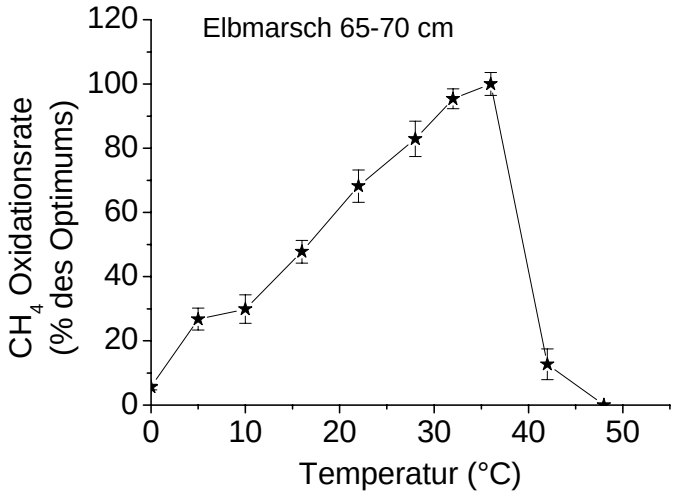

Abbildung 39: Temperaturabhängigkeit der Methanoxidation in einem Boden aus der niedersächsischen Elbmarsch, 65-70 cm Tiefe (Mittelwerte und Standardabw., n=3-4)

5.10 Langzeitinkubationen zur Untersuchung des Temperatureinflusses auf die MOB-Populationsstruktur

Um zu prüfen, ob und wie die Struktur der aktiven MOB-Populationen von der Temperatur beeinflusst wird, wurde ein Langzeit-Temperaturversuch durchgeführt. Der Oberboden (0-14 cm Tiefe) aus der Talsohle am Mamontovy Klyk wurde für 11 Wochen bei 0 °C und 22 °C mit 1,5-5 % Methan im Kopfgasraum inkubiert.

5.10.1 PLFA-Gehalte nach Langzeitinkubation

Insgesamt wurden für den Vergleich von inkubierten und uninkubierten Proben 46 verschiedene PLFA quantifiziert, 2 davon konnten nicht identifiziert werden und wurden mit „unbekannt“ gekennzeichnet (Tab. 20). Die Gesamtgehalte der PLFA waren nach den Inkubationen bei 0 und 22°C tendenziell etwas niedriger als in der Ausgangsprobe, allerdings waren diese Unterschiede nicht signifikant (U-Test, $\alpha = 0{,}05$).

Nach der Inkubation bei 0°C haben die Konzentrationen der meisten PLFA-Moleküle entweder abgenommen oder sich nicht signifikant verändert. Nur die Konzentrationen des Typ-I-Markers 16:1ω8c sowie der PLFA 16:1ω11c, 16:1ω6c und 16:1ω5t waren signifikant erhöht (Tab. 20 und Abb. 40). Dies deutet darauf hin, dass auch die letzteren PLFA von MOB stammen, da unter den Inkubationsbedingungen mit der regelmäßigen Zugabe des Substrates Methan vor allem Methanoxidierer wachsen konnten. Nach der Inkubation bei 22°C waren nur die Konzentrationen des Typ-II-Markers 18:1ω8c sowie der PLFA 18:1ω7c signifikant erhöht, die letztere besonders deutlich um ca. 93 nmol g^{-1} TS (Tab. 20 und Abb. 40). Diese Fettsäure kommt in allen bekannten Typ-II-MOB vor, ist jedoch nicht spezifisch. Neben anderen PLFA hat auch die Konzentration des Typ-I-Markers 16:1ω8c bei 22°C signifikant abgenommen.

Tabelle 20: PLFA-Gehalte in Bodenproben der Talsohle, vor und nach der 11-wöchigen Inkubation bei 0°C bzw. 22°C. Mittelwerte und Standardabweichungen (n=3) in nmol g^{-1} TS. Mit * gekennzeichnete Konzentrationen sind signifikant größer oder kleiner als die Startkonzentration (U-Test, α = 0,05). Fettgedruckt sind PLFA, deren Gehalte bei 0°C oder 22°C signifikant erhöht waren. Unterstrichene PLFA sind spezifische MOB-Biomarker.

PLFA	Start		0°C		22°C	
GESAMT	1442,1	(± 205,6)	1289,1	(± 112,5)	1079,3	(± 189,2)
12:0	5,6	(±2,8)	6,9	(± 3,5)	1,6	(± 1,1) *
i13:0	2,0	(±0,9)	1,2	(± 0,3)	1,4	(± 0,6)
a13:0	2,4	(±1,0)	1,7	(± 0,5)	1,6	(± 1,1)
13:0	2,7	(±0,8)	2,0	(± 0,5)	0,8	(± 0,5) *
i14:0	29,9	(±8,5)	20,1	(± 3,5)	18,8	(± 7,4)
14:0	37,3	(±8,7)	34,7	(± 5,9)	25,9	(± 7,7)
br 15:1	18,9	(±3,5)	20,4	(± 2,7)	15,8	(± 8,3)
i15:0	81,3	(±15,1)	59,8	(± 6,5)	72,8	(± 19,4)
a15:0	93,1	(±20,6)	60,5	(± 4,2) *	58,9	(± 13,1) *
unbekannt	3,5	(±0,7)	2,9	(± 0,5)	2,3	(± 0,5) *
15:1	7,7	(±1,7)	4,8	(± 0,9) *	2,3	(± 0,1) *
15:0	26,2	(±4,3)	19,9	(± 0,9) *	12,3	(± 2,5) *
br 16:0	3,1	(±1,0)	1,6	(± 0,2) *	0,8	(± 0,1) *
i16:1	14,0	(±3,3)	11,8	(± 0,8)	4,9	(± 1,1) *
i16:0	65,1	(±9,9)	46,8	(± 1,7) *	28,0	(± 6,8) *
16:1ω11c	**7,9**	**(±0,6)**	**11,5**	**(± 2,2)** *	10,1	(± 1,4)
16:1ω9c	10,5	(±1,8)	8,7	(± 1,0)	7,6	(± 3,9)
<u>16:1ω8c</u>	**36,0**	**(±4,6)**	**88,6**	**(± 15,4)** *	15,9	(± 2,8) *
16:1ω7c	186,1	(±16,7)	208,4	(± 51,9)	124,0	(± 21,3) *
16:1ω6c	**13,4**	**(±2,3)**	**19,3**	**(± 2,7)** *	3,4	(± 0,7) *
16:1ω7t	6,9	(±1,4)	5,4	(± 0,1) *	3,2	(± 1,5) *
16:1ω5c	27,7	(±4,7)	24,7	(± 2,0)	40,8	(± 9,0) *
16:1ω5t	**22,5**	**(±3,0)**	**50,3**	**(± 6,5)** *	8,7	(± 1,8) *
16:0	200,0	(±27,1)	151,3	(± 14,7) *	162,4	(± 33,0)
i17:1	12,5	(±2,2)	10,6	(± 0,8)	8,2	(± 2,3)
10Me16:0	33,6	(±2,1)	22,7	(± 2,3) *	18,9	(± 1,4) *
unbekannt	7,0	(±1,2)	6,5	(± 1,0)	7,2	(± 2,6)
i17:0	11,8	(±1,6)	9,9	(± 1,5)	15,5	(± 4,3)
a17:0	19,8	(±4,0)	13,6	(± 0,6) *	13,0	(± 1,5) *
17:1ω8	23,2	(±3,4)	14,3	(± 1,4) *	5,1	(± 0,6) *
17:1ω6	5,9	(±1,2)	3,4	(± 0,1) *	2,1	(± 0,2) *
cy17:0	14,6	(±1,8)	20,2	(± 3,6)	24,3	(± 9,4)
17:0	12,3	(±1,9)	9,4	(± 0,6) *	7,0	(± 1,4) *
10Me17:0	23,0	(±1,7)	27,8	(± 3,3)	17,1	(± 4,0) *
18:2	43,7	(±10,7)	18,2	(± 4,2) *	24,0	(± 4,6) *
18:1ω9c	126,7	(±21,2)	66,2	(± 6,6) *	35,8	(± 7,4) *
18:1ω9t	1,4	(±1,0)	1,9	(± 0,5)	1,5	(± 0,1)
<u>18:1ω8c</u>	**1,0**	**(±0,2)**	0,5	(± 0,2) *	**4,3**	**(± 1,7)** *
18:1ω7c	**95,4**	**(±12,0)**	86,2	(± 15,9)	**188,8**	**(± 16,3)** *
18:1ω7t	2,6	(±0,5)	1,1	(± 0,3) *	1,3	(± 0,7) *
18:1ω5c	2,3	(±0,5)	1,2	(± 0,2) *	2,9	(± 1,6)
18:0	25,5	(±5,1)	17,2	(± 1,0) *	29,4	(± 7,1)
10Me18:0	64,2	(±4,9)	67,5	(± 3,2)	19,6	(± 5,0) *
br19:0	5,5	(±1,2)	4,4	(± 0,3) *	2,8	(± 0,3) *
cy19:0	11,2	(±1,6)	8,2	(± 0,5) *	12,0	(± 3,1)
20:0	6,7	(±1,2)	4,1	(± 0,9) *	6,0	(± 2,6)

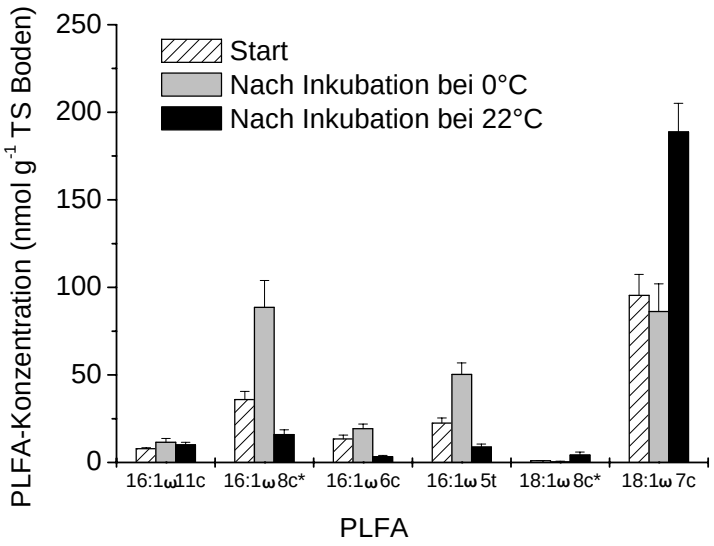

Abbildung 40: Konzentrationen von PLFA, die während der Inkubation bei 0°C oder 22°C signifikant zugenommen haben (Mittelwerte mit Standardabweichungen, n=3); mit * gekennzeichnete PLFA sind spezifische MOB-Biomarker.

5.10.2 $^{13}CH_4$-Markierungen von PLFA nach Langzeitinkubation

Vor und nach den Langzeit-Inkubationen wurden die Proben mit ^{13}C-Methan markiert und die Markierungsmuster der PLFA miteinander verglichen.

Es konnten hier die ^{13}C-Gehalte von insgesamt 25 PLFA bzw. PLFA-Gruppen quantifiziert werden. Viele der 46 mit dem GC-MS quantifizierten PLFA (s.o.) waren zu gering konzentriert, um sichere δ^{13}C-Werte im GC-*C*-IRMS zu bestimmen. Andere konnten im GC-*C*-IRMS chromatographisch nicht getrennt werden, so dass in Abb. 40 zum Teil Werte für Mischpeaks angegeben sind. Letzteres gilt auch für die MOB-Biomarker 16:1ω8c und 18:1ω8c.

Die absolute Menge des eingebauten ^{13}C unterschied sich deutlich zwischen den einzelnen Markierungsansätzen. In der Ausgangsprobe wurden insgesamt 15,3 ± 0,8 nmol g^{-1} TS ^{13}C in die PLFA eingebaut; die Differenzen der δ^{13}C-Werte vor und nach der Markierung lagen hier bei bis zu 286 ‰. Während der Markierungen nach der Langzeitinkubation wurde weniger ^{13}C-Methan umgesetzt und weniger ^{13}C in die PLFA eingebaut (0°C: 3,5 ± 0,4 nmol g^{-1} TS; 22°C: 0,7 ± 0,3 nmol g^{-1} TS). Die maximalen Differenzen der δ^{13}C-Werte vor und nach der

Markierung betrugen bei den 0°C-Proben 43 ‰ und bei den 22°C-Proben 9 ‰. Da in den 0°C und 22°C-Ansätzen in etwa gleich viel Methan umgesetzt wurde, deutet der geringe ^{13}C-Einbau bei 22°C auf einen geringeren Wachstumsertrag (= oxidierte Menge C-Substrat / Menge produzierte Zellmasse) der hier aktiven MOB hin.

In Abb. 40 ist dargestellt, wie viel des gesamten ^{13}C, das in PLFA eingebaut wurde, anteilig in welcher PLFA zu finden war. Nach der Langzeit-Inkubation bei 0°C wurde das meiste ^{13}C in 16:1-PLFA (82,9 %) angereichert; dies entspricht in etwa dem Anteil in der Ausgangsprobe (85,1 %). Die Markierung von 18:1 PLFA (2,3 %) war etwas niedriger als in der Ausgangsprobe (5,2 %). Nach der Inkubation bei 22°C wurden dagegen die 18:1 mit 36,0 % ungefähr ebenso stark mit ^{13}C angereichert wie die 16:1 mit 33,0 %.

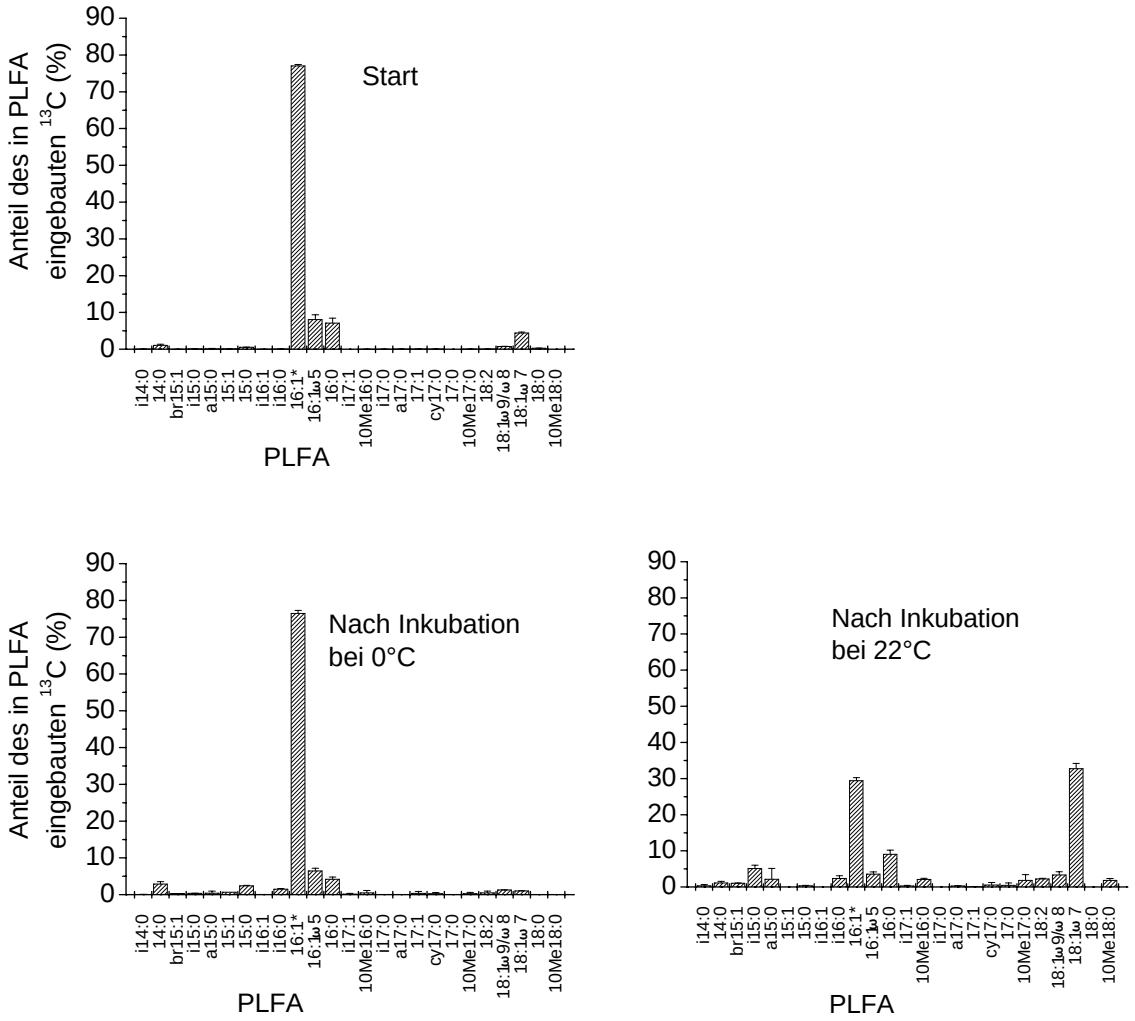

Abbildung 41: ^{13}C-PLFA Markierungsmuster in der Ausgangsprobe (Start) sowie nach Inkubation bei 0°C und 22°C. 16:1* = 16:1ω11,9,8,7,6.

