

Charakterisierung Ammoniak oxidierender Mikroorganismen in Böden kalter und gemäßigter Klimate und ihre Bedeutung für den globalen Stickstoffkreislauf



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften im Fachbereich
Geowissenschaften der Universität Hamburg

vorgelegt von

Tina Sanders

aus

Oldenburg

Hamburg

2011

Als Dissertation angenommen vom Fachbereich Geowissenschaften der Universität Hamburg.

Aufgrund der Gutachten von

Prof. Dr. Eva-Maria Pfeiffer

PD Dr. Eva Spieck

Betreut durch Dr. Claudia Fiencke

Hamburg, den 29.6.2011

Prof. Dr. Oßenbrügge
Leiter des Fachbereichs Geowissenschaften

Titelbild: Aufnahme der polygonalen Tundra der Insel Samoylov. Eingelassen ist eine TEM-Aufnahme eines aus Sibirien angereicherten *Nitrosospira*-ähnlichen Bakteriums

INHALT

<i>Inhalt</i>	III
<i>Zusammenfassung</i>	VII
<i>Abstract</i>	X
<i>Abkürzungen</i>	XIII
<i>Abbildungen</i>	XIV
<i>Tabellen</i>	XVI
1 Einleitung und Zielsetzung	1
2 Grundlagen	3
2.1 Die Bedeutung des Stickstoffkreislaufs.....	3
2.2 Die Nitrifikation - Ein Schlüsselprozess im Stickstoffkreislauf.....	5
2.2.1 Verbreitung Ammoniak oxidierender Bakterien.....	6
2.2.2 Verbreitung Ammoniak oxidierender Archaeen	8
2.2.3 Physiologie Ammoniak oxidierender Mikroorganismen	9
2.2.4 Bedeutung Ammoniak oxidierender Mikroorganismen	10
2.3 Psychrophile and psychrotolerante Bakterien.....	11
2.4 Grundlagen der methodischen Ansätze.....	13
2.4.1 Bodenklassifikation nach der US Soil Taxonomy.....	13
2.4.2 Charakterisierung der Ammoniak oxidierenden Mikroorganismen (AOM).....	14
2.4.3 Nachweis von nitrifizierenden Mikroorganismen.....	14
2.4.4 Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (DGGE)	14
2.4.5 Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung (FISH) und Immunofluoreszenz (IF).....	15
2.4.6 Reverse Transkriptase RCR.....	16
3. Beschreibung der Untersuchungsgebiete	17
3.1. Untersuchungsgebiet im kalten Klimat – die Insel Samoylov im Lena-Delta	17
3.2. Untersuchungsgebiet im gemäßigten Klimat – Hahnheide bei Hamburg	22
4 Material und Methoden	24
4.1 Probenahme und bodenkundliche Standortaufnahme.....	24
4.2 Herkunft der verwendeten Anreicherungskulturen.....	26
4.3 Bodenchemische und –physikalische Laboruntersuchungen	27
4.4 Quantifizierung von gelösten Stickstoffverbindungen in Böden	28
4.4.1 Ammoniumbestimmungen	28
4.4.2 Nitrit- und Nitratbestimmung	29
4.4.3 Bestimmung der gelösten organischen Stickstoffverbindungen (DON).....	31
4.5 Nährmedien.....	32
4.6 Nachweis von mikrobiellen N-Umsetzungen in Böden	33

4.6.1 Bestimmung der potentiellen Nitrifikation	33
4.6.2 Bestimmung der potentiellen Mineralisationsaktivitäten.....	34
4.6.3 Bestimmungen der Temperaturoptima der Nitrifikation	36
4.6.4 Quantifizierung von nitrifizierenden Mikroorganismen mittels MPN	36
4.7 Kulturführungen von Anreicherungen und Reinkulturen	37
4.7.1. Anreicherung von Ammoniak oxidierenden Mikroorganismen (AOM)	37
4.7.2. Kulturführung von Reinkulturen	38
4.7.3 Reinheitstest der Anreicherungs- und Reinkulturen	38
4.8 Mikroskopische Verfahren	40
4.9. Molekularbiologische Methoden	41
4.9.1 DNA Extraktion	41
4.9.2 Polymerasenkettenreaktion (PCR)	41
4.9.3 Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (DGGE)	44
4.9.4 RNA Isolation und Reverse Transkriptase (RT) PCR Anwendungen	46
4.9.5 Klonierung	47
4.9.6 Sequenzanalysen und Stammbäume	50
4.10 Statistische Verfahren	50
5. Ergebnisse.....	51
5.1. Bodenkundliche Charakterisierung der untersuchten Permafrostböden	51
5.1.1 Böden der Flussterrasse	51
5.1.2 Böden der jüngeren Überflutungsebene	60
5.1.3 Beschreibung des untersuchten Permafrostaufschlusses am Kliff	65
5.2 Bodenkundliche Charakterisierung der Vergleichsböden im gemäßigten Klimat.....	68
5.3 Gelöste anorganische Stickstoffverbindungen (DIN)	71
5.3.1 DIN in den kalten Klimaten	71
5.3.2 DIN-Gehalte in den Böden der gemäßigten Klimaten	75
5.4. Mineralisation	76
5.4.1 Bestimmung der Mineralisationsraten	76
5.4.2 Mineralisation im Mikrokosmos Ansatz	78
5.5 Potentielle Nitrifikation	80
5.5.1 Gesamte potentielle Nitrifikation in den Böden der kalten Klimaten.....	80
5.5.2 Archaeale potentielle Nitrifikation in den Böden der kalten Klimate	84
5.5.3 Temperaturabhängige potentielle Ammoniakoxidation	85
5.5.4 Potentielle Nitrifikationsaktivität im gemäßigten Klimat	87
5.6 Quantifizierungen von Nitrifikanten	88
5.7. Molekularbiologische Befunde	93
5.7.1. Diversität des bakteriellen und archaealen 16S-rRNA-Gens	93
5.7.2 Nachweis AOB und AOA mittels der Ammoniakmonooxygenase (AMO)	99

5.8 DGGE Analysen der Anreicherungskulturen.....	100
5.8.1 Anreicherungen bei 4 °C.....	100
5.8.2 Anreicherungen bei 10 °C.....	105
5.8.3 Anreicherungen bei 28 °C.....	106
5.9 Taxonomie der untersuchten Ammoniak oxidierenden Mikroorganismen (AOM).....	107
5.9.1 Taxonomie der AOB.....	109
5.9.2 Taxonomie der AOA.....	111
5.10 Charakterisierungen der Anreicherungskulturen.....	113
5.10.1 Morphologische Eigenschaften der Anreicherungskulturen.....	113
5.10.2 Lichtmikroskopische Untersuchungen der Anreicherungskulturen	116
5.10.3 Temperaturanpassung als physiologische Eigenschaft der AOM.....	121
5.11 Zusammenfassender Überblick der Ergebnisse	123
6. Diskussion.....	126
6.1 Permafrostböden und die Prozesse des Stickstoffkreislaufes	126
6.1.1 Stickstoffumsätze aufgrund kleinräumige Variabilität der Böden Samoylovs	126
6.1.2 Verteilung der gelösten anorganischen Stickstoffverbindungen (DIN).....	127
6.1.3 N-Limitierung in den Permafrostböden	129
6.1.4 Die Prozesse im Küstenaufschluss am Samoylov-Kliff.....	130
6.2 Die mikrobielle Diversität in den Permafrostböden	132
6.2.1 Diversität in Permafrostböden.....	133
6.2.3 Unterscheidung AOB und AOA.....	135
6.2.4 Wer ist wann aktiv? Die Bewertung der RT PCR Ergebnisse.....	135
6.3 Temperaturanpassung	138
6.4 Möglicher Einfluss des Klimawandels auf die Stickstoffumsetzung	139
7. Schlussbetrachtung und Ausblick.....	142
Literatur	144
Veröffentlichungen	156
Dank.....

ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Ammoniak oxidierende Mikroorganismen (AOM) in Permafrostböden der Tundra Nordostsibiriens und in Böden eines Vergleichsstandortes in gemäßigten Klimaten in der Nähe von Hamburg untersucht. Die Analysen des Prozesses der Nitrifikation und der daran beteiligten Ammoniak oxidierenden Bakterien (AOB) und Archaeen (AOA) geben Hinweise auf die Abläufe des Stickstoffkreislaufes in den verschiedenen Permafrostböden der kalten Klimate und dem Vergleichsstandort in den gemäßigten Klimaten.

Während zweier Expeditionen (2007, 2008) auf die Insel Samoylov im Lena-Delta wurden die sommerliche Auftauschicht (active layer) der Böden der unterschiedlichen geomorphologischen Einheiten der Insel Samoylov im Lena-Delta charakterisiert und beprobt. Zu diesen geomorphologischen Einheiten gehörten die, durch polygonale Tundra geprägte, höher gelegene Flussterrasse und die jüngere mit Pioniervegetation bewachsene Überflutungsebene. Polygone sind durch Tau- und Gefrierprozesse entstandene Landschaftseinheiten, die ein eigenes Mikorelief aufweisen. Drei Untersuchungsstandorte lagen auf der Flussterrasse: Der Polygonwall und das Polygonzentrum sowie der trockenere versandete Bereich im Süden der Insel; zwei weitere Standorte befanden in der Überflutungsebene, einer mit und einer ohne Vegetation. Die untersuchten Böden tauten im Sommer für ca. drei Monate 30 - 70 cm tief auf, darunter folgen 400 - 600 Meter mächtiger Permafrost. Zusätzlich wurde an einem Küstenaufschluss am südlichen Kliff der Insel auch der Übergang vom active layer in den dauerhaft gefrorenen Untergrund von der Geländeoberfläche bis in eine Tiefe von etwa 5 m untersucht.

Die Böden dieser geomorphologischen Einheiten zeigten deutliche Unterschiede hinsichtlich ihre Gehalte an organischer Substanz, ihrer C/N-Verhältnisse oder ihrer Wassergehalte. Die Böden lassen sich in der polygonalen Tundra als *Typic Aquiturbel* im Polygonwall und *Typic Historthel* im Polygonzentrum klassifizieren. Die Böden auf der trockenen Flussterrasse und der Überflutungsebene wurden als *Typic Psammenorthel* und am Strand als *Psammentic Aquorthel* typisiert. Die Einteilung erfolgte dabei nach der US Soil Taxonomy (2006).

Die Verteilung an gelösten anorganischen Stickstoffverbindungen (DIN) über die Vegetationsperiode sowie die N-Mineralisationsraten und die potentielle Nitrifikation ergaben Hinweise auf die Funktionsweise des Stickstoffkreislaufes im Untersuchungsgebiet. Die DIN wurden generell nur in geringen Mengen nachgewiesen. In den Böden ohne Vegetationsbedeckung wurde jedoch Nitrat am Ende der

Vegetationsperiode stark angereichert, da es zu diesem Zeitpunkt nicht mehr umgehend von Pflanzen aufgenommen wurde. Sowohl die DIN als auch die Mineralisationsraten und die potentielle Nitrifikation variieren kleinräumig. Die gelösten anorganischen N-Gehalte und die Raten sind abhängig vom Gehalt der Böden an organischer Substanz, vom pH-Wert, von der Bodentemperatur und der Bedeckung der Böden mit Vegetation. Die Prozesse in den unterschiedlichen geomorphologischen Einheiten mit Vegetationsbedeckung können als Stickstoff-limitiert bezeichnet werden.

Die potentielle Nitrifikation war in den trockenen sandigen *Typic Psammenorthel* und *Psammentic Aquorthel* der Überflutungsebene und trockenen Flussterrasse am höchsten mit bis zu $600 \text{ ng N g}^{-1} \text{ TS h}^{-1}$ und korrelierte positiv mit der Inkubationstemperatur. In der organikreichen polygonalen Tundra wurde potentielle Nitrifikation nur in dem, im Gegensatz zum Zentrum, relativ trockenen Polygonwall in einer Tiefe von 5 bis 15 cm und in den organischen Auflagen nachgewiesen. Sie war aber deutlich geringer als in den anderen sandigen Böden mit durchschnittlich ca. $100 \text{ ng N g}^{-1} \text{ TS h}^{-1}$.

Die höchste potentielle Nitrifikation und Anreicherung an Nitrat wurde im Strand ohne Vegetationsbedeckung gemessen. An diesem Standort ohne Vegetation ist der Stickstoff kein limitierender Faktor, da die mikrobiellen Organismengemeinschaften nicht mit der Vegetation in Konkurrenz um Nährstoffe stehen.

Der Küstenaufschluss am Samoylov-Kliff im Südwesten der Insel wurde sowohl in der Auftauschicht als auch in tieferen gefrorenen Horizonten bis in eine Tiefe von fast 5 m untersucht. Potentielle Ammoniakoxidation wurde vor allem im tiefer liegenden Permafrost ab 2,3 m unter der Geländeoberfläche bis in eine Tiefe von 4,7 m nachgewiesen. Die potentielle Nitrifikation nahm mit der Tiefe zu und korrelierte positiv mit dem ansteigenden Tongehalt und dem steigenden pH-Wert von schwach sauer zu neutral.

Die Diversität der Ammoniak oxidierenden Mikroorganismen war auf Gattungsebene sehr gering. Die Gattung *Nitrosospira* - als ein Ammoniak oxidierendes Bakterium (AOB) - dominiert in den Böden der kalten Klimate (Samoylov). In allen Böden, mit Ausnahme des Polygonzentrums, konnten *Nitrosospira*-ähnliche Bakterien über das Gen der Ammoniakmonooxygenase (*amoA*) nachgewiesen werden. Außerdem waren in allen Ammoniak oxidierenden Anreicherungskulturen *Nitrosospira*-ähnliche Bakterien dominant. Die angereicherten *Nitrosospira*-ähnlichen Bakterien fallen in die Cluster 0, 2 und 3, in denen vor allem *Nitrosospira* aus Böden zu finden sind. Innerhalb der Gattung

Nitrosospira ist die Diversität somit relativ hoch, da insgesamt mindestens 4 verschiedenen *Nitrosospira*-ähnliche Bakterien angereichert werden konnten.

Das Temperaturoptimum der untersuchten *Nitrosospira*-ähnlichen Bakterien liegt zwischen 22 °C und 26 °C, das Maximum nicht höher als 35 °C. Das Minimum ist unterhalb von 4 °C. Diese *Nitrosospira*-ähnlichen Bakterien können als psychrotolerant, aber nicht als psychrophil bezeichnet werden. Die Morphologie der *Nitrosospira*-ähnlichen Bakterien reicht von kurzen Stäbchen bis zu deutlichen Spirillen. Die Zellen sind zwischen 1,5 bis 1,8 µm lang.

In den Böden und Sedimenten der jungen Überflutungsebene, der trockenen Flussterrasse und des Samoylov-Kliffs wurden neben den AOB auch Ammoniak oxidierende Archaeen (AOA) nachgewiesen. Eine messbare potentielle Ammoniakoxidation der AOA wurde aber nur in den Strandsedimenten ermittelt. Die AOA aus Sibirien liegen im phylogenetischen Stammbaum im Cluster 1.1b, in dem hauptsächlich Vertreter aus Böden zu finden sind. Eine Anreicherung der AOA gelang nur gemeinsam mit AOB, da die Anreicherungsbedingungen wahrscheinlich das Wachstum der AOB bevorzugte.

Im Vergleichsstandort mit gemäßigten Klima, einem Auengley in der Hahnheide, konnten AOA als dominierende Ammoniakoxidanten nachgewiesen und ein Stamm angereichert werden. Auch dieses angereicherte AOA gehört phylogenetisch in den Cluster 1.1b. Bei den Zellen der angereicherten AOA handelt es sich um sehr kleine Kokken mit einem Durchmesser von 0,5 bis 0,7 µm. Ihr Temperaturoptimum liegt über 25 °C.

Mit der vorliegenden Promotionsarbeit konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zu gemäßigten Klimaten die AOB gegenüber den AOA in den untersuchten Permafrostböden dominieren. Dies ergibt sich aus der besseren Anpassung an die tiefen Temperaturen und an die schwach sauren bis neutralen pH-Werte

ABSTRACT

In the context of this thesis, ammonia oxidizing microorganisms (AOM) were investigated in permafrost affected soils of the northeast Siberian tundra and in the soils of a reference area in the moderate climate near Hamburg. The analysis of the nitrification process and the involved ammonia oxidizing bacteria (AOB) and archaea (AOA) gives insight into the procedures of the nitrogen cycle in different permafrost affected soils in cold climate and in the reference area in moderate climate.

During two expeditions (2007, 2008) the thawed active layer of the soils of the different geomorphologic units of Samoylov Island in the Lena River delta were characterized and soil samples were taken. The geomorphologic units were a higher situated river terrace characterized by the polygonal tundra and a younger floodplain overgrown by pioneer vegetation. Polygons are landscape units evolved by thawing and freezing processes, which have an own micro relief. The river terrace consisted of three sites: The polygon rim, the polygon center and the dryer silted area in the south of the island; two further sites were located in the floodplain, one with and one without vegetation. The investigated soils have been thawing in the summer for approx. 3 months to a depth of 30 to 70 cm, underneath followed by 400 to 600 meters of permafrost. Additional on an outcrop on the southern cliff of the island the transition zone from the active layer to the permafrost was investigated from the surface to a depth of 5 meters.

The soils of the geomorphologic units showed significant differences concerning e.g. the content of organic matter, the C/N ratios and the water content. The soils were characterized in the polygonal tundra as *Typic Aquiturbel* in the polygon rim and *Typic Historthel* in the polygon center. The soils of the dry river terrace and the vegetation covered floodplain were characterized as *Typic Psammorthel* and on the beach as *Psammentic Aquorthel*. The classification was made using the US Soil Taxonomy (2006).

The distribution of the dissolved inorganic nitrogen (DIN) in the vegetation period as well as the N-mineralization rates and the potential nitrification, gave insight into the ongoing N-cycle in the investigation site. DIN was generally only detected in small amounts. However, in the soils without vegetation cover nitrate was enriched at the end of the vegetation period, due to a lacking uptake by plants. The DIN as well as the N-mineralization and potential nitrification varied on a small-scale. The amounts of dissolved inorganic nitrogen and the nitrification rates depended on content of organic matter, pH value, temperature and vegetation coverage. The processes in the different geomorphologic units can be characterized as nitrogen limited.

The potential nitrification was highest in the dry sandy *Typic Psammenorthel* and *Psammentic Aquorthel* of the floodplain and the dry river terrace up to $600 \text{ ng N g}^{-1} \text{ TS h}^{-1}$. It is correlated positive to the incubation temperature. In the organic rich polygonal tundra, potential nitrification was only detected in the comparably dry polygon rim in a depth of 5 to 15 cm and in the upper organic layer. Nevertheless, it was significantly lower than in the other sandy soils in an average of $100 \text{ ng N g}^{-1} \text{ TS h}^{-1}$.

The highest potential nitrification and enrichment of nitrate was determined on the beach without vegetation cover. Here, nitrogen was not a limiting factor, since the microbial processes were not competing on nutrients with the vegetation.

In the outcrop on Samoylov Cliff in the southwest of the island, the active layer as well as in deeper frozen horizon up to a depth of up to 5 m were investigated. Potential ammonia oxidation was measured mainly in the deeper sediment at 2.3 m below the surface down to the permafrost sample in 4.7 m. The potential nitrification correlated positively with increasing depth, clay content and a pH value ranging from slightly acid to neutral.

The diversity of ammonia oxidizing microorganisms was low with respect to the genera. The genus *Nitrosospira* –as ammonia oxidizing bacteria (AOB) – dominated in the cold climate on Samoylov Island. In all soils except for the polygon center, the existence of *Nitrosospira*-like bacteria was proven by the amplification of the ammoniamonooxygenase (*amoA*) gene sequence. In addition, in all ammonia oxidizing enrichment cultures *Nitrosospira*-like bacteria were found. The enriched bacteria belonged to the phylogenetic cluster 0, 2 and 3, which are predominated by soil derived *Nitrosospira*. Within the genus *Nitrosospira* the diversity of detected species was relatively high. At least four different *Nitrosospira*-like bacteria were enriched.

The temperature optimum of the *Nitrosospira*-like bacteria ranged between $22 \text{ }^{\circ}\text{C}$ and $26 \text{ }^{\circ}\text{C}$. The maximum was not higher than $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$ and the minimum below $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. These *Nitrosospira*-like bacteria can therefore be classified as psychrotolerant but not psychrophil. The morphology of these bacteria included short rods and spirilla with a length of 1.5 to 1.8 μm .

In the soils and sediments of the young floodplain, of the dry river terrace and of the Samoylov cliff, Ammonia oxidizing archaea were detected in addition to AOB. Potential ammonia oxidation of the AOA was only measurable in the beach sediments. The AOA of Siberia belongs to the phylogenetic cluster 1.1b of the Crenarchaeota, where mainly soil derived representatives were found. An enrichment of AOA was only successful together with AOB, because in enrichment conditions potential enhance the growth of AOB.

Reference area in moderate climate was the river floodplain gley of the Hahnheide near Hamburg. Here ammonia oxidizing archaea were detected as the predominating ammonia

oxidizer and enriched. This enriched AOA also belongs to the phylogenetic cluster 1.1b. The cells of the enriched AOA were very small cocci with a diameter of 0.5 μm . The temperature optimum was above 25°C.

The present thesis shows that in the permafrost affected soils of the Samoylov Island, the predominating ammonia oxidizers were AOB and not AOA, which dominate in comparable soils of moderate climates. This is essentially due to a better adaptation of AOB to the low temperatures as well as the slightly acid to neutral pH-value of the permafrost affected soils.