6 Diskussion

6.1 Bedeutung methanoxidierender Bakterien in der Auftauschicht von Tundrenböden

Um die Bedeutung von methanoxidierenden Bakterien (MOB) in nassen arktischen Böden zu ermitteln, wurden zwei verbreitete Landschaftstypen der nordsibirischen Tiefland-Tundra untersucht. Zum einen handelte es sich um eine Küstenebene, die von einem dichten Netz aus weiten Thermoerosionstälern durchzogen war. In einem dieser Täler wurden repräsentative Böden an den drei Reliefpositionen Talsohle, Unterhang, Mittelhang untersucht (Standort Mamontovy Klyk). Zum anderen wurde eine Eiskeil-Polygonlandschaft mit vernässten Polygoncentern und leicht erhöhten und deshalb trockenen Polygonrändern untersucht (Standort Lena Delta / Insel Samoylov). An diesem Vergleichsstandort in der polygonalen Tundra konzentrierten sich die Untersuchungen auf Böden im Polygoncenter.

Die ausgewählten Böden unterschieden sich insbesondere im Wasserstand und im Gehalt an organischer Substanz sowie in der Vegetationszusammensetzung. Die Böden in der Talsohle am Mamontovy Klyk und im Polygoncenter im Lena Delta / Samoylov waren vollständig wassergesättigt und von ähnlichen Pflanzengesellschaften bedeckt. Die Methanemissionen waren hier ebenfalls ähnlich hoch. Die Böden am Unter- und Mittelhang des Thermoerosionstals am Mamontovy Klyk waren trockener, die Gehalte an organischer Substanz niedriger und die Pflanzengesellschaften waren anders zusammengesetzt.

Die MOB-Populationsgrößen wurden mittels PLFA-Biomarker-Konzentrationen (Macalady et al. 2002, Costello et al. 2002, Börjesson et al. 2004, Sundh et al. 2005) in Kombination mit potentiellen Methanoxidationsaktivitäten (Sundh et al. 1995, Costello et al. 2002) untersucht. Als Indikator für die Größe der gesamten mikrobiellen Biomasse (ohne Archaeen) diente die gesamte Konzentration von PLFA-Molekülen in den einzelnen Proben.

6.1.1 Größe der gesamten Bakterienpopulationen und der Anteil der MOB im Vergleich zu Böden wärmerer Klimate

PLFA-Gesamtkonzentrationen

Die PLFA-Gesamtgehalte in den Oberböden der untersuchten nassen vertorften Tundrenböden (Standorte Talsohle und Polygoncenter) waren ähnlich hoch bzw. sogar höher als in Torfen aus wärmeren Klimaten. Gattinger (2001) analysierte die PLFA-Konzentrationen in Niedermooren Süddeutschlands und fand volumenbezogene Gesamtgehalte zwischen 110 und 210 nmol cm^{-3} Boden. Wenn die PLFA-Gesamtkonzentrationen in der vorliegenden Arbeit mit den durchschnittlichen Bodendichten in Beziehung gesetzt werden, liegen die Werte in den oberen Zentimetern der Talsohle bei 130-200 nmol cm^{-3} und im Polygoncenter bei 80-230 nmol cm^{-3} – und damit im Bereich der süddeutschen Moore. Krumholz et al. (1995) sowie Ranneklev & Baath (2003) haben PLFA-Gehalte von bis zu 520 bzw. 620 nmol g^{-1} TS in Torfproben bestimmt. Diese auf die Trockensubstanz der Böden bezogenen Werte sind nicht eindeutig vergleichbar mit den eigenen Daten, da die Autoren keine C-Gehalte bzw. Bodendichten bestimmt haben. Die auf Trockensubstanz bezogenen Werte in den selbst untersuchten torfreichen Tundrenböden sind jedoch höher als in den genannten Vergleichsböden. Sie lagen im Oberboden des Polygoncenters bei 650-1750 und in der Talsohle bei 1650-2500 nmol g^{-1} TS, wobei die C-Gehalte in der Talsohle höher als im Polygoncenter waren.

Die Gesamtgröße der mikrobiellen Biomasse in den kalten nassen Tundrenböden, die ca. 9 Monate im Jahr gefroren sind, ist demnach ähnlich groß wie in vergleichbar nassen Böden wärmerer Klimate.

MOB-Biomarker

In den untersuchten Tundrenproben mit höchster Methanoxidationsaktivität (Talsohle und Polygoncenter) lagen die Anteile der MOB-Biomarker an der gesamten PLFA-Biomasse bei 1 bis 4,5 %. Diese waren vergleichbar mit methanreichen Böden wärmerer Klimate. Bei eigenen Arbeiten in der norddeutschen Elbmarsch konnten Biomarker-Gehalte von 2,5 % gefunden werden. In Reisböden in den USA und auf den Philippinen machten die MOB-Biomarker 2 % bzw. 2,2-3,9 % der PLFA-Biomasse aus (Reichardt et al. 1997, Macalady et al. 2002).

Demnach haben Methanoxidanten in nassen Böden der Arktis und wärmerer Klimate eine ähnlich große Bedeutung.

In den bislang bekannten MOB stellen die spezifischen Biomarker 14 - 41% (Typ I) bzw. 19 - 68% (Typ II) der gesamten PLFA-Menge in den Zellen dar (Sundh et al. 1995, Wise et al. 2001). Ausnahmen bilden diejenigen MOB-Gattungen, die diese Moleküle nicht enthalten (s. Kap. 2.4.2). Auf Basis der genannten Werte kann angenommen werden, dass in den untersuchten Böden der Anteil der MOB-PLFA an der gesamten PLFA-Menge 2- bis 7-mal höher war als der reine Anteil der spezifischen Biomarker. Für den Boden in der Talsohle am Mamontovy Klyk würde dies beispielsweise bedeuten, dass hier mindestens 9 % der gesamten PLFA-Biomasse im Oberboden von methanoxidierenden Bakterien stammten.

6.1.2 Tiefenverteilung der MOB in den verschiedenartigen Tundrenböden

Die höchsten Konzentrationen von MOB-Biomarkern und die höchsten potentiellen Methanoxidationsaktivitäten wurden in allen Profilen nahe dem Wasserspiegel gefunden. In dieser Zone nahmen auch die Methankonzentrationen im Bodenwasser von unten nach oben deutlich ab. Ein Methanoxidationsmaximum nahe dem Wasserspiegel ist typisch für nasse Böden und wurde in zahlreichen weiteren Studien gefunden (Sundh et al. 1994, 1995, Whalen & Reeburgh 2000, verschiedene Autoren zitiert in Whalen 2005). Der Wasserspiegel stellt eine aerob-anaerobe Grenzschicht dar. Hier stehen meist ausreichende Mengen des Substrates Methan aus den wassergesättigten anaeroben Bodenbereichen und gleichzeitig genügend Sauerstoff aus den durchlüfteten Bodenbereichen zur Verfügung. Oberhalb des Wasserspiegels kann das Substrat Methan limitierend werden, unterhalb des Wasserspiegels der Sauerstoff.

In Bodenbereichen, die mehr als 20 cm unter dem Wasserspiegel lagen, war in keinem der untersuchten Standorte potentielle Methanoxidationsaktivität messbar. In den Profilen der Talsohle und des Polygoncenters wurden jedoch deutliche Methanoxidationsaktivitäten bis ca. 15-20 cm unter dem aktuellen Wasserspiegel gemessen. Aus anderen Studien ist bekannt, dass in Torfböden wenige Millimeter bis ca. 2 cm unter dem Wasserspiegel kein Sauerstoff mehr nachweisbar ist (Benstead & Lloyd 1994, King 1996). Fiedler et al. (2004) zeigten zudem für einen Boden im nassen Polygoncenter des Lena Delta / Samoylov, dass hier in

5 cm Tiefe Redoxpotentiale zwischen -50 und -150 mV herrschten. Bei diesen Werten ist kein Sauerstoff mehr nachweisbar (Scheffer & Schachtschabel 1998).

Es besteht die Möglichkeit, dass die Methanoxidationsaktivitäten bis ca. 15-20 cm unter dem Wasserspiegel auf zeitweilig niedrigere Wasserstände in den Profilen zurückgehen. In verschiedenen Arbeiten ist beobachtet worden, dass Methanoxidanten anaerobe Bedingungen gut ohne Methanumsatz überdauern können und danach ohne oder mit nur geringer zeitlicher Verzögerung wieder aktiv sind (King 1990, Roslev & King 1994, Whalen & Reeburgh 2000). Für die Böden im Thermoerosionstal ist der Schwankungsbereich des Wasserstandes vor der Probennahme nicht bekannt. Im untersuchten Polygoncenter ist der Wasserspiegel während des Beprobungszeitraums von Juli 2003 bis Juli 2004 nicht unter die Geländeoberfläche gesunken. Demnach hätten zum Beispiel die – im Laborversuch sofort aktiven – Methanoxidanten in 10-15 cm Tiefe des Profils vom Juli 2004 mindestens seit Juli 2003 *in situ* ohne aktiven Methanumsatz gelebt.

Eine weitere Möglichkeit ist, dass die Methanoxidanten im makroskopisch anaeroben Boden über die Pflanzenwurzeln Sauerstoff erhalten haben. Die in der Talsohle und im Polygoncenter dominierende *Carex aquatilis* besitzt ein ausgedehntes Aerenchymgewebe in Blättern, Wurzeln und Rhizomen (Kutzbach et al. 2004). Über dieses Gewebe versorgt sie ihre Wurzel- und Rhizomzellen mit Sauerstoff aus der bodennahen Luft. Dabei kann überschüssiger Sauerstoff in die Rhizosphäre des Bodens diffundieren. Methanoxidation in der wassergesättigten Rhizosphäre von *Carex aquatilis* wurde bereits von Popp et al. (1999, 2000) für boreale Moore nachgewiesen. In diesen und weiteren *in situ* Studien zur wurzelassoziierten Methanoxidation an unterschiedlichen Pflanzenarten wurde gezeigt, dass die Methanoxidationsraten zeitlich stark schwanken und zeitweilig gegen Null gehen (Lombardi et al. 1997, van der Nat & Middelburg 1998, Popp et al. 1999, 2000, Krüger et al 2001). Dies wird häufig auf wechselnde Sauerstoffverfügbarkeiten in der Rhizosphäre zurückgeführt. Das heißt, auch in der Rhizosphäre müssen die MOB zeitweilig anaerobe Bedingungen überdauern.

Die Methanoxidanten im untersuchten Polygoncenter-Boden waren gut an niedrige Sauerstoffkonzentrationen angepasst. Ihre potentiellen Aktivitätsraten sanken erst bei Sauerstoffkonzentrationen unter 0,5 % im Kopfgasraum der Inkubationsgefäße. Die MOB-Gemeinschaft in 10-15 cm Tiefe unter dem Wasserspiegel wies bei 0,5 % Sauerstoff sogar

höhere Methanoxidationsraten als bei atmosphärischen Sauerstoffgehalten (ca. 21 %) auf. Gute Anpassung an niedrige Sauerstoffkonzentrationen scheint bei MOB, die aufgrund ihres Substrats Methan meist in sauerstoffarmen Habitaten leben, weit verbreitet zu sein. Ähnliche Anpassungen wurden auch von Henckel et al. (2000) sowie Bender & Conrad (1994) für MOB-Gemeinschaften in Nassreisböden gefunden. Ren et al. (1997) untersuchten die Aktivität verschiedener MOB-Reinkulturen (Typ I und Typ II) und beobachteten ebenfalls, dass die Methanoxidationsaktivitäten erst bei Sauerstoff-Konzentrationen unter ca. 0,5 % v/v abnahmen. In sauerstoffreicheren Habitaten scheint es aber auch MOB zu geben, deren Aktivität schon bei höheren Sauerstoffkonzentrationen limitiert ist. So beobachteten Gebert et al. (2003) in einen Methan-Deponiebiofilter, dass die Methanoxidationsaktivität bereits bei Konzentrationen unter ca. 6 % O_2 v/v limitiert war.

Im Profil am Unterhang konnte nur in der obersten, stark torfhaltigen Lage (0-8 cm) Methanoxidationsaktivität gemessen werden. Der Wasserspiegel lag hier zur Zeit der Probennahme ca. 2 cm unter der Geländeoberfläche und damit etwas niedriger als in der Talsohle. In 8 cm Tiefe begann der Mineralboden, der im oberen Bereich noch stark durchwurzelt war. Möglicherweise ist der Grund für die fehlende Methanoxidation unterhalb des Wasserspiegels, dass die vorherrschenden Pflanzen am Unterhang keine wurzelassoziierte Methanoxidation unterstützen. *Carex aquatilis* spielte hier nur noch eine untergeordnete Rolle, stattdessen dominierten *Eriophorum angustifolium* und *Arctagrostis latifolia*. Für *Eriophorum*-Pflanzen ist bekannt, dass sie ebenfalls über Aerenchymgewebe in den Wurzeln Sauerstoff in den Boden abgegeben können (Gaynard & Armstrong 1987, zitiert in Frenzel & Rudolph 1998). Frenzel & Rudolph (1998) konnten in einem borealen Moor jedoch keine Methanoxidationsaktivität an den Wurzeln von *Eriophorum angustifolium* finden. Sie diskutieren, dass die Wurzeln dieser Pflanze möglicherweise Substanzen abgeben, die die Methanoxidanten hemmen.

Insgesamt ist wurzelassoziierte Methanoxidation zwar an einer Vielzahl von Feuchtgebietspflanzen nachgewiesen worden (Epp & Chanton 1993, Gerard & Chanton 1993, King 1994, 1996, Bosse & Frenzel 1997, Calhoun & King 1997, Lombardi et al. 1997, van der Nat & Middelburg 1998, Gilbert & Frenzel 1998, Eller et al. 2001, Krüger et al. 2001), aber *Eriophorum angustifolium* stellt nicht die einzige bekannte Ausnahme dar. So beobachteten King et al. (1990) an dem Sauergras *Cladium jamaicense* zwar in Torfböden wurzelassoziierte Methanoxidation, in Mineralböden dagegen nicht. Durch Isotopen-

Messungen des Methans an diesen Standorten konnten in beiden Bodentypen keine Hinweise auf Methanoxidation in der Rhizosphäre gefunden werden (Happell et al. 1993).

Im Polygoncenter, in der Talsohle und im Unterhang waren in den tieferen Bodenlagen, in denen keine Methanoxidationsaktivität mehr messbar war, noch unterschiedlich große Mengen von MOB-Biomarkern vorhanden. In diesen Proben konnten Methanoxidanten nach Langzeitinkubationen mit ausreichender Sauerstoff- und Methanversorgung leicht reaktiviert werden. Dies spricht dafür, dass hier die Methanoxidanten aufgrund von Sauerstoffmangel in einem tieferen Ruhestadium überdauerten. Von einigen Vertretern der dominierenden Typ I MOB ist zum Beispiel bekannt, dass sie Zysten bilden können, die kein Methan umsetzen, aber unter günstigen Bedingungen keimen und wieder Methan oxidieren können (Bowman 2000).

6.1.3 Ursachen für unterschiedliche MOB-Populationsgrößen in verschiedenartigen Tundrenböden

Innerhalb des Thermoerosionstals am Mamontovy Klyk waren sowohl die potentiellen Methanoxidationsaktivitäten als auch die Konzentrationen der MOB-Biomarker in der Talsohle wesentlich höher als im Unter- und Mittelhang. Auch im Vergleich zum morphologisch und hydrologisch ähnlichen Boden im Polygoncenter / Samoylov waren die potentiellen Aktivitäten und Biomarker-Konzentrationen in der Talsohle am höchsten. Dies lässt darauf schließen, dass an diesem Standort auch *in situ* am meisten Methan oxidiert wird.

In den untersuchten Böden stieg die Bedeutung der Methanoxidation mit der Bedeutung der Methanbildung – d.h. mit der Verfügbarkeit des Substrates Methan. Niedrigere Methanoxidationsraten im Unterhang wurden eventuell zusätzlich, wie oben diskutiert, durch geringere wurzelassoziierte Methanoxidation verursacht.

Die Methanbildung wurde zwar nur im Polygoncenter explizit quantifiziert (Wagner et al. 2003, 2005, Kobabe et al. 2004), aber Unterschiede im Vernässungsgrad und in den Methanemissionswerten deuteten auf Unterschiede im Methanbildungspotential hin. In den beiden nassesten Standorten mit der größten Methanemission – in der Talsohle und im Polygoncenter – waren die MOB-Populationen trotz stark eingeschränkter oxischer Bodenbereiche am größten. Aufgrund der stärkeren Vernässung und damit geringeren Sauerstoffgehalte waren die Bedingungen für die Methanbildung hier günstiger als in den

trockeneren Profilen am Unter- und Mittelhang. Wagner et al. (2003, 2005) untersuchten ebenfalls einen nassen Boden im Polygoncenter auf der Insel Samoylov und verglichen diesen mit einem trockeneren Boden im nahe gelegenen Polygonrand. Im nassen Polygoncenter waren die Methanbildungsraten sowie die Biomarker-Konzentrationen für methanbildende *Archaeen* größer als im trockeneren Polygonrand. Dies ging einher mit ebenfalls höheren Raten der Methanoxidation und höheren Konzentrationen von MOB-Biomarkern im nassen Polygoncenter als im trockenen Polygonrand. Auch Whalen & Reeburgh (2000) beobachteten höhere Methanoxidationsraten in Böden mit höherem Wasserstand.

Die wesentlich größere Bedeutung der Methanoxidation in der Talsohle als im Polygoncenter lässt sich dagegen nicht auf unterschiedliche Wasserstände zurückführen, da beide Profile ähnlich nass waren. Ein Hinweis auf höhere Methanbildungsraten in der Talsohle ergibt sich aus Untersuchungen von Ganzert (2005), der die Methanbildung in einem nassen Boden nahe des Standortes Talsohle am Mamontovy Klyk untersucht hat. In diesem Boden waren die Methanbildungsraten um das 10- bis 20-fache höher als im Polygoncenter / Samoylov. In der Talsohle war darüber hinaus das C/N Verhältnis deutlich enger als im Polygoncenter, was auf bessere Zersetzbarkeit der organischen Substanz schließen lässt. Dies deutet darauf hin, dass in der Talsohle schneller Substrate für die Methanbildung nachgeliefert werden und dadurch größere Methanbildungsraten als im Polygoncenter erreicht werden können. Die Tatsache, dass die Methanemissionen an beiden Standorten ähnlich hoch waren, spricht ebenfalls dafür, dass in der Talsohle nicht nur die Methanoxidation, sondern auch die Methanbildung deutlich höher war als im Polygoncenter.

Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang auch, dass die MOB in der Talsohle offenbar in ihrer Aktivität besser an niedrige *in situ* Temperaturen angepasst waren als die MOB im Polygoncenter. In der Talsohle wurden bei 0°C ca. 30 % der Optimalaktivität erreicht, im Polygoncenter weniger als 10 %. Auch lag das Temperaturoptimum in der Talsohle mit 22°C etwas niedriger als im Polygoncenter mit 28°C. Möglicherweise waren die MOB in der Talsohle durch die bessere Kälteanpassung besonders konkurrenzstark und konnten so eine größere Population bilden als im Polygoncenter.

Auch wenn in trockeneren Böden geringere absolute Mengen Methan oxidiert werden und die MOB-Populationen kleiner sind, kann der Anteil des oxidierten im Verhältnis zum gebildeten Methan größer sein als in nasseren Böden. In den mächtigeren aeroben Zonen von Böden mit

tieferem Wasserstand werden zum Teil bis zu 100 % des gebildeten Methans oxidiert (Frenzel & Karofeld 2000).

6.1.4 Dynamik der MOB-Populationsgrößen

Die kleinräumigen Unterschiede in der Konzentration der MOB-Biomarker lagen in der gleichen Größenordnung wie die saisonalen Unterschiede innerhalb eines Profils. Demnach sind zeitliche Dynamiken nur bei sehr großen Unterschieden bzw. bei der Einbeziehung von sehr vielen Parallelprofilen auflösbar. Aus den stichprobenartig durchgeführten Analysen im Polygoncenter zu unterschiedlichen Zeitpunkten ließen sich dennoch Schlüsse ziehen. An den einzelnen Probennahme-Terminen zwischen Juli 2003 und Juli 2004 lagen die Konzentrationen der MOB-Biomarker zwischen 36 und 51 nmol g^{-1} C_{org}. Ob die gefundenen Konzentrations-Unterschiede der MOB-Biomarker auf kleinräumige Variabilitäten oder auf zeitliche Dynamiken zurückzuführen sind, ist nicht zu klären. Aber es kann festgestellt werden, dass keine größeren saisonalen Einschnitte in der Populationsgröße erkennbar waren. Vor allem scheint die Mehrzahl der MOB den ca. 9-monatigen sibirischen Winter mit Temperaturminima von -37°C im Boden zu überleben. Im Profil vom Juni 2004, ca. 3 Wochen nach Beginn der Auftauperiode, waren die potentiellen Aktivitäten sogar höher als im Profil vom Juli desselben Jahres. Die untersuchten Böden im Polygoncenter waren während des gesamten Untersuchungszeitraums vollständig wassergesättigt. Der Wasserstand befand sich entweder an der Geländeoberfläche oder mehrere Zentimeter darüber und konnte damit keinen Einfluss auf die Populationsdynamik in den untersuchten Profilen ausüben.

6.2 Bedeutung der MOB im Permafrost – im Vergleich zur Auftauschicht

Mit der Untersuchung von Permafrostproben sollte geprüft werden, ob sich MOB-Populationen im Permafrost erhalten haben. Zu diesem Zweck wurden die Aktivitäten und Strukturen der methanoxidierenden Gemeinschaften im Permafrost mit denen in der Auftauschicht verglichen. Dazu wurden Proben aus einem holozänen Permafrost-Kliff auf der Insel Samoylov im Lena-Delta sowie holozäne und spätpleistozäne Proben aus einem Kliff am Standort Mamontovy Klyk untersucht.

In der Mehrzahl der untersuchten holozänen Permafrostproben aus dem Lena-Delta konnte nach dem Auftauen und nach einer Vorinkubationsphase Methanoxidationsaktivität gemessen

werden. Diese Proben waren ca. 3000 Jahre lang gefroren. Auch in spätpleistozänen Proben vom Standort Mamontovy Klyk, die bis zu 25000 Jahre lang gefroren waren, konnten in einigen Fällen Methanoxidationaktivitäten gemessen werden. In keiner der Proben waren die Methanoxidierer allerdings sofort bei Beginn der Inkubation aktiv – im Gegensatz zu den MOB in der Auftauschicht nahe dem Wasserspiegel.

Die verzögerte Aktivität lässt darauf schließen, dass sich die MOB *in situ* in einem Ruhestadium ohne Methanumsatz befanden. Allerdings ist es wahrscheinlich, dass sie einen eingeschränkten Reparatur- oder Erhaltungsstoffwechsel aufrechterhalten haben. Vollkommene Stoffwechselinaktivität vermindert die Überlebensdauer von Bakterien im Permafrost, auch von Sporen und Cysten, da so z.B. DNA-Schäden durch die Hintergrund-γ-Strahlung aus den Gesteinsmineralen nicht repariert werden (Ponder et al. 2005).

Im Permafrost herrschen Temperaturen von ca. minus 10°C. Bei diesen Temperaturen wurde in Laborversuchen Aktivität verschiedener Bakterienarten (Carpenter et al. 2000, Rivkina et al. 2000) und sogar vereinzelt sehr langsames Wachstum beobachtet (Bakermans et al. 2003, Breezee et al. 2003). Für Methanoxidanten wurde bislang lediglich der Methanabbau bei minus 5°C berichtet (Khmelenina et al. 2002). Der Stoffwechsel von Bakterien im Permafrost ist zusätzlich durch die extreme Trockenheit des gefrorenen Habitats eingeschränkt. Bei minus 10°C existieren zwar noch ca. 5 nm dünne Filme flüssigen Wassers, die die Bodenpartikel und die Mikroorganismen umgeben (Ostroumov & Siegert 1996, Rivkina et al. 2000). Die Diffusion von Nährstoffen und Substraten zu den Zellen ist bei diesen Querschnitten allerdings so stark verlangsamt, dass nur mit einer geringen Aktivität, aber nicht mit Wachstum zu rechnen ist (Rivkina et al. 2000).
Für aerobe Organismen wie für die Methanoxidanten kommt hinzu, dass der sibirische Permafrost ein weitgehend anaerobes Habitat ohne Kontakt zum Luftsauerstoff darstellt (Shi et al. 1996, Vorobyova et al. 1997). Das Substrat Methan ist dagegen in vielen Permafrostsedimenten vorhanden (Rivkina & Gilichinsky 1996). Aus Untersuchungen von Roslev & King (1994) ist bekannt, dass Methanoxidanten sehr gut anaerobe Bedingungen ohne Methanumsatz überdauern können. Die von Roslev & King (1995) untersuchten MOB waren in der Lage, ohne Sauerstoff alternative endogene und auch exogene organische Substrate wie z.B. Glukose umzusetzen. Demnach ist es möglich, dass die MOB im Permafrost in einem derartigen anaeroben Ruhezustand mit einem stark reduzierten Erhaltungsstoffwechsel überlebten. Khmelenina et al. (2002) haben Hinweise darauf

gefunden, dass MOB sogar in bis zu 3 Mio. Jahre alten Permafrostschichten überdauert haben. Auch andere Bakterienarten sind bereits in derart alten Permafrostlagen gefunden worden (Shi et al. 1997).

Eine Anreicherung und Selektion von Organismen, die speziell an die Bedingungen im Permafrost angepasst sind, findet wahrscheinlich nicht statt, da die Bakterien kaum wachsen (Shi et al. 1997). Im Permafrost lebt vermutlich vielmehr eine „Gemeinschaft der Überlebenden“ (Friedmann 1994, zitiert in Vishnivetskaya et al. 2000), bestehend aus den widerstandsfähigsten Überresten der ursprünglichen Gemeinschaft vor dem Einfrieren.

Dazu passt, dass im untersuchten Permafrost mit ca. 28-37°C ein mesophiles Temperaturoptimum der Methanoxidation zu beobachten und die Inkubationszeit bis zum Eintreten von messbarer Aktivität im Bereich von 22-37°C am kürzesten war. Da die Methanoxidanten *in situ* vermutlich weder wuchsen noch Methan umsetzten, konnten die dauerhaft niedrigen Temperaturen im Permafrost keinen Selektionsdruck in Richtung kälteangepasster Methanoxidations-Aktivität ausüben. Auch für andere Bakterienarten aus dem Permafrost wurden hauptsächlich mesophile Temperaturanpassungen gefunden (Shi et al. 1997, Vorobyova et al. 1997, Ponder et al. 2005).

MOB im Permafrost waren nach dem Auftauen ohne Zugabe von Nährmedium reaktivierbar. Daraus kann geschlossen werden, dass auch *in situ* nach dem Auftauen von Permafrostsedimenten die darin lebenden Methanoxidanten wieder Methan abbauen können. Die Inkubationszeit bis zum Eintreten messbarer Methanoxidationsaktivität verkürzte sich in den Laborversuchen jedoch, je mehr Nährstoffe zugegeben wurden. Hohe Nährstoffkonzentrationen haben in anderen Fällen auch die Aktivität und das Wachstum von ruhenden Bakterien aus dem Permafrost gehemmt. So isolierten Vishnivetskaya et al. (2000) mehr Bakterien aus Permafrostproben, wenn sie Nährmedien mit niedrigen Nährstoffkonzentrationen einsetzten. Diese Autoren vermuten, dass die plötzliche Zugabe von großen Nährstoffmengen Stress für Bakterien bedeutet, die lange Zeit im nährstoffarmen Permafrost ruhten.

In den untersuchten ca. 3000 Jahre alten Permafrostlagen waren sowohl die Konzentrationen der MOB-Biomarker als auch die PLFA-Gesamtgehalte in etwa so groß wie in den untersten Lagen der Auftauschicht im Polygoncenter. Es gibt bislang keine Untersuchungen darüber,

wie schnell die PLFA von abgestorbenen Organismen im Permafrost zerfallen. Deshalb ist es unklar, ob die PLFA-Konzentrationen die Populationsgrößen vor dem Einfrieren oder aber die momentan im Permafrost lebenden Gemeinschaften widerspiegeln. Markierungsexperimente an einer reaktivierten Permafrostprobe mit ^{13}C-angereichertem CH_4 zeigten, dass es sich bei den überlebenden Methanoxidanten hauptsächlich um Typ I Organismen handelte. Diese waren auch in der Auftauschicht hauptverantwortlich für den Abbau des Methans. Es gibt bislang kaum weitere Untersuchungen über die Zusammensetzung von MOB-Gemeinschaften im Permafrost. Khmelenina et al. (2002) fanden in sibirischen Permafrostproben häufig Typ I und Typ II Gattungen nebeneinander; allerdings haben die Autoren die Populationen mit einer nicht quantitativen PCR-basierten Methode untersucht.

6.3 Anpassung der Aktivität von MOB an niedrige *in situ* Temperaturen

Alle untersuchten MOB-Gemeinschaften in der Auftauschicht der Tundrenböden hatten ein Aktivitätsoptimum zwischen 22 und 28°C und behielten bei 0°C noch zwischen 5 und 32 % ihrer Optimalaktivität. Damit kann die Anpassung ihrer potentiellen Aktivitätsraten als psychrotolerant bezeichnet werden, d.h. die MOB-Gemeinschaften haben zwar wie mesophile Organismen ein Optimum über 20°C, sind aber auch bei 0°C noch deutlich aktiv (Brock et al. 1994).

In der vorliegenden Arbeit wurden zum ersten Mal die Temperaturoptima der Methanoxidation in arktischen Böden untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich die Lage der Optima nicht deutlich von denen an diversen Standorten der gemäßigten Klimate unterschieden (Tab. 21). Die von Dunfield et al. (1993) bearbeiteten subarktischen Standorte sind die kühlsten, in denen bislang die Temperaturoptima der Methanoxidation untersucht wurden. Auch hier lagen die Optima mit 20 bis 25°C nur geringfügig niedriger als an untersuchten gemäßigten Standorten. Es wurden zudem bei den eigenen Untersuchungen keine Unterschiede im Temperaturoptimum zwischen dem Unterboden (10-15 cm) mit *in situ* Temperaturen von maximal 10°C und dem Oberboden (0-5 cm) festgestellt, an dessen Oberfläche kurzzeitig bei starker Sonneneinstrahlung 25°C erreicht werden können.

Die Kältetoleranz war in den untersuchten arktischen Böden größer als an diversen Standorten gemäßigter und subtropischer Klimate (Tab. 21). Dort wurden MOB-Gemeinschaften gefunden, die bereits bei 3-5°C nicht mehr aktiv waren (Nesbit & Breitenbeck 1992,

Krumholz et al. 1995, Reay et al. 2001), bzw. nur 2-5 % ihrer Optimalaktivität erreichten (Cai & Yan 1999, De Visscher et al. 2001, Gebert et al. 2003). In den vorliegenden Untersuchungen an Tundrenböden lagen die Aktivitäten bei ca. 5°C zwischen 12 und 42 % des Optimums. Allerdings kann aus den Temperaturprofilen der Aktivität nicht grundsätzlich geschlussfolgert werden, dass MOB aus kalten Böden kältetoleranter sind als solche aus Böden wärmerer Klimate. Ein Beispiel sind die MOB im hier untersuchten Boden einer niedersächsischen Flussmarsch. Hier wurden mit 6 % der Optimalaktivität bei 0°C ähnliche Werte wie im Polygoncenter der untersuchten Tundra erreicht.