ABKÜRZUNGEN

AMO	Ammoniakmonooxygenase
amoA	Untereinheit A der Ammoniakmonooxygenase
Amox	Ammoniakoxidanten
AOA	Ammoniak oxidierende Archaeen
AOB	Ammoniak oxidierende Bakterien
AOM	Ammoniak oxidierende Mikroorganismen
APS	Ammoniumpersulfat
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	komplimentäre DNA; Entstehung durch reversen Transkriptase von RNA
C _{org}	Organischer Kohlenstoff
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DGGE	Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese
DIN	Gelöste anorganische Stickstoffverbindungen (Dissolved inorganic nitrogen)
DNRA	Dissimilatorische Nitratassimilation
dNTP	Nukleosidtriphosphate
DOC	Gelöster organischer Kohlenstoff (<u>D</u> issolved <u>o</u> rganic <u>c</u> arbon)
DON	Gelöste organische Stickstoffverbindungen (<u>D</u> issolved <u>o</u> rganic <u>n</u> itrogen)
EM	Elektronenmikroskopie
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FISH	Fluoreszenz <i>in-situ</i> Hybridisierung
GOF	Geländeoberfläche
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IF	Immunofluoreszenz
MPN	Most Probable Number
NEDA	N-(1-Naphtyl)-ethylen-diammoniumchlorid
Niox	Nitritoxidanten
NOB	Nitrit oxidierende Bakterien
OD	Optische Dichte
OPA	Ortho-Phthaldialdehyd
PCR	Polymerasen Kettenreaktion
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Analyse
RT PCR	Reverse Transkriptase PCR
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBAHS	Tetrabutylammoniumhydrogensulfat
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	N,N,N",N"-Tetramethylethylendiamin
TGGE	Temperierende Gradienten Gelelektrophorese
TS	Trockensubstanz
WRB	World Reference Base

ABBILDUNGEN

<i>Abb. 2.1 Schematische Darstellung des Stickstoffkreislaufes.</i>	3
<i>Abb. 2.2 Vergleichende Raten der Netto N-Mineralisation in verschiedenen Klimaten.</i>	4
<i>Abb. 2.3 16S rRNA Gen basierender phylogenetischer Baum.</i>	7
<i>Abb. 2.4 Schema zur Klassifikation der Permafrostböden nach der US Soil Taxonomy</i>	13
<i>Abb. 3.1 Lage des Untersuchungsgebiets in der Zone des kontinuierlichen Permafrostes.</i>	17
<i>Abb. 3.2 Lage des Untersuchungsgebietes im Lena-Delta</i>	18
<i>Abb. 3.3 Klimadiagramm für Tiksi für die Jahre 1961-1990 und 1999-2009</i>	19
<i>Abb. 3.4 Luftbild der Eiskeil-Polygon-Landschaft auf Samoylov.</i>	20
<i>Abb. 3.5 Orthorektifiziertes Luftbild der Insel Samoylov.</i>	21
<i>Abb. 3.6 Lage der Untersuchungsgebiet im gemäßigten Klimat</i>	22
<i>Abb. 3.7 Klimadiagramm für Hamburg Fuhlsbüttel für die Jahre 1971-2000.</i>	23
<i>Abb. 4.1 Schematische Anordnungen der Bohrungen in dem verwendeten Temperaturblock.</i>	36
<i>Abb. 5.1 Überblick über die Morphologie der polygonalen Tundra.</i>	51
<i>Abb. 5.2 Transsekt eines Eiskeilpolygons</i>	53
<i>Abb. 5.3 Bodenprofile des Polygons</i>	54
<i>Abb. 5.4 Die Böden der trockenen Flussterrasse</i>	57
<i>Abb. 5.5 Bodenprofil des untersuchten Typic Psammorthel der trockenen Flussterrasse.</i>	59
<i>Abb. 5.6 Lage des Probenahmepunktes am Strandstandort</i>	60
<i>Abb. 5.7 Bodenprofil des untersuchten Psammentic Aquorthel am Strand</i>	61
<i>Abb. 5.8 Die Überflutungsebene</i>	62
<i>Abb. 5.9 Bodenprofile des untersuchten Typic Psammorthel in der Überflutungsebene</i>	63
<i>Abb. 5.10 Das Samoylov Kliff als Küstenaufschlusses auf der Insel Samoylov.</i>	65
<i>Abb. 5.11 Korngrößenverteilung und pH-Werte im Kliff.</i>	67
<i>Abb. 5.12 Überblick über den Probenahmeort in der Hahnheide.</i>	68
<i>Abb. 5.13 Bodenprofils des Humusgley aus der Hahnheide</i>	68
<i>Abb. 5.14: Bodenprofils des Auengley aus der Hahnheide.</i>	69
<i>Abb. 5.15 Bodenprofils des Anmoorgley aus der Hahnheide.</i>	69
<i>Abb. 5.16 N-Ammonium- und N-Nitratwerte der Böden der geomorphologischen Einheiten</i>	71
<i>Abb 5.17 N-Nitrit-Werte der Böden der geomorphologischen Einheiten.</i>	72
<i>Abb. 5.18 DIN der Böden der geomorphologischen Einheiten.</i>	73
<i>Abb. 5.19 DIN und DON Konzentrationen des Polygons</i>	79
<i>Abb. 5.20 DIN und DON Konzentrationen der Flussterrasse und der Überflutungsebene</i>	79
<i>Abb. 5.21 Potentielle Ammoniakoxidation in Bodenproben der polygonalen Tundra</i>	80
<i>Abb. 5.22 Potentielle Ammoniakoxidation in Bodenproben der trockenen Flussterrasse.</i>	82
<i>Abb. 5.23 Potentielle Ammoniakoxidation in Bodenproben der Überflutungsebene.</i>	83
<i>Abb. 5.24 Potentielle Ammoniakoxidation in Bodenproben des Samoylov-Kliffs.</i>	84
<i>Abb. 5.25 Temperaturspektrum der potentiellen Ammoniakoxidation aus dem Polygonwall.</i>	86
<i>Abb. 5.26 Temperaturspektrum der potentiellen Nitrifikation im Strand in 0 bis 5 cm Tiefe.</i>	87

<i>Abb. 5.27 Zellzahlen der Ammoniakoxidanten und Nitritoxidanten bei 6°C.</i>	89
<i>Abb. 5.28 Zellzahlen der Ammoniakoxidanten und Nitritoxidanten bei 22°C.</i>	90
<i>Abb. 5.29 Vergleichende Zellzahlen der Ammoniakoxidanten der Böden des Polygons</i>	91
<i>Abb. 5.30 Zellzahlen der der Ammoniakoxidanten und Nitritoxidanten im Samolyov Kliff.</i>	92
<i>Abb. 5.31 DGGE-Profil der AOB aus den Böden der geomorphologischen Einheiten.</i>	93
<i>Abb. 5.32 Maximum-likelihood Tree basierend auf dem bakteriellen 16S rRNA Gen nach DGGE Analysen.</i>	96
<i>Abb.5.33 DGGE Profil von Archaea aus den Böden der geomorphologischen Einheiten</i>	97
<i>Abb. 5.34 Maximum-Likelihood Stammbaum der Archaea basierend auf dem 16S-rRNA-Gen</i>	98
<i>Abb. 5.35 DGGE-Profile von Anreicherungskulturen bei 4-6 °C</i>	101
<i>Abb. 5.36 DGGE-Profile von Anreicherungskulturen bei 6 °C von 2008.</i>	102
<i>Abb. 5.37 Neighbour Joining Stammbaum der DGGE-Banden aus den Anreicherungen bei 4 bzw. 6°C.</i>	104
<i>Abb. 5.38 DGGE Profil der Anreicherungen von Ammoniakoxidanten aus einem Polygon.</i>	105
<i>Abb. 5.39 DGGE Profil der Anreicherungen bei 28°C.</i>	107
<i>Abb. 5.40 16S-rRNA-Gen basierender Maximum-Likelihood phylogenetischer Baum der Nitrosospira.</i>	109
<i>Abb. 5.41 Auf dem bakteriellem amoA-Gen basierender Maximum Likelihood Stammbaum.</i>	110
<i>Abb. 5.42 Auf dem 16S-rRNA-Gen basierender Maximum-Likelihood phylogenetischer Baum der AOA.</i>	111
<i>Abb. 5.43 Auf dem amoA- Gen basierender Maximum-Likelihood phylogenetischer Baum der AOA.</i>	112
<i>Abb. 5.44 Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Anreicherungskultur aus dem Samoylovkliff</i>	114
<i>Abb. 5.45 Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Anreicherungskultur aus dem Polygonhang.</i>	116
<i>Abb. 5.46 IF Färbung der Anreicherungskultur aus dem Samolyov Kliff.</i>	117
<i>Abb. 5.47 DAPI-Färbung der Anreicherungskultur vom Samoylov-Kliff.</i>	118
<i>Abb. 5.48 IF Färbung der Anreicherungskultur aus dem Strand.</i>	119
<i>Abb. 5.49 IF Färbung der Anreicherungskultur aus dem Polygonhang.</i>	119
<i>Abb. 5.50 FISH-Färbung der Anreicherungskultur aus dem Auengley.</i>	120
<i>Abb. 5.51 Temperaturoptimum der untersuchten Anreichungskulturen als Sibirien.</i>	122

TABELLEN

<i>Tabelle 4.1 Herkunft der verwendeten Anreicherungskulturen</i>	26
<i>Tabelle 4.2 Methoden der bodenkundlichen Laboranalytik</i>	27
<i>Tabelle 4.3 Liste und Wirkungsweise der verwendeten Antibiotika</i>	34
<i>Tabelle 4.4 Liste der verwendeten Reinkulturen</i>	38
<i>Tabelle 4.5 Aufstellung der verwendeten mikroskopischen Verfahren</i>	40
<i>Tabelle 4.6 Sequenzen und Bezeichnungen der verwendeten Primerpaare für die Domäne der Bacteria</i>	42
<i>Tabelle 4.7 Sequenzen und Bezeichnungen der verwendeten Primerpaare für die Domäne der Archaea</i>	43
<i>Tabelle 4.8 Sequenzen und Bezeichnungen anderer verwendeter Primerpaare</i>	43
<i>Tabelle 5.1 Ausgewählte Merkmale der Boden im Polygon des Transektes von 2007</i>	52
<i>Tabelle 5.2 Ausgewählte Merkmale der Boden im Polygon des Polygon von 2008</i>	56
<i>Tabelle 5.3 Ausgewählte Merkmale des Typic Psammorthel auf der trockenen Flussterasse</i>	58
<i>Tabelle 5.4 Ausgewählte Merkmale des Psammentic Aquorthel am Strand der jungen Überflutungsebene</i>	64
<i>Tabelle 5.5 Ausgewählte Merkmale des Typic Psammorthel in der Überflutungsebene</i>	64
<i>Tabelle 5.6 Charakterisierung des Samoylov-Kliffs an einem Küstenausschluss der Insel Samoylov</i>	66
<i>Tabelle 5.7 Ausgewählte Merkmale der Proben aus den Vergleichsböden der gemäßigten Klimaten</i>	70
<i>Tabelle 5.8 Gelöste anorganische Stickstoffverbindungen des Samoylov-Kliffs</i>	74
<i>Tabelle 5.9 Gelöste anorganische Stickstoffverbindungen der Böden der gemäßigten Klimate</i>	75
<i>Tabelle 5.10 Mineralisationsraten der Böden aus 2007 und 2008</i>	77
<i>Tabelle 5.11 Mineralisationsraten des Samoylov-Kliffs</i>	78
<i>Tabelle 5.12 Potentielle Ammoniakoxidation der Böden der gemäßigten Klimate</i>	88
<i>Tabelle 5.13 Taxonomische Zuordnung der ausgeschnittenen Banden der Böden Samoylovs</i>	95
<i>Tabelle 5.14 Taxonomische Zuordnung der 16S rRNA-Gen Sequenzen der Archaea</i>	98
<i>Tabelle 5.15 Untersuchung des amoA-Gens in den Umweltproben</i>	99
<i>Tabelle 5.16 Taxonomische Zuordnung der Sequenzen bei 4 °C</i>	103
<i>Tabelle 5.17 Taxonomische Zuordnung der Sequenzen bei 10°C</i>	106
<i>Tabelle 5.18 Taxonomische Zuordnung der Sequenzen aus 28 °C</i>	107
<i>Tabelle 5.19 Naturproben und Anreicherungskulturen für die Taxonomie der AOB und AOA</i>	108
<i>Tabelle 5.20 Überblick über die untersuchten Anreicherungskulturen</i>	113
<i>Tabelle 5.21 Gesamtübersicht über die Ergebnisse der untersuchten Bodenproben</i>	124
<i>Tabelle 5.22 Gesamtübersicht über die Ergebnisse der untersuchten Anreicherungskulturen</i>	125

1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

Der Stickstoffkreislauf hat eine essentielle Bedeutung für alle Organismengruppen, so dass die vollständige Aufklärung der mikrobiellen Kreisläufe in natürlichen Habitaten von herausragender Bedeutung ist. Die Prozesse in den Ökosystemen der Arktis gelten als Stickstoff limitiert, da dort kaum gelöste anorganischen wie organischen Stickstoffverbindungen verfügbar sind (SCHIMEL & BENNETT 2004). Der mikrobielle Abbau von organischer Substanz und die Stickstofffreisetzung sind durch die niedrige Temperaturen, hohe Wassersättigung der Böden, kurze Vegetationsperiode, ungünstige C/N-Verhältnisse und geringe Nährstoffverfügbarkeit begrenzt. Diese Eigenschaften zeichnen die Böden der Arktis als extreme Habitate aus (MACK et al. 2004, RODIONOV et al. 2007). Trotz der beschriebenen N-Limitierungen kommt es vereinzelt zu starken Austrägen von Stickstoff in Form von N_2O aus arktischen Ökosystemen (REPO et al. 2009, ELBERLING et al. 2010). Die in der nördlichen Hemisphäre weit verbreiteten Tundraböden stehen mit ca. 1600 Gt nun seit einigen Jahren im Focus der klimarelevanten Geosystemforschung, da sie einen großen Teil der globalen Kohlenstoffspeicher darstellen (TARNOCAI et al. 2009). Bislang sind die möglichen Folgen und Reaktion der Permafrostböden auf die prognostizierte Klimaerwärmung in der Arktis weder vollständig untersucht noch werden diese in den vorliegenden Klimaberichte (IPCC 2007) behandelt. Wenn die Prozesse N-limitiert sind, wird die Verfügbarkeit von Stickstoff einen entscheidenden Einfluss auf die Kohlenstoff Freisetzung und damit auch auf die Freisetzung von Treibhausgasemissionen wie CH_4 , CO_2 und N_2O haben. Um diesen Einfluss zu bestimmen und bewerten zu können, muss der Stickstoffkreislauf in arktischen Böden im Detail besser verstanden werden.

Die Nitrifikation – d.h. die Oxidation von Ammoniak über Nitrit zu Nitrat – ist ein Schlüsselprozess des globalen Stickstoffkreislaufs. Die Ammoniak oxidierenden Bakterien (AOB) und Archaeen (AOA) oxidieren Ammoniak über Hydroxylamin zu Nitrit. Das Nitrit wird anschließend von Nitrit oxidierenden Bakterien (NOB) zu Nitrat oxidiert. Die Ammoniakoxidation ist dabei der geschwindigkeitbestimmende und limitierende Prozess. Die nitrifizierenden Mikroorganismen sind ubiquitär verbreitet (KOOPS & POMMERENING-RÖSER 2001). Dass auch Archaeen Ammoniak oxidieren, ist erst relativ kurz bekannt (KÖNNEKE et al. 2005). Welche ökologische Bedeutung sie haben, ist seitdem in der Diskussion (SCHLEPER 2010). Archaeen im Allgemeinen wird eine große Bedeutung in extremen Habitaten zugesprochen (CAVICCHIOLI 2010).

Ziel dieser Arbeit ist es die beteiligten Ammoniakoxidanten in den Böden der kalten Klimate im Vergleich zu einem Standort der gemäßigten Zone zu untersuchen und zu charakterisieren. Dazu werden die Böden und ihre spezifische Horizontabfolge als Habitate klassifiziert. Ziel ist es auch einen Einblick in die Stickstoffflüsse anhand der potentiellen

Umsatzraten der Nitrifikation und der Mineralisation zu geben. Weiterhin sollen Analysen der DNA eine Charakterisierung der Ammoniak oxidierenden Mikroorganismen und ihrer Diversität ermöglichen. Die unterschiedliche Ausprägungen der Mikroorganismengemeinschaften und der potentiellen Mineralisation bzw. Nitrifikation als Antwort auf unterschiedliche Temperatureinflüsse mittels Inkubationsversuchen, soll Hinweise auf die Fähigkeit der untersuchten Habitats und ihrer Organismen geben, sich an prognostizierten Klimawandel anzupassen.

Im Einzelnen ergeben sich daraus folgende Fragestellungen der vorliegenden Promotionsarbeit:

1. Was sind die Besonderheiten des Stickstoffkreislaufes in Permafrostböden? Gibt es kleinräumiger Unterscheide in der Verteilung des verfügbaren Stickstoffs? Welche Bodeneigenschaften beeinflussen die Raten der Nitrifikation und Mineralisation? Können im dauerhaft gefrorenen Permafrost ebenfalls Ammoniakoxidanten nachgewiesen werden und ihre Aktivität bestimmt werden? Sind die Prozesse in den Permafrostböden Stickstoff-limitiert?
2. Wie ist die Diversität der Ammoniak oxidierenden Mikroorganismen in den Permafrostböden? Dominieren AOB oder AOA in den Böden der sibirischen Tundra und in Vergleich zu ausgewählten Böden der gemäßigten Breiten? Inwieweit lassen sich mit den klassischen und kultivierungsunabhängigen Methoden Aussagen über die Zellzahlen treffen? Sind die AOB oder AOA an bestimmte ökologische Nischen angepasst?
3. Sind die Ammoniak oxidierende Mikroorganismen an die niedrigen *in situ* Temperaturen in den Tundrenböden angepasst? Können sie als psychrophile Mikroorganismen bezeichnet werden?
4. Lassen sich mit den erhobenen Daten erste Aussagen über den Einfluss von Standortfaktoren wie Temperatur, Wassergehalt, Sauerstoffgehalt, auf die Quantität und Qualität der Ammoniakoxidanten? Welchen Einfluss können die postulierten Klimaänderungen auf die Ammoniakoxidation in diesem Habitat haben? Welche Auswirkungen ergeben sich für den globalen N-Kreislauf?

Diese Fragen sollen mit einem interdisziplinären Ansatz von mikrobiologischen, bodenkundlichen und biogeochemischen Methoden beantwortet werden.

2 GRUNDLAGEN

2.1 Die Bedeutung des Stickstoffkreislaufs

Der Stickstoffkreislauf umfasst elementare Prozesse, die das Leben auf der Erde prägen (Abb. 2.1). Ungefähr 1,5 % der lebenden Biomasse bestehen aus Stickstoff. Im Besonderen wird Stickstoff in der reduzierten Form der Aminogruppen von Proteinen und in den Basen der Nukleinsäuren eingebaut. Auf der Erde überwiegt mengenmäßig der elementare Stickstoff der Atmosphäre mit mehr als 99 % des Gesamtstickstoffes. Im Verlauf des N-Kreislaufes wechselt der Redoxzustand von $-III$ bis $+V$. Elementarer Stickstoff (N_2) kann von stickstofffixierenden Bakterien aufgenommen werden und zu Ammonium (NH_4^+) reduziert werden. Außerdem kann der Ammonium-Pool über die Prozesse der Protolyse und Ammonifikation gespeist werden. Als dritte Quelle des Ammoniumpools gilt die Deposition von Ammoniak (NH_3) über Gewitter und Regen. Neben der Assimilation des Ammoniums ist die Oxidation durch mikrobiellen Prozess der Nitrifikation von besonderer Bedeutung, da durch diesen Prozess und der anschließenden Denitrifikation dem System Stickstoff entzogen werden kann.

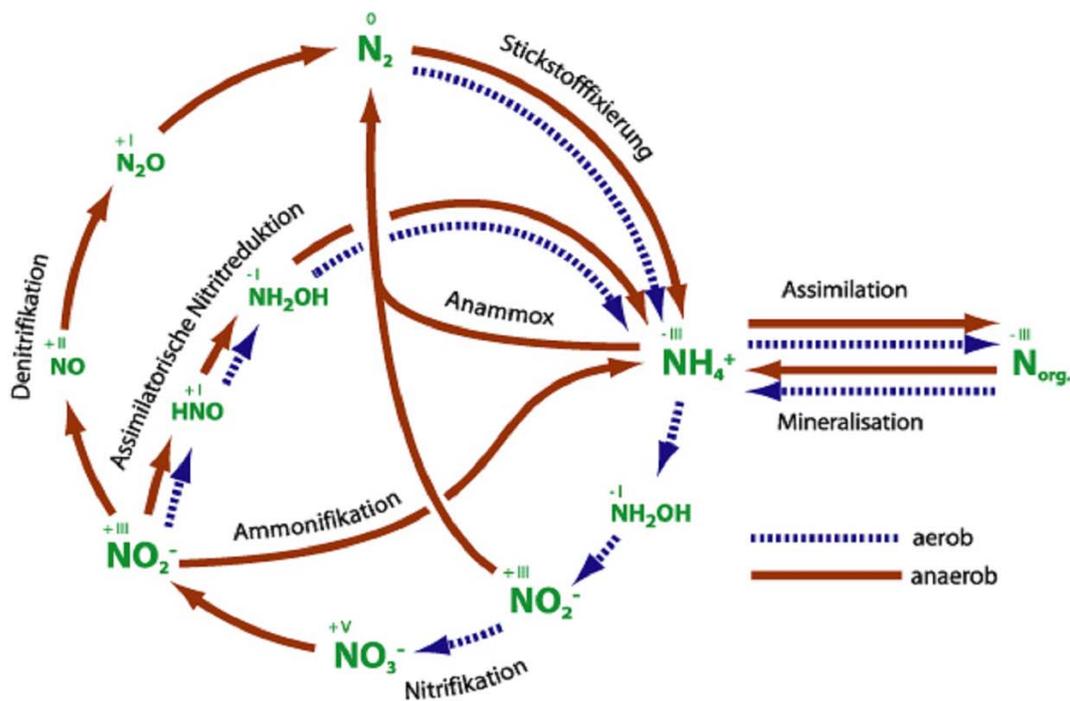


Abb. 2.1 Schematische Darstellung des Stickstoffkreislaufes.

Modifiziert von M. Alawi nach MADIGAN & MARTINKO (2006)

Die in der nördlichen Hemisphäre weitverbreiteten Tundraböden spielen eine wichtige Rolle für den globalen Stickstoffkreislauf, da sie einen sehr großen N-Speicher darstellen (HOBBIE et al. 2000). Der Stickstoffkreislauf ist sehr eng mit dem Kohlenstoffkreislauf verbunden. Die

Böden der Arktis speichern mit über 1600 Gt einen großen Teil des globalen Kohlenstoffpools (TARNOCAI et al. 2009), dabei beinhalten die Böden mehr als zwei Mal so viel Stickstoff wie Böden in gemäßigten Klimaten (POST et al. 1985, HOBIE & HOBIE 2006). Trotz des großen Stickstoffpools gelten die Ökosysteme der Arktis grundsätzlich als Stickstoff-limitiert, da der Stickstoff oft weder als gelöste anorganische Stickstoffverbindungen (DIN) wie Ammonium (NH_4^+) oder Nitrat (NO_3^-) noch als gelöste organische Stickstoffverbindungen (DON) verfügbar ist (SCHIMEL & BENNETT 2004, KAISER et al. 2005). In der Arktis ist die Stickstofflimitierung durch sehr kleine Stickstoffdepositionen (HOLLAND et al. 1999), geringe Stickstofffixierungsraten (CLEVELAND et al. 1999, HOBARA et al. 2006) und geringe N-Mineralisationsraten (NADELHOFFER et al. 1992) im Unterschied zu gemäßigten Klimaten begründet. In Abbildung 2.2 sind die N-Mineralisationsraten in verschiedenen Klimaten vom tropischen Wald, über gemäßigte Ökosysteme bis in die arktische Tundra dargestellt.

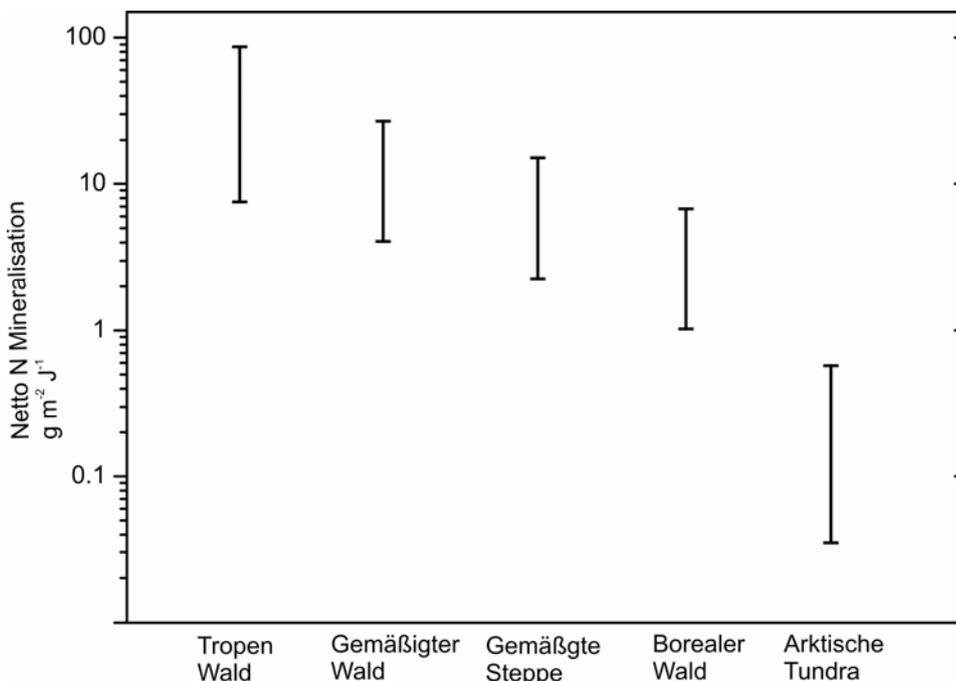


Abb. 2.2 Vergleichende Raten der Netto N-Mineralisation in verschiedenen Klimaten.
Basierend auf einer Graphik aus NADELHOFFER et al. (1992)

Die Abbildung ist nach NADELHOFFER et al. (1992) modifiziert worden, die N-Mineralisation in der arktischen Tundra liegt ein bis zwei Potenzen unter denen aus den gemäßigten oder tropischen Klimazonen. Zusätzlich ist der mikrobielle Abbau von organischem Material und damit auch die Stickstoffmineralisation durch geringe Temperaturen, hohe Wassersättigungsbedingungen, einer kurzen Vegetationsperiode, hohe C/N-Verhältnisse und demzufolge geringe Nährstoffverfügbarkeit begrenzt (MACK et al. 2004, KAISER et al. 2005, MEYER et al. 2006, RODIONOV et al. 2007). Diese Eigenschaften zeichnen die Böden der Arktis als extreme Habitate aus. Einige Autoren sehen die Stickstoff- und

Kohlenstoffmineralisation zusätzlich als entkoppelt an, d.h. sie finden in unterschiedlichen Größenordnungen in verschiedenen Horizonten der Permafrostböden statt (NADELHOFFER et al. 1991, MEYER et al. 2006).

Die Nitrifikation – also die Oxidation von Ammoniak über Nitrit zu Nitrat – ist ein Schlüsselprozess im Stickstoffkreislauf. Die Nitrifikation zusammen mit der Ammonifikation wird Mineralisation genannt. Dieser Prozess stellt verfügbare Stickstoffverbindungen bereit. Die Konzentrationen an gelösten anorganischen Stickstoffverbindungen (Ammonium, Nitrit und Nitrat), die auch Zwischen- und Endprodukte der Nitrifikation sind, geben Hinweise auf die Stickstofflimitierung. Ein Ökosystem gilt u.a. als N-limitiert, wenn die gelösten anorganischen Stickstoffverbindungen (DIN) hauptsächlich als N-Ammonium vorliegen und kaum bis kein N-Nitrat nachgewiesen werden kann (ABER 1992).