Die Temperaturanpassung von Mikroorganismen zeigt sich nicht nur in den Aktivitätsraten, sondern auch in Wachstumsgeschwindigkeiten. Letztere wurden bislang hauptsächlich an Reinkulturen bestimmt, da es keine zuverlässige direkte Methode zur Messung von Wachstumsraten in Umweltproben gibt. Indirekt wurden Änderungen der MOB-Biomasse in Böden bei verschiedenen Inkubationsbedingungen bereits mit der PLFA-Technik untersucht (Henckel et al. 2000). Die eigenen Langzeitinkubationen mit anschließenden PLFA-Analysen deuten auf ein Wachstumsoptimum der *in situ* dominierenden Typ-I-MOB bei Temperaturen unterhalb des bestimmten Aktivitätsoptimums hin (s. auch Kap. 6.4). Ein niedrigeres Temperaturoptimum für Wachstum als für Aktivität wurde auch bei anderen Organismen gefunden (Isaksen & Jørgensen 1996, Knoblauch & Jørgensen 1999).

Tabelle 21: Temperaturabhängigkeit der Methanoxidation in Böden verschiedener Klimate.

Standort, Klimazone	Temperatur-optimum der Methanoxidation (°C)	Aktivität bei 0°C (% des Optimums)	Aktivität bei ca. 3-5°C (% des Optimums)	Quelle
Feuchtgebiete, Arktis	22-28°C	5-32	12-42	diese Studie
Moore, Subarktis	20-25	13-38	16-48	Dunfield et al. (1993)
Moor, boreale Zone	23-28	n.b.	35	Whalen & Reeburgh (1996)
Deponieabdeckung, gemäßigte Zone	25-30	n.b.	n.b.	Boeckx & Cleemput (1996)
Boden unter Eichenwald, gemäßigte Zone	25	n.b.	0	Reay et al. (2001)
Flussmarsch, gemäßigte Zone	37	6	27	diese Studie
Deponieabdeckung, gemäßigte Zone	38	n.b.	3	Gebert et al. (2003)
Moor, gemäßigte Zone	24-30	n.b.	0	Krumholz et al. (1995)
Deponieabdeckung, gemäßigte Zone	35°C	n.b.	5	De Visscher et al. (2001)
Deponieabdeckung, Subtropen	31-36	n.b.	22	Whalen et al. (1990)
Reisboden, Subtropen	30-35	n.b.	2	Cai & Yan (1999)
Böden unter Sumpfwald, Subtropen	30	n.b.	0	Nesbit & Breitenbeck (1991)

n.b. = nicht bestimmt

In allen untersuchten Tundrenböden stieg die Methanoxidationsaktivität in dem *in situ* besonders relevanten Temperaturbereich zwischen 0 und 10°C sehr deutlich an; im Oberboden des Polygoncenters z.B. von 5 auf 17 % der Optimalaktivität, im Oberboden der Talsohle von 32 auf 52 %. Damit unterschied sich die Temperaturempfindlichkeit der Methanoxidation deutlich von der der Methanbildung: Für Oberböden im Polygoncenter konnten sowohl Kobabe (2001) als auch Knoblauch (unveröffentlichte Daten) einen sehr

geringen Anstieg der Methanbildungsaktivität zwischen 0 und 10-12°C feststellen. In diesem Bereich stieg die potentielle Methanproduktion lediglich von 6 auf 8 % der Optimalaktivität an (Knoblauch, unveröffentlichte Daten). Erst bei Temperaturen oberhalb von 10-12°C konnte ein deutlicher Anstieg der Methanbildungsaktivität beobachtet werden. Ob sich diese Befunde auf die Feldsituation übertragen lassen, müsste weiter untersucht werden.

6.4 Struktur der MOB-Gemeinschaften

Ziel der Untersuchungen zur Struktur der MOB-Gemeinschaften war, den Anteil von Typ-I- und Typ-II-MOB in verschiedenartigen Tundrenböden sowie mögliche Selektionsfaktoren für die Verteilung der beiden MOB-Gruppen zu ermitteln. Dies geschah über PLFA-Analysen in Kombination mit Markierungsexperimenten mit ^{13}C-angereichertem Methan. An einem der Tundrenböden wurde zusätzlich ein Laborversuch durchgeführt, mit dem Einfluss der Temperatur auf die Verteilung von Typ-I- und Typ-II-MOB untersucht wurde.

6.4.1 Verhältnis zwischen Typ-I- und Typ-II-MOB *in situ* – im Vergleich zu Böden wärmerer Klimate

Die untersuchten Böden der sibirischen Tundra unterschieden sich untereinander deutlich im Wasserstand, Organikgehalt und anderen Bodeneigenschaften. Dies resultierte in sehr unterschiedlichen Populationsgrößen der MOB (siehe oben). Es konnte jedoch für alle untersuchten Böden gezeigt werden, dass Typ I deutlich über Typ II MOB dominierten und hauptsächlich für den Methanumsatz verantwortlich waren. Dies zeigte sich zum einen in wesentlich höheren Konzentrationen des Typ-I-spezifischen PLFA-Biomarkers (16:1ω8c) als des Typ-II-Biomarkers (16:1ω8c). Zum anderen waren nach Markierung mit ^{13}C-angereichertem Methan hauptsächlich PLFA markiert, die in Typ-I-MOB vorkommen (16:1 PLFA). Diese 16:1 Fettsäuren waren zudem vor der Markierung stärker mit ^{13}C abgereichert als die übrigen Fettsäuren in den Proben. Das in Feuchtgebieten vorkommende biogene Methan hat im Vergleich zu anderen organischen Kohlenstoffverbindungen generell einen sehr geringen ^{13}C-Gehalt mit $\delta^{13}C$-Werten von ca. -50 bis -65 ‰ (Martens et al. 1986, Whiticar et al. 1986). Dies spiegelt sich in niedrigen $\delta^{13}C$-Werten der Zellbestandteile von methanoxidierenden Organismen wider, die aus dem Kohlenstoff dieses Methans ihre Zellsubstanz aufbauen (Nold et al. 1999). Daher deuten die niedrigen $\delta^{13}C$-Werte von 16:1

PLFA in den Tundrenböden auf die starke Bedeutung von Typ-I-MOB an diesen Standorten hin.

Auch Liebner & Wagner (2006) fanden mit der FISH-Methode in Böden der Insel Samoylov im Lena Delta, dass Typ-I- über Typ-II-Methanoxidanten dominierten. Vecherskaya et al. (1993) haben ebenfalls die MOB-Gemeinschaften in sibirischen Tundrenböden untersucht und fanden dagegen beide MOB-Typen nebeneinander mit ähnlichen Häufigkeiten. Diese Autoren waren eine der ersten, die natürliche MOB-Gemeinschaften mit molekularen Techniken untersuchten. Sie arbeiteten mit einer Immunofloureszenz-Methode, die den Nachteil hat, dass hauptsächlich bereits kultivierte Stämme detektiert werden. Daher ist dieser methodische Ansatz nur bedingt geeignet, um die Dominanz einzelner Bakteriengruppen nachzuweisen.

Weitere Studien über die mengenmäßige Bedeutung der beiden MOB-Typen in methanreichen Böden beschränken sich bislang auf wärmere, d.h. boreale, gemäßigte und subtropische Klimate. In zahlreichen untersuchten Böden natürlicher Feuchtgebiete, Reisböden sowie Böden auf Deponieabdeckungen wurden MOB-Gemeinschaften mit jeweils ähnlichen Anteilen von Typ I und II MOB gefunden (eigene Arbeiten in niedersächsischer Elbmarsch, Sundh et al. 1995, Börjesson et al. 1998, Henckel et al. 2000, Macalady et al. 2002, Crossman et al. 2004, Knief et al. 2006). Es werden zum Teil auch wechselnde Häufigkeiten mit der Bodentiefe (Crossman et al. 2004) sowie die Dominanz von Typ II beschrieben (Eller & Frenzel 2001; Dedysh et al. 2001, 2003, Gebert et al. 2004). Eine Ausnahme bildet die Arbeit von Bodrossy et al. (2006) an einem Boden aus Kompostsubstrat auf einer Deponieabdeckung in Österreich. Hier dominierten - wie in den selbst untersuchten Tundrenböden - Typ I deutlich über Typ II MOB.

Weit verbreitet ist hingegen eine Dominanz der Typ-I-MOB in der Wassersäule und im Sediment von Süßwasserhabitaten in verschiedenen Klimaten (Ross et al. 1997, Nold et al. 1999, Costello et al. 2002, Miller et al. 2004, Carini et al. 2005, Eller et al. 2005, Sundh et al. 2005). Sundh et al. (2005) diskutieren für Seen in Mittelschweden, dass in diesen Habitaten die niedrigen *in situ* Temperaturen eine Rolle bei der Selektion von Typ-I-MOB spielen können. In den von Sundh et al. (2005) untersuchten Wassertiefen mit hoher MOB-Aktivität und großer Typ-I-Biomasse lagen die Temperaturen zum Beispiel meist unter 7°C. Untersuchungen von Dumestre et al. (2001) sprechen ebenfalls für die Temperatur als ein

Selektionsfaktor auf Typ-I- bzw. Typ-II-MOB. In dem von diesen Autoren untersuchten tropischen Fluss dominierten – im Gegensatz zu den oben zitierten Arbeiten an weiteren Süsswasserhabitaten – Typ-II- deutlich über Typ-I-MOB.

Die Ergebnisse des eigenen Langzeit-Temperaturversuchs an dem untersuchten Boden in der Talsohle / Mamontovy Klyk deuten darauf hin, dass bei hohen Temperaturen (22°C) Typ II und bei niedrigen Temperaturen (0°C) Typ I MOB gewachsen sind. Dies lässt darauf schließen, dass auch *in situ* die niedrigen Temperaturen in den untersuchten Böden für die Selektion von Typ I MOB verantwortlich waren.

Auch Börjesson et al. (2004) beobachteten, dass niedrige Temperaturen auf Typ I Organismen selektieren. Diese Autoren zeigten mit einem Laborversuch, dass in einem Boden aus Südschweden bei Inkubationstemperaturen von 5-10°C bevorzugt Typ-I-PLFA zunahmen, bei 20°C hingegen bevorzugt Typ-II-PLFA. In den Ausgangsproben waren hier PLFA-Marker für beide Gruppen in etwa gleich stark vertreten. Zudem gehören die bislang isolierten MOB mit psychrophilem Wachstum der Typ I Gruppe an (Omelchenko et al. 1993, Bowman et al. 1997, Kalyuzhnaya et al. 1999).

Für die Typ I Dominanz in den untersuchten Tundrenböden können verschiedene andere Selektionsfaktoren als die Temperatur ausgeschlossen werden. Die Methan- und Sauerstoffverfügbarkeit variierte zwischen den verschiedenen Proben deutlich und scheint demnach hier nicht für die durchgehende Dominanz von Typ I bedeutsam zu sein. In mehreren Laborversuchen anderer Arbeiten selektierten hohe Methankonzentrationen eher für Typ II und niedrige Konzentrationen eher für Typ I MOB (Graham et al. 1993, Amaral & Knowles 1995, Henckel et al. 2000). Für sehr niedrige pH-Werte ist ebenfalls bekannt, dass sie die Struktur von MOB-Gemeinschaften beeinflussen können. So wurden in extrem sauren Böden hauptsächlich säureangepasste Typ-II-MOB gefunden (Dedysh et al. 2000, 2002, 2004, Dunfield et al. 2003). In den selbst untersuchten Böden lag der pH-Wert lediglich im leicht sauren Bereich - zwischen 5,0 und 6,5 (in $CaCl_2$) - und unterschied sich damit nicht von Böden, in denen beide MOB-Typen nebeneinander bedeutsam sind. Faktoren, die eher auf Typ-II-MOB selektieren, sind außerdem Kupfer- und Stickstoffmangel (s. Kap. 2.3). Da in den untersuchten Böden Typ I dominierten, konnten diese Faktoren ebenfalls nicht die Ursache sein.

Die Temperaturabhängigkeit der Methanoxidation in der Talsohle unterschied sich von den Böden in der Polygonlandschaft des Lena-Deltas (siehe oben). Dies beruht wahrscheinlich auf Unterschieden in der Populationszusammensetzung auf Gattungs- oder Artebene innerhalb der Familie der Typ-I-MOB. Die Dominanz von Typ I konnte mit der hier angewendeten ^{13}C-PLFA-Analyse gut aufgezeigt werden. Für weitere Populationsanalysen auf Gattungs- oder Artebene sind Untersuchungen mit Nukleinsäure-basierten Techniken notwendig.

6.4.2 Einfluss der Temperatur auf das Typ-I-/Typ-II-Verhältnis im Laborversuch

Um den Einfluss der Temperatur auf die Populationsstruktur der MOB zu untersuchen, wurde eine Probe aus dem Oberboden der Talsohle für 11 Wochen bei 0°C bzw. bei 22°C inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Proben bei 0°C bzw. 22°C mit $^{13}CH_4$ markiert und anschließend die Konzentrationen der PLFA sowie deren ^{13}C-Gehalte bestimmt. Zu Beginn des Versuches wurde eine Teilprobe ebenfalls mit ^{13}C-Methan markiert.

Das ^{13}C-PLFA Markierungsmuster hatte sich nach der Inkubation bei 0°C nur geringfügig im Vergleich zur Ausgangsprobe verändert. Das meiste ^{13}C wurde – genauso wie in der Ausgangsprobe – in 16:1 PLFA eingebaut, die hauptsächlich in Typ-I-MOB vorkommen. 18:1 PLFA, die typisch für Typ II sind, waren noch geringer markiert als in der Ausgangsprobe. Damit deutet sich an, dass die Bedeutung von Typ-II-MOB bei 0°C weiter abgenommen hat.

Bei den PLFA-Gehalten lassen sich auch keine Hinweise auf Typ II Wachstum finden. Alle 18:1-Konzentrationen, inklusive des Typ II spezifischen Markers 18:1ω8c, haben abgenommen oder sich nicht signifikant verändert. Die Zunahme des spezifischen Typ I Markers 16:1ω8c um den Faktor 2,5 deutet dagegen auf Wachstum von Typ I MOB bei 0°C hin. Die einzigen PLFA, deren Gehalte während der 0°C-Inkubation außerdem zugenommen haben, waren weitere 16:1 Moleküle. Diese Zunahme kann ebenfalls auf das Wachstum von Typ I MOB zurückgeführt werden, da die 16:1 in großen Mengen von diesen Organismen gebildet werden. Die bekannten Typ II MOB bilden dagegen allenfalls geringe Mengen dieser PLFA (Bowman 2000, Wise et al. 2001, Dedysh et al. 2004). Da die Inkubationsbedingungen die Anreicherung von Methanoxidanten förderten, ist es unwahrscheinlich, dass die Konzentrationszunahme der 16:1 PLFA auf Wachstum von nicht methanoxidierenden Bakterien zurückzuführen ist.

Die Typ-I-MOB in der Talsohle sind demnach nicht nur in ihrer Aktivität (s. Kap. 6.3), sondern auch in ihrem Wachstum psychrotolerant. Nur wenige bislang isolierte MOB können bei 0°C wachsen. Bei den bekannten mesophilen Stämmen liegt die Mindesttemperatur für Wachstum bei 10°C und höher (Bowman 2000), bei dem psychrophilen Stamm *Methylomonas scandivica* bei 5°C (Kalyuzhnaya et al. 1999). Wartiainen et al. (2006a,b) beschrieben kürzlich zwei neue MOB-Arten aus Tundrenböden in Norwegen mit ähnlichen *in situ* Temperaturen und Auftautiefen wie in den in dieser Arbeit untersuchten Böden. Die isolierten MOB bei Wartiainen et al. wuchsen erst bei 10°C (*Methylobacter tundripaludum*, Typ I) bzw. 14°C (*Methylocystis rosea*, Typ II) und hatten ein mesophiles Wachstumsoptimum. Die Organismen wurden allerdings bei 20°C angereichert, wodurch eventuell vorhandene MOB mit psychrophilem oder psychrotolerantem Wachstum möglicherweise nicht erfasst worden sind. Wachstum bei 0°C wurde bislang lediglich für *Methylobacter psychrophilus* (Omelchenko 1993), einem MOB-Isolat aus einem sibirischen Tundrenboden, sowie für *Methylosphaera hansonii* (Bowman 1997), einem Isolat aus einem antarktischen See, beschrieben. Beide Isolate gehören zur Gruppe der Typ I-Organismen.

Für viele Bakterienarten ist nachgewiesen worden, dass sie die Zusammensetzung ihrer PLFA bei Temperaturverschiebungen verändern. Dies dient der Aufrechterhaltung einer optimalen Fluidität der Zellmembranen, die zu einem großen Teil aus PLFA aufgebaut sind (s. Kap. 2.4.2). Eine häufig beobachtete Umstrukturierung ist dabei eine Veränderung des Verhältnisses von gesättigten zu ungesättigten Fettsäuren, z.B. von 16:1 zu 16:0 PLFA. Auch bei einer Reinkultur des Methanoxidierers *Methylococcus capsulatus* ist ein derartiger Effekt beobachtet worden (Jahnke 1992). Die Zunahme der 16:1 PLFA nach der 0°C-Inkubation war tatsächlich mit einer Abnahme von 16:0 in den Proben verbunden. Es kann deshalb nicht ausgeschlossen werden, dass die erhöhte Konzentration von 16:1 PLFA zum Teil auf die Umstrukturierung von 16:0 PLFA in den bereits vorhandenen MOB-Zellen zurückzuführen ist. Die sehr ähnlichen ^{13}C-Markierungsmuster nach der 0°C-Inkubation und in der Ausgangsprobe deuten jedoch darauf hin, dass sich das Verhältnis zwischen 16:1 und 16:0 innerhalb der MOB-Zellen während der Langzeitinkubation nur geringfügig verschoben hat. Demnach kann zumindest der überwiegende Teil der Konzentrationszunahme von 16:1 PLFA auf die Zunahme von MOB-Biomasse zurückgeführt werden. Zusätzlich lebte die Ausgangspopulation der MOB *in situ* bereits bei Temperaturen nahe des Gefrierpunktes; von daher sind starke Umstrukturierungen als Anpassung an niedrige Temperaturen unwahrscheinlich. Die verringerte Konzentration von 16:0 nach der Langzeitinkubation kann

auf das Absterben von nicht methanoxidierenden Bakterien in den Proben zurückzuführen sein. Neben der 16:0 – die in vielen Bakterienarten vorkommt – sind die Konzentrationen diverser weiterer weit verbreiteter PLFA während der Inkubation gesunken.

Welche methanotrophen Typ I Gattungen in den 0°C-Ansätzen gewachsen sind, lässt sich aufgrund der Zunahme von 16:1ω8c, 16:1ω6c und 16:1ω5t nur eingeschränkt bestimmen. Das gleichzeitige Vorkommen dieser drei PLFA ist für die Gattungen *Methylomonas*, *Methylomicrobium* und *Methylosarcina* bekannt (Bowmann 2000, Wise et al. 2001). Es ist jedoch auch möglich, dass die Zunahme dieser drei PLFA auf das Wachstum mehrerer Gattungen zurückgeht, deren Mitglieder jeweils nur ein oder zwei dieser PLFA enthalten.

Nach der Inkubation bei 22°C und der anschließenden $^{13}CH_4$-Markierung bei 22°C war das ^{13}C-PLFA Markierungsmuster deutlich gegenüber der Ausgangsprobe verändert. Es dominierte nicht mehr allein die ^{13}C-Markierung von 16:1 PLFA; sondern die 18:1 waren in etwa ebenso stark mit ^{13}C angereichert.

Dies deutet darauf hin, dass Typ II MOB nach der 22°C-Inkubation aktiver waren als in den Ausgangsproben. In Kap. 5.8 wurde gezeigt, dass Proben aus dem Polygoncenter nach paralleler $^{13}CH_4$-Markierung bei 0°C und 28°C ein untereinander sehr ähnliches ^{13}C-Markierungsmuster aufwiesen. Bei beiden Temperaturen waren 16:1 stark und 18:1 PLFA schwach markiert. Das heißt, bei beiden Temperaturen waren offenbar Typ I MOB wesentlich aktiver als Typ II MOB. Die starke Markierung von 18:1 PLFA nach der Langzeitinkubation bei 22°C deutet demnach darauf hin, dass nicht allein die *in situ* schon vorhandenen Typ II MOB bei hohen Temperaturen aktiver waren als bei 0°C. Vielmehr kann gefolgert werden, dass während der mehrwöchigen Inkubation bei 22°C verstärkt Typ II MOB gewachsen sind und dadurch auch stärker als zuvor zum Methanumsatz beigetragen haben.

Auch die PLFA-Konzentrationen deuten auf Wachstum von Typ II MOB hin. Die einzigen PLFA, die während der 22°C-Inkubation zugenommen haben, waren der spezifische Typ II Marker 18:1ω8c sowie die 18:1ω7c. Letztere PLFA ist in Bakterien, vor allem den gram-negativen, weit verbreitet (Zelles 1999) und kommt auch in allen bekannten Typ II Gattungen vor (Bowman 2000, Dunfield 2003, Dedysh 2004). Unter den Typ I MOB wurde bislang nur eine halophile, d.h. salzliebende, Art beschrieben (Heyer 2005), die diese PLFA enthält. Halophile MOB sind jedoch in der untersuchten Probe nicht zu erwarten. Bei den auf MOB

abgestimmten Inkubationsbedingungen ist es deshalb wahrscheinlich, dass die deutliche Zunahme von 18:1ω7c zu einem großen Teil auf Wachstum von Typ II MOB zurückzuführen ist.

Sowohl die ^{13}C-PLFA Markierungsmuster als auch die PLFA-Konzentrationen bei 22°C zeigten, dass in den hier angereicherten Typ II MOB der Marker 18:1ω8c eine sehr viel geringere Rolle spielte als die PLFA 18:1ω7c. Bekannte Vertreter der Typ II Gattungen *Methylosinus* und *Methylocystis* enthalten mindestens 19 % des Biomarkers 18:1ω8c (Bowman 2000) und können deshalb nicht hauptverantwortlich für das MOB-Wachstum bei 22°C sein. Die erst kürzlich entdeckten Typ II Gattungen *Methylocella* und *Methylocapsa* bilden zwar große Mengen der bei 22°C stark angereicherten PLFA 18:1ω7c, jedoch die ebenfalls angereicherte Marker-PLFA 18:1ω8c gar nicht (Dedysh et al. 2000, 2002, 2004, Dunfield et al. 2003). Demnach sind in den 22°C-Ansätzen wahrscheinlich Mischpopulationen aus den genannten Organismen oder bislang unbekannte MOB gewachsen.

Die deutliche Zunahme von 18:1 ging mit einer Abnahme von 16:1 PLFA einher. Eine Verschiebung von 16:1 nach 18:1 gehört zu den möglichen internen PLFA Umstrukturierungen in Bakterienzellen bei erhöhten Temperaturen (Russel & Fukunaga 1990, Doumenq et al. 1999). Für MOB ist eine derartige Verschiebung allerdings bislang nicht beschrieben worden. Neben den bislang isolierten psychrophilen Typ-I-MOB bilden auch die bekannten mesophilen Typ-I-MOB – mit Wachstumsoptima zwischen ca. 25 und 35°C – keine 18:1 PLFA (Bowman 2000). Bislang sind nur zwei Typ-I-Arten bekannt, die neben 16C- auch 18C-Fettsäuren enthalten. Es handelt sich dabei zum einen um die oben erwähnte halophile Art (Heyer et al. 2005); zum anderen um die thermophile Art *Methylothermus thermalis* (Tsubota et al. 2005), die aus heißen Quellen isoliert wurde. Letztere enthält die PLFA 18:1ω9c; nach den 22°C-Inkubationen hat dagegen die 18:1ω7c zugenommen. Daneben sind auch thermophile Typ-I-MOB bekannt (*Methylococcus sp*. und *Methylocaldum sp*.), die keine 18C-Fettsäuren bilden (Bowman 2000). Demnach erscheinen temperaturbedingte PLFA-Umstrukturierungen von 16:1 nach 18:1 bei 22°C innerhalb der Typ-I-MOB aus dem untersuchten Tundrenboden unwahrscheinlich.

Eine teilweise PLFA-Aufsättigung während der 22°C-Inkubation, d.h. Umstrukturierung von 16:1 nach 16:0 als Anpassung an erhöhte Temperaturen, ist dagegen für die vorhandenen

Typ-I-MOB zu auszuschließen. Im ^{13}C-Markierungsmuster nach der 22°C-Inkubation hat 16:0 an Bedeutung gegenüber den 16:1 PLFA gewonnen.

Hinweise auf Wachstum von Typ-I-MOB bei 22°C sind nicht zu finden. Die Abnahme von verschiedenen 16:1 PLFA gegenüber der Ausgangsprobe, einschließlich des Typ-I-Markers 16:1ω8c, deutet darauf hin, dass die Biomasse der Typ I MOB bei 22°C nicht zugenommen oder sogar gegenüber der Ausgangsprobe abgenommen hat. Bei 22°C hatte die *in situ* vorhandene, Typ-I-dominierte MOB-Population ihr Aktivitätsoptimum. Da offenbar Typ-I-MOB bei 22°C nicht gewachsen sind, scheint bei diesen Organismen das Optimum der Aktivität bei höheren Temperaturen als das Optimum des Wachstums zu liegen. Derartige Unterschiede sind auch an Reinkulturen verschiedener anderer Bakterienarten gefunden worden (Isaksen & Jørgensen 1996, Knoblauch & Jørgensen 1999).

Zusammenfassend hatten im Laborversuch die Temperaturen offenbar einen entscheidenden Einfluss auf die Struktur der MOB-Populationen. Bei 0°C dominierten wie unter *in situ* Bedingungen Typ I typische PLFA, bei 22°C haben dagegen Typ II typische PLFA stark zugenommen.

7 Schlussfolgerungen und Ausblick

Die vorliegende Arbeit liefert mittels Phospholipid-Fettsäure (PLFA)-Analysen, ^{13}C-Markierungsexperimenten sowie Aktivitätstests einen Überblick über die Größe, Struktur und Temperaturanpassung der methanoxidierenden Bakteriengemeinschaften in den feuchten Tundrenböden Sibiriens. Vor dem Hintergrund prognostizierter Umweltveränderungen in der Arktis mit steigenden Temperaturen und erhöhten Niederschlägen lassen sich daraus die unten aufgeführten Schlussfolgerungen ziehen. Die erzielten Ergebnisse eignen sich zudem als Basis für weitergehende Untersuchungen der mikrobiellen – insbesondere methanotrophen – Gemeinschaften in permafrostbeeinflussten Habitaten. Ensprechende Anregungen für weiterführende Forschungsarbeiten werden ebenfalls im Folgenden gegeben.

Es konnte gezeigt werden, dass die methanoxidierenden Bakterien (MOB) in den untersuchten nassen Tundrenböden eine ähnlich große Bedeutung hatten wie in vergleichbaren nassen Böden wärmerer Klimate. Zusätzlich führte der 9-monatige sibirische Winter mit Temperaturminima von bis zu -37°C im Boden offenbar zu keinem deutlichen Absinken der Populationsgrößen im Laufe des Jahres. Ein Einfluss der Temperatur auf die **Größe der methanoxidierenden Gemeinschaften** konnte somit nicht nachgewiesen werden.

Im Gegensatz zur Größe der methanoxidierenden Gemeinschaften unterschied sich deren **Struktur** in den kalten Tundrenböden deutlich von Böden wärmerer Klimate. In allen untersuchten Tundrenböden waren MOB der Typ-I-Gruppe die häufigsten und aktivsten Methanoxidierer. Zahlreiche Studien an wärmeren Böden zeigten demgegenüber keine Dominanz von Typ I: Entweder wurden beide MOB-Gruppen, Typ I und II, mit ähnlichen Häufigkeiten oder eine Dominanz von Typ II nachgewiesen.

Inkubationsversuche zeigten, dass die in den kalten Böden dominierenden Typ-I-MOB besser an **niedrige Temperaturen angepasst** waren als die in geringeren Mengen vorhandenen Typ-II-MOB. Zusätzlich wurde deutlich, dass die methanoxidierenden Gemeinschaften auf steigende Temperaturen durch Veränderung ihrer Zusammensetzung reagieren: Bei Inkubation von Bodenproben über mehrere Wochen bei 0°C kam es zu Wachstum der *in situ* dominierenden Typ I; für Wachstum von Typ-II-MOB gab es hier keine Hinweise. Bei 22°C gewannen dagegen Typ II-MOB stark an Bedeutung, ihre Biomasse und Aktivität nahmen deutlich zu, gleichzeitig gab es keine Anzeichen für Wachstum von Typ I. Durch weitere

Inkubationsversuche bei verschiedenen Temperaturen müsste verifiziert werden, ob derartige **Strukturverschiebungen** bereits bei den prognostizierten geringeren *in situ* Temperaturanstiegen zu beobachten sind.

Die höchsten Methanoxidationsraten wurden in den Tundrenböden bei Temperaturen zwischen 22 und 28°C erreicht – ähnlich wie bei MOB-Gemeinschaften aus Böden wärmerer Klimate. Dabei zeigten die MOB in den Tundrenböden jedoch eine klare **Kältetoleranz** mit deutlicher Aktivität bei Temperaturen um 0°C. Dies wurde in wärmeren Böden bislang selten beobachtet. Mit den oben genannten Inkubationsversuchen bei 0°C und 22°C konnte zudem gezeigt werden, dass die dominierenden Typ-I-MOB bei Temperaturen um 0°C nicht nur Methan umsetzten, sondern auch Wachstum zeigten. Bei 22°C war dagegen kein Biomassezuwachs von Typ I zu beobachten. Dies deutet auf das Vorhandensein von Methanoxidierern hin, die in ihrem Wachstumsverhalten psychrophil (**kälteliebend**) sind. Um direkt zu untersuchen, ob es sich um echt psychrophile Organismen handelt – mit ausschließlichem Wachstum bei Temperaturen unter 20°C und höchsten Wachstumsgeschwindigkeiten bei 15°C oder niedriger – sind weitere Untersuchungen an **Reinkulturen** notwendig. Bei der Anreicherung der methanoxidierenden Bakterien sollten dabei möglichst naturnahe Bedingungen – vor allem niedrige Temperaturen – gewählt werden, um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, tatsächlich die *in situ* dominierenden Organismen zu isolieren. An den Reinkulturen sollte zudem die Kälteanpassung bezüglich der Methanoxidationsraten weiter untersucht werden. Dabei ist vor allem interessant, wie hoch die absoluten Aktivitätsraten pro Zelle bei verschiedenen Temperaturen im Vergleich zu methanoxidierenden Bakterien aus wärmeren Böden sind. Da mit der Anreicherung und Isolierung jedoch immer nur ein Ausschnitt der vorhandenen Population erfasst wird, wäre es auch in diesem Zusammenhang sinnvoll, die oben erwähnten Inkubationsversuche mit Naturproben zu erweitern. Wenn diese Versuche bei weiteren Temperaturen zwischen 0 und 22°C durchgeführt werden, könnte die optimale Wachstumstemperatur der Typ-I-Gemeinschaft ermittelt werden.

In dem ständig gefrorenen Untergrund der Böden wurden lebende, jedoch inaktive Methanoxidanten gefunden. In der Mehrzahl der hier untersuchten holozänen **Permafrost**-Proben, die ca. 3000 Jahre lang gefroren waren, konnten MOB **reaktiviert** werden. Auch in älteren, spätpleistozänen Proben, die mindestens 25000 Jahre lang gefroren waren, ließen sich Methanoxidanten zum Teil reaktivieren. Dies bedeutet, dass die im Permafrost überdauernden

MOB nach einem eventuellen Auftauen des Materials *in situ* auch wieder aktiv werden und als Ausgangspopulation für die Entwicklung einer aktiven methanoxidierenden Gemeinschaft dienen können. Die untersuchten reaktivierten Methanoxidanten aus dem Permafrost waren, genauso wie die aktiven Populationen in der Auftauschicht, von Typ-I-Organismen dominiert.

Die vergleichenden Untersuchungen an Tundrenböden mit unterschiedlichem Wasserhaushalt zeigten, dass MOB in **nassen Böden** mit hohem Wasserstand mengenmäßig bedeutender waren als in trockeneren Böden. Die geringere Sauerstoffverfügbarkeit in den zum Teil komplett wassergesättigten Böden schien für die MOB weniger bedeutsam zu sein als die bessere **Nachlieferung des Substrates Methan** in den nassen Böden. Sauerstoff erhielten die MOB hier wahrscheinlich über Pflanzenwurzeln, aus denen Sauerstoff in die wassergesättigte Rhizosphäre diffundiert. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Methanoxidierer gut an **niedrige Sauerstoffkonzentrationen angepasst** waren: In Proben aus mehr als 10 cm Tiefe unterhalb des Wasserspiegels wurde das Methan bei niedrigen Sauerstoffkonzentrationen (ca. 0,5 % v/v) schneller abgebaut als bei atmosphärischen Konzentrationen (ca. 21 % v/v O_2).