2.2 Die Nitrifikation - Ein Schlüsselprozess im Stickstoffkreislauf

Die zwei Hauptprozesse der Nitrifikation werden in erster Linie von lithoautotrophen Mikroorganismengruppen geleistet. Die Ammoniak oxidierenden Mikroorganismen (AOM) unterteilen sich in Ammoniak oxidierende Bakterien (AOB) und Ammoniak oxidierende Archaeen (AOA). Der zweite Prozess die Nitritoxidation wird – so weit bis jetzt bekannt ist - nur von Nitrit oxidierenden Bakterien (NOB) durchgeführt. Die Ammoniakoxidation ist der ratenbestimmende Prozess, dabei ist das von den AOM gebildete Nitrit das Substrat für die NOB (FIENCKE et al. 2005). Diese katalysieren den zweiten Schritt des Nitrifikationsprozesses, die Oxidation zum Nitrat (BOCK & KOOPS 1992). Die Vielfalt der nitrifizierenden Mikroorganismen ist längst nicht aufgeklärt, das zeigen auch die neueren Untersuchungen zur Beteiligung von Ammoniak oxidierende Archaeen an diesem Prozess (FRANCIS et al. 2005, KÖNNEKE et al. 2005). Die ökologische Bedeutung der AOA wird aber noch nicht vollständig verstanden, wie einige Autoren zusammenfassend und übereinstimmend beschreiben haben (PROSSER & NICOL 2008, JUNIER et al. 2010, SCHLEPER 2010).

Die nitrifizierenden Mikroorganismen sind ubiquitär verbreitet (KOOPS & POMMERENING-RÖSER 2001). WINOGRADSKY (1890) gelang bei Versuchen mit AOB erstmals der endgültige Nachweis autotrophen Wachstums bei chemolithotrophen Mikroorganismen. Die beiden phänotypisch definierten Gram-negativen Gruppen nitrifizierender Bakterien (AOB und NOB) sind nach heutigen Erkenntnissen phylogenetisch nicht unmittelbar miteinander verwandt (WOESE et al. 1984a, WOESE et al. 1984b, WOESE et al. 1985, TESKE et al. 1994). Die Ammoniak oxidierenden Archaeen weisen eine eigene Entwicklungslinie auf und werden heute zu den Thaumachoata gezählt (BROCHIER-ARMANET et al. 2008). Die heterotrophe Nitrifikation der Bakterien, Pilze und einiger Algen hat eine untergeordnete Bedeutung, da

dieser Prozess nicht der Energiegewinnung dient (KILLHAM 1986). Die von den Nitrifikanten durchgeführten Oxidationen verhindern nicht nur eine toxische Nitritakkumulation, sondern beeinflussen auch die Aktivitäten der denitrifizierenden Bakterien. Denn im anschließenden Prozess der Denitrifikation werden Nitrit und Nitrat zu Stickoxiden und elementarem Stickstoff reduziert und der Kreislauf so geschlossen (KNOWLES 2000). Die Stoffwechselleistung der Denitrifikanten beeinflusst auch die Emission von Treibhausgasen und somit das globale Klima (VITOUSEK et al. 1997). Vervollständigt wird der Stickstoffkreislauf durch die Prozesse der anaeroben Ammoniumoxidation (Anammox) (MULDER et al. 1995, VAN DE GRAAF et al. 1995, JETTEN et al. 1998) und durch die dissimilatorischen Nitratassimilation (DNRA) (ZUMPFT 1992, STOLZ & BASU 2002). Beide Prozesse sind bisher vor allem in marinen Habitaten beschrieben worden. Die am Anammox beteiligten Organismen gehören zu den Planctomycetales (STROUS et al. 1999) und sind sehr schwer zu kultivieren (EGLI et al. 2001, KUENEN & JETTEN 2001, JETTEN et al. 2003).

2.2.1 Verbreitung Ammoniak oxidierender Bakterien

AOB kommen in zahlreichen aeroben Habitaten vor. Man findet sie sowohl in natürlichen Lebensräumen – Böden, Felsoberflächen, Süß- und Brackwasser, Meeren, etc. (KOOPS & POMMERENING-RÖSER 2001) – als auch in künstlichen Systemen wie z.B. Kläranlagen (WAGNER et al. 1996, JURETSCHKO et al. 1998, PURKHOLD et al. 2000), Aquarien (BURRELL et al. 2001) oder Trinkwasseraufbereitungsanlagen (REGAN et al. 2002). Bisher ist kein AOB bekannt, das in allen potentiellen Habitaten vorkommt; bei den einzelnen AOB handelt es sich eher um Spezialisten als Generalisten (KOOPS & POMMERENING-RÖSER 2001). Geringe Ammoniaktoleranz geht meist mit hoher Substrat-Affinität (niedrige K_s -Werte des Ammoniak oxidierenden Systems) und der Fähigkeit zur Harnstoffspaltung einher (KOOPS & POMMERENING-RÖSER 2001); beide Merkmale werden als Anpassung an oligotrophe Habitate interpretiert. Des Weiteren hat der pH-Wert großen Einfluss auf die Populationsstruktur der AOB. Dies liegt unter anderem daran, dass sich mit sinkendem pH das Säure-Base-Gleichgewicht $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ aufgrund des hohen pK_s -Wertes von Ammoniak (9,25) in Richtung NH_4^+ verschiebt. Da dem Enzym Ammoniakmonooxygenase (AMO) Ammoniak und nicht Ammonium als Substrat dient (SUZUKI et al. 1974), sind im leicht sauren Milieu die AOB begünstigt, welche im Besitz einer Urease sind. Dieses Enzym ist im Zellinneren lokalisiert und stellt mit dem Ammoniak aus der Harnstoffspaltung zusätzliches Substrat für die AMO zur Verfügung (BOER & LAANBROEK 1989). Neben den oben genannten Faktoren beeinflussen auch Temperatur (GOLOVACHEVA 1976, JONES & MORITA 1985), Sauerstoffverfügbarkeit (GOREAU et al. 1980) und Lichtintensität (HOOPER & TERRY 1974) die AOB-Populationsstruktur.

Den AOB gehören die fünf Gattungen *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosolobus*, *Nitrosovibrio*, und *Nitrospira* an (WATSON 1974). Die Einteilung der Gattungen erfolgte anfangs über die Morphologie der Zellen. Diese morphologischen Merkmale spiegeln jedoch nicht zwingend die phylogenetischen Beziehungen der Bakterien wider. Das Verständnis der verwandtschaftlichen Verhältnisse innerhalb der Gruppe der Ammoniak oxidierenden Bakterien beruht heute vor allem auf der vergleichenden Sequenzanalyse zweier Markermoleküle: Das Gen der 16S-rRNA (WOESE et al. 1985) sowie das *amoA*-Gen, codierend für die aktive Untereinheit des funktionellen Schlüsselenzyms Ammoniakmonooxygenase (AMO) (ROTHAUWE et al. 1997). Gemäß den Ergebnissen vergleichender 16S-rRNA-Gensequenzanalysen gehören alle untersuchten AOB zwei jeweils monophyletischen Entwicklungslinien innerhalb der *Proteobacteria* an (Abb. 1.2.).

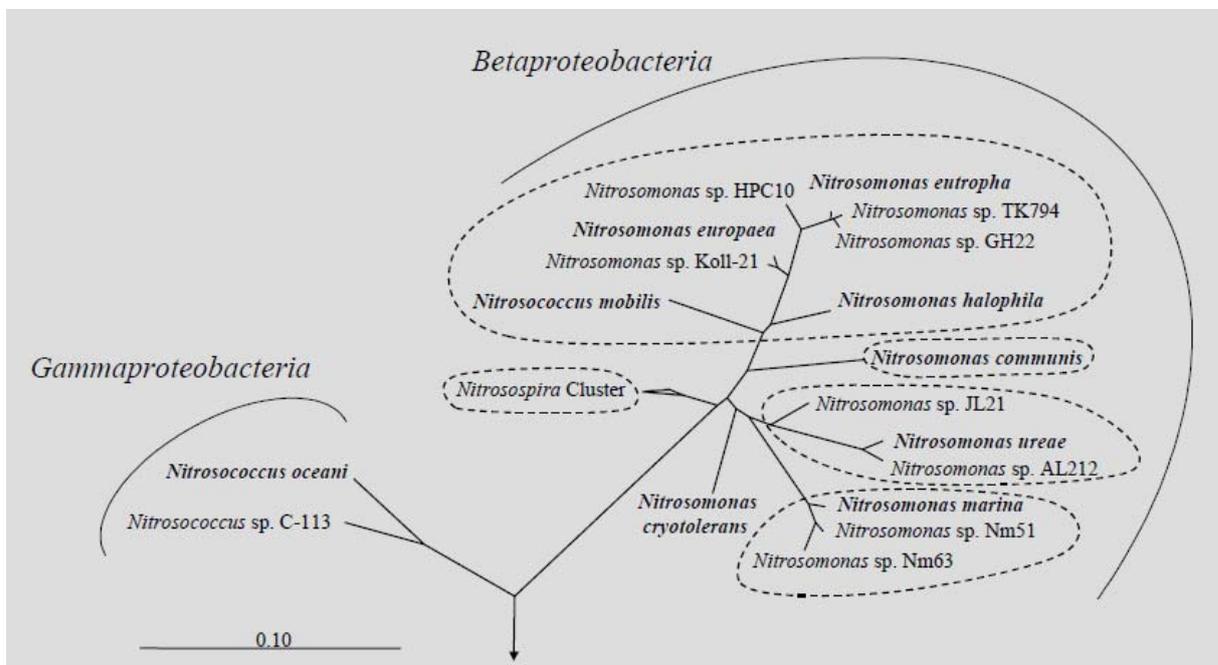


Abb. 2.3 16S rRNA Gen basierender phylogenetischer Baum.

Enthalten alle im Jahr 1998 verfügbaren AOB-Reinkultur-Sequenzen (Länge >1000bp). Gestrichelte Linien deuten die von POMMERENING-RÖSER et al. (1996) vorgeschlagenen Cluster an. Der Balken entspricht einem Sequenzunterschied von 10%. (PURKHOLD 2003a)

Wegen der hohen Übereinstimmung der 16S-rRNA-Gensequenzen von *Nitrospira*, *Nitrosovibrio* und *Nitrosolobus* haben HEAD et al. (1993) vorgeschlagen, diese drei Gattungen trotz unterschiedlicher Morphologie zu der Gattung *Nitrospira* zusammenzufassen. Eine andere bildet die marine Gattung *Nitrosococcus* (bestehend aus den beiden Arten *Nc. oceani* und *Nc. halophilus*) innerhalb der *Gammaproteobacteria*. Alle anderen AOB gehören zu den *Betaproteobacteria* (WOESE et al. 1984b, HEAD et al. 1993, TESKE et al. 1994, STEHR et al. 1995, POMMERENING-RÖSER et al. 1996, UTAKER et al. 1996) (Abb. 2.3).

Diese Zuordnung deckt sich weitgehend mit den Ergebnissen *amoA*-basierender phylogenetischer Studien (ROTHAUWE et al. 1997). Die phylogenetischen Untersuchungen vor allem der bekannten *Nitrosomonas* und *Nitrospira* zeigen noch intensiver die Clusterbildung innerhalb der Gattungen, da sie nicht nur Reinkulturen, sondern auch Anreicherungskulturen und Umweltsequenzen mit in die Stammbaumberechnung einbeziehen (PURKHOLD et al. 2000, PURKHOLD 2003b, AVRAHAMI & CONRAD 2005)

Die Gattung *Nitrospira* ist speziell an die ökologischen Bedingungen in Böden angepasst. Sie dominiert vor allem in terrestrischen Habitaten mit einer geringen Ammoniak-Verfügbarkeit (HASTINGS et al. 2000, KOWALCHUK et al. 2000, KOWALCHUK & STEPHEN 2001, CARNEY et al. 2004, AVRAHAMI & CONRAD 2005). Die Gattung *Nitrospira* ist phylogenetisch eine sehr jungen Gruppe (KOOPS et al. 2006), dadurch sind sowohl die 16S-rRNA-Gene und auch die Sequenzen der *amoA*-Gens sehr konserviert und unterscheiden sich nur wenig. Aus ökologischer Sicht stellt sich die Frage, ob sich die phylogenetischen Cluster trotzdem aus physiologischen Eigenschaften ableiten lassen (AVRAHAMI & CONRAD 2005). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die Community-Struktur der Ammoniak oxidierenden Bakterien von unterschiedlichen selektiven Faktoren wie pH-Wert, Wassergehalt oder Nährstoffversorgung (KOWALCHUK & STEPHEN 2001) und von der Temperatur (AVRAHAMI & CONRAD 2003, AVRAHAMI et al. 2003) abhängt. Trotzdem ist nicht geklärt, wie die Bodenbedingungen die Struktur der Bakteriengemeinschaften der Ammoniakoxidanten beeinflusst. Die *Nitrospira* scheinen aber besser an die unterschiedlichen pH-Werte angepasst zu sein (DE BOER et al. 1991, JIANG & BAKKEN 1999, HASTINGS et al. 2000). In völlig unterschiedlichen Bodentypen dominieren die *Nitrospira*, wie in Sanddünen (KOWALCHUK et al. 1997) in schwach sauren Torfböden (KOWALCHUK et al. 2000), in Wiesen (WEBSTER et al. 2002, AVRAHAMI & CONRAD 2003, MINTIE et al. 2003), in Waldböden (LAVERMAN et al. 2001, AVRAHAMI 2002, MINTIE et al. 2003, COMPTON et al. 2004) oder in Ackerland (STEPHEN et al. 1999, CHANG et al. 2001, AVRAHAMI 2002, WEBSTER et al. 2002). *Nitrospira* ist also am besten an die ökologischen Bedingungen natürlicher terrestrischer Habitate angepasst.

2.2.2 Verbreitung Ammoniak oxidierender Archaeen

Durch die Arbeit von VENTER et al. (2004), die über eine Metagenomanalysen Hinweise auf Ammoniak oxidierende Archaea (AOA) erhielten, und die Arbeit von KÖNNEKE et al. (2005), die das erste Ammoniak oxidierende Archaeon beschreibt, ist nun allgemein bekannt, dass auch Archaeen eine wichtige Rolle bei der Nitrifikation übernehmen. Inzwischen wurden noch weitere AOA beschrieben, jedoch sind die Habitate aus denen AOA isoliert werden konnten noch eingeschränkt. Die AOA sind bis jetzt nur aus marinen Habitaten (KÖNNEKE et al. 2005, HALLAM et al. 2006, HERRMANN et al. 2008) und heißen Quellen (DE LA TORRE et al.

2008, HATZENPICHLER et al. 2008) angereichert und beschrieben worden. Es gibt viele Hinweise darauf, dass die AOA eine entscheidende Rolle bei der autotrophen Ammoniakoxidation einnehmen, so wurden hohe Abundanz von Crenarchaeota in Ozeanen (DELONG 1992, FUHRMAN et al. 1992, 1998, KARNER et al. 2001), in terrestrischen (OCHSENREITER et al. 2003, LEININGER et al. 2006) und einigen anderen nicht extremen Habitaten (PERREAULT et al. 2007, AUGUET & CASAMAYOR 2008) nachgewiesen. Zusätzlich haben Studien, in denen das archaeale *amoA*-Gen als Marker diente, eine ubiquitäre Verteilung von AOA in marinen, limnischen und terrestrischen Umwelteinheiten gezeigt und dass diese an Nischen in diesen Habitaten angepasst sind (FRANCIS et al. 2005, ERGUDER et al. 2009). Die Quantifizierung der bakteriellen und archaealen *amoA*-Genkopien zeigen, dass die Anzahl an AOA die AOB um ein Vielfaches übersteigen können (FRANCIS et al. 2005, LEININGER et al. 2006, WUCHTER et al. 2006, LAM et al. 2007, BEMAN et al. 2008). Jedoch konnte bis jetzt noch kein Ammoniak oxidierendes Archaeon aus Böden isoliert und beschrieben werden.

AOA wurden über das 16S-rRNA-Gen und die *amoA*-Sequenzen auch in extremen Habitaten nachgewiesen, wie z.B. in kalten Gebirgsseen (DORADOR 2007, DORADOR et al. 2008, JIANG et al. 2009) in der Tiefsee (TAMEGAI et al. 2007), in heißen Quellen in Kamchatka, Sibirien, bei Temperaturen von 82 °C bis 97 °C (REIGSTAD et al. 2008) oder aus hocharktischem Permafrost (YERGEAU et al. 2010). In einigen dieser extremen Habitate wiesen die AOA eine höhere Abundanz als die AOB auf (JIANG et al. 2009).

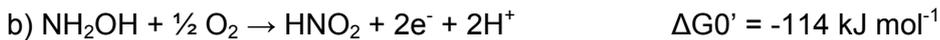
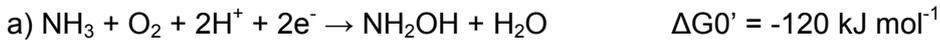
Neuere Veröffentlichungen sehen aber nicht nur die Kopienzahl, sondern auch die Expression des Gens oder die Aktivität des Enzyms als einen Maßstab für die Dominanz an. Diese Kriterien ergeben eine höhere Dominanz bei den Bakterien (JIA & CONRAD 2009, DI et al. 2010). Diese entscheidende Frage muss in den nächsten Jahren geklärt werden, ob diese hohe Abundanz von AOA auch eine hohe Bedeutung für die stattfindenden Prozesse hat, oder ob die Umsatzraten der AOB doch eine größere Rolle einnehmen (SCHLEPER 2007, PROSSER & NICOL 2008, JUNIER et al. 2010).

2.2.3 Physiologie Ammoniak oxidierender Mikroorganismen

Bereits Ende des 19. Jahrhunderts gelang Winogradsky bei Versuchen mit AOB der endgültige Nachweis autotrophen Wachstums bei chemolithotrophen Mikroorganismen. Im Zuge dieser Untersuchungen isolierte er – wie kurz zuvor bereits (FRANKENLAND & FRANKENLAND 1890) – AOB in rein mineralischem Medium mit Ammoniak als Elektronen-Donor und CO₂ als einziger Kohlenstoffquelle. Auffallend ist die ungewöhnlich lange Generationszeit dieser Organismen in Reinkulturen (Minimum: 7h). Dieses extrem langsame Wachstum ist vor allem auf die hohen Redoxpotentiale der Redoxpaare NH₂OH/NH₃

(+899 mV) und $\text{NO}_2^-/\text{NH}_2\text{OH}$ (+66 mV) zurückzuführen. Der erste Oxidationsschritt ist endergonisch und die gesamte Energieausbeute pro Mol oxidierten Ammoniaks beträgt lediglich 120 kJ. Das entspricht ca. 4 % des Energiegewinns, den heterotrophe Organismen bei der Oxidation eines Mols Glucose erzielen.

Die Gleichung für die Ammoniakoxidation sieht wie folgt aus (BOCK & WAGNER 2003):



Dieser niedrige Energiegewinn hat zur Folge, dass AOB pro Stunde bis zu 1/3 ihres Zellgewichts an Ammoniak umsetzen. Zudem müssen die Reduktionsäquivalente NAD(P)H aufgrund der hohen Redoxpotentiale der Redoxpaare über reversen Elektronentransport regeneriert werden (ALEEM 1966, BOCK & KOOPS 1992). Schließlich fließen bis zu 80 % des gewonnenen ATP in die energieaufwendige CO_2 -Fixierung über den Calvin-Benson-Zyklus (WALLACE & NICHOLAS 1969, HARMS et al. 1981, BELSER 1984). Alternativ kann Kohlendioxid über das Enzym Phosphoenolpyruvat-Carboxylase fixiert werden (TAKAHASHI et al. 1993).

2.2.4 Bedeutung Ammoniak oxidierender Mikroorganismen

Wie alle Lebewesen stehen auch die AOM in steter Wechselwirkung mit ihrer Umwelt, und nehmen durch die von ihnen katalysierten biochemischen Vorgänge direkt oder indirekt Einfluss auf ihre Umgebung. Beispielsweise führt die Umsetzung des Ammoniak-Anteils in Düngemitteln zu verstärktem N-Austrag aus landwirtschaftlichen Flächen. Grund dafür sind die unterschiedlichen Ladungseigenschaften von $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ und NO_2^- bzw. NO_3^- . Positiv geladene Verbindungen werden aufgrund der Ionenbindung an Bodenpartikel weniger leicht ausgewaschen als die wasserlöslichen Verbindungen, was zur Eutrophierung der umliegenden Gewässer (SCHWOERBEL 1993) sowie zum Eintrag von Nitrat / Nitrit ins Grundwasser führen kann. In ungepufferten Böden bedingt die Versauerung in manchen Fällen die Freisetzung phytotoxischer Kationen, wie beispielsweise Aluminiumionen (Al_3^+) (SPIECK & BOCK, 1998). Darüber hinaus trägt die denitrifizierende Aktivität von AOB durch die Bildung flüchtiger Stickoxide zu weiterem Stickstoffverlust aus Böden, sowie einer erhöhten Konzentration des Treibhausgases N_2O bei (HOOPER 1968, REMDE & CONRAD 1990, STÜVEN et al. 1992, BOUWMAN et al. 1993). In Kläranlagen stellt die Nitrifikation eine effiziente und kostengünstige Möglichkeit dar, Ammoniak, Harnstoff und Nitrit aus Abwässern zu eliminieren (PAINTER 1986, EIGHMY & BISHOP 1989). Dies ist für den Umweltschutz aufgrund der Toxizität von Ammoniak und Nitrit (ARTHUR et al. 1987) sowie der eutrophierenden Wirkung von Ammoniak (SCHWOERBEL 1993) von herausragender

Bedeutung. Eine stabile Nitrifikation in Kläranlagen ist jedoch aufgrund der Sensitivität von AOB gegenüber niedrigen Temperaturen, pH-Schwankungen sowie toxischen Substanzen nicht immer gegeben (PAINTER 1986, RITTMANN & WHITEMAN 1994).

Kürzlich wurde eine weitere Organismengruppe identifiziert, die Energie aus der Verwertung von Ammonium gewinnt: Die sogenannten ANAMMOX-Organismen setzen Ammonium mit Nitrit unter anaeroben Bedingungen direkt zu N_2 um (STROUS et al. 1999, SCHMID et al. 2000) und bieten in Zukunft möglicherweise eine Alternative bei der Stickstoffentfernung aus Abwässern (JETTEN et al. 2001).

2.3 Psychrophile and psychrotolerante Bakterien

Die Stoffwechselaktivität von Mikroorganismen wird neben dem Substratangebot maßgeblich von der Temperatur beeinflusst. Berücksichtigt man, dass ca. 25 % der Landoberfläche der nördlichen Hemisphäre permanent gefroren sind (STEVEN et al. 2006), ist die Erforschung von psychrophilen and psychrotoleranten Bakterien von großer Bedeutung. Wachstum und Stoffwechsellistung nitrifizierender Bakterien bei Temperaturen um den Gefrierpunkt wurden bisher nur vereinzelt nachgewiesen (RIVKINA et al. 2000, BAKERMANS et al. 2003). Für die Nitrifikanten ist die beste Anpassung an niedrige Temperaturen um 5 °C bei dem marinen Bakterium *Nitrosomonas cryotolerans* beschrieben worden (JONES et al. 1988). AVRAHAMI & CONRAD (2005) bezeichnen auch Ammoniakoxidanten aus gemäßigten Klimaten als Kälte-angepasst.

Nach MORITA (2000) werden Bakterien mit einem Temperaturminimum kleiner gleich 0 °C, einem Temperaturoptimum von größer gleich 15 °C und einem Maximum von größer gleich 20 °C als psychrophil bezeichnet. Die von MORITA (1975) eingeführte Bezeichnung psychrotroph sollte durch moderat psychrophil ersetzt werden. Diese Organismen haben ein Minimum bei kleiner gleich 0 °C, ein Optimum bei größer gleich 15 °C und ein Maximum bei größer gleich 20 °C. MADIGAN & MARTINKO (2006) unterscheiden weiter die sogenannten psychrotoleranten Bakterien, die zwar ein Wachstumsoptimum bei mesophilen Temperaturen über 20 °C zeigen, jedoch bei Temperaturen um den Gefrierpunkt verhältnismäßig wenig Aktivität verlieren. Sicherlich dürfen die Bezeichnungen der Temperaturoptima nicht als feste Grenzen für die Einteilung angesehen werden, zumal ein *in-vitro* gemessenes Temperaturoptimum nicht die komplexen *in-situ*-Bedingungen berücksichtigen kann

Mikroorganismen, die in Permafrost beeinflussten Gebieten vorkommen, müssen extremen Schwankungen unterschiedlicher chemischer und physikalischer Umweltfaktoren standhalten. Die entscheidenden Parameter im Habitat sind neben dem Substratangebot die Temperatur, die Sauerstoff- und Wasserverfügbarkeit und die Tau- und Gefrierprozesse

sowie die dadurch verursachten stellenweise sehr hohen Salzgehalte im Boden. Die aus Permafrostgebieten isolierten Reinkulturen von Bakterien mit unterschiedlichsten Stoffwechselformen gehören über 30 verschiedenen Gattungen an. Die meisten dieser Reinkulturen sind nicht psychrophil, sondern meist moderat psychrophil, psychrotolerant oder mesophil (RIVKINA et al. 2000, STEVEN et al. 2006). Nach RUSSEL & FUKUNAGA (1990) könnten psychrophile Bakterien in den tiefen permanent gefrorenen Zonen der Permafrostböden zu finden sein, während der Auftauhorizont von psychrotoleranten und mesophilen Bakterien dominiert wird. Inzwischen konnten noch weitere kälteadaptierte Arten beschrieben werden (BAKERMANS et al. 2006, GANZERT et al. 2010)

Besonderes Interesse für mikrobiologische Untersuchungen weckte der Auftaubereichshorizont (active layer) des Permafrostes, der je nach Standortbedingung im Lena-Delta unterschiedliche Mächtigkeiten haben kann und am Ende des Sommers seine größte Ausdehnung erreicht (bis zu einem Meter). GANZERT et al., (2007) konnten in Tundraböden von Samoylov und Mamontovy Klyk methanogene Archaeen detektieren. Diese angereicherten Archaeen zeigten entweder psychrotolerante oder mesophile Eigenschaften. ZIMMERMANN (2006) hingegen erläuterte mit ihren Untersuchungen die wichtige Funktion von kältetoleranten Methan oxidierenden Bakterien (MOB) im active layer der Böden auf Samoylov. Die MOB besaßen ein Temperaturoptimum von über 20 °C. ALAWI et al. (2007) haben ein neues Nitrit oxidierendes Betaproteobakterium beschrieben, den *Candidatus* „Nitrotoga arctica“, der ein Temperaturoptimum bei ca. 17 °C hat. Bei 25 °C ist bei ihm kein Wachstum mehr detektierbar. Auch dieser Organismus kann nur als moderat psychrophil bezeichnet werden.

2.4 Grundlagen der methodischen Ansätze

2.4.1 Bodenklassifikation nach der US Soil Taxonomy

Die Charakterisierung der Permafrostböden erfolgte hauptsächlich nach der US Soil Taxonomy (SOILSURVEYSTAFF 2006), nach der World Reference Base (WRB) (FAO 2006) und nach der russischen Klassifikation (ELOVSKAYA 1987). In der deutschen Klassifikation kommen keine Permafrostböden als eigene Gruppe vor (AD-HOC-AGBODEN 2005) und in der WRB werden die organischen Böden von den Permafrostböden getrennt, so dass nur mineralische Böden in die Gruppe der Cryosole fallen (FAO 2006). Deshalb wird für die Vergleichbarkeit die US Soil Tax benutzt.

In Abbildung 2.4 ist die Klassifikation nach der Soil Tax schematisch dargestellt. Wenn Böden in den ersten 2 m Permafrost aufweisen werden sie als Gelisole eingestuft. Danach erfolgt die Unterteilung in organische und mineralische Böden. Die Böden fallen in die *Histels*, wenn sie mehr als 80 Volumenprozent organisches Material aufweisen. Die Mineralböden werden unterschieden in *Orthels* mit nur minimaler Kryoturbation und *Turbels* mit starken Merkmalen von Kryoturbation. Über die diagnostischen Merkmale werden sie weiter spezifiziert.

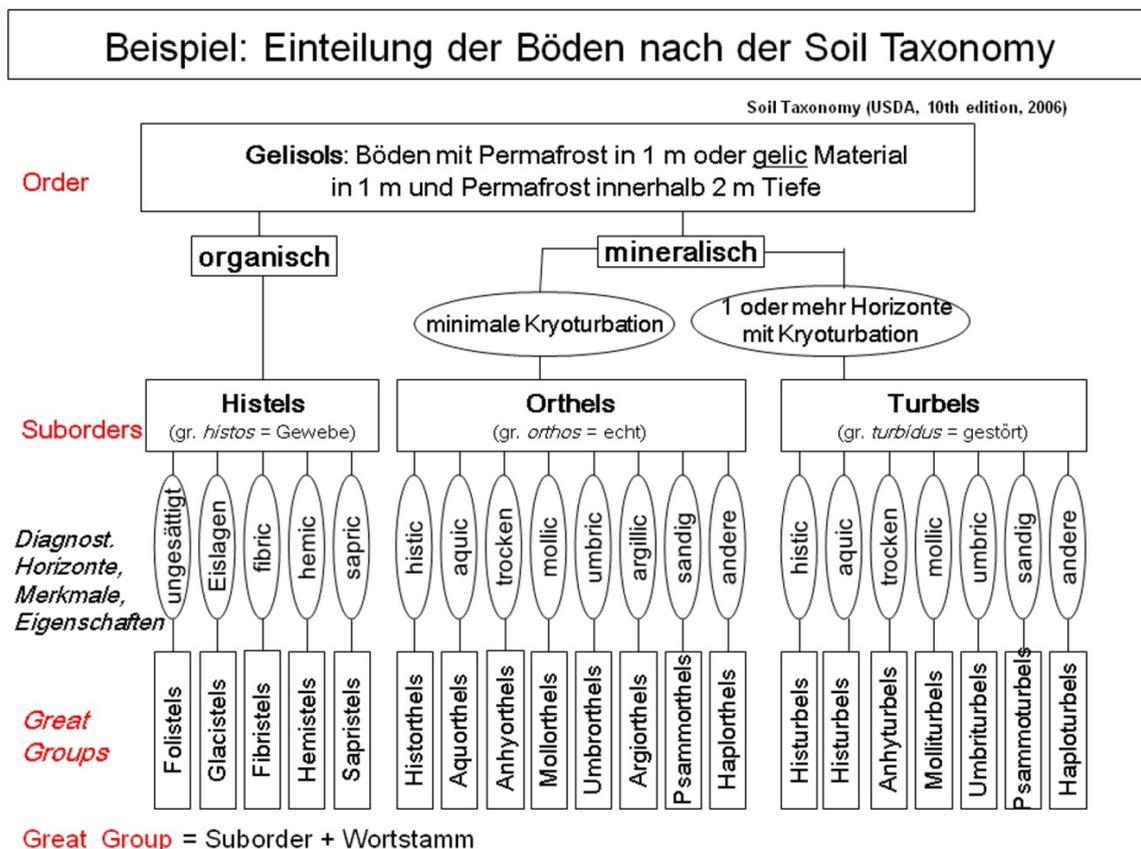


Abb. 2.4 Schema zur Klassifikation der Permafrostböden nach der US Soil Taxonomy
Modifiziert nach PFEIFFER

2.4.2 Charakterisierung der Ammoniak oxidierenden Mikroorganismen (AOM)

Zur Charakterisierung der AOM werden sowohl klassische mikrobiologische Methoden verwendet, wie der MPN-Test (Most Probable Number), Anreicherungsversuche, Aktivitätstests, immunologische Nachweise, als auch kultivierungsunabhängige Methoden wie Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung (FISH), Reverse Transkriptase PCR, oder auch Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (DGGE).

2.4.3 Nachweis von nitrifizierenden Mikroorganismen

Es wurden in den letzten Jahren mehrere Methoden entwickelt, um Bakterien speziell Nitrifikanten zu detektieren. Dazu gehören immunologische Untersuchungen an den Schlüsselenzymen wie der Ammoniakmonooxygenase (FIENCKE & BOCK 2004) oder der Nitritoxidoreduktase (BARTOSCH et al. 1999, 2002). Es wurden verschiedene molekularbiologische Methoden entwickelt, die Untersuchungen der mikrobiellen Diversität kulturunabhängig in unterschiedlichsten Habitaten ermöglichten (OVREAS et al. 1997, ISHII et al. 2000, WATANABE et al. 2004, GERDES et al. 2005, VAN DER GUCHT et al. 2005). Dazu zählen neben der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) (AMANN ET AL. 1995) oder der Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Analyse (RFLP) (VANECHOUTTE 1996) auch die Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (DGGE) oder die Temperierende Gradienten Gelelektrophorese (TGGE) (MUYZER ET AL. 1993, TESKE ET AL. 1994). In der vorliegenden Arbeit wurde mit der DGGE gearbeitet. Dazu müssen Amplifikate mittels PCR hergestellt werden. 1983 wurde erstmals die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) von Kary B. Mullis vorgestellt. Diese Technik ermöglicht, dass die DNA als Träger der Erbinformation auch außerhalb einer Zelle vervielfältigt werden kann. Da die Vervielfältigung zumindest theoretisch exponentiell verläuft, ist es möglich, auch mit Proben mit geringen DNA-Mengen zu arbeiten (SAIKI et al. 1988).

2.4.4 Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (DGGE)

Mit Hilfe der DGGE lassen sich DNA-Fragmente, die die gleiche Länge, aber unterschiedliche Sequenzen aufweisen, in einem Polyacrylamidgel mit einem linearen Harnstoff/Formamid-Gradienten auftrennen (FISCHER & LERMAN 1979, 1983). Dies ist möglich bei einer Fragmentlänge der Amplifikate zwischen 500 und 1000 bp (SHEFFIELD et al. 1989), aber auch mit kleineren Fragmenten von z.B. 360 bp (ALAWI 2003). Aus dem genetischen Material, das mit einer DNA-Extraktion aus Reinkulturen, Anreicherungskulturen oder Naturproben gewonnen worden ist, wurde unter Verwendung des Eubakterien-Primersets (MUYZER et al. 1998) in einer PCR-Reaktion ein Fragment der 16S-rRNA-Gene amplifiziert. Das PCR Produkt wird in einer DGGE aufgetrennt. Durch das Vorhandensein von Harnstoff und Formamid wird die DNA zusätzlich denaturiert, d.h. es wird ein Aufschmelzen der doppelsträngigen DNA verursacht. Der gebildete Harnstoff/Formamid-

Gradient im Gel führt beim Gellauf mit zunehmend denaturierenden Bedingungen zu einem partiellen Schmelzen der doppelsträngigen DNA. Durch die Formänderung, d.h. Bildung von einzelsträngigen Bereichen und Loops, kommt es zu einer Reduktion der Mobilität des DNA-Fragmentes im Gel. Nach ca. 16 Stunden Elektrophorese bei einer konstanten Temperatur von 60 °C und einer angelegten Spannung von 100 V bildet die DNA abhängig von ihrem sequenzspezifischen Schmelzverhalten distinkte Banden (MUYZER & SMALLA 1998). Das Aufschmelzen der DNA ist sequenzabhängig und vollzieht sich nicht linear, sondern es ist sowohl vom Anteil an Cytosin und Guanin, die eine Dreifachwasserstoffbrückenbindung bilden, als auch von übergeordneten Schmelzdomänen abhängig. Bei der Betrachtung von Schmelzdomänen wird der gegenseitige Einfluss der Basen eines größeren Bereiches betrachtet, denn die Auftrennung zwischen zwei Basen ist in einem großen Maße auch von den benachbarten Basensequenzen abhängig. Für die taxonomische Charakterisierung der nitrifizierenden Lebensgemeinschaften ist die Amplifikation des 16S-rRNA-Gens gut geeignet. Das gilt auch für die Mehrzahl anderer Bakteriengruppen und vor allem bei Untersuchungen von Mischpopulationen. Mit der Amplifikation der 16S-rRNA-Gene können theoretisch alle Bakterienvertreter erfasst werden. Für phylogenetische Untersuchungen sind ebenfalls die Sequenzen der 16S-rRNA codierenden Gene am besten geeignet, da so alle prokaryotischen Organismen miteinander verglichen werden können. Das Gen kann also als Gradmesser für die Verwandtschaftsverhältnisse dienen. Es werden Abschnitte auf der 16S-rRNA-Gene mit einander verglichen, die in hypervariablen Bereichen (V1 und V3) liegen. In dieser Arbeit wurden aber auch Primersets für die 16S-rRNA-Gene der Archaeen verwendet, sowie spezifische Primersets für die 16S-rRNA-Gene für Ammoniakoxidanten der Betaproteobakterien und für die bakteriellen und archaealen Gene der Ammoniakmonooxygenase.

2.4.5 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) und Immunfluoreszenz (IF)

Die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) (AMANN et al. 1995) und immunologische Untersuchungen an den Schlüsselenzymen wie der Ammoniakmonooxygenase (FIENCKE & BOCK 2004) dienen in dieser Arbeit dazu, die Ammoniakoxidanten in Anreicherungskulturen zu charakterisieren. Bei beiden Methoden werden die Zellen fixiert und deren Zellwand permeabel gemacht, so dass entweder spezifische Sonden gegen die 16S rRNA Gene oder spezifische Antikörper gegen die verschiedenen Untereinheiten der AMO in die Zellen gelangen können. In mehreren Arbeiten wurden die Ammoniakoxidanten direkt in den Proben mit Hilfe der *In-situ*-Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden (engl.: fluorescence *in situ* hybridisation = FISH) gegen die 16S rRNA Gene detektiert (MOBARRY et al. 1996, WAGNER et al. 1996, JURETSCHKO et al. 1998, VOYTEK et al. 1999). Auch die komplexe mikrobielle Population von sibirischen Tundraböden konnte teilweise mit Hilfe der FISH- Methode aufgedeckt werden (KOBABE et al. 2004, 2005).

2.4.6 Reverse Transkriptase RCR

Das Prinzip der Reverse Transkriptasen (RT) PCR beruht darauf, dass die gesamte RNA aus einer Kultur oder einer Bodenprobe isoliert wird, und anschließend die RNA in cDNA mit Hilfe des Enzymes Reverse Transkriptase umgeschrieben wird. Die RT ist aus Viren bekannt, die ihre Erbinformationen in RNA gespeichert haben und diese mit der RT in die DNA des Wirtes einbauen können. Die im Versuch gebildete cDNA kann dann als Template für eine PCR genutzt werden, z.B. mit spezifischen Primern gegen die *amo* Gene. Diese beiden Schritte können heute mit Kits einiger Firmen schon in einem Schritt durchgeführt werden. Bei dieser Methode sind aber einige Schwierigkeiten zu beachten, z.B. der besondere Umgang mit RNA, da diese schnell durch kontaminierte RNAsen abgebaut werden können. Dafür ist es aber eine der wenigen Methoden, um die Aktivität einer spezifischen Gruppe zu einem bestimmten Zeitpunkt nachzuweisen. Es gab auch bereits einige Untersuchungen von Ammoniakoxidanten mit dieser Methode (KOWALCHUK et al. 1999, TREUSCH et al. 2005, DI et al. 2010).

3. BESCHREIBUNG DER UNTERSUCHUNGSGEBIETE

Als Untersuchungsgebiet dient hauptsächlich die Insel Samoylov in Lena-Delta, Nordostsibirien. Als Vergleichsstandort wurde die Hahnheide in der Nähe von Hamburg gewählt, dort sollte zum einen Vergleichsstudien durchgeführt werden und zum anderen sollten Proben des Vergleichsstandortes zur Methodenentwicklung genutzt werden.

3.1. Untersuchungsgebiet im kalten Klimat – die Insel Samoylov im Lena-Delta

Das Permafrost-Untersuchungsgebiet gehört zum Hinterland der Laptev-See, die ein Randmeer des Arktischen Ozeans ist und sich zwischen der Taimyr-Halbinsel und den Neusibirischen Inseln in Nord-Zentral-Sibirien, Russland befindet (Abb.3.1). Die Untersuchungen wurden im Lena-Delta auf der Insel Samoylov (Abb. 3.2) durchgeführt. Durch die Lage der Insel Samoylov im zentralen Deltabereich ist der Einfluss mariner Sedimente sehr gering und der Großteil der terrestrischen Sedimente wird über die Lena ins Delta eingetragen.

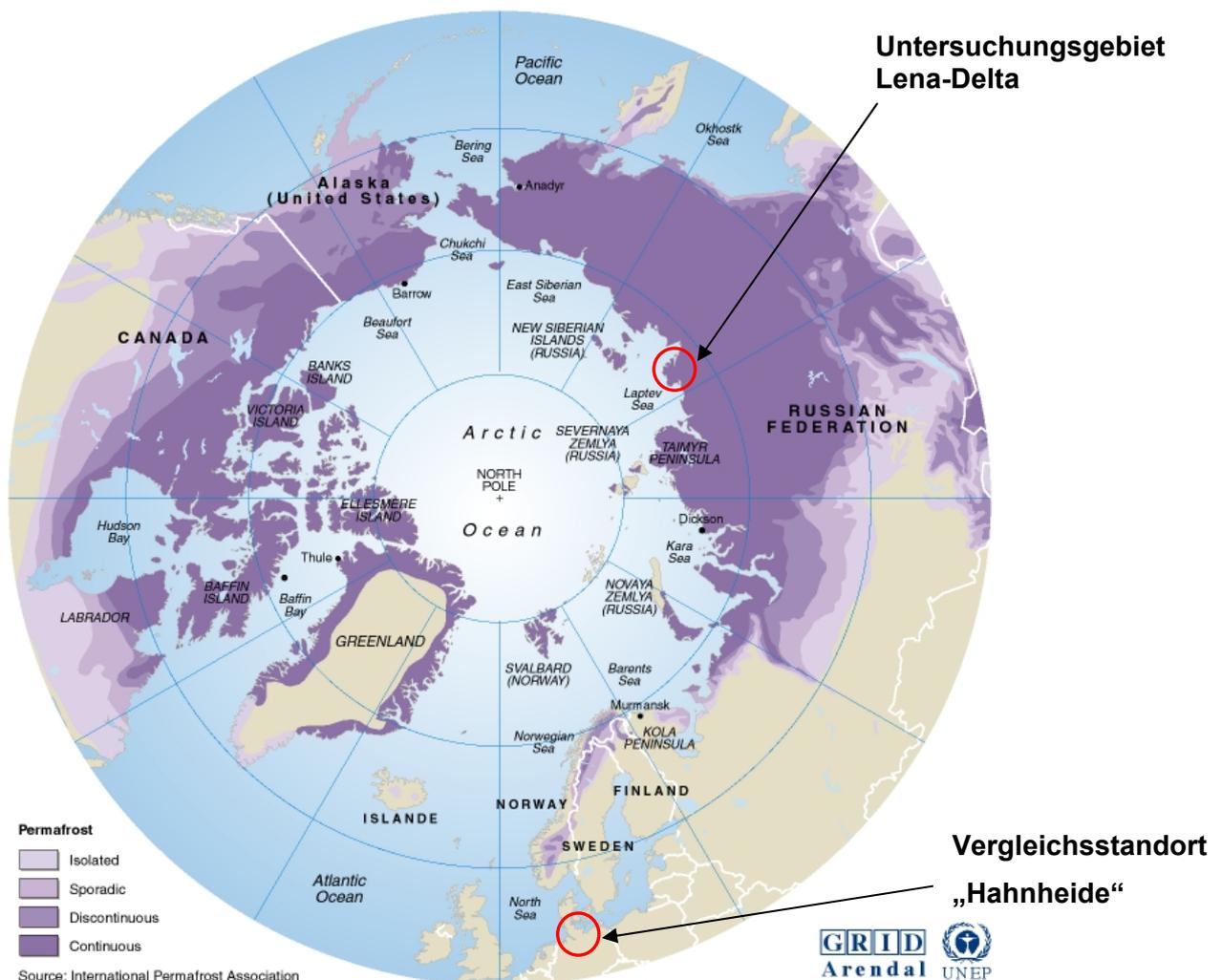


Abb. 3.1 Lage des Untersuchungsgebiets in der Zone des kontinuierlichen Permafrostes. (Karte: International Permafrost Association). Die beiden Untersuchungsgebiete sind eingetragen.

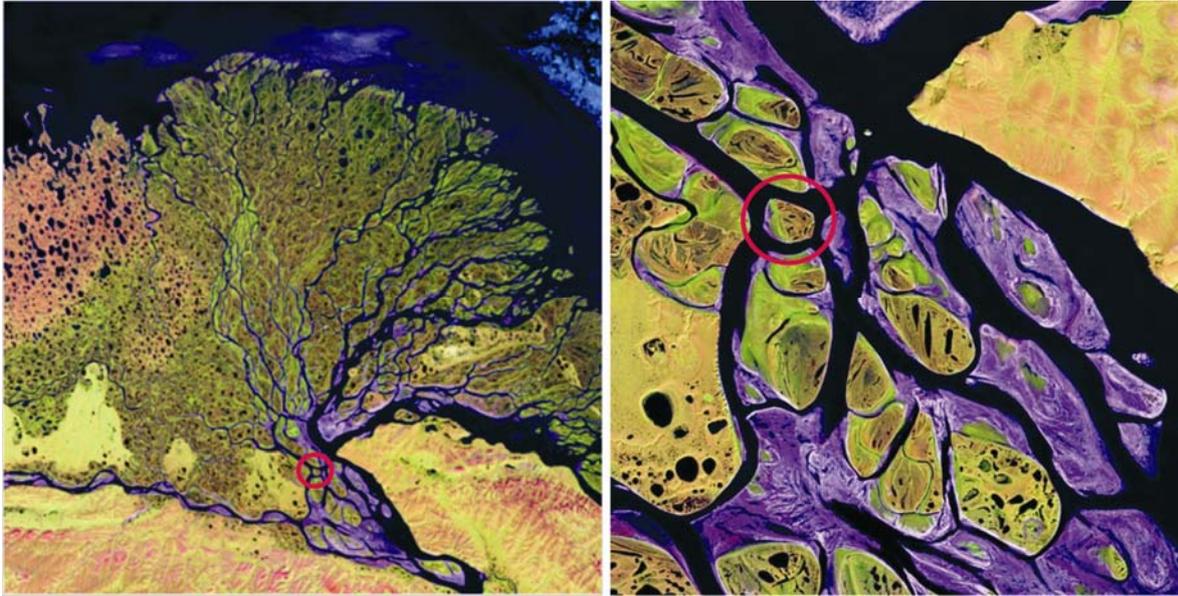


Abb. 3.2 Lage des Untersuchungsgebietes im Lena-Delta
(Satellitenbild: NASA Earthwind). Der rote Kreis markiert die Insel Samoylov.

Das Klima in der Küstenregion der Laptewsee ist durch sehr niedrige Temperaturen und geringe Niederschläge arktisch und kontinental geprägt. Die mittleren Jahresniederschläge liegen zwischen 230 und 323 mm, die jährlichen Durchschnittstemperaturen der Luft zwischen -12 °C und -14 °C (Abb.3.3) (DEVEVIAGIN & KUNITSKY 2004, ROSHYDROMET 2010). Trotz der geringen Niederschläge ist das Klima als humid einzustufen, da die Evapotranspiration bei den niedrigen Temperaturen gering ist (Abb. 3.3). Die durchschnittlichen Temperaturen im Sommer und Winter liegen mit ca. + 5 bis + 10 °C im Juli und - 32 bis - 36° C im Januar mehr als 40 °C auseinander. Der Sommer im Lena-Delta ist kurz, Tages-Durchschnittstemperaturen über 0 °C werden von ca. Mitte Juni bis Mitte September erreicht. Die Periode von Anfang Mai bis Anfang August wird als Polartag bezeichnet; Die Periode von Mitte November bis Ende Januar als Polarnacht.

Das Untersuchungsgebiet gehört zur 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 außerdem vor allem Flechten und Zwergsträucher (z.B. *Dryas*, *Salix*) vor (ZIMMERMANN 2006).

Das Lena-Delta ist mit 32.000 km² und ca. 1500 Inseln das größte Delta der Arktis. Es gehört zum „Naturschutzgebiet Lena-Delta und Neusibirische Inseln“. Namensgebend ist der Fluss Lena, der mit 4270 km einer der längsten Flüsse der Erde ist. Sie entspringt in der Nähe des Baikalsees. Das Lena-Delta lässt sich in drei unterschiedlich alte Flussterrassen untergliedern (SCHWAMBORN et al. 2002).