Aus der Tatsache, dass die MOB in den untersuchten Böden mit hohem Methanbildungspotential die größte Bedeutung hatten, lässt sich ableiten, dass im Falle einer zukünftigen Verstärkung der mikrobiellen Methanbildung auch die Bedeutung der Methanoxidation steigen wird. Dies ist vor allem der Fall, wenn durch die prognostizierten steigenden Niederschläge in der Arktis die Böden nasser werden und damit mehr anaerobe Bodenzonen mit erhöhter Methanbildung entstehen. Die dann ebenfalls gesteigerte Methanoxidation wird jedoch voraussichtlich die vermehrte Methanbildung nicht vollständig abpuffern. Denn sowohl in dieser Arbeit als auch in zahlreichen anderen Untersuchungen konnten generell steigende Methanemissionen bei einem steigenden Wasserspiegel im Boden gemessen werden.

Die in dieser Arbeit angewendete **Methoden-Kombination** aus ^{13}C-Markierungen, PLFA-Analysen und Aktivitätstests ist ebenfalls für die Untersuchung anderer Bakteriengruppen geeignet. Auch wenn es nicht immer möglich ist, die mit ^{13}C markierten PLFA-Moleküle einzelnen Organismengruppen zuzuordnen, können durch den Vergleich von Markierungsmustern wertvolle Hinweise auf unterschiedliche aktive Populationsanteile beim Abbau der eingesetzten Substrate in verschiedenen Proben gewonnen werden. Insbesondere für Populationen mit geringer Aktivität – wie zum Beispiel im Permafrost – ist die sehr

empfindliche ^{13}C-PLFA-Analyse mit dem Gaschromatograph-Isotopenmassenspektrometer (GC-IRMS) gut geeignet. Techniken, bei denen aktive Populationsanteile über die ^{13}C-Markierung von Nukleinsäuren analysiert werden, erfordern dagegen einen wesentlich stärkeren Einbau des ^{13}C in die Zellsubstanz und sind demnach für gering aktive Populationen weniger geeignet. Über ^{13}C-PLFA-Analysen lassen sich nicht nur – wie in dieser Arbeit gezeigt – nach dem Auftauen reaktivierte Populationen aus dem Permafrost untersuchen. Auch ^{13}C-Markierungen von PLFA bei *in situ* Temperaturen von bis zu -10°C wären sehr aufschlussreich. Dies ist vor allem für anoxische Prozesse wie zum Beispiel die Methanbildung interessant, da der Permafrost ein weitgehend anaerobes Habitat ist. In diesem Falle müssten die in den methanogenen Archaeen vorkommenden Phospholipid-Etherlipide (PLEL) untersucht werden.

Die Struktur der MOB-Gemeinschaften in permafrostbeeinflussten Habitaten konnte mit den in dieser Arbeit angewandten Techniken auf der Ebene der beiden MOB-Familien, Typ I und II, aufgezeigt werden. Um die gefundene durchgehenden Dominanz von Typ I in den Tundrenböden sowie die Zunahme der Bedeutung von Typ II im Laborversuch bei erhöhten Temperaturen weiter auf Gattungs- oder Artebene aufzulösen, müssen weitergehende Untersuchungen mit nukleinsäurebasierten quantitativen Methoden durchgeführt werden.

Daten aus Prozessstudien und mikrobiologisch-biochemischen Analysen, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt worden sind, liefern einen wichtigen Beitrag zur Entwicklung und Validierung prozessgesteuerter Modelle hinsichtlich kleinskaliger Methanflüsse im Permafrost.

8 Literatur

ACIA (2004). Impacts of a Warming Arctic: Arctic Climate Impact Assessment. Cambridge University Press, New York.

Ad-hoc-AG Boden (2005). Bodenkundliche Kartieranleitung. 5. Auflage. Hannover.

Amann, R., Ludwig, W., Schleifer, K.-H. (1995). Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. Microbiological Reviews 59, 143-169.

Amaral, J. A., Knowles, R. (1995). Growth of methanotrophs in methane and oxygen counter gradients. FEMS Microbiology Letters 126, 215-220.

Are, F.E. (1999). The role of coastal retreat for sedimentation in the Laptev Sea. In: Kassens, H.; Bauch, H.A.; Dmitrenko, I.A.; Eicken, H.; Hubberten, H.-W.; Melles, M.; Thiede, J.; Timokhov, L.A. (Hrsg.). Land-Ocean Systems in the Siberian Arctic: Dynamics and History. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Baath, E., Diaz-Ravina, M., Bakken, L. R. (2005). Microbial Biomass, Community Structure and Metal Tolerance of a Naturally Pb-Enriched Forest Soil. Microbial Ecology 50, 496-505.

Bakermans, C., Tsapin, A. I., Souza-Egipsy, V., Gilichinsky, D. A., Nealson, K. H. (2003). Reproduction and metabolism at – 10°C of bacteria isolated from Siberian permafrost. Environmental Microbiology 5, 321-326.

Bartlett, K. B., Harriss, R. C. (1993). Review and assessment of methane emissions from wetlands. Chemosphere 26, 261-320.

Bender, M., Conrad, R. (1994). Methane oxidation activity in various soils and freshwater sediments: Occurence, characteristics, vertical profiles, and distribution on grain size fractions. Journal of Geophysical Research 99, 16531-16540.

Benstead, J., Lloyd, D. (1994). Direct mass spectrometric measurement of gases in peat cores. FEMS Microbiology Ecology 13, 233-240.

Blumenberg, M., Seifert, R., Nauhaus, K., Pape, T., Michaelis, W. (2005). In Vitro Study of Lipid Biosynthesis in an Anerobically Methan-Oxidizing Microbial Mat. Appl. Environ. Microbiol. 71, 4345-4351.

Bodrossy, L., Stralis-Pavese, N., Konrad-Koszler, M., Weilharter, A., Reichenauer, T. G., Schofer, D., and Sessitsch, A. (2006). mRNA-Based Parallel Detection of Active Methanotroph Populations by Use of a Diagnostic Microarray. Appl. Environ. Microbiol. 72, 1672-1676.

Boeckx, P., Van Cleemput, O. (1996). Methane Oxidation in a Neutral Landfill Cover Soil: Influence of Moisture Content, Temperature, and Nitrogen-Turnover. J. Environ. Qual. 25, 178-183.

Boerjesson, G., Sundh, I., Svensson, B. (2004). Microbial oxidation of CH_4 at different temperatures in landfill cover soils. FEMS Microbiology Ecology 48, 305-312.

Boerjesson, G., Sundh, I., Tunlid, A., Svensson, B. (1998). Methane oxidation in landfill cover soils, as revealed by potential oxidation measurements and phospholipid fatty acid analyses. Soil Biology & Biochemistry 30, 1423 - 1433.

Boetius, A., Ravenschlag, K., Schubert, C. J., Rickert, D., Widdel, F., Gieseke, A., Amann, R., Jorgensen, B. B., Witte, U., Pfannkuche, O. (2000). A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. Nature 407, 623 - 626.

Boschker, H. T. S., Middelburg, J. J. (2002). Stable isotopes and biomarkers in microbial ecology. FEMS Microbiology Ecology 40, 85 - 95.

Bosse, U., Frenzel, P. (1997). Activity and Distribution of Methane-Oxidizing Bacteria in Flooded Rice Soil Microcosms and in Rice Plants (Oryza sativa). Appl. Environ. Microbiol. 63, 1199-1207.

Bossio, D. A., Scow, K. M. (1998). Impacts of Carbon and Flooding on Soil Microbial Communities: Phospholipid Fatty Acid Profiles and Substrate Utilization Patterns. Microbial Ecology 35, 265-278.

Bousquet, P., Ciais, P., Miller, J. B., Dlugokencky, E. J., Hauglustaine, D. A., Prigent, C., Van der Werf, G. R., Peylin, P., Brunke, E.-G., Carouge, C., Langenfelds, R. L., Lathiere, J., Papa, F., Ramonet, M., Schmidt, M., Steele, L. P., Tyler, S. C., White, J. (2006). Contribution of anthropogenic and natural sources to atmospheric methane variability. Nature 443, 439-443.

Bowman, J., McCammon, S., Skerratt, J. (1997). *Methylosphaera hansonii* gen. nov., sp. nov., a psychrophilic, group I methanotroph from Antarctic marine-salinity, meromictic lakes. Microbiology 143, 1451-1459.

Bowman, J., Sly, L., Nichols, P., Hayward, A. (1993). Revised taxonomy of the methanotrophs: description of *Methylobacter* gen. nov., emendation of *Methylococcus*, validation of *Methylosinus* and *Methylocystis* species, and a proposal that the family Methylococcaceae includes only the group I methanotrophs. Int. J. Syst. Bacteriol. 43, 735-753.

Bowman, J. P. (2000). The Methanotrophs - The families Methylococcaceae and Methylocystaceae. In: The Prokaryotes: An Evolving electronic resource for the microbiological community. 3rd edition, release 3.1, 1/20/2000. Springer Verlag, New York. http://link.springer-ny.com/link/service/books/10125/

Brant, J. B., Myrold, D. D., Sulzman, E. W. (2006). Root controls on soil microbial community structure in forest soils. Oecologia 148, 650-659.

Breezee, J., Cady, N., Staley, J. T. (2004). Subfreezing Growth of the Sea Ice Bacterium "*Psychromonas ingrahamii*". Microbial Ecology 47, 300-304.

Brennan, P. (1988). *Mycobacterium* and other actinomycetes. In: Ratledge, C., Wilkinson, S. (eds.): Microbial Lipids, Academic Press, London, 203-298.

Brinch-Iverson, J., King, G. M. (1990). Effects of substrate concentration, growth state, and oxygen availability on relationships among bacterial carbon, nitrogen and phospholipid phosphorours content. FEMS Microbiology Ecology 74, 345-356.

Brock, T.D., Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. (1994). Biology of Microorganisms. 7th ed. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.

Bull, I. D., Parekh, N. R., Hall, G. H., Ineson, P., Evershed, R. P. (2000). Detection and classification of atmospheric methane oxidizing bacteria in soil. Nature 405, 175-178.

Cai, Z., Yan, X. (1999). Kinetic model for methane oxidation by paddy soil as affected by temperature, moisture and N addition. Soil Biology & Biochemistry 31, 715 - 725.

Calhoun, A., King, G. M. (1997). Regulation of Root-Associated Methanotrophy by Oxygen Availability in the Rhizosphere of Two Aquatic Macrophytes. Appl. Environ. Microbiol. 63, 3051 - 3058.

Cao, M., Marshall, S., Gregson, K. (1996). Global carbon exchange and methane emissions from natural wetlands: Application of a process-based model. Journal of Geophysical Research 101, 14399-14414.

Carini, S., Bano, N., LeCleir, G., Joye, S. B. (2005). Aerobic methane oxidation and methanotroph community composition during seasonal stratification in Mono Lake, California (USA). Environmental Microbiology 7, 1127-1138.

Carpenter, E. J., Lin, S., Capone, D. G. (2000). Bacterial Activity in South Pole Snow. Appl. Environ. Microbiol. 66, 4514-4517.

Christensen, T. R., Prentice, I. C., Kaplan, J., Haxeltine, A., Sitch, S. (1996). Methane flux from northern wetlands and tundra: An ecosystem source modelling approach. Tellus 48B, 652-661.

Christie, W.W. (2006). The Lipid Library. http://www.lipidlibrary.co.uk.

Costello, A. M., Auman, A. J., Macalady, J. L., Scow, K. M., Lidstrom, M. E. (2002). Estimation of methanotroph abundance in a freshwater lake sediment. Environmental Microbiology 4, 443 - 450.

Cronan, J. E. (2002). Phospholipid modifications in bacteria. Current Opinion in Microbiology 5, 202-205.

Crossman, Z. M., Abraham, F., Evershed, R. P. (2004). Stable Isotope Pulse-Chasing and Compound Specific Stable Carbon Isotope Analysis of Phospholipid Fatty Acids To Assess Methane Oxidizing Bacterial Populations in Landfill Cover Soils. Environ. Sci. Technol. 38, 1359-1367.

Crossman, Z. M., Ineson, P., Evershed, R. P. (2005). The use of ^{13}C labelling of bacterial lipids in the characterisation of ambient methane-oxidising bacteria in soils. Organic Geochemistry 36, 769-778.

Crossman, Z. M., Wang, Z.-P., Ineson, P., Evershed, R. P. (2006). Investigation of the effect of ammonium sulfate on populations of ambient methane oxidising bacteria by ^{13}C-labelling and GC/C/IRMS analysis of phospholipid fatty acids. Soil Biology and Biochemistry 38, 983-990.

Crutzen, P.J. (1991). Methane's sources and sinks. Nature 350: 380-381.

De Visscher, A., Schippers, M., Cleemput, O. V. (2001). Short-term kinetic response of enhanced methane oxidation in landfill cover soils to environmental factors. Biol. Fertil. Soils 33, 231-237.

Dedysh, S. N. (2002a). Methanotropic Bacteria of Acidic *Sphagnum* Peat Bogs. Microbiology 71, 638-650.

Dedysh, S. N., Berestovskaya, Y. Y., Vasylieva, L. V., Belova, S. E., Khmelenina, V. N., Suzina, N. E., Trotsenko, Y. A., Liesack, W., Zavarzin, G. A. (2004). *Methylocella tundrae* sp. nov., a novel methanotrophic bacterium from acidic tundra peatlands. Int. J Syst. Evol. Microbiol. 54, 151-156.

Dedysh, S. N., Derakshani, M., Liesack, W. (2001). Detection and Enumeration of Methanotrophs in Acidic *Sphagnum* Peat by 16S rRNA Fluorescence In Situ Hybridization, Including the Use of Newly Developed Oligonucleotide Probes for *Methylocella palustris*. Appl. Environ. Microbiol. 67, 4850 - 4857.

Dedysh, S. N., Dunfield, P. F., Derakshani, M., Stubner, S., Heyer, J., and Liesack, W. (2003). Differential detection of type II methanotrophic bacteria in acidic peatlands using newly developed 16S rRNA-targeted fluorescent oligonucleotide probes. FEMS Microbiology Ecology 43, 299 - 308.

Dedysh, S. N., Khmelenina, V. N., Suzina, N., Trotsenko, Y. A., Semrau, J. D., Liesack, W., Tiedje, J. M. (2002b). *Methylocapsa acidiphila* gen. nov., sp. nov., a novel methane-oxidizing and dinitrogen-fixing acidophilic bacterium from *Sphagnum* bog. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52, 251-261.

Dedysh, S. N., Knief, C., Dunfield, P. F. (2005). *Methylocella* Species Are Facultatively Methanotrophic. Journal of Bacteriology 187, 4665-4670.

Dedysh, S., Liesack, W., Khmelenina, V., Suzina, N., Trotsenko, Y., Semrau, J., Bares, A., Panikov, N., Tiedje, J. (2000). *Methylocella palustris* gen. nov., sp. nov., a new methane-oxidizing acidophilic bacterium from peat bogs, representing a novel subtype of serine-pathway methanotrophs. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50, 955-969.

Dereviagin, A., Kunitsky, V. (2004). Periglacial studies around Cape "Mamontov Klyk" / Geographical and geological backround. In: Schirrmeister, L. (Hrsg.): Expeditions in Siberia in 2003. Reports on Polar and Marine Research 489: 63-66.

DIN 18123 (1983). Baugrund; Untersuchung von Bodenproben – Bestimmung der Korngrößenverteilung. DIN-Taschenbuch 113, Deutsches Institut für Normung e.V., Beuth Verlag, Berlin.

DIN 19683-1 & 19683-2 (1973). Bodenuntersuchungsverfahren im landwirtschaftlichen Wasserbau – Physikalische Laboruntersuchungen – Bestimmung der Korngrößenzusammensetzung nach Vorbehandlung mit Natriumpyrophosphat. Deutsches Institut für Normung e.V., Beuth Verlag, Berlin.

DIN 19684-1 (1977). Bodenuntersuchungsverfahren im landwirtschaftlichen Wasserbau – Chemische Laboruntersuchungen – Bestimmung des pH-Wertes des Bodens und Ermittlung des Kalkbedarfs. Deutsches Institut für Normung e.V., Beuth Verlag, Berlin.

Dlugokencky, E. J., Houweling, S., Bruhwiler, L., Masarie, K. A., Lang, P. M., Miller, J. B., Tans, P. P. (2003). Atmospheric methane levels off: temporary pause or a new steady-state? Geophysical Research Letters 30, doi:10.1029/2003GL018126.