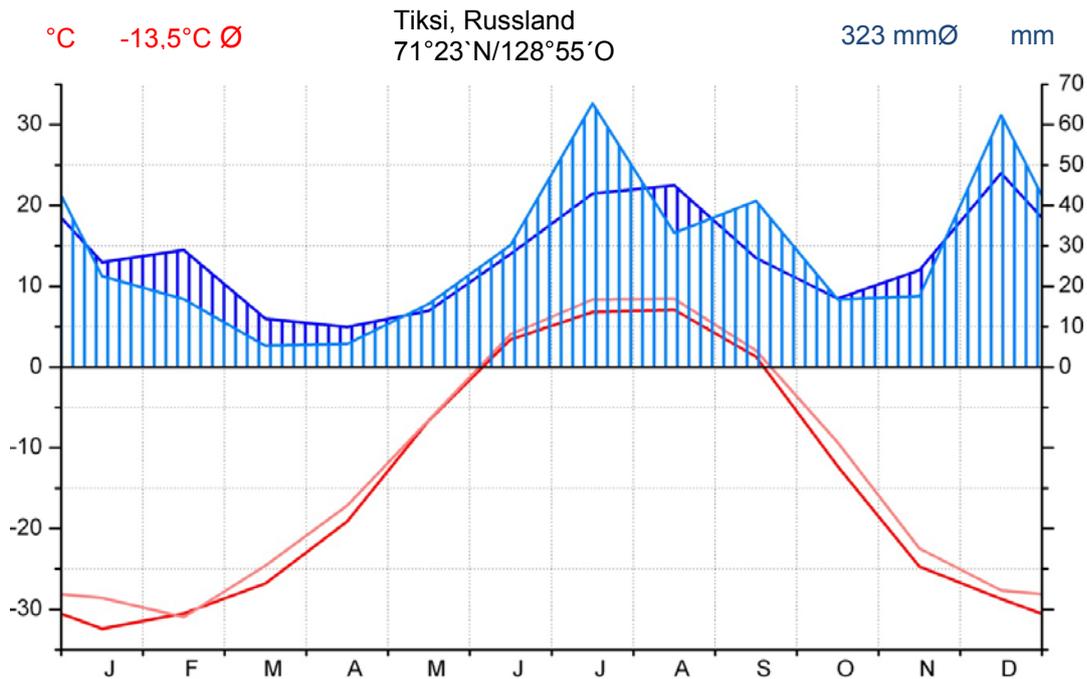


Abb. 3.3 Klimadiagramm für Tiksi für die Jahre 1961-1990 und 1999-2009

Die Klimastation liegt ca. 150 km südöstlich vom Standort. ROSHYDROMET (2010). Hellblau und hellrot: Temperatur (1999-2009) und Niederschlag (2000-2004). Nach Russia's Weather server 2010.

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. 3.2) und hat eine Fläche von 5 km². 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 Ammoniakoxidation und zum Stickstoffkreislauf 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. 3.4). Das Makrorelief ist mit Hangneigungen von weniger als 0,2 % eben (KUTZBACH 2006). 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. Bei der Eiskeil-Bildung kommt es zur Aufwölbung der Polygonränder, weil der Permafrostkörper sich im Sommer durch die Erwärmung ausdehnt. Die im jeweiligen Winter

und Frühjahr entstandenen bzw. herangewachsenen Eiskeile (siehe Abbildung 3.4) verhindern dabei eine laterale Ausdehnung, weshalb sich die Böden entlang der Eiskeile langsam aufwölben (WASHBURN 1979).



Abb. 3.4 Luftbild der Eiskeil-Polygon-Landschaft auf Samoylov.

Auf dem Bild sind vor allem die Untersuchungsinstrumente (Klima-, Boden-, und Eddy Covariance-Messstationen) zu sehen. Die eingezeichneten Pfeile markieren die Messstationen.

Die Böden in den terrestrischen Küstenebenen der Laptev-See tauen im Sommer ca. 30 - 60 cm tief auf. Diese sommerliche Auftauzone (*active layer*) ist, wie generell an Permafrost beeinflussten 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 untersuchten Böden der spätholozänen Flussterrasse auf der Insel Samoylov wurden erstmals von KUTZBACH et al. (2004) beschrieben. Diese Untersuchungen können wie folgt zusammengefasst werden: Die Böden der Polygonzentren 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 Polygonzentren 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 werden hier als *Glacic* oder *Typic Aquiturbels* klassifiziert (nach Soil Survey Staff 2003). Für die Untersuchungen der Ammoniakoxidation wurden die Böden der unterschiedlichen geomorphologischen Landschaftseinheiten der Insel Samoylov miteinander verglichen. Die Böden lagen in der noch jungen Überflutungsebene und in der höher gelegenen Flussterrasse, die einen großen Bereich mit Eiskeilpolygonen und einen kleinen trockeneren

Bereich im Süden aufweist. Die Abbildung 3.5 gibt einen Überblick über die Insel Samoylov, im Bildausschnitt sind die einzelnen Probenahmeorte der Insel eingezeichnet.

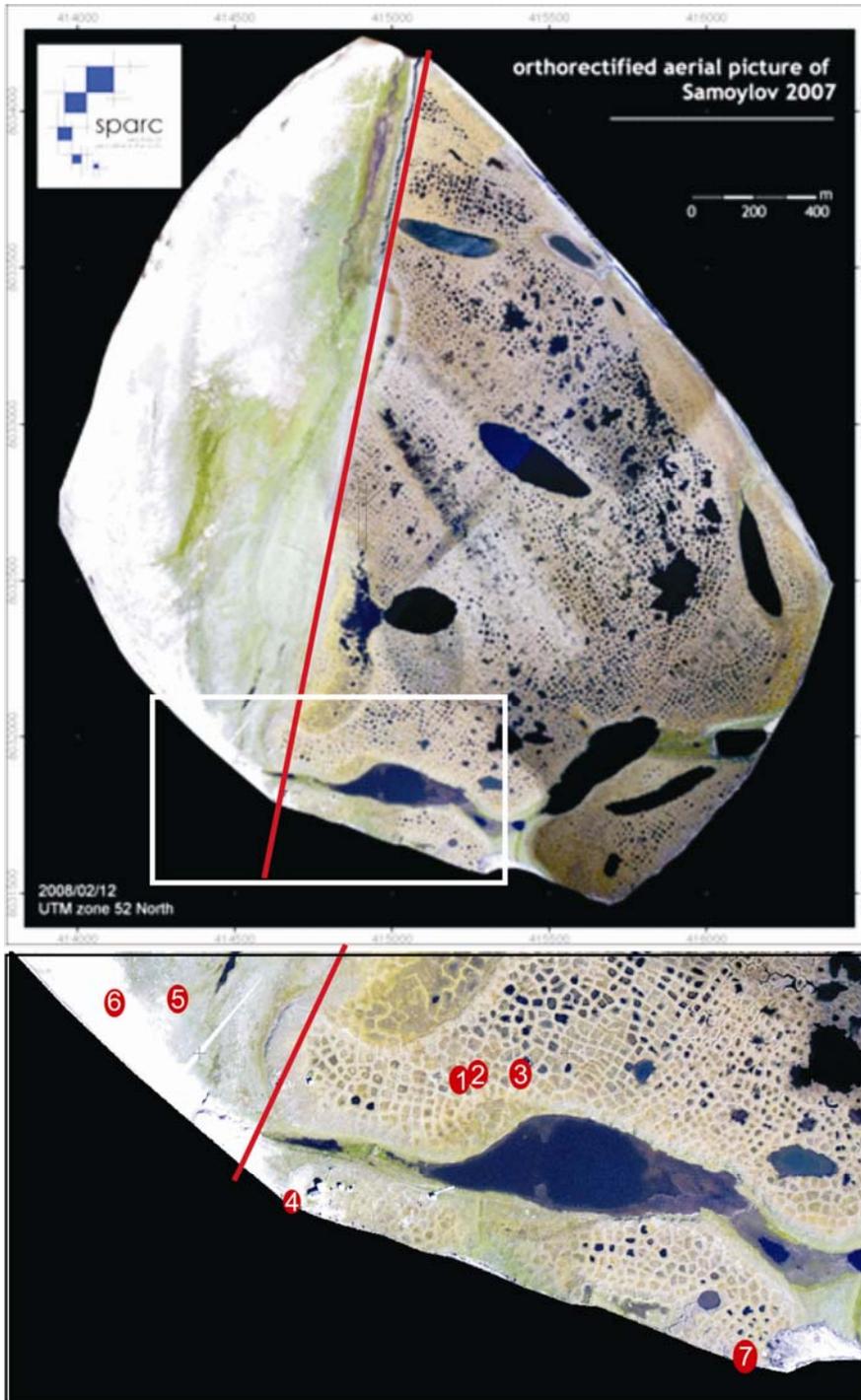


Abb. 3.5 Orthorektifiziertes Luftbild der Insel Samoylov.

Sparc: Sensitivity of Permafrost in the Arctic.(SPARGROUP et al. 2008) Die roten Punkte markieren die Probenahmeorte 1: Polygon Nr. 2 2007, 2: Polygon Nr. 1 2007 3: Polygon 2008 4: Trockene Flussterrasse mit Kliff 5: Überflutungsebene, 6: Strand und 7: Samoylovkliff. Der rote Strich in den Bildern unterscheidet die Flussterrasse von der Überflutungsebene

Ein Überblick über die untersuchten Umweltproben, ihre Probenahmeort und die entsprechenden Anreicherungskultur ist auch auf der letzten Seite dieser Arbeit zu finden, die ausgeklappt werden kann.

In den geomorphologischen Einheiten wurden an repräsentativen Punkten fünf Standorte ausgesucht, die sich deutlich in ihren Bodentypen, in der Lage in den geomorphologischen Einheiten, im Wasserregime und in der Vegetation unterschieden. Während der Feldkampagne 2007 lag der Schwerpunkt der Untersuchung auf den Böden der Polygonebene (Standort 1 und 2). Im darauf folgenden Jahr 2008 wurden auch die Böden der jüngeren Überflutungsebene und die trockene höher gelegene Flussterrasse untersucht. In dieser höher gelegenen Flussterrasse wurden von einem Polygon jeweils der Wall und das Zentrum (Standort 3) und die trockene Flussterrasse mit dem anliegenden Kliff beprobt (Standort 4). In der jüngeren Überflutungsebene wurden die vegetationsbedeckte Überflutungsebene (Standort 5) und der Strand (Standort 6) beprobt. Zusätzlich erfolgte eine engmaschigere Beprobung des Samoylov-Kliffs am Standort 7, im Südosten der Insel.

3.2. Untersuchungsgebiet im gemäßigten Klimat – Hahnheide bei Hamburg

Der gemäßigte Vergleichsstandort liegt am norddeutschen Geestrand in der Hahnheide, Schleswig-Holstein. Die Hahnheide ist mit einer Fläche von ca. 25 km² eines der größten zusammenhängenden Waldgebiete in Schleswig-Holstein. In westlicher Richtung wird die Hahnheide vom Mühlenbach und der Stadt Trittau eingegrenzt. Im Osten und Südosten begrenzen der Fluss Bille und die ihn umgebenden Niederungsflächen das Gebiet. In die anderen Richtungen wird die Hahnheide von Feldmarken einiger Dörfer begrenzt. Die Abbildung 3.6 gibt einen Überblick über den Probenahmestandort in der Hahnheide.

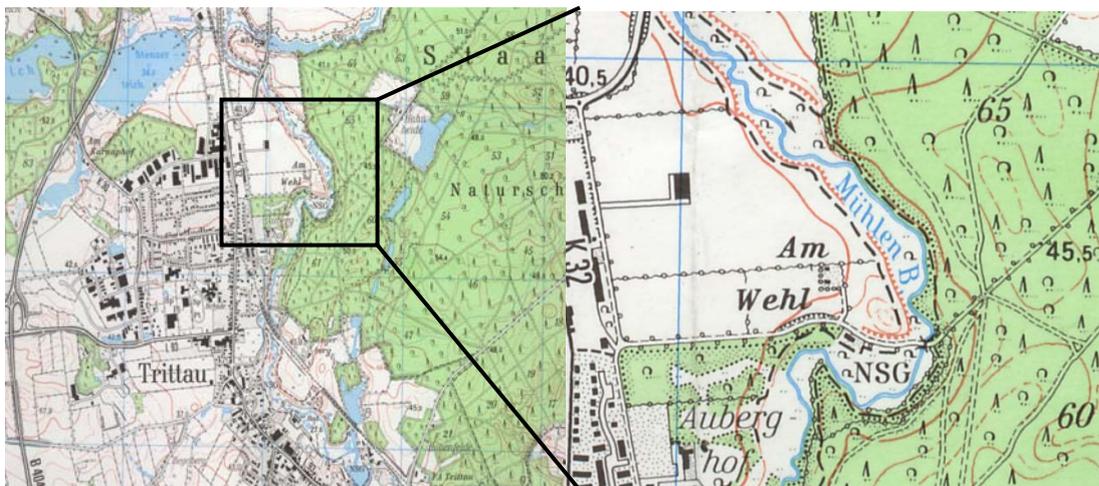


Abb. 3.6 Lage der Untersuchungsgebiet im gemäßigten Klimat

Zu sehen ist die Stadt Trittau und in der Vergrößerung der Verlauf des Mühlenbachs am Rande der Hahnheide. Ausschnitt aus der Topographischen Karte (Normalausgabe 2328 Trittau)(2004)

Die Profilaufnahme und Probenahme für die vorliegende Arbeit erfolgte am westlichen Ende der Hahnheide im Auenbereich des Mühlenbaches.

Morphologisch handelt es sich um ein Hochgebiet mit einem durchschnittlichen Höhengniveau von 60 bis 80 m über NN, das durchschnittlich 30 bis 40 m höher als sein Umland liegt. Der höchste Punkt in der Hahnheide mit 99,1 m über NN ist der *Hahnheider Berg* (FIENCKE et al. 2009). Das Klima im Bereich der Hahnheide ist überwiegend atlantisch dominiert, in das jedoch bereits kontinentale Einflüsse wirken. Die atlantische Komponente bewirkt durch die feuchte Meeresluft ein ganzjähriges humides Klima mit viel Niederschlag. Der durchschnittliche Jahresniederschlag liegt um 750 mm, der, von einem leichten Maximum im Juli und August abgesehen gleichmäßig über das Jahr verteilt ist. Die durchschnittliche Jahrestemperatur beträgt zwischen 7,6 und 8,1 °C. In Abbildung 3.7 ist zum Vergleich das Klimadiagramm der Wetterstation am Hamburger Flughafen angegeben, der ca. 30 km westlich der Hahnheide liegt. Die mittlere Jahrestemperatur von 1971 bis 2000 betrug 9 °C und der durchschnittliche Niederschlag in diesem Zeitraum belief sich auf 773 mm.

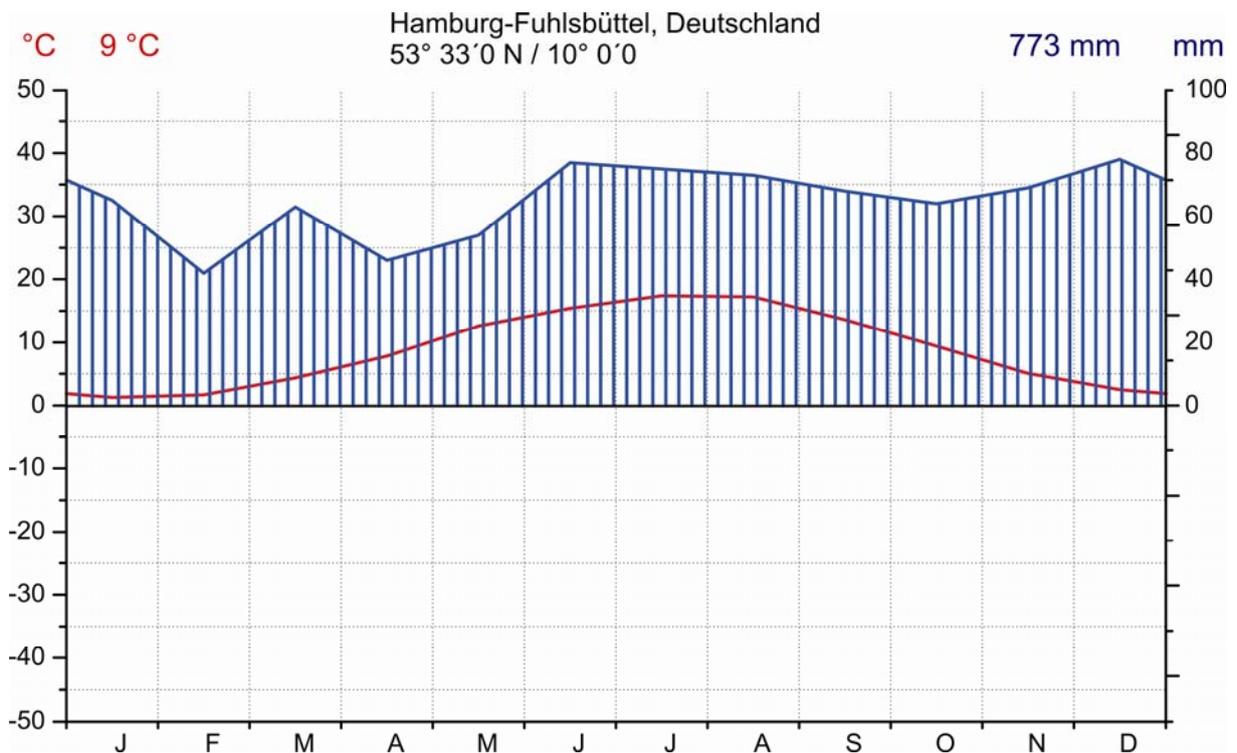


Abb. 3.7 Klimadiagramm für Hamburg Fuhlsbüttel für die Jahre 1971-2000

Die Wetterstation liegt ca. 30 km westlich von der Hahnheide am Hamburger Flughafen. In Rot ist die Temperatur im Wetter der Jahre 1971 bis 2000 angegeben. In Blau die der durchschnittliche Niederschlag derselben Jahre dargestellt. Quelle ist die Internetseite <http://www.klimadiagramme.de>

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Probenahme und bodenkundliche Standortaufnahme

Die untersuchten Bodenproben stammen hauptsächlich von der Insel Samoylov, im Lena-Delta, in Nordostsibirien. Für Vergleichsanalysen wurden Bodenproben aus der Hahnheide, Schleswig-Holstein, Deutschland, genommen.

Die Probennahmen in Sibirien fanden im Juli 2007 und Juli/August 2008 auf der Insel Samoylov im Lena-Delta, Sibirien, statt. Die Expeditionen wurden in Kooperation mit dem Alfred-Wegener-Institut (AWI, Potsdam) und ARII (Russland) durchgeführt. Im Juli 2007 wurde ein Transekt durch ein Eiskeilpolygon vom Eiskeil am Rand des Polygons bis in das Zentrum des Polygons gegraben. Der Transekt wurde in einer Breite von etwa 50 cm bis zur Permafrosttafel ausgehoben, so dass der Boden offen lag und so beschrieben und beprobt werden konnte. An diesem Polygon wurden sowohl im Juli als auch August jeweils Proben in einer Tiefe von 0 - 5, 5 - 15 und 15 - 25 cm am Polygonwall und im Polygonzentrum entnommen (siehe Abbildung 3.5 Standort 2 oder die Abbildung auf der letzten Seite). Zusätzlich wurde in den gleichen Tiefen aus einem anderen Polygon Bodenproben entnommen (Abb. 3.5 Standort 1).

2008 wurden neben einem Eiskeilpolygon (Abb 3.5 Standort 3) noch 3 weitere Bodenstandorte auf der Insel Samoylov untersucht, trockene Flussterrasse mit Kliff (Abb. 3.5 Standort 4), der Überflutungsebene (Standort 5) und der Strand (Standort 6). An diesen Standorten (3, 4, 5 und 6) wurden jeweils 3 Profile bis zur Permafrosttafel gegraben, d.h. zwischen 23 und ca. 70 cm tief. Vor Ort wurden die untersuchten Böden bodenkundlich beschrieben und anschließend wurden Bodenproben entnommen. Dabei wurde die Bodenfarbe anhand der Farbtabelle 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 BIS 2008) sowie nach der *World Reference Base for Soil Resources (FAO 2006)*, der russischen Klassifikation (ELOVSKAYA 1987) und nach der deutschen Kartieranleitung KA 5 (AD-HOC-AGBODEN 2005).

Die Böden wurden nicht horizontweise beprobt, sondern aus alle Böden wurden Mischproben in drei Tiefen entnommen: 0 cm bis 5 cm, 5 cm bis 15 cm und 15 cm bis 25 cm. Es wurde zwischen 400 und 1500 g Bodenmaterial entnommen. Neben diesen Bodenstandorten wurden Proben an einem Küstenaufschluss entnommen, dem Standort 7

Samoylovkliff (Abb. 3.5). Vor der Probenahme wurde an den Probennahmepunkten zunächst getautes Material entfernt, ab einer Tiefe von 4,10 m wurde in den Permafrost gegraben. Die Permafrostproben wurden aus dem dahinter liegenden ungestörten Material entnommen, da die Küstenaufschlüsse während der Sommermonate fortwährend Material durch Thermoerosion verlieren.

Für jeden Standort wurden in drei verschiedenen Profilgruben Proben entnommen, diese wurden geteilt und je eine Parallele gefroren und eine ungefroren nach Hamburg transportiert. In Hamburg wurden die ungefrorenen Proben nach mehr als drei monatigen Transport homogenisiert und anschließend bei 4 °C gelagert. Die Homogenisierung erfolgte mit Hilfe eines Siebes (\varnothing 2 mm), dabei wurden die organkreichen Böden mit hohem Torfanteil mit Hilfe von Scheren zerkleinert. Die gefrorenen Proben wurden langsam auf Eis aufgetaut und schließlich ebenso behandelt.

Als Vergleichsboden diente ein Auenbereich am Mühlenbach in der Hahnheide, Schleswig-Holstein, Deutschland. Die Vergleichsflächen sollten folgenden Kriterien entsprechen: 1. Es sollten Böden in gemäßigten Klimaten sein. 2. Sie sollten einen Übergang zwischen Torf und Aue aufweisen. 3. Die Böden sollten Ähnlichkeiten mit den Böden in Sibirien haben. 4. Der Eintrag von Stickstoffverbindungen über Düngung sollte möglichst gering sein.

Die Proben aus dem Vergleichsstandort dienten dem Vergleich der Bodeneigenschaften und der potentiellen Stickstoffumsätze und zur der Methodenentwicklung anhand ähnlicher, aber einfacher zu beschaffender Proben. Die Bodenproben wurden in erster Linie zur Methodenentwicklung und Etablierung der Arbeiten mit der RNA genutzt. Insgesamt wurden im Jahr 2009 an drei Tagen (4. März, 8. April und 16. Dezember) in drei Profilen Proben entnommen. An den Terminen im Frühjahr 2009 fand auch eine Bodenansprache wie oben beschrieben statt.

4.2 Herkunft der verwendeten Anreicherungskulturen

Während dieser Arbeit konnte auf AOM Anreicherungskulturen zurückgegriffen werden, die in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Eva Spieck (Biozentrum Klein Flottbek) bereits während des Verbundprojektes LAPTEVSEE hergestellt worden sind. In der Tabellen 4.1 sind die ursprünglichen Bodenproben angegeben mit der Probenbezeichnung, dem Probenahmeort und der Entnahmetiefe.

Die Proben wurden in den Jahren 2004 und 2005 auf der Insel Samoylov entnommen. Zum einen wurden Proben aus unterschiedlichen Polygonen gewonnen, aus dem Wall, Hang und Zentrum (Tabelle 4.1) und zum anderen wurde das Kliff auf Samoylov untersucht und beprobt.

Tabelle 4.1 Herkunft der verwendeten Anreicherungskulturen

Samoylov Polygon 2004			Samoylov-Kliff 2004		Samoylov Polygon 2005		
Probe-nummer	Probe-nahmeort	Tiefe unter GOF [cm]	Probe-nummer	Tiefe unter GOF [m]	Probe-nummer	Probe-nahmeort	Tiefe unter GOF [cm]
W 0 - 5	Wall	0-5	3301	0,8 – 1,0	1	Wall	0-5
W 8,5 - 13,5	Wall	8,5-13,5	3302	1,4 - 1,5	3	Wall	8,5-13,5
W 17 - 22	Wall	17-22	3303	1,9 – 2,0	5	Wall	17-22
PH 0 - 5	Hang	0-5	3304	2,4 - 2,5	7	Hang	0-5
PH 6 - 11	Hang	6-11	3305	2,9 - 3,0	9	Hang	6-11
PH 12 - 17	Hang	12-17	3306	3,5 – 3,6	11	Hang	12-17
C1 0 - 5	Zentrum	0-5	3307	3,9 – 4,0	13	Hang	17-21
C1 12 - 17	Zentrum	12-17	3308	4,5 – 4,6	14	Wall	35 - 39
C1 24 - 29	Zentrum	24-29	3309	5,0 – 5,1	15	Zentrum	0-5
			3310	5,5 – 5,6	17	Zentrum	12-17
					19	Zentrum	14-29

Die Probenahme erfolgte durch Dirk Wagner, AWI Potsdam, Hanno Meyer, AWI Potsdam, Eva-Maria Pfeiffer, Uni Hamburg und Susanne Kopelke, Uni Hamburg. Daten aus SANDERS (2006), ZIMMERMANN (2006) und ALAWI (2007)

4.3 Bodenchemische und –physikalische Laboruntersuchungen

Die bodenkundlichen, -chemischen und –physikalischen Analysen dienen in erster Linie dazu, die Böden zu charakterisieren und zu klassifizieren. In Tabelle 4.2 sind alle gemessenen Parameter und die dazugehörigen Analyseverfahren und entsprechenden Referenzen angegeben.

Grundsätzlich wurden die Methoden in Hamburg am Institut für Bodenkunde durchgeführt. Die pH-Wert- und Leitfähigkeitsmessung- sowie die Wassergehaltsbestimmung wurden auch bereits vor Ort auf Samoylov durchgeführt.

Tabelle 4.2 Methoden der bodenkundlichen Laboranalytik

Parameter	Analyseverfahren
Korngrößenverteilung	<ul style="list-style-type: none"> • Kombiniertes Sieb- und Pipettverfahren nach Köhn (SCHLICHTING et al. 1995) DIN 18123 (1983), DIN 19683-1 und 19683-2 (1973) • Bei organischen Kohlenstoffgehalten von >1 % Humusbefreiung mit H₂O₂ vor der Korngrößenanalyse.
Porung	DIN ISO 11274 (1998)
pH-Wert	In aqua bidest nach DIN 19684-1 (1977) <ul style="list-style-type: none"> • 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.
Leitfähigkeit	• DIN ISO 11265(1996)
Wassergehaltsbestimmung	• DIN ISO 11461(2001)
C und N gesamt	• Elementaranalysator (Elementar VarioMAX) mit Wärmeleitfähigkeitsdetektor; Verbrennung bei 900 °C.
Pflanzenverfügbares Phosphor und Kalium	<ul style="list-style-type: none"> • Doppellactat (DL)-Auszug nach VDLUFA (1991) • Messung von Phosphor am Photometer (DR Lange CADAS 100). • Messung von Kalium am Atomemissionsspektrometer (Perkin-Elmer 1100).
Kationenaustauschkapazität (KAK)	Nach SCHLICHTING (1995)

4.4 Quantifizierung von gelösten Stickstoffverbindungen in Böden

Die reaktiven gelösten Stickstoffverbindungen sind sowohl anorganisch als auch organisch. Die gelösten anorganischen Stickstoffverbindungen (dissolved inorganic nitrogen - DIN) liegen in drei Formen vor: Als Ammonium/Ammoniak ($\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$), Nitrit (NO_2^-) oder Nitrat (NO_3^-). Die gelösten organischen Stickstoffverbindungen (dissolved organic nitrogen DON) sind organische Verbindungen, die Aminogruppen enthalten. Mit der Bestimmung der DIN können Aussagen über die Stickstoffverfügbarkeit in Böden gemacht werden. Die DIN werden mit zwei unterschiedlichen Messverfahren bestimmt. Die Ammoniumkonzentrationen wurden mit einer photometrischen Methode; die Nitrit- und Nitratkonzentrationen wurden mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) bestimmt. Die DON werden nach einer Aufschlussmethode als Nitrat gemessen.

Probenvorbereitung

Für die Bestimmung der Konzentrationen der Stickstoffverbindungen wurde jeweils 5 g feldfrisches, homogenisiertes Bodenmaterial eingewogen. Dieses wurde mit 20 ml einer 0,0125 M CaCl_2 Lösung in einem Greinerröhrchen vermischt. Die Greinerröhrchen wurden eine Stunde auf einem Schüttler (125 rpm) bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Bodensuspension bei 8500 g zentrifugiert (Heraeus Biofuge Primo R). Der Überstand wurde zur Bestimmung der DIN Konzentration genutzt, bei zeitlicher Unterbrechung der Messungen wurde der Überstand eingefroren werden.

Bei der Arbeit auf den Expeditionen in Sibirien erfolgte die Inkubation bei *in-situ*-ähnlichen Temperaturen, d.h. der Schüttler (Fa. Bühler) wurde im Boden eingelassen. Die Zentrifugation erfolgte mit einer Epifuge (Fa. Haemofuge) bei 10.000 g.

4.4.1 Ammoniumbestimmungen

Bei der Ammoniumbestimmung nach LUFA reagieren die Ammoniumionen bei einem hohen pH-Wert von etwa 12,6 mit Hypochloritionen und Salicylationen in Gegenwart von Natriumpentacyanonitrosylferrat zu einem blaugefärbten Komplex. Die Hypochloritionen entstehen im alkalischen Medium durch Hydrolyse der Ionen der Dichlorisocyanursäure. Der Nachweis des blauen Komplexes erfolgte bei 655 nm mit dem Spektralphotometer (Themo Scientific). Der Messbereich lag zwischen 0,75 μM und 75 μM NH_4Cl .

Zur Vorbereitung wurden 800 μl der zu messenden Probe mit 40 μl aqua dest je 80 μl der Lösung 1 und Lösung 2 versetzt und vermischt. Nach einer einstündigen Inkubation wurde die Probe gemessen.

Lösung 1:

13 g	Natriumsalicylat (C_7H_5ONa)
13 g	Trinatriumcitrat ($C_6H_5O_7Na \times 2 H_2O$)
0,097 g	Nitroprussid-Natrium (Dinatriumpentacyanonitrosylferrat, $Na_2Fe(CN)_5NO \times 2 H_2O$)
ad 100 ml	aqua dest

Die Lösung ist im Dunkeln 4 Wochen haltbar

Lösung 2:

3,2 g	NaOH
0,2 g	Dichlorcyanursäure-dinatriumsalz (Natriumdichlorisocyanurat, $C_3NCl_2O_3Na$)
ad 100 ml	aqua dest

Die Ammoniumbestimmung mit OPA basiert auf einem indirekten Nachweis der Ammonium-Ionen durch eine Reaktion mit β -Mercaptoethanol und Phthaldialdehyd zu einem gelben N-substituierten 1-(2-Hydroxyethyl)-Thioisindol. Die Methode wurde von CORBIN (1984) für die HPLC entwickelt.

50 μ l Probe und 950 μ l Derivatisierungsreagenz werden zusammengegeben und gut gemixt. Nach einer einstündigen Inkubation im Dunkeln wird das Gemisch bei einer Wellenlänge von 420 nm gemessen. Eine Eichung erfolgt alle 10 bis 15 Proben. Der Messbereich liegt zwischen 0,01 und 1 mM Ammonium.

Derivatisierungsreagenz (OPA)

540 mg	OPA (ortho-Phthaldialdehyd)
10 ml	Ethanol absolut
50 μ l	β -Mercaptoethanol
ad 100 ml	Phosphatpuffer (0,2 M pH 7,3)

Phosphatpuffer (0, 2 M)

Lösung A: KH_2PO_4	13,61 g	ad 500 ml aqua bidest
Lösung B: K_2HPO_4	34,84 g	ad 1000 ml aqua bidest

Durch das Mischen von Lösung A und Lösung B wird der pH-Wert auf 7,3 eingestellt

4.4.2 Nitrit- und Nitratbestimmung

Die Bestimmung der Nitrit- und Nitratkonzentrationen der Proben erfolgte in Hamburg meist durch die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC, High-Performance-Liquid-Chromatographie) nach MEINKE et al. (1992). Der Trennung der stark polaren Substanzen liegt das Prinzip der Ionenpaarchromatographie an einer Umkehr-Phase zugrunde. Als Gegenion wurde Tetrabutylammonium der mobilen Phase zugesetzt. Die entstandenen

Ionenpaare erhielten so einen genügend lipophilen Charakter, um durch die unpolare stationäre Phase verlangsamt zu werden. Dem unterschiedlichen Lösungsverhalten der beiden Ionenpaare entsprechend verlassen Nitrit und Nitrat die Säule nacheinander. Die mobile Phase wurde mit einer Flussrate von 1 ml pro Minute bei einem Druck ca. 90 bis 150 bar durch die Säule gepumpt. Die aufgetrennten Substanzen wurden mit einem UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 225 nm über die Absorptionsänderung registriert. Die Auswertung der Peaks erfolgt computergestützt durch die Integration der Peakflächen. Es wurden 50 µl Probe injiziert. Als HPLC System wurde die Agilent System 1200 genutzt, zur Auswertung diente das Computerprogramm Chemstation.

Die Kalibrierung erfolgte von 10 µM bis 10.000 µM. Bei jeder Messung wurden Standards mit einem Gemisch an Nitrit und Nitrat zur Überprüfung der Kalibrierung mitgemessen.

Laufmittel für die Nitrit / Nitrat-HPLC

360 ml Stammlösung

4365 ml aqua bidest.

Unter Rühren wird der Ausgangswert von pH 6,4 wieder eingestellt.

525 ml Methanol

Das Laufmittel musste durch Erwärmen und Schütteln entgast werden, damit keine Luftbläschen durch die Säule gepumpt werden.

Stammlösung (50 mM)

16,977 g TBAHS (Tetrabutylammoniumhydrogensulfat)

ad 1000 ml aqua bidest.

Der pH-Wert wird auf einen Wert von 6,4 eingestellt

Bei der Herstellung von Lösungen für die HPLC wurden immer aqua bidest. und höchst reine Lösungen verwendet, damit es nicht zu Verstopfung der Kapillare kommen kann.

Photometrische Nitritbestimmung

Bei der Untersuchung im Feld wurden die Nitritkonzentrationen im Feldlabor mit dem Photometer bestimmt. Die quantitative Bestimmung von Nitrit beruht auf der Bildung eines Diazoniumsalzes aus Sulfanilsäure und Nitrit mit der nachfolgenden Kopplung mit 1-Naphtylamin zu einem roten Azofarbstoff. Dazu wurde 500 µl der abzentrifugierten Probe zunächst mit 500 µl Sulfanilsäure versetzt und vermischt, anschließend wurde 500 µl NEDA hinzugeben und wieder vermischt. Die Messung erfolgte nach einer einstündigen Inkubation bei einer Wellenlänge von 546 nm (Photometer, Fa. Themo Scientific). Die Eichung erfolgte in einem Bereich zwischen 0,5 und 30 µM Nitrit-N.

Sulfanilsäure (1 %)

1 g	Sulfanilsäure
20 ml	konz. HCl
ad 100 ml	aqua dest

Die Lösung wurde bei Raumtemperatur gelagert.

NEDA Lösung (0,12 %)

0,12 g	N-(1-Naphtyl)-ethylen-diammoniumchlorid
100 ml	aqua dest

Die Lösung wurde im Kühlschrank gelagert.

4.4.3 Bestimmung der gelösten organischen Stickstoffverbindungen (DON)

Aus den CaCl_2 -Extrakten, die z.B. im Rahmen der Mikrokosmenversuche hergestellt worden sind, wurden teilweise auch die gelösten organischen Stickstoffverbindungen (DON) über den gesamten gelösten Stickstoff bestimmt.

Eine einfache und schnelle Methode zur Bestimmung des gesamten gelösten Stickstoffes ist die Oxidation mit Persulfat zu Nitrat (HAGEDORN & SCHLEPPI 1999). Dies wird durch die Zugabe von Kaliumpersulfat ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) sowie Natriumhydroxid (NaOH) und anschließendes Autoklavieren der Probe erreicht. Dabei wird auch ein Teil des Luftstickstoffes zu Nitrat oxidiert. Dieser Fehler kann vermieden werden, indem immer gleiche Autoklavierflaschen und Probenvolumina verwendet, die Flaschen festverschlossen werden und die Bestimmung von Blindwerten wiederholt wird.

Material und Methode

1. Herstellung eine Lösung mit 15 ml Kaliumpersulfat ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) in 250 ml 0,5 M NaOH (N-frei) und 500 ml aqua dest.
Lösung ist für 8 Tage im Dunkeln stabil (PE Flasche).
2. Mischung von 15 ml Kaliumpersulfatlösung mit 10 ml Probe
Autoklavierflaschen sind säuregespült.
Zusätzlich werden immer Blindwerte (aqua dest als Probe) und Standards (Ammoniumsulfat und Glyzin) mitgemessen.
18 mg / l N sind das obere Limit der Reaktion
3. Autoklavieren der Flaschen für 45 min bei 1,2 hPa und 121 °C
4. Nach der Abkühlung Bestimmung der Nitrat-Konzentration mit der Methode nach Lufa gemessen

Zur Bestimmung des DON werden die DIN Werte von dem gemessenen Nitrat abgezogen.

4.5 Nährmedien

Alle aufgeführten Chemikalien wurden in der höchstmöglichen Reinheit von der Firma Merck, Darmstadt bezogen. Ausnahmen sind jeweils an der dazugehörigen Stelle vermerkt. Alle Medien wurden, wenn nicht anders beschrieben, 30 Minuten bei 110 °C und 0,5 bar im Autoklaven (Fa. Systec 5050 ELV) sterilisiert autoklaviert.

Ammoniakoxidenten-Medium (1 mM)

0,0535 g	NH ₄ Cl
100 ml	Stammlösung AOB 10fach
1 ml	Spurenelemente terrestrisch
5 g	CaCO ₃
(0,147 g	CaCl ₂)
(1 ml	Kresolrot / Indikator)
900 ml	aqua dest

Es wurde entweder CaCO₃ als Puffer verwendet oder es wurde ein ungepuffertes Medium benutzt mit CaCl₂ und dem Indikator Kresolrot. Der pH-Wert wurde dann regelmäßig mit Natronlauge oder Natriumhydrogencarbonat eingestellt. Es wurden Konzentrationen zwischen 0 und 10 mM angesetzt, dem entsprechend wurde die Einwaage von Ammoniumchlorid geändert.

Ammoniakoxidenten-Platten (10 mM)

100 ml	Stammlösung AOB 10fach
1 ml	Spurenelementelösung terrestrisch
0,535 g	NH ₄ Cl
5 g	CaCO ₃
900 ml	aqua dest
13 g	Agarose

Spurenelementelösung terrestrisch

0,0338 g	MnSO ₄ x H ₂ O
0,0494 g	H ₃ BO ₃
0,0431 g	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O
0,0371 g	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄
0,973 g	FeSO ₄ x 7 H ₂ O
0,025 g	CuSO ₄ x 5 H ₂ O
in 0,025 n	HCl lösen
ad 1000 ml	aqua dest.

Stammlösung Ammoniakoxidenten (10fach)

0,54 g	KH ₂ PO ₄
0,74 g	KCl
0,49 g	MgSO ₄ x 7 H ₂ O
5,84 g	NaCl
ad 1000 ml	aqua dest

NOB Medium (0,3 mM)

100 ml	Stammlösung NOB 10fach
1 ml	Spurenelemente terrestrisch
0,02 g	NaNO ₂
900 ml	aqua dest

Die Lösung wurde auf einen pH-Wert von 8,4 eingestellt.

Stammlösung NOB (10fach)

0,07 g	CaCO ₃
5,0 g	NaCl
0,5 g	MgSO ₄ x 7 H ₂ O
1,5 g	KH ₂ PO ₄
ad 1000 ml	aqua dest.

4.6 Nachweis von mikrobiellen N-Umsetzungen in Böden

4.6.1 Bestimmung der potentiellen Nitrifikation

Mit diesem Test sollte nachgewiesen werden, ob sowohl Ammoniak oxidierende Bakterien (AOB) als auch Archaeen (AOA) in den Naturproben potentiell stoffwechselphysiologisch aktiv sind. Der Aktivitätstest wurde modifiziert nach DIN ISO 15685 (2001) „Bestimmung der potentiellen Nitrifizierung – Schnellverfahren mittels Ammoniumoxidation“ durchgeführt. Diese DIN Norm dient in der Regel dazu, die potentielle Nitrifikation von Belebtschlamm und Bodenproben zu bestimmen. Die Inkubation erfolgt auf dem Schüttler mit 120 rpm bei 6 °C, 18 °C und 28 °C über 6 Wochen für die Proben aus dem Permafrostgebiet und bei ca. 22 °C für 24 Stunden für die Proben aus der Hahnheide. Die DIN ISO sieht hingegen 25 °C und 175 rpm vor. Während der Feldphase wurde der Aktivitätstest bei *in-situ*-ähnlichen Temperaturen durchgeführt, d.h. der Schüttler wurde im Boden eingelassen. Um die Aktivitäten der Ammoniak oxidierenden Bakterien und Archaeen zu unterscheiden, wurden Antibiotika eingesetzt, die die Bakterienaktivität unterbinden sollten. Als Hemmstoff wurde hauptsächlich Streptomycin, aber auch Ampicillin und Vancomycin mit der Endkonzentration von 50 µg ml⁻¹ benutzt.

Es wurden jeweils 12,5 g feldfrisches homogenisiertes Bodenmaterial auf 50 ml Medium in einem 300-ml-Kolben oder einer 100-ml-Schottflasche eingewogen. Die Inkubation erfolgt auf einem Schüttler bei 120 rpm. Die erste Probenahme erfolgte unmittelbar nach dem Animpfen der Kulturen und anschließend ein bis dreimal wöchentlich über einen Zeitraum von 6 Wochen. Anschließend wurden die Nitrit- und Nitratkonzentrationen mit der HPLC gemessen und die Aktivität wurde über die Steigung der Nitritbildung berechnet.

Nachweis von Ammoniak oxidierende Mikroorganismen:

Prüfmedium (1,5 mM)

10 ml	Stammlösung A
10 ml	NaClO ₃ (Endkonz. 5 mM)
0,099 g	(NH ₄) ₂ SO ₄
ad 1000 ml	aqua dest

Stammlösung A

28 ml	KH ₂ PO ₄ (0,2 M)
72 ml	K ₂ HPO ₄ (0,2 M)
100 ml	aqua dest

Der pH-Wert wurde auf 7,2 eingestellt

Für die Antibiotika Streptomycin, Vancomycin und Ampicillin wurden Stammlösungen mit einer Konzentration von 50 mg ml⁻¹ angesetzt und im Gefrierschrank bei -20 °C gelagert.

Tabelle 4.3 Liste und Wirkungsweise der verwendeten Antibiotika

Antibiotika	Angiffsort	Mirkoorganismengruppen
Streptomycin	30S Untereinheit der Ribosome	Hauptsächlich Gramnegative Bakterien
Vancomycin	Zellwandsynthese	Hauptsächlich Grampositive Bakterien
Ampicillin	Zellwandsynthese	Hauptsächlich Grampositive Bakterien

4.6.2 Bestimmung der potentiellen Mineralisationsaktivitäten

Als N-Mineralisation bezeichnet man zwei Stickstoffumsetzungen: zum einen die Ammonifikation, also die Freisetzung von Ammonium aus organischen Stickstoffverbindungen und zum anderen die Nitrifikation, also die Oxidation des Ammoniaks über Nitrit zu Nitrat. Ein Teil der freigesetzten DIN wird dem System durch Assimilation, der N-Aufnahme der Pflanzen oder Mikroorganismen und der Denitrifikation, der anaeroben Umwandlung von Nitrit und Nitrat zu N₂, wieder entzogen. Messungen der N-Mineralisation können daher z.B. bei Sauerstoffmangel deutlich unterschätzt werden. Die N-Mineralisation

wird im Brutversuch gemessen. Als zweite Methode wurde ein Mikrokosmos Versuch durchgeführt.

Mineralisation im „Brutversuch“

Für die Mineralisation im Brutversuch werden vier parallele Ansätze mit je 10 g frischer homogenisierter Probe, die zuvor bei 4 °C gelagert wurden, eingewogen. Zwei Ansätze davon werden sofort eingefroren. Die anderen beiden werden vier Wochen bei 18 °C bzw. Raumtemperatur mit ausreichender Sauerstoffversorgung auf dem Schüttler (120 rpm) inkubiert, dabei werden regelmäßig die Sauerstoffversorgung und der Wasserhaushalt kontrolliert und gegebenenfalls eingestellt. Die Proben werden zu Beginn der Inkubation leicht mit Wasser bedeckt.

Die Extraktion der gelösten anorganischen Stickstoffverbindungen aller vier parallelen Ansätze erfolgt mit einer 1-M-KCl-Lösung. Die Nitrit- und Nitrat-Bestimmung wurde mit der HPLC und die Ammonium- Bestimmung photometrisch (siehe 4.2.1.) durchgeführt.

Mineralisation im „Mikrokosmosversuch“

Auch in diesem Versuch erfolgt die Inkubation der Bodenproben ohne Zugabe des Substrates, so dass Ammonium nur aus der Mineralisation organischer Bestandteile des Bodens zur Verfügung steht. Dabei soll die Konzentration des Ammoniums ungefähr den *In-situ*-Bedingungen entsprechen. Ein Problem kann dabei sein, dass der Boden austrocknet oder dass nur wenige Stickstoffverbindungen mineralisiert werden.

Auch hier werden 10 g gesiebter, feldfrischer, homogenisierter Boden in insgesamt acht Parallelen in 100-ml-Schottflaschen eingewogen und bei 18 °C bzw. Raumtemperatur inkubiert. Mindestens zweimal die Woche wird durch Öffnen der Flaschen und Umrühren des Bodens für ausreichend Sauerstoffversorgung gesorgt. Alle zwei Wochen werden aus zwei Parallelen die gelösten anorganischen Stickstoffverbindungen mit 0,0125-M-CaCl₂ Lösung extrahiert und gemessen, gleichzeitig wird die gesamt DNA aus 0,25 g des Bodens isoliert (siehe 4.7.1).

Der Unterschied zwischen diesem Mikrokosmosansatz und dem Ansatz im Brutversuch besteht in folgenden Punkten:

- 8 statt 4 parallele Ansätze
- Keine Überschüttung des Bodens mit Wasser
- Sauerstoffversorgung nicht über Schütteln
- Es werden nur verfügbare Stickstoffverbindungen mit der CaCl₂-Lösung erfasst

4.6.3 Bestimmungen der Temperaturoptima der Nitrifikation

Es wurden die Temperaturoptima der Ammoniakoxidation von Bodenproben aus Sibirien und der AOM-Anreicherungskulturen bestimmt. Dazu wurde ein Temperaturblock verwendet (Abb. 4.1.), der wie folgt aufgebaut war: An einem Metallblock mit 42 Bohrungen für 50-ml-Glasflaschen und 56 Bohrungen für 10-ml-Glasflaschen kann durch das Anschließen einer Heizquelle und einer Kühlung ein frei wählbarer konstanter Temperaturgradient angelegt werden. Für die Anwendungen in dieser Arbeit lag der Gradient zwischen 0 und 40 °C. Als Heizquelle diente ein iTron 32 der Firma JUMO und als kombinierbares Kühl und Heizgerät diente ein Julabo F 25.

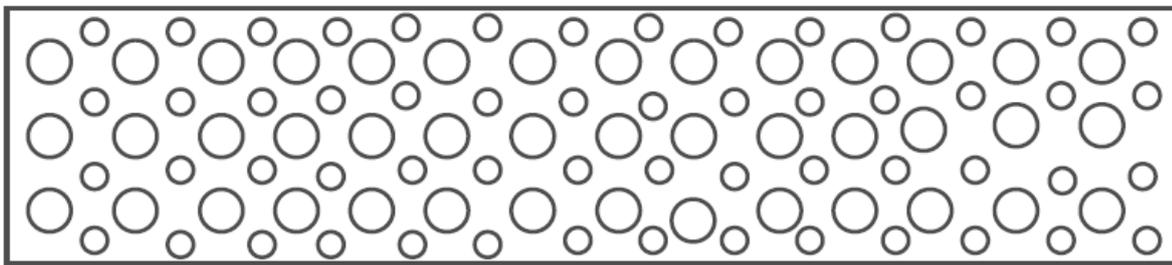


Abb. 4.1 Schematische Anordnungen der Bohrungen in dem verwendeten Temperaturblock. Die runden großen Einzeichnungen stehen für die 42 Bohrungen für die 50-ml-Flaschen und die kleinen runden Einzeichnungen stehen für die 56 Bohrungen für die 10-ml-Flaschen.

Für die Bestimmung des Temperaturoptimums der Nitrifikation in Bodenproben wurden 2,5 g feldfrischer homogenisierter Boden in 50-ml-Glasflaschen eingewogen und mit 25 ml Prüfmedium (siehe 4.4.1) vermischt. Um die Aktivitäten von AOB und AOA unterscheiden zu können, wurden 50 µl einer Streptomycinlösung mit einer Endkonzentration von 50 µg ml⁻¹ zugegeben.

Für die Bestimmung des Temperaturoptimums von Ammoniak oxidierenden Anreicherungskulturen wurde AOB Medium mit Carbonat und Kresolrot verwendet (siehe 4.3).