Doumenq, P., Acquaviva, M., Asia, L., Durbec, J. P., Le Dreau, Y., Mille, G., Bertrand, J. C. (1999). Changes in fatty acids of *Pseudomonas nautica*, a marine denitrifying bacterium, in response to n-eicosane as carbon source and various culture conditions. FEMS Microbiology Ecology 28, 151-161.

Dumestre, J.-F., Casamayor, E. O., Massana, R., Pedros-Alio, C. (2001). Changes in bacterial and archaeal assemblages in an equatorial river induced by the water eutrophication of Petit Saut dam reservoir (French Guiana). Aquatic Microbial Ecology 26, 209-221.

Dunfield, P. F., Khmelenina, V. N., Suzina, N. E., Trotsenko, Y. A., Dedysh, S. N. (2003). *Methylocella silvestris* sp. nov., a novel methanotroph isolated from an acidic forest cambisol. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53, 1231-1239.

Dunfield, P. F., Knowles, R., Dumont, R., Moore, T. R. (1993). Methane Production and Consumption in Temperate and Subarctic Peat Soils: Response to Temperature and pH. Soil Biology & Biochemistry 25, 321 - 326.

Edlund, A., Nichols, P., Roffey, R., White, D. (1985). Extractable and lipopolysaccharide fatty acid and hydroxy acid profiles from *Desulfovibrio* species. J. Lipid Res. 26, 982-988.

Eller, G., Frenzel, P. (2001). Changes in Activity and Community Structure of Methane-Oxidizing Bacteria over the Growth Period of Rice. Appl. Environ. Microbiol. 67, 2395 - 2403.

Eller, G., Kruger, M., Frenzel, P. (2005). Comparing field and microcosm experiments: a case study on methano- and methylo-trophic bacteria in paddy soil. FEMS Microbiology Ecology 51, 279-291.

Epp, M. A., Chanton, J. P. (1993). Rhizospheric Methane Oxidation Determined via the Methyl Fluoride Inhibition Technique. Journal of Geophysical Research 98, 18, 413 - 418, 422.

Evershed, R. P., Crossman, Z. M., Bull, I. D., Mottram, H., Dungait, J. A., Maxfield, P. J., Brennand, E. L. (2006). ^{13}C-Labelling of lipids to investigate microbial communities in the environment. Current Opinion in Biotechnology 17, 72-82.

Fairbanks, R. G. (1989). A 17,000-year glacio-eustatic sea level record: influence of glacial melting rates on the Younger Dryas event and deep-ocean circulation. Nature 342, 637-642.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (1998). World Reference Base for Soil Ressources. World Soil Ressources Report 84. FAO, Rom.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (2001). Global Forest Resources Assessment 2000, Main Report. FAO Forestry Paper No. 140. FAO, Rom.

Fiedler, S., Wagner, D., Kutzbach, L., Pfeiffer, E.-M. (2004). Element Redistribution along Hydraulic and Redox Gradients of Low-Centered Polygons, Lena Delta, Northern Siberia. Soil Science Society of America Journal 68, 1002-1011.

Fierer, N., Schimel, J. P., Holden, P. A. (2003). Variations in microbial community composition through two soil depth profiles. Soil Biology and Biochemistry 35, 167-176.

Findlay, R. H., King, G. M., Watling, L. (1989). Efficacy of Phospholipid Analysis in Determining Microbial Biomass in Sediments. Appl. Environ. Microbiol. 55, 2888-2893.

Frenzel, P., Karofeld, E. (2000). CH_4 emission from a hollow-ridge complex in a raised bog: The role of CH_4 production and oxidation. Biogeochemistry 51, 91 - 112.

Frenzel, P., Rudolph, J. (1998). Methane emission from a wetland plant: the role of CH_4 oxidation in *Eriophorum*. Plant and Soil 202, 27 - 32.

Friedrich, M. W. (2006). Stable-isotope probing of DNA: insights into the function of uncultivated microorganisms from isotopically labeled metagenomes. Current Opinion in Biotechnology 17, 59-66.

Frostegard, A., Baath, E. (1996). The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil. Biology and Fertility of Soils 22, 59-65.

Ganzert, L. (2005). Biodiversität methanogener Archaeen in arktischen Böden des Lena-Delta / Sibirien. Diplomarbeit, Universität Potsdam.

Ganzert, L., Zimmermann, U., Wagner, D. (2004). Microbial process studies on methane fluxes from permafrost environments. In: Schirrmeister, L. (Hrsg.): Russian-German Cooperation System Laptev Sea: The Expedition Lena-Anabar 2003. Berichte zur Polar- und Meeresforschung 489.

Gattinger, A. (2001). Entwicklung und Anwendung von Methoden zur Charakterisierung von mikrobiellen Gemeinschaften in oxischen und anoxischen Bodenökosystemen anhand von Phospholipid-Profilen. Dissertation. Technische Universität München.

Gaynard, T.J., Armstrong, W. (1987). Some aspects of internal plant aeration in amphibious habitats. In: Crawford, M.M. (Hrsg.): Plant life in aquatic and amphibious habitats. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 303-320.

Gebert, J., Groengroeft, A., Miehlich, G. (2003). Kinetics of Microbial Landfill Methane Oxidation in Biofilters. Waste Management 23, 609-619.

Gebert, J., Groengroeft, A., Schloter, M., Gattinger, A. (2004). Community structure in a methanotroph biofilter as revealed by phospholipid fatty acid analysis. FEMS Microbiology Letters 240, 61-68.

Gerard, G., Chanton, J. P. (1993). Quantification of methane oxidation in the rhizosphere of emergent aquatic macrophytes: defining upper limits. Biogeochemistry 23, 79-97.

Gilbert, B., Frenzel, P. (1998). Rice Roots and CH_4 Oxidation: The Activity of Bacteria, their Distribution and the Microenvironment. Soil Biology & Biochemistry 30, 1903 - 1916.

Graham, D. W., Chaudhary, J. A., Hanson, R. S., Arnold, R. G. (1993). Factors affecting competition between type I and type II methanotrophs in two-organism, continuous-flow reactors. Microbial Ecology 25, 1-17.

Green, C. T., Scow, K. M. (2000). Analysis of phospholipid fatty acids (PLFA) to characterize microbial communities in aquifers. Hydrogeology Journal 8, 126-141.

Grosse, G. (2005). Characterisation and evolution of periglacial landscapes in Northern Siberia during the Late Quaternary – Remote sensing and GIS studies. Dissertation. Universität Potsdam.

Guckert, J. B., Hood, M. A., White, D. C. (1986). Phospholipid ester-linked fatty acid profile changes during nutrient deprivation of *Vibrio cholerae*: increases in the trans/cis ratio and proportions of cyclopropyl fatty acids. Appl. Environ. Microbiol. 52, 794-801.

Hanson, R. S., Hanson, T. E. (1996). Methanotrophic Bacteria. Microbiological Reviews 60, 439 - 471.

Happell, J. D., Chanton, J. P., Whiting, G. J., Showers, W. J. (1993). Stable Isotopes as Tracers of Methane Dynamics in Everglades Marshes With and Without Active Populations of Methane Oxidizing Bacteria. Journal of Geophysical Research 98, 14771 - 14782.

Heinrich, D., Hergt, M. (1991). dtv-Atlas zur Ökologie. 2. Auflage. Deutscher Taschenbuch Verlag, München.

Henckel, T., Roslev, P., Conrad, R. (2000). Effects of O_2 and CH_4 on presence and activity of the indigenous methanotrophic community in rice field soil. Environmental Microbiology 2, 666-679.

Heyer, J., Berger, U., Hardt, M., Dunfield, P. F. (2005). *Methylohalobius crimeensis* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic, methanotrophic bacterium isolated from hypersaline lakes of Crimea. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55, 1817-1826.

HMCR (Hydrometeorological Centre of Russia) (2004) Russia's Weather. http://meteo.infospace.ru

Hood, M. A., Guckert, J. B., White, D. C., Deck, F. (1986). Effect of Nutrient Deprivation on Lipid, Carbohydrate, DNA, RNA, and Protein Levels in *Vibrio cholerae*. Appl. Environ. Microbiol. 52, 788-793.

IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change) (1994). Radiative Forcing of Climate Change, the 1994 Report of the Scientific Assessment Group of IPCC. Cambridge University Press, Cambridge.

IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change) (2001). Climate Change 2001: The Scientific Basis. Cambridge University Press, Cambridge.

Isaksen, M., Jorgensen, B. (1996). Adaptation of Psychrophilic and Psychrotrophic Sulfate-Reducing Bacteria to Permanently Cold Marine Environments. Appl. Environ. Microbiol. *62,* 408-414.

Jahnke, L. L. (1992). The effects of growth temperatures on the methyl sterol and phospholipid fatty acid composition of *Methylococcus capsulatus* (Bath). FEMS Microbiology Letters 93, 209-212.

Kalyuzhnaya, M. G., Khmelenina, V. N., Kotelnikova, S., Holmquist, L., Pedersen, K., Trotsenko, Y. A. (1999). *Methylomonas scandinavica* sp. nov., a new methanotrophic psychrotrophic bacterium isolated from deep igneous rock ground water of Sweden. Systematic and Applied Microbiology 22, 565-572.

Kalyuzhnaya, M. G., Stolyar, S. M., Auman, A. J., Lara, J. C., Lidstrom, M. E., Chistoserdova, L. (2005). *Methylosarcina lacus* sp. nov., a methanotroph from Lake Washington, Seattle, USA, and emended description of the genus *Methylosarcina*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55, 2345-2350.

Kaneda, T. (1977). Fatty Acids of the Genus *Bacillus*: an Example of Branched-Chain Preference. Bacteriological Reviews 41, 391-418.

Kaneda, T. (1991). Iso- and anteiso-fatty acids in bacteria: biosynthesis, function, and taxonomic significance. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 55, 288-302.

Keppler, F., Hamilton, J. T. G., Braß, M., Röckmann, T. (2006). Methane emissions from terrestrial plants under aerobic conditions. Nature 439, 187-191.

Khmelenina, V. N., Makutina, V. A., Kalyuzhnaya, M. G., Rivkina, E. M., Gilichinsky, D. A., Trotsenko, Y. A. (2002). Discovery of Viable Methanotrophic Bacteria in Permafrost Sediments of Northeast Siberia. Doklady Biological Sciences 384, 235 - 237.

Kieft, T., Wilch, E., O'Connor, K., Ringelberg, D., White, D. (1997). Survival and Phospholipid Fatty Acid Profiles of Surface and Subsurface Bacteria in Natural Sediment Microcosms. Appl. Environ. Microbiol. 63, 1531-1542.

Kieft, T. L., Ringelberg, D. B., White, D. C. (1994). Changes in Ester-Linked Phospholipid Fatty Acid Profiles of Subsurface Bacteria during Starvation and Desiccation in a Porous Medium. Appl. Environ. Microbiol. 60, 3292-3299.

King, G. M. (1990). Dynamics and controls of methane oxidation in a danish wetland sediment. FEMS Microbiology Ecology 74, 309 - 324.

King, G. M. (1994). Associations of methanotrophs with the roots and rhizomes of aquatic vegetation. Appl. Environ. Microbiol. 60, 3220-3227.

King, G. M. (1996). In Situ Analyses of Methane Oxidation Associated with the Roots and Rhizomes of a Bur Reed, *Sparganium eurycarpum*, in a Maine Wetland. Appl. Environ. Microbiol. 62, 4548 - 4555.

King, G. M., Roslev, P., Skovgaard, H. (1990). Distribution and Rate of Methane Oxidation in Sediments of the Florida Everglades. Appl. Environ. Microbiol. 56, 2902-2911.

Knief, C., Altendorf, K., Lipski, A. (2003). Linking autotrophic activity in environmental samples with specific bacterial taxa by detection of ^{13}C-labelled fatty acids. Environmental Microbiology 5, 1155 - 1167.

Knief, C., Kolb, S., Bodelier, P. L. E., Lipski, A., Dunfield, P. F. (2006). The active methanotrophic community in hydromorphic soils changes in response to changing methane concentration. Environmental Microbiology 8, 321-333.

Knivett, V. A., Cullen, J. (1965). Some factors affecting cyclopropane acid formation in *Escherichia coli*. Biochem. J. 96, 771-776.

Knoblauch, C. (1994). Bodenkundlich-mikrobiologische Bestandsaufnahme zur Methanoxidation in einer Flussmarsch der Tide-Elbe. Diplomarbeit. Universität Hamburg, Institut für Allgemeine Botanik.

Knoblauch, C., Jorgensen, B. B. (1999). Effect of temperature on sulphate reduction, growth rate and growth yield in five psychrophilic sulphate-reducing bacteria from Arctic sediments. Environmental Microbiology 1, 457-467.

Kobabe, S. (2001). Vergleichende Untersuchungen zu den Methanflüssen verschiedener arktischer Habitate des Lenadeltas / Laptevsee. Diplomarbeit, Universität Hamburg.

Kobabe, S. (2005). Charakterisierung der mikrobiellen Lebensgemeinschaft eines sibirischen Permafrostbodens. Dissertation. Universität Potsdam.

Kobabe, S., Wagner, D., Pfeiffer, E.-M. (2004). Characterisation of microbial community composition of a Siberian tundra soil by flurescence in situ hybridisation. FEMS Microbiology Ecology 50, 13-23.

Koenneke, M., Widdel, F. (2003). Effect of growth temperature on cellular fatty acids in sulphate-reducing bacteria. Environmental Microbiology 5, 1064 - 1070.

Kroppenstedt, R. (1985). Fatty acid and menaquinone analysis of actinomycetes and related organisms. In: Goodfellow, M., Minnikin, D. (eds.): Chemical Methods in Bacterial Systematics. Academic Press, London, 173-199.

Krueger, M., Frenzel, P., Conrad, R. (2001). Microbial processes influencing methane emission from rice fields. Global Change Biology 7, 49 - 63.

Krumholz, L. R., Hollenback, J. L., Roskes, S. J., Ringelberg, D. B. (1995). Methanogenesis and methanotrophy within a Sphagnum peatland. FEMS Microbiology Ecology 18, 215-224.

Kutzbach, L. (2005). The exchange of energy, water and carbon dioxide between wet tundra and the atmosphere at the Lena River Delta, northern Siberia. Dissertation. Universität Hamburg.

Kutzbach, L., Wagner, D., Pfeiffer, E.-M. (2004). Effect of microrelief and vegetation on methane emission from wet polygonal tundra, Lena Delta, Northern Siberia. Biogeochemistry 69, 341-362.

Lechevalier, H., Lechevalier, M. P. (1998). Chemotaxonomic use of lipids - an overview. In: Radledge, C., Wilkinson, S.G. (eds.): Microbial Lipids. Academic Press, London, 869-902.

Lechevalier, M. P. (1977). Lipids in Bacterial Taxonomy - Taxonomists View. CRC Critical Reviews in Microbiology 5, 109-210.

Lelieveld, J. (2006). A nasty surprise in the greenhouse. Nature 443, 405-406.

Liebner, S., Wagner, D. (2006). Abundance, distribution and potential activity of methane oxidizing bacteria in permafrost soils from the Lena Delta, Siberia. doi:10.1111/j.1462-2920.2006.01120.x. Environmental Microbiology (Online Veröffentlichung).

Lin, J.-L., Radajewski, S., Eshinimaev, B. T., Trotsenko, Y. A., McDonald, I. R., Murrell, J. C. (2004). Molecular diversity of methanotrophs in Transbaikal soda lake sediments and identification of potentially active populations by stable isotope probing. Environmental Microbiology 6, 1049-1060.

Lombardi, J. E., Epp, M. A., Chanton, J. P. (1997). Investigation of the methyl fluoride technique for determining rhizospheric methane oxidation. Biogeochemistry 36, 153 - 172.

Lowe, D. C. (2006). A green source of surprise. Nature 439, 148-149.

Macalady, J. L., McMillan, A. M. S., Dickens, A. F., Tyler, S. C., Scow, K. M. (2002). Population dynamics of type I and II methanotrophic bacteria in rice soils. Environmental Microbiology 4, 148 - 157.

Mancinelli, R. L. (1995). The regulation of methane oxidation in soil. Annual Reviews of Microbiology 49, 581-605.

Martens, C. S., Blair, N. E., Green, C. D., Des Marais, D. J. (1986). Seasonal variations in the stable carbon isotopic signature of biogenic methane in a coastal sediment. Science 233, 1300-1303.

Maxfield, P. J., Hornibrook, E. R. C., Evershed, R. P. (2006). Estimating High-Affinity Methanotrophic Bacterial Biomass, Growth, and Turnover in Soil by Phospholipid Fatty Acid ^{13}C Labeling. Appl. Environ. Microbiol. *72*, 3901-3907.

McDonald, I. R., Radajewski, S., Murrell, J. C. (2005). Stable isotope probing of nucleic acids in methanotrophs and methylotrophs: A review. Organic Geochemistry 36, 779-787.

McKinley, V. L., Peacock, A. D., White, D. C. (2005). Microbial community PLFA and PHB responses to ecosystem restoration in tallgrass prairie soils. Soil Biology and Biochemistry 37, 1946-1958.

Michaelis, W., Seifert, R., Nauhaus, K., Treude, T., Thiel, V., Blumenberg, M., Knittel, K., Gieseke, A., Peterknecht, K., Pape, T. Boetius, A., Amann, R., Jorgensen, B.B., Widdel, F., Peckmann, J., Pimenov, N.V., Gulin, M.B., (2002). Microbial Reefs in the Black Sea Fueled by Anaerobic Oxidation of Methane. Science 297, 1013 - 1015.

Miller, D. N., Yavitt, J. B., Madsen, E. L., Ghiorse, W. C. (2004). Methanotrophic Activity, Abundance, and Diversity in Forest Swamp Pools: Spatiotemporal Dynamics and Influences on Meethane Fluxes. Geomicrobiology Journal 21, 257-271.

Mohanty, S. R., Bodelier, P. L. E., Floris, V., Conrad, R. (2006). Differential Effects of Nitrogenous Fertilizers on Methane-Consuming Microbes in Rice Field and Forest Soils. Appl. Environ. Microbiol. 72, 1346-1354.

Moosavi, S. C., Crill, P. M. (1998). CH_4 oxidation by tundra wetlands as measured by a selective inhibitor technique. Journal of Geophysical Research 103, 29093 - 29106.

Morris, S. A., Radajewski, S., Willison, T. W., Murrell, J. C. (2002). Identification of the Functionally Active Methanotroph Population in a Peat Soil Microcosm by Stable-Isotope Probing. Appl. Environ. Microbiol. 68, 1446 - 1453.

Munsell (1975). Munsell Soil Color charts. Baltimore.

Nesbit, S. P., Breitenbeck, G. A. (1992). A laboratory study of factors influencing methane uptake by soils. Agriculture, Ecosystems and Environment 41, 39-54.

Nielsen, A. K., Gerdes, K., Murrell, J. C. (1997). Copper-dependent reciprocal transcriptional regulation of methane monooxygenase genes in *Methylococcus capsulatus* and *Methylosinus trichosporium*. Molecular Microbiology 25, 399-409.

Nold, S. C., Boschker, H. T. S., Pel, R., Laanbroek, H. J. (1999). Ammonium addition inhibits ^{13}C-methane incorporation into methanotroph membrane lipids in a freshwater sediment. FEMS Microbiology Ecology 29, 81 - 89.

Norland, S., Heldal, M., Tumyr, O. (1987). On the relation between dry matter and volume of bacteria. Microbial Ecology 13, 95-101.

O'Leary, W., Wilkinson, S. (1988). Microbial Lipids. In: Radledge, C., Wilkinson, S.G. (eds.): Microbial Lipids. Academic Press, London, pp. 117-202.

Omelchenko, M. V., Vasilyeva, L. V., Zavarzin, G. A. (1993). Psychrophilic methanotroph from tundra soil. Current Microbiology 27, 255-259.

Ostroumov, V. E., Siegert, C. (1996). Exobiological aspects of mass transfer in microzones of permafrost deposits. Advances in Space Research, Proceedings of the F31, F34, F24 and F38 Symposia of COSPAR Scientific Commission F 18, 79-86.

Pfeiffer, E.-M. (1998). Methanfreisetzung aus hydromorphen Böden verschiedener naturnaher und genutzter Feuchtgebiete (Marsch, Moor, Tundra, Reisanbau). Hamburger Bodenkundliche Arbeiten, Band 37.

Pinkart, H.C., Ringelberg, D.B., Piceno, Y.M., Macnaughton, S.J., White, D.C. (2002). Biochemical Approaches to Biomass Measurements and Community Structure Analysis. In: Hurst, C.J. (Hrsg.): Manual of Environmental Microbiology. 2nd edition, ASM Press, Washington DC, 101-113.

Pombo, S. A., Kleikemper, J., Schroth, M. H., and Zeyer, J. (2005). Field-scale isotopic labeling of phosholipid fatty acids from acetate-degrading sulfate-reducing bacteria. FEMS Microbiology Ecology 51, 197-207.

Ponder, M. A., Gilmour, S. J., Bergholz, P. W., Mindock, C. A., Hollingsworth, R., Thomashow, M. F., Tiedje, J. M. (2005). Characterization of potential stress responses in ancient Siberian permafrost psychroactive bacteria. FEMS Microbiology Ecology 53, 103-115.

Popp, T. J., Chanton, J. P., Whiting, G. J., Grant, N. (1999). Methane Stable Isotope Distribution at a *Carex* Dominated Fen in North Central Alberta. Global Biogeochemical Cycles 13, 1063 - 1077.

Popp, T. J., Chanton, J. P., Whiting, G. J., Grant, N. (2000). Evaluation of methane oxidation in the rhizosphere of a *Carex* dominated fen in north central Alberta, Canada. Biogeochemistry 51, 259 - 281.

Radajewski, S., Webster, G., Reay, D. S., Morris, S. A., Ineson, P., Nedwell, D. B., Prosser, J. I., Murrell, J. C. (2002). Identification of active methylotroph populations in an acidic forest soil by stable-isotope probing. Microbiology 148, 2331 - 2342.

Ranneklev, S. B., Baath, E. (2003). Use of Phospholipid Fatty Acids To Detect Previous Self-Heating Events in Stored Peat. In: Radledge, C., Wilkinson, S.G. (eds.): Microbial Lipids. Academic Press, London,69, 3532-3539.

Reay, D. S., Nedwell, D. B., McNamara, N. (2001). Physical Determinants of Methane Oxidation Capacity in a Temperate Soil. Water, Air, and Soil Pollution: Focus 1, 401 - 414.

Reichardt, W., Mascarina, G., Padre, B., Doll, J. (1997). Microbial Communities of Continuously Cropped, Irrigated Rice Fields. Appl. Environ. Microbiol. 63, 233-238.

Reimer, P.J. (Hrsg.) (2004): Terrestrial Radiocarbon Age Calibration, 0-26 Kyr BP. Radiocarbon 46: 1029-1058.

Ren, T., Amaral, J. A., Knowles, K. (1997). The response of methane consumption by pure cultures of methanotrophic bacteria to oxygen. Canadian Journal of Microbiology 43, 925-928.

Rivkina, E. M., Friedmann, E. I., McKay, C. P., Gilichinsky, D. A. (2000). Metabolic Activity of Permafrost Bacteria below the Freezing Point. Appl. Environ. Microbiol. 66, 3230 - 3233.

Rivkina, E. M., Gilichinsky, D. A. (1996). Methane as a Paleoindicator of the Dynamics of Permafrost Deposits. Lithology and Mineral Resources 31, 396 - 399.

Romanovskii, N. N., Hubberten, H.-W., Gavrilov, A. V., Tumskoy, V. E., Kholodov, A. L. (2004). Permafrost of the east Siberian Arctic shelf and coastal lowlands. Quaternary Science Reviews, Quaternary Environments of the Eurasian North (QUEEN) 23, 1359-1369.

ROSHYDROMET (Russian Federal Service for Hydrometeorology and Environment Monitoring) (2004) Weather Information for Tiksi. http://www.worldweather.org/107/c01040.htm (World Meteorological Organization).

Roslev, P., King, G. M. (1994). Survival and Recovery of Methanotrophic Bacteria Starved under Oxic and Anoxic Conditions. Appl. Environ. Microbiol. 60, 2602 - 2608.

Roslev, P., and King, G. M. (1995). Aerobic and Anaerobic Starvation Metabolism in Methanotrophic Bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 61, 1563 - 1570.

Ross, J. L., Boon, P. I., Ford, P., Hart, B. T. (1997). Detection and Quantification with 16S rRNA Probes of Planktonic Methylotrophic Bacteria in a Floodplain Lake. Microbial Ecology 34, 97-108.

Russell, N. J. (1990). Cold adaptation of microorganisms. Phil. Trans. R. Soc. Lond. 326, 595-611.

Russell, N. J., Fukunaga, N. (1990). A comparison of thermal adaptation of membrane lipids in psychrophilic and thermophilic bacteria. FEMS Microbiology Reviews 75, 171-182.

Scheffer, F. und P. Schachtschabel (1998). Lehrbuch der Bodenkunde. 14., neu bearb. und erw. Auflage v. P. Schachtschabel, H.-P. Blume, G. Brümmer, K.H. Hartge und U. Schwertmann. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.

Schirrmeister, L., Grigoriev, M. (2004). Periglacial studies around Cape Mamontov Klyk. In: Schirrmeister, L. (Hrsg.): Russian-German Cooperation System Laptev Sea: The Expedition Lena-Anabar 2003. Berichte zur Polar- und Meeresforschung 489.

Shi, T., Reeves, R. H., Gilichinsky, D. A., Friedmann, E. I. (1997). Characterization of Viable Bacteria from Siberian Permafrost by 16S rDNA Sequencing. Microbial Ecology 33, 169 - 179.

Soil Survey Staff (2003). Keys to Soil Taxonomy. 9th edition. United States Department of Agriculture, Natural Resources Conservation Service, Washington, D.C.

Stuiver, M., Polach, H. A. (1977). Discussion: Reporting of ^{14}C Data. Radiocarbon 19, 355-363.

Sundh, I., Bastviken, D., Tranvik, L. J. (2005). Abundance, Activity, and Community Structure of Pelagic Methane-Oxidizing Bacteria in Temperate Lakes. Appl. Environ. Microbiol. 71, 6746-6752.

Sundh, I., Borga, P., Nilsson, M., Svensson, B. (1995). Estimation of cell numbers of methanotrophic bacteria in boreal peatlands based on analysis of specific phospholipid fatty acids. FEMS Microbiology Ecology 18, 103 - 112.

Sundh, I., Nilsson, M., Granberg, G., Svensson, B. H. (1994). Depth distribution of microbial production and oxidation of methane in northern boreal peatlands. Microbial Ecology 27, 253-265.

Svendsen, J. I., Alexanderson, H., Astakhov, V. I., Demidov, I., Dowdeswell, J. A., Funder, S., Gataullin, V., Henriksen, M., Hjort, C., Houmark-Nielsen, M. (2004). Late

Quaternary ice sheet history of northern Eurasia. Quaternary Science Reviews 23, 1229-1271.

Tsubota, J., Eshinimaev, B. T., Khmelenina, V. N., Trotsenko, Y. A. (2005). Methylothermus thermalis gen. nov., sp. nov., a novel moderately thermophilic obligate methanotroph from a hot spring in Japan. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55, 1877-1884.

Van der Nat, F.-J. W. A., Middelburg, J. J. (1998). Effects of two common macrophytes on methane dynamics in freshwater sediments. Biogeochemistry 43, 79-104.

VDLUFA (Hrsg.) (1991). Methodenbuch, Bd. 1. Die Untersuchung von Böden. 4. Auflage, VDLUFA-Verlag, Darmstadt.

Vecherskaya, M. S., Galchenko, V. F., Sokolova, E. N., Samarkin, V. A. (1993). Activity and Species Composition of Aerobic Methanotrophic Communities in Tundra Soils. Current Microbiology 27, 181 - 184.

Vishnivetskaya, T., Kathariou, S., McGrath, J., Gilichinsky, D., Tiedje, J. M. (2000). Low-temperature Recovery Strategies for the Isolation of Bacteria from Ancient Permafrost Sediments. Extremophiles 4, 165 - 173.

Vorobyova, E., Soina, V., Gorlenko, M., Minkovskaya, N., Zalinova, N., Mamukelashvili, A., Gilichinsky, D. A., Rivkina, E. M., Vishnivetskaya, T. (1997). The deep cold biosphere: facts and hypothesis. FEMS Microbiology Reviews 20, 277 - 290.

Wagner, D. (1998). Einfluss von Temperatur, Sauerstoff und organischer Substanz auf die Methanogenese in hydromorphen Böden. Dissertation. Universität Hamburg.

Wagner, D., Kobabe, S., Pfeiffer, E.-M., Hubberten, H.-W. (2003). Microbial Controls on Methane Fluxes from a Polygonal Tundra of the Lena Delta, Siberia. Permafrost and Periglacial Processes 14, 173-185.

Wagner, D., Lipski, A., Embacher, A., Gattinger, A. (2005). Methane fluxes in permafrost habitats of the Lena Delta: effects of microbial community structure and organic matter quality. Environmental Microbiology 7, 1582-1592.

Wagner, M., Nielsen, P. H., Loy, A., Nielsen, J. L., Daims, H. (2006). Linking microbial community structure with function: fluorescence in situ hybridization-microautoradiography and isotope arrays. Current Opinion in Biotechnology 17, 83-91.

Wartiainen, I., Hestness, A. G., McDonald, I. R., Svenning, M. M. (2006a). *Methylobacter tundripaludum* sp. nov., a methane-oxidizing bacterium from Arctic wetland soil on the Svalbard islands, Norway (78° N). Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56, 109-113.

Wartiainen, I., Hestness, A. G., McDonald, I. R., Svenning, M. M. (2006b). *Methylocystis rosea* sp. nov., a novel methanotrophic bacterium from Arctic wetland soil, Svalbard, Norway (78° N). Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56, 541-547.

Washburn, A.L. (1979). Geocryology. A Survey of Periglacial Processes and Environments. Arnold, London.

Whittenbury, R., Phillips, K.C., Wilkinson, J.F. (1970). Enrichment, isolation and some properties of methane-utilizing bacteria. J. General Microbiol. 61, 205-218.

Whalen, S. C. (2005). Biogeochemistry of Methan Exchange between Natural Wetlands and the Atmosphere. Environmental Engineering Science 22, 73-93.

Whalen, S. C., Reeburgh, W. S. (1996). Moisture and temperature sensitivity of CH_4 oxidation in boreal soils. Soil Biol & Biochem 28, 1271-1281.

Whalen, S. C., Reeburgh, W. S. (2000). Methane oxidation, production and emission at contrasting sites in a boreal peat. Geomicrobiology Journal 17, 237-251.

Whalen, S. C., Reeburgh, W. S., Sandbeck, K. A. (1990). Rapid Methane Oxidation in a Landfill Cover Soil. Appl. Environ. Microbiol. 56, 3405-3411.

White, D., Stair, J., Ringelberg, D. (1996). Quantitative comparisons of *in situ* microbial biodiversity by signature biomarker analysis. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 17, 185-196.

White, D. C., Davis, W. M., Nickels, J. S., King, J. D., Bobbie, R. J. (1979). Determination of the sedimentary microbial biomass by extractible lipid phosphate. Oecologia 40, 51-62.

Whiteley, A. S., Manefield, M., Lueders, T. (2006). Unlocking the 'microbial black box' using RNA-based stable isotope probing technologies. Current Opinion in Biotechnology 17, 67-71.

Whiticar, M. J., Faber, E., Schoell, M. (1986). Biogenic methane formation in marine and freshwater environments: CO_2 reduction vs acetate fermentation -- Isotope evidence. Geochimica et Cosmochimica Acta 50, 693-709.

Wise, M., McArthur, J., Shimkets, L. (2001). *Methylosarcina fibrata* gen. nov., sp. nov. and *Methylosarcina quisquiliarum* sp. nov., novel type I methanotrophs. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51, 611-621.

Wuebbles, D. J., Hayhoe, K. (2002). Atmospheric methane and global change. Earth-Science Reviews 57, 177-210.

Yershov, E.D. (1998). General Geocryology. Studies in Polar Research. Cambridge University Press, Cambridge.

Zelles, L. (1999). Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review. Biol. Fertil.Soils 29, 111-129.

Zhang, T., Barry, R. G., Knowles, K. (1999). Statistics And Characteristics of Permafrost and Ground-Ice Distribution In The Northern Hemisphere. Polar Geography 23, 132-154.

Zhuang, Q., Melillo, J. M., Kicklighter, D. W., Prinn, R. G., McGuire, A. D., Steudler, P. A., Felzer, B. S., Hu, S. (2004). Methane fluxes between terrestrial ecosystems and the atmosphere at northern high latitudes during the past century: A retrospective analysis with a process-based biogeochemistry model. Global Biogeochemical Cycles 18, GB3010, doi:3010.1029/2004GB002239