Die Inkubation dauert zwischen einer und vier Wochen. Die Probenahme erfolgt meist täglich aber mindestens zweimal pro Woche. Die entnommenen Suspensionen wurden 15 min bei 13.000 g zentrifugiert und die Nitrit- und Nitrat-Konzentration des Überstandes wurde mit Hilfe der HPLC gemessen (siehe 4.2.1.). Das Temperaturoptimum wurde über die Darstellung der stärksten Steigung der Nitritbildung und damit höchsten Aktivität gegen die Temperatur ermittelt.

4.6.4 Quantifizierung von nitrifizierenden Mikroorganismen mittels MPN

Die MPN-Methode (most probable number) ist ein statistisches Annäherungsverfahren zur Lebendzellzahlbestimmung von Mikroorganismen. Bei dieser Methode wird ermittelt, bis zu welcher Verdünnungsstufe Teströhrchen bewachsen sind. Aus Wahrscheinlichkeitstabellen lässt sich daraus die wahrscheinliche Zellzahl berechnen (ALEF 1991). Zur

Lebendzellzahlbestimmung wurde 1 g Bodenmaterial in ein steriles Greiner Röhrchen (Fa. Greiner) eingewogen und mit 5 ml steriler 0,9 %-iger NaCl-Lösung vermischt. Anschließend wurden die Proben eine halbe Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach der Inkubation wurde eine Verdünnungsreihe von 10^{-1} bis 10^{-6} angefertigt. Aus diesen Verdünnungen wurde dann jeweils 0,1 ml in Reagenzröhrchen mit 5 ml Medium überführt. Pro Verdünnungsstufe wurden drei Parallelen angesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 6 °C und 22 °C (Raumtemperatur) stehend im Dunkeln. Die Auswertung erfolgte nach 9 Wochen bzw. 9 und 14 Monaten.

4.7 Kulturführungen von Anreicherungen und Reinkulturen

Die Anzucht der Kulturen von AOB und AOA erfolgte über mehrere unterschiedliche Verdünnungsstufen. Die Anreicherungen wurden entweder in kleinen Reagenzröhrchen mit 0,5 g bzw. 1 g Bodenmaterial in 5-ml-Kulturmedium oder in Kulturkolben mit 5 g Bodenmaterial auf 100 ml Medium begonnen. Nach mindestens fünfmaliger Wiedereinstellung der Ausgangskonzentration wurden die Anreicherungen in ein größeres Volumen mit einem 1 bis 10 %igen Inokulum überimpft. Die Überimpfung erfolgte in ein Reagenzglas mit 10 ml Medium, dann in einen 100-ml-Kolben mit 50-ml-Medium und anschließend in 300-ml-Kolben mit einem Mediumvolumen von 100 ml bzw. 150 ml. Wenn ein größeres Volumen der Bakterienkultur nötig war, wurde in 3-l-Erlenmeyerkolben mit 1 l Medium überimpft. Neben den Flüssigkulturen wurden auch Festmedien beimpft, um die Anreicherungskulturen eventuell isolieren zu können. Auf die Festmedien wurden 100 µl der Kulturen ausgestrichen. Über Verdünnungsreihen in langen Reagenzgläsern wurde zusätzlich der Anreicherungsprozess vorangetrieben.

4.7.1. Anreicherung von Ammoniak oxidierenden Mikroorganismen (AOM)

Die Anzucht der Kulturen erfolgte in 0,5 bis 1 mM AOB-Medium. Das Wachstum über die Bildung von Nitrit wurde alle drei bis 14 Tage qualitativ mit Hilfe des Tüpfeltests überprüft. Der Verbrauch von Ammonium bzw. die Bildung von Nitrat wurde mit Hilfe von Teststäbchen (Firma Merck, bis 10 mg/l) kontrolliert. Die Einstellung der ursprünglichen Konzentration erfolgte durch die Zugabe von 0,5 bzw. 5 M Ammoniumchloridlösung.

Ammoniak oxidierende Archaeen sollten mit Hilfe von Hemmstoffen für die Ammoniak oxidierenden Bakterien angereichert werden. Hierfür wurden die Antibiotika Streptomycin, Ampicillin und Vancomycin mit einer Endkonzentration von $50 \mu\text{l ml}^{-1}$ verwendet.

Tüpfeltest zum Nachweis von Nitrit

4,0 g	Sulfanilamid
10 ml	Ortho-Phosphorsäure
0,2 g	N-(1-Naphtyl)-ethylendiamin-dihydrochlorid
ad 100 ml	aqua dest

Die Lösung wurde in lichtgeschützten Behältern bei 4 °C gelagert.

4.7.2. Kulturführung von Reinkulturen

Die Anzucht der Reinkulturen erfolgte in 300-ml-Erlenmeyerkolben mit 150 ml Medium bei 28 °C im Dunkeln. Die Reinkulturen dienen als Referenzen für physiologische und molekularbiologische Untersuchungen.

Tabelle 4.4 Liste der verwendeten Reinkulturen

Bakterieart	Herkunft
<i>Nitrosolobus (Nitrosospira) multiformis</i> NI 13	(KOOPS & HARMS 1985)
<i>Nitrosospira</i> M 1.3	(PINCK 2001)
<i>Nitrosomonas eutropha</i> Nm 57	(KOOPS & HARMS 1985)

4.7.3 Reinheitstest der Anreicherungs- und Reinkulturen

Um die Reinheit der Anreicherungs- bzw. Reinkulturen zu überprüfen, wurden die nachfolgenden verschiedenen Medien mit der angereicherten Kultur angeimpft. In der Regel wurden 50 µl der Anreicherungskulturen und Reinkulturen auf die Festmedien gegeben und die Flüssigkulturen wurden mit 1 ml beimpft. Die Inkubation erfolgte zwischen einigen Tagen und mehreren Wochen für die Reinkulturen bei 28 °C und für die Anreicherungskulturen bei den ursprünglichen Anreicherungstemperaturen, bis ein Wachstum festzustellen war oder dieses ausgeschlossen werden konnte. Die unterschiedlichen Medien waren notwendig, da die Begleitorganismen unterschiedliche Nährstoffansprüche aufweisen können.

Reinheitsagar

2,5 g	Fleischextrakt
2,5 g	Casamino acids
0,5 g	Hefeextrakt
1,0 g	KH ₂ PO ₄
0,5 g	NaCl
ad 1000 ml	aqua dest

Der pH-Wert wird auf 7,3 bis 7,4 eingestellt

15 g	Agar-Agar
------	-----------

Hefeboullion

0,5 g	Hefeextrakt
0,5 g	Pepton
0,5 g	Fleischextrakt
0,58 g	NaCl
ad 1000 ml	aqua dest

Der pH-Wert wird auf 7,3 bis 7,4 eingestellt

Minimalmedium mit Glucose als C Quelle

0,8 g	K_2HPO_4
0,2 g	KH_2PO_4
0,05 g	$CaSO_4 \times 2 H_2O$
0,5 g	$MgSO_4 \times 7 H_2O$
0,01 g	$FeSO_4 \times 7 H_2O$
1 g	$(NH_4)_2SO_4$
10 g	Glucose
ad 1000 ml	aqua dest

Der pH-Wert wird auf $7,0 \pm 0,1$ eingestellt

Standard I Agar

15 g	Standard I Agar
1000 ml	aqua dest

4.8 Mikroskopische Verfahren

Mit Hilfe von unterschiedlichen mikroskopischen Verfahren wurden die Anreicherungskulturen charakterisiert. Diese Verfahren sind in Tabelle 4.5 aufgeführt. Die lichtmikroskopischen Untersuchungen und die DAPI-Färbung dienten dazu, die Zellformen zu bestimmen. Mit Hilfe der elektronenmikroskopischen Aufnahmen sollten die Morphologien und die einzelnen Kompartimente der Zellen näher bestimmt werden. Die Immunfluoreszenz und Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) dienten der Identifikation der Ammoniak oxidierenden Bakterien bzw. Archaeen.

Für die Einbettung der Zellen für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen war eine große Zelldichte notwendig. Für die Immunfluoreszenz- und FISH-Aufnahmen mussten die Zellen zuvor fixiert werden. Für die Lichtmikroskopie bzw. DAPI Färbung reichten einige Mikroliter einer Anreicherungskultur.

Tabelle 4.5 Aufstellung der verwendeten mikroskopischen Verfahren

Art der Mikroskopie	Referenzen
Lichtmikroskopie	Lichtmikroskopisch wurden vorhandene Morphologien der Organismen in den Mischkulturen überprüft.
Fluoreszenz Mikroskopie	
DAPI Färbung	DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff der zur Markierung von doppelsträngiger DNA eingesetzt wird und der bläulich fluoresziert. Mit dieser Technik können eindeutig Zellen mit DNA identifiziert werden. (PORTER & FEIG 1980)
Immunfluoreszenz	Mit dieser Technik werden Zellen mit Hilfe von markierten Antikörpern gegen Enzyme angefärbt. In dieser Arbeit wurden Antikörper gegen die A- und B- Untereinheit der Ammoniak Monooxygenase (AMO) verwendet. (FIENCKE & BOCK 2004)
Fluoreszenz <i>in-situ</i> Hybridisierung (FISH)	Mit dieser Technik werden Zellen mit Hilfe von markierten DNA Sonden angefärbt. Verwendet wurden in dieser Arbeit Sonden gegen Beta-AOB und Archaeen (AMANN et al. 1995)
Elektronenmikroskopie	Mit der Technik der Elektronenmikroskopie können viel größere Vergrößerungen erreicht werden, um einen Einblick in die Mikromorphologie der Zellen bekommen zu können
Transmissions-Elektronen Mikroskopie (TEM)	Mit der TEM Technik können Schnitte durch Zellen sichtbar gemacht werden. Dadurch können Zellsegmente und Zellkompartimente erkannt werden. (SPURR 1969)
Raster-Elektronen Mikroskopie (REM)	Mit der REM Technik können ganze Zellen und ihre Oberflächen sichtbar gemacht werden. Die Zellen werden mit einer dünnen Goldschicht überzogen. (REYNOLDS 1963)

4.9. Molekularbiologische Methoden

4.9.1 DNA Extraktion

Die genomische DNA aus den Rein- und Anreicherungskulturen wurden mit Hilfe des DNA Isolierungskit „Ultra Clean™ Microbial DNA Isolation Kit“ der Firma MoBio Laboratories Inc. extrahiert. Für die Extraktion direkt aus Bodenproben wurde das „Ultra Clean™ PowerSoil DNA Isolation Kit“ oder für größeres Volumen das „PowerMax Soil DNA Isolation Kit“ derselben Firma verwendet.

Es wurde nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen. Der Aufschluss der Zellen erfolgte sowohl chemisch als auch mechanisch. Die Inkubation mit dem Lysispuffer wurde um einige Minuten verlängert. Um eine höhere Effektivität bei der Eluierung der DNA vom Spinfilter zu erreichen, wurde das Wasser vorher auf ca. 55 °C erwärmt.

Für die DNA-Extraktion aus Rein- und Anreicherungskulturen wurden mindestens 10 ml Zellsuspension nacheinander in einem 2 ml Reaktionsgefäß in einer Zentrifuge (Eppendorf Biofuge) für 15 min bei 10.000 g zentrifugiert. Wenn die 10 ml nicht ausreichten, wurden solange weitere 2 ml der Zellsuspension hinzugefügt, bis ein kleines Pellet sichtbar wurde. Für die Bodenextraktion wurde 0,25 g Boden bzw. 10 g für die Maxi Bodenextraktion aus der Originalprobe benutzt.

Um die Konzentration der extrahierten DNA zu überprüfen, wurde eine 1,5 %ige Agarosegelelektrophorese bei 75 V für 30 bis 45 Minuten durchgeführt. Dabei wurde ein definierter DNA Standard (Fa. Fermentas) mit aufgetragen. Alternativ erfolgte die Messung der Konzentration der DNA mit dem Photometer bei einer Wellenlänge von 280 nm (Firma Eppendorf).

Agarosegel 1,5 %

100 ml	1 x TAE Puffer
1,55 g	Agarose (Firma Fermentas)

Die Agarose kann bei 60 °C in einem Wärmeschrank gelagert werden.

4.9.2 Polymerasenkettenreaktion (PCR)

Der Polymerasenkettenreaktion (PCR) liegen im Prinzip drei Teilreaktionen zugrunde. Im ersten Schritt muss der DNA-Doppelstrang bei hohen Temperaturen aufgeschmolzen werden. An die einzelsträngige DNA lagern sich die Primer, kurze Oligonukleotide, spezifisch an. Diesen Vorgang nennt man Annealing. Die Annealingtemperatur eines Primers (T_{Am}-Wert) ist abhängig von der Basenpaarzusammensetzung und liegt in der Regel zwischen 40 und 60 °C. In Anwesenheit von freien Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTP) und den

Primern im Überschuss kann eine hitzebeständige DNA-abhängige DNA-Polymerase die Primerbindestellen bei 72 °C verlängern. Diese Reaktionen werden dann meist 25 bis 35-mal wiederholt. Jeder dieser weiteren Zyklen steht für eine Verdoppelung des Amplifikats, so dass die Anzahl der Kopien exponentiell ansteigt. Bei zu hoher Anzahl von Zyklen steigt die Wahrscheinlichkeit von fehlerhafter Bindung des Primers oder fehlerhaft eingebauter Nukleotide. Daher sind 30 Zyklen in der PCR-Reaktion die Regel. Die PCR erfolgte in einem Biometra Tpersonal Minicycler (Fa. Biometra) in einem 50 µl Ansatz in einem 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß. Im PCR-Reaktionsgefäß werden das PCR Reaktionsgemisch mit dem DNA-Extrakt (5 bis 50 ng DNA pro µl) vermengt. In den Tabellen 4.6, 4.7 und 4.8 sind die verwendeten Primerpaare angegeben.

PCR Reaktionsgemisch

5 µl	10 x Reaktionspuffer (25 mM) (Fa. Fermentas, Dreamtaq)
6 µl	dNTPs (2 mM) (Fa. Fermentas)
1 µl	MgCl ₂ (25 mM) (Fa. Promega)
1 µl	Primer 1 (25 pmol/ml) (Fa. MWG)
1 µl	Primer 2 (25 pmol/ml) (Fa. MWG)
(0,5 µl	BSA (Bovines Serumalbumin) (20 mg/ml)) (Fa. Fermentas)
0,25 µl	Taq-Polymerase (5 u/µl) (Fa. Fermentas, Dreamtaq)
Ad 50 µl	pyrogen- nukleasenfreies PCR Wasser (Fa. Roth)

Tabelle 4.6 Sequenzen und Bezeichnungen der verwendeten Primerpaare für die Domäne der Bacteria

Bezeichnung	Bindungs-ort	Sequenz (5' → 3')	Annealing-temperatur [°C]	Referenz
27 F	16S <i>Bac</i>	AGAGTTTGAT(CT)(AC)TGGCTCAG	55	(LANE 1991)
1492 R	16S <i>Bac</i>	CGG(CT)TACCTTGTACGAC		
341 F GC	16S <i>Bac</i>	*CCT ACG GGA GGC AGC AG	56	(MUYZER ET AL. 1998)
907R	16S <i>Bac</i>	AAACTCAAAGGAATTGAC		
CTO 189A F GC	β-AOB	*GGAGRAAAGCAGGGGATCG	57	(KOWALCHUK ET AL. 1997)
CTO 189C F GC	β-AOB	*GGAGGAAAGTAGGGGATCG		
CTO 654R	β-AOB	CTAGCYTTGTAGTTTCAAACGC		
amoA-1F	<i>amoA</i>	GGGGTTTCTACTGGTGGT	58	(ROTHAUWE ET AL. 1997)
amoA-2R	<i>amoA</i>	CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC		

Die Primer, die mit einem * gekennzeichnet sind, besitzen folgende GC Klammer:
5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGACGGGGG-3'

Tabelle 4.7 Sequenzen und Bezeichnungen der verwendeten Primerpaare für die Domäne der Archaea.

Bezeichnung	Bindungs-ort	Sequenz (5' → 3')	Annealing-temperatur [°C]	Referenz
21 F	16S Arch.	TTCCGGTTGATCCYGCCGGA	58	(DELONG 1992)
958 R	16S Arch.	YCCGGCGTTGAMTCCAATT		
519 F GC	16S Arch.	*CAGCCGCCGCGGTAA	57	(COOLEN ET AL. 2004)
915 R	16S Arch.	GTGCTCCCCGCCAATTCCT		
Arch-amoAF	<i>amoA</i> Arch.	STAATGGTCTGGCTTAGACG	53	(FRANCIS ET AL. 2005)
Arch-amoAR	<i>amoA</i> Arch.	GCGGCCATCCATCTGTATGT		

Die Primer, die mit einem * gekennzeichnet sind, besitzen folgende GC Klammer: 5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGGGG-3'

Tabelle 4.8 Sequenzen und Bezeichnungen anderer verwendeter Primerpaare

Bezeichnung	Bindungs-ort	Sequenz (5' → 3')	Annealing-temperatur [°C]	Referenz
M13-forward	Vektor-MCS spezifisch	GTTTTCCCAGTCACGACGT	57	(MESSING 1983)
M13-revers	Vektor-MCS spezifisch	CACACAGGAAACAGCTATGA		

Als Standard PCR Programm wurde folgende Reihenfolge benutzt:

Denaturierung: 95 °C 5 min
 Amplifizierung (30 Zyklen): 95 °C 45 s
 53 - 65 °C 45 s (Temperatur abhängig vom Primer)
 72 °C 1 min
 Verlängerung: 72 °C 15 min

Einige Faktoren wurden für die verschiedenen Anwendungen verändert. Die Annealingtemperatur ist abhängig von den verwendeten Primerpaaren. Die Elongationzeit ist abhängig von der Länge des zu amplifizierenden DNA Stückes und die Zyklenzahl ist abhängig von der Art des DNA Stückes, d.h. für die Amplifikation von 16S Stückes wurde die Zyklenzahl auf 28 reduziert. Für die Amplifikation von den Genen der *amoA* wurde die Zyklenzahl auf 35 erhöht, um eine höhere Ausbeute zu erreichen.

TAE-Puffer (25fach)

242 g Tris
 18,6 g Ethylendiamintetraacetat (EDTA)
 Der pH-Wert wird mit Essigsäure auf 7,8 eingestellt
 ad 2000 ml aqua dest

Ethidiumbromidfärbelösung (200fach)

300 µg Ethidiumbromid
 ad 100 ml aqua dest

Ethidiumbromidfärbebad

1,5 ml Ethidiumbromidfärbelösung (200fach)
 400 ml aqua dest

4.9.3 Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (DGGE)

Mit der Denaturierenden Gradienten Gelelektrophorese (DGGE) ist es möglich, die Schmelzeigenschaften von 16S rDNA Fragmenten von Mikroorganismen zu vergleichen (MUYZER ET AL., 1998). Dadurch kann man auch Hinweise auf die vorhandenen Sequenzunterschiede bekommen. Der bei der DGGE-Analyse verwendete denaturierende Harnstoff-Formamid-Gradient wurde ausgehend von zwei unterschiedlich konzentrierten Stammlösungen hergestellt. Der Gradient wurde durch die Veränderung des Mischungsverhältnisses variiert.

Das Mischungsverhältnis für die Stammlösung 1 und 2 lässt sich anhand der standardisierten Formel nach MUYZER et al. (1998) berechnen:

$$(100 - X) V / 100 + X V / 100 = V \text{ Stammlösung 1} + V \text{ Stammlösung 2 (1:1)=V \%}$$

Dabei ist das X ein Platzhalter für den minimalen bzw. maximalen Wert des einzustellenden Gradienten in Prozent. Eine Variable ist auch das Volumen des Gels, das V bezeichnet die Hälfte des Gesamtvolumens.

Das Volumen des 8%igen Gels betrug insgesamt 42 ml, so dass die 50 und 80 % Ansätze jeweils 21 ml betragen. Diese wurden in Greinerröhrchen vorgelegt und anschließend mit Hilfe eines Gradientenmischers zu einem linearen Harnstoff-Formamid-Gradient gegossen. Das Sammelgel hatte ein Volumen von 10 ml und enthält kein Harnstoff oder Formamid. Die Polymerisation der Gele erfolgte durch die Zugabe der Starterreagenzien Ammoniumpersulfat (APS) und N,N,N",N"-Tetramethylethylendiamin (TEMED).

Zur Durchführung einer DGGE wurde das System Complete DCode System von Biorad verwendet. In sterilen Greinerröhrchen wurden die Acrylamidlösungen vorgelegt und mit

82 µl APS und 17 µl TEMED vermischt. Anschließend wurden die Lösungen in die Röhren des Gradientenmischers gegeben. Das Gemisch wurde über eine Injektionsnadel mit Hilfe einer Pumpe zwischen die Glasplatten geleitet. Danach wurde das Sammelgel mit 50 µl APS und 10 µl TEMED vermischt und vorsichtig mit der Pumpe über das Trenngel geschichtet, wobei vorher ein Kamm mit 15 Kammern zwischen die Glasplatten gehängt wurde. Das Gel polymerisierte bei 4 °C für ca. 24 Stunden aus.

Die Taschen wurden mit 10 µl bis 50 µl des PCR-Produkts gefüllt. Es wurde kein Ladepuffer verwendet, da zum Beschweren der Flüssigkeit bereits der PCR-Reaktionspuffer dient. Die Menge des PCR-Produktes wurde durch die Intensität der Banden im Agarosegel abgeschätzt. So wurde eine relativ homogene Bandenintensität verschiedener Proben im DGGE-Gel erreicht. Die Proben wurden mit Hilfe von Gel-Ladespitzen aufgetragen. Die leeren Taschen wurden mit einem Ladepuffer beladen um eine gleichmäßige Verteilung der Ionen im Gel zu erreichen, so wurde ein sogenanntes „Smilybild“ des Gels verhindert.

Das mit den Proben beladene Gel wurde nun in die bereits auf 60 °C vortemperierte Gelkammer eingesetzt. Anschließend wurde eine Spannungsquelle (Biorad Model 3000Xi) angeschlossen. Die Gele wurden bei einer Spannung zwischen 100 und 220 V für 8 bis 17 Stunden laufen gelassen. Während des Laufes wurde kontinuierlich frischer Puffer auf das Gel gepumpt.

Nach dem Ende des Gellaufes wurden die Glasplatten mit Hilfe von aqua dest. vorsichtig entfernt. Die überstehenden Gelreste der Taschen wurden abgetrennt, um ein Einreißen des Gels zu verhindern. Das Gel wurde nun in einen Ethidiumbromid-Färbebad für 20 min inkubiert. Anschließend wurde es in einem Bad mit aqua dest. kurz gewaschen. Das Gel wurde mit einer Geldokumentationsanlage der Firma Biorad dokumentiert.

Um eine genauere Betrachtung der Diversität zu ermöglichen und zu überprüfen, ob die gleichen Laufweiten im Gel den vermuteten Organismen zuzuordnen sind, wurden beispielhaft DNA-Banden aus den DGGE-Gelen ausgeschnitten und sequenziert. Die ausgeschnittene DNA wurde in 50 µl aqua dest bei 4 °C eluiert und anschließend in einer PCR reamplifiziert. Bei dieser PCR wurde der Vorwärts-Primer ohne GC-Klammer verwendet. Die 16S rRNA-Genfragmente wurden anschließend durch die Firma DNA-Cloning Service (Biozentrum Klein Flottbek), Seqlab (Göttingen) oder MWG (Ebersberg) sequenziert.

Stammlösung 1 (Acrylamidlösung mit 0 % Harnstoff-Formamid)

20 ml	Acrylamidlösung (Fa. Applichem)
80 ml	1xTAE-Puffer
1 ml	25xTAE-Puffer

Stammlösung 2 (Acrylamidlösung mit 100 % Harnstoff-Formamid)

20 ml	Acrylamidlösung (Fa. Applichem)
42 g	Harnstoff
40 ml	Formamidlösung (Fa. Applichem)
4,5 ml	25x TAE-Puffer
ad 100ml	aqua dest

Aus diesen Stammlösungen wurde ein Ansatz mit einem 50 % Harnstoff-Formamid-Gehalt (Lösung A) und ein Ansatz mit 80 % Harnstoff-Formamid-Gehalt (Lösung B) hergestellt.

Lösung A (50 % Harnstoff-Formamid-Gehalt)

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

Lösung B (80 % Harnstoff-Formamid-Gehalt)

4,2 ml	Stammlösung 1
16,8 ml	Stammlösung 2

Ammoniumpersulfat (APS)

1 g	Ammoniumpersulfat (Serva)
10 ml	aqua bidest

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

TEMED (*N,N,N',N'*-Tetramethylethan-1,2-diamin) wurde gebrauchsfertig von der Fa. Biorad bezogen und bei Raumtemperatur lichtgeschützt aufbewahrt.

4.9.4 RNA Isolation und Reverse Transkriptase (RT) PCR Anwendungen

Bei dem Arbeiten mit RNA, speziell mit mRNA geht es darum, zu überprüfen, ob bestimmte Gene - in dieser Arbeit die Ammoniakmonooxygenase (AMO) - auch zu einem gewissen Zeitpunkt exprimiert werden. Hauptproblem dabei ist, das mRNA sehr instabil ist. Zur Stabilisierung kann es bei -70 °C eingefroren werden oder in RNA later (Firma Qiagen oder Mobio) gelagert werden.

Für die RNA-Isolierung aus Böden wurde das RNA PowerSoil Total RNA Isolation Kit für 15 Anwendungen der Firma Mobio verwendet. Dieses Kit beinhaltet einen Chlorform/Phenol Fällungsschritt zu Beginn der Extraktion. Für die RNA Isolierung aus Anreicherungskulturen wurde das UltraClean Microbial RNA Isolation Kit der gleichen Firma verwendet. Die Reinheit der isolierten RNA wurde anschließend mit dem Photometer (Fa. Eppendorf) bei einer

Wellenlänge von 260 und 280 nm bestimmt. Bei 260 nm sollte die OD bei 0,1 bis 1 liegen und das Verhältnis (260/280) zwischen 1,8 und 2,1 für reine RNA liegen.

Um das exprimierte Gen der AMO zu amplifizieren muss die RNA erst einmal in cDNA umgeschrieben werden, anschließend kann diese mit den Primern für die bakterielle und archaeale AMO (Siehe Tab 4.6 und 4.7) amplifiziert werden. Mit dem OneStep RT PCR Kit (Fa. Quiagen) können diese beiden Schritte in einer Reaktion durchgeführt werden. Dafür wurde vor der normalen PCR ein Kochschritt eingebaut, bei dem die RNA in cDNA umgeschrieben wurde.

RT PCR Mastermix

32 µl	RNase free water
10 µl	5x Qiagen Onestep Puffer
2 µl	dNTP's
1 µl	Primer AmoA F (25 pmol)
1 µl	Primer AmoA R (25 pmol)
2 µl	Quiagen Enzyme Mix
2 µl	Template RNA

RT RCR Programm

Kochen	50 °C	30 min
Denaturierung	95 °C	15 min
	95 °C	45 s
Amplifizierung	53 – 59 °C	45 s (Insgesamt 35 Zyklen)
Elongation	72 °C	1 min
	53 -59 °C	1 min
	72 °C	10 min
	12 °C	

4.9.5 Klonierung

Als Klonierung bezeichnet man die Integration eines Gens oder DNA-Fragmentes in einen Klonierungs- bzw. Expressionsvektor, sowie die nachfolgende Vermehrung und Expression dieser rekombinanten DNA in einem geeigneten Wirtssystem. Alle identischen Nachkommen einer einzigen Zelle werden als Klon bezeichnet. Ein geeigneter Wirtsorganismus ist beispielsweise *Escherichia coli*. Diese Bakterien wachsen sehr schnell. Bereits in einer Übernachtskultur ist ausreichend Vektor-DNA vorhanden, so dass die klonierte DNA *in vitro* untersucht werden kann.

Der erste Schritt ist die sogenannte Ligation, also die Verknüpfung des zu klonierenden DNA-Fragmentes mit einem entsprechenden Klonierungsvektor mittels des Enzyms Ligase. Es folgt die Transformation des rekombinanten DNA-Moleküls in den entsprechenden Wirtsorganismus und der Nachweis der rekombinanten *E. coli* Zellen durch das Vorhandensein spezieller Selektionsmarker („Blue-White-Screening“).

Bei der Ligation wurde das zu klonierende DNA-Fragment in einen entsprechenden Vektor durch die T4 DNA-Ligase unter Ausbildung einer Phosphordiesterbindung eingefügt. Dieses geschieht in Gegenwart von Mg^{2+} und ATP. Als Vektoren dienten in dieser Arbeit pGEM-T Plasmide der Firma Promega. Die Ligation wurde mit den Reagenzien und nach dem Protokoll der Firma Promega durchgeführt. Für den Ligationsansatz wurde jeweils 1,5 μ l PCR-Produkt mit 2,5 μ l 2fach Rapid Ligationspuffer, 0,5 μ l pGEM-T Vektor (50 ng) und 0,5 μ l T4 DNA-Ligase (3 Weiss units/ μ l) versetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Als Transformation wird die Aufnahme der Plasmide mit dem zu klonierenden DNA Fragment durch die kompetenten Zellen bezeichnet. Als kompetente Zellen dienten in dieser Arbeit die Wirtszellen des *E. coli* Stammes DH5 α (DNA Cloning Service, Biozentrum KleinFlottbek). Für die Transformation wurden die kompetenten Zellen zuerst auf Eis aufgetaut und vorsichtig durchgemischt. Anschließend wurden 25-50 μ l der kompetenten Zellen in einem sterilen 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt und 2-3 μ l des Ligationsansatzes hinzugefügt und leicht gemischt. Der Ansatz inkubierte dann 20 Min auf Eis. Danach folgte ein Hitzeschock für 45 Sek. bei 42 °C auf einem Heizblock und sofort darauf ein zweiminütiger Eisschock.

Danach wurde 20 bis 50 μ l der transformierten Zellen zusammen mit 20 μ l SOB-Medium auf den LB-Amp-Platten (X-Gal und IPTG) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die positiven weißen Klone enthalten das rekombinante Plasmid. X-Gal ist ein modifizierter Zucker, der durch das Enzym β -Galactosidase gespalten werden kann und ein blau gefärbtes Produkt ergibt. Die Plasmide, die eingesetzt wurden, tragen das sogenannte *lacZ*-Gen, dieses ist für die Expression der β -Galactosidase verantwortlich. Die Expression der β -Galactosidase wird wiederum durch IPTG induziert. Die Bakterien, die ein eingebautes DNA-Fragment tragen, haben ein unterbrochenes *lacZ*-Gen; es werden keine blauen Farbstoffe gebildet und die Kolonien bleiben weiß. Die Bakterien ohne eingebautes Fragment färben sich blau, da die β -Galactosidase durch IPTG induziert weiterhin exprimiert wird.

Die positiven Klone wurden im ersten Schritt auf einer neuen LB-Amp-Platte in nummerierten Feldern ausgestrichen und anschließend in 20 μ l pyrogen-nukleasenfreies PCR Wasser überführt. Um die Zellen aufzubrechen und die DNA zu lösen, wurden diese Ansätze für 10

Min. bei 96 °C gekocht. Danach wurde mit der gelösten DNA eine entsprechende archaeale bzw. bakterielle 16S rRNA PCR mit den Primern in Tabellen 4.6 und 4.7 durchgeführt.

LB-Medium

10 g	Trypton
5 g	Bacto Yeast Extract
10 g	1 M NaCl
ad 1000 ml	aqua dest

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,0 eingestellt.

LB-Amp-Platten

Dem LB-Medium (1000 ml) wurden 15 g Agar-Agar hinzugefügt.

Das LB-Medium wurde erst nach dem sterilisiert und anschließend bei 50 °C mit Ampicillin, X-Gal und IPTG versehen:

Ampicillin (100 ng/ml):	1 ml auf 1000 ml Medium
X-Gal:	2 ml auf 1000 ml Medium
IPTG:	2 ml auf 1000 ml Medium

SOC-Medium

1 g	Trypton
0,25 g	Hefeextrakt
0,025 ml	1 M NaCl
0,125 ml	1 M KCl
48,875 ml	aqua bidest
0,5 ml	2 M MgCl ₂ x 7 H ₂ O
0,5 ml	2 M D-Glucose x 1 H ₂ O

IPTG (0,1 M)

1,2 g	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
ad 50 ml	aqua bidest

Der Ansatz wurde steril filtriert, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

X-Gal

100 mg	5-Brom-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactosid
2 ml	N,N-dimethylformamid

Der Ansatz wurde steril filtriert, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

4.9.6 Sequenzanalysen und Stammbäume

Die Sequenzierungen der Klone als auch der reamplifizierten DGGE Banden sind durch die Firmen DNA-Cloning Service (Biozentrum Klein Flottbek), Seqlab (Göttingen) oder MWG (Ebersberg) durchgeführt worden.

Es folgte eine Auswertung und Bearbeitung der erhaltenen Sequenzen mittels des Programms BioEdit (Version 7.0.8, 2007, 35 <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html>). Überprüft wurden die Sequenzen anhand der in der NCBI Blast-Datenbank hinterlegten DNA-Sequenzen (ALTSCHUL et al. 1990) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Das Aligment erfolgte mit dem Programm BioEdit. Bei diesem Verfahren werden die Sequenzen so angeordnet, dass sich homologe oder identische Basen an der gleichen Position befinden. Für das Aligment wurde das eingebettete Programm ClustelW verwendet. Phylogenetische Stammbäume wurden anschließend mit dem Programm Mega 5 (TAMURA ET AL. 2007) berechnet. Hauptsächlich wurde das Neighbour-joining (NJ) und das Maximum-Likelihood Verfahren benutzt.

Von den Clustering-Algorithmen, die keine molekulare Uhr berücksichtigen, zählt Neighbour-Joining (SAITOU & NEI 1987) zu den am häufigsten verwendeten. Es ist ein schnelles Verfahren, um einen Minimum-Evolution-Baum zu erhalten. Voraussetzungen sind, dass die Distanzmatrix die tatsächlichen evolutiven Distanzen wiedergeben. Bei der Neighbor-joining Methode werden Baumtopologien als optimal bewertet, wenn die Abstände der Matrix am besten mit den jeweiligen Astlängen übereinstimmen. Hierzu wurden 1000 mögliche Bäume berechnet und die prozentualen Wahrscheinlichkeiten der Äste (größer als 50 %) im Bootstrap-Baum zusammengefasst.

Bei dem Maximum-Likelihood-Verfahren werden verschiedene Modelle zur Sequenzevolution genutzt. Parameter wie das Verhältnis von Transversion zu Transition, der Konservierungsgrad an bestimmten Positionen oder die Wahrscheinlichkeit für Konservierung im Gegensatz zur Mutation werden berücksichtigt. Es werden diskrete Merkmale untersucht und nicht wie bei der Distanzmethode ermittelte Matrizen.

4.10 Statistische Verfahren

Zur Bestimmung von bivariate Korrelation wurde die Software SPSS 16 verwendet.

5. ERGEBNISSE

5.1. Bodenkundliche Charakterisierung der untersuchten Permafrostböden

Für die Untersuchungen der Ammoniakoxidation wurden Böden unterschiedlicher geomorphologischer Landschaftseinheiten der Insel Samoylov analysiert und miteinander verglichen. Die Böden lagen in der noch jungen Überflutungsebene und in der höher gelegenen Flussterrasse, die einen großen Bereich mit Eiskeilpolygonen und einen kleinen trockeneren Bereich im Süden aufweist. Im Abschnitt 3 sind die Untersuchungsstandorte dargestellt. In Abbildung 3.5 sind die 7 Standorte eingezeichnet (siehe auch die letzte Seite dieser Arbeit).

5.1.1 Böden der Flussterrasse

Die höher gelegene Flussterrasse im östlichen Teil der Insel bildet mit ca. 3 km² den größten Teil Samoylovs. Die Flussterrasse ist geprägt von der polygonalen Tundra, die von Eiskeilpolygonen unterlagert ist. Im südlichen Teil befinden sich trockene und versandete Sandkeil und „high-centered“ Polygone.

5.1.1.1 Böden der polygonalen Tundra

Während der Expedition 2007 wurden unterschiedliche Abfolgen der Bodenhorizontierung der polygonalen Tundra charakterisiert. Der acht Meter lange Transekt war 50 cm breit und bis zu 40 cm tief. (Siehe Abbildung 5.1 B) Die Abbildung 5.1 A gibt einen Überblick über die Morphologie der polygonalen Tundra. In der Abbildung 5.2. ist sowohl die Horizontabfolge über die gesamte Länge des Transektes abgebildet, als auch die Vergrößerung der beprobten Bodenabschnitte am Polygonwall und im Polygonzentrum.



Abb. 5.1 Überblick über die Morphologie der polygonalen Tundra.

A Polygonale Tundra auf der Insel Samoylov mit einem Blickwinkel nach Nordost (2008). B Gegrabenes Transekt von 2007

Tabelle 5.1 Ausgewählte Merkmale der Boden im Polygon des Transektes von 2007

Typic Aqiturbels im Polygonwall und *Typic Historthel* im Polygonzentrum

<u>Koordination:</u> N 72° 22,186, E 126°28,903 <u>Datum der Profilaufnahme:</u> 13.7.2007 <u>Tiefe des Wasserspiegels bei Profilaufnahme:</u> 0 cm GOF <u>Auftautiefe bei Profilaufnahme:</u> 24 cm <u>Lage im Gelände:</u> Wall und Zentrum eines Eiskeilpolygons <u>Vegetation:</u> nicht bestimmt <u>Substrat:</u> Schwach zersetzter Torf (Polygonzentrum) Holozäne fluviatile Sande (Polygonwall)													
Horizont ^a	Soil Tax Horizonte	Tiefe [cm]	Bodenfarbe	Durchwurzelungsintensität	Korngrößenverteilung ₁			Bodenart	C _{org} [%]	N [%]	C/N	Wassergehalt [%]	pH [H ₂ O]
					Sand [%]	Schluff [%]	Ton [%]						
Polygonwall: <i>Typic Aqiturbel</i>													
Aa	A	0-5	10YR 2/1	stark	78	18	4	Su2	8,5±5,0	0,2±0,1	35,1±8,6	54±10	6,4±0,4
Ahe/M/G	Bgjj1	5-15	10YR 5/1 10YR 3/1	mittel	73	23	4	Su2	2,4±2,5	0,1±0,1	17,1±2,9	31±30	7,0±0,3
GO	Bgjj2	15-24	10YR 3/1	mittel	58	35	7	Su3	3,2±0,0	0,1±0,0	17,0±0,8	35±10	6,5±0,1
Polygonzentrum: <i>Typic Historthel</i>													
H	Oi	0-5	10YR3/2	stark	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	16,4±3,0	0,7±0,0	33,9±3,1	72±12	6,7±0,2
Aa	Oeg	5-15	10YR3/2	schwach	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	14,4±2,5	0,5±0,1	31,6±2,9	68±9	6,2±0,2
Aa	Oeg	15-24	10YR3/2	schwach	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	3,7±0,9	0,1±0,0	29,8±0,8	42±9	6,2±0,0

n.b.: nicht bestimmt, (1)Korngrößen von ZUBRYZCKI (2008). Wenn Standardabweichungen angegeben sind, wurden 2 Parallele bestimmt

Oberhalb des Eiskeils und am Polygonwall sind deutliche Anzeichen für Kryptoturbation zu erkennen, d.h. die einzelnen Horizonte richten sich mit dem Eiskeil auf und verlaufen nicht horizontal. In den torfhaltigen Böden des Polygonzentrums, waren keine deutlichen Kryptoturbationsmerkmale zu erkennen. Anhand des Sandbandes, ca. 20 bis 22 cm unterhalb der Geländeoberfläche, sind nur leichte Schwankungen in den Horizontgrenzen zu sehen. Aufbauend auf die Bodenansprache und die im Labor ermittelten Eigenschaften und Merkmale (siehe Tabelle 5.1) wurden die Böden des Polygonwalls nach US Soil Taxonomy (ST) als *Typic Aquiturbel* und die Böden des Polygonzentrums als *Typic Historthel* klassifiziert.

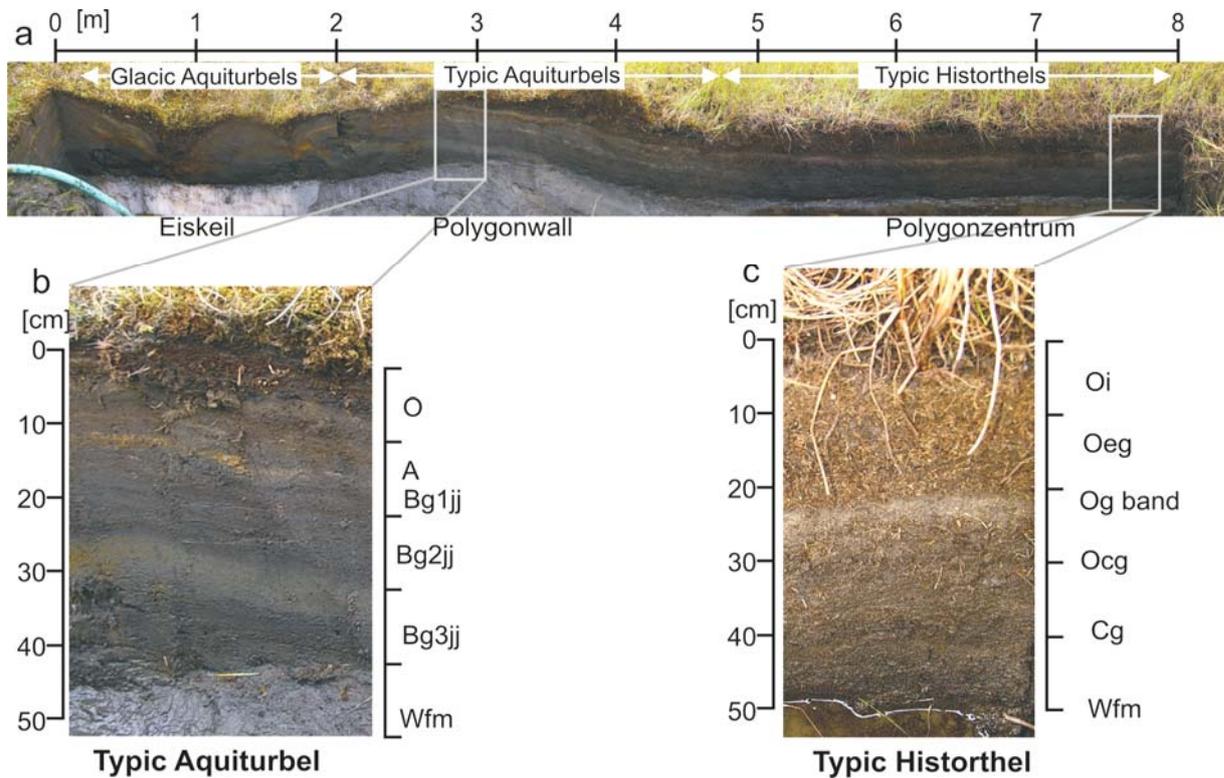


Abb. 5.2 Transsekt eines Eiskeilpolygons

a: Profilansicht des Transektes eines Eiskeilpolygons vom Eiskeil bis zum Zentrum des Polygons. b: Vergrößerung des Bodenprofils im Polygonwall und c: Polygonzentrum. Die Klassifizierung erfolgte nach Soil Tax. O: Organikhorizont, A: Mineralhorizont, B: Unterbodenhorizont C: Untergrundhorizont; W: Wasser, c: Konkretionen g: gleyig, j: Redox Merkmale, i: leicht umgesetztes organischen Material, e: organisches Material, f: gefrorener Boden, m: massiv (Bild: S.Zubryzcki)

Die *Typic Aquiturbel* zeichnen sich durch einen hohen Wassergehalt und der Strukturveränderung durch Kryptoturbation aus. Wenn der Boden von einem Eiskeil oder von eisreichen Sedimenten unterlagert ist, wird es als *Glacic Aquiturbel* klassifiziert.

Die Böden eines anderen Polygons (siehe Abb. 3.5 Standort 3) wurden 2008 in der gleichen Weise klassifiziert. Die Böden des Polygonwalls wurden nach der US Soil Tax als *Typic Aquiturbel*, nach der World Reference Base (WRB) als Cryosol (Reductaquic) und nach der Russischen Boden Klassifikation (RSS; Elovskaya, 1987) als ein Permafrost Peatichs Ley

klassifiziert. Der Boden des Polygonzentrum wurde nach der US Soil Tax als *Typic Historthels*, nach der WRB als Cryic Histosol und nach der RSS als Permafrost Alluvial Muddy-Peat Gley klassifiziert.

Nach der US Soil Taxanony werden die von Permafrost beeinflussten Böden, die Gelisole, zu *Turbels*, wenn Kryoturbationsmerkmale deutlich zur erkennen sind. Gerade im Wall der Polygone waren die Merkmale deutlich ausgeprägt. In Abbildung 5.2 sind die Veränderungen der Horizontübergänge deutlich nachgezeichnet, die durch die Herausbildung des Eiskeils entstanden sind. In der Abbildung 5.3 A sind die Kryoturbationsmerkmale nur schwach erkennbar, die Böden des Polygonwalls wurden trotzdem als *Turbels* identifiziert. Der C_{org} Anteil und der Gesamtstickstoff nimmt mit der Tiefe ab. Im obersten Horizont war die organische Substanz stark angereichert, aber nicht so stark wie im Zentrum. Die C/N-Verhältnisse nahmen auch mit der Tiefe ab, was ein Hinweis auf den Zersetzungsgrad der organischen Substanz im Boden war.

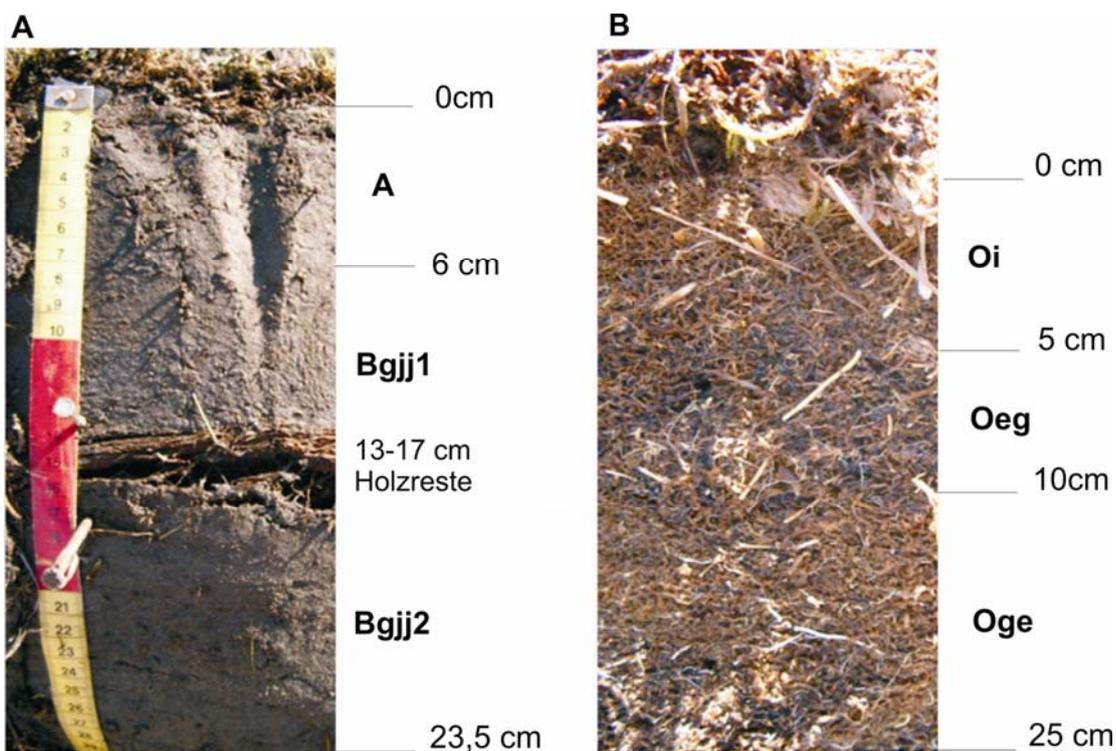


Abb. 5.3 Bodenprofile des Polygons

A *Typic Aquiturbel* im Polygonwall und B *Typic Historthels* im Polygonzentrum auf der Insel Samoylov. Bodenhorizontsymbbole nach der US Soil Tax. Die Klassifizierung erfolgte nach Soil Tax. O: Organikhorizont, A: Mineralhorizont, B: Unterbodenhorizont; g: gleyig, j: Redox Merkmale, i: leicht umgesetztes organischen Material, e:organisches Material

Der pH-Wert ist nur sehr schwach sauer. Die verfügbaren Nährstoffe Phosphor und Kalium nahmen mit der Tiefe stark ab und waren geringer als im Zentrum. Die Lagerungsdichten lagen im Polygonwall bei ca. 1 g pro cm^3 , das Porenvolumen hatte einen Prozentanteil von 55 bis 67 %.

Die Böden des Polygonzentrums wurden aus zwei Gründen nicht als *Histels*, also organische Böden, sondern als *Historthels* charakterisiert. Die Böden waren erstens zwar mehr als 30 Tage wassergesättigt, sie wiesen aber nicht 80 Volumenprozent organisches Material auf. In den Tabellen 5.1 und 5.2 sind die C_{org} -Gehalte angegeben; von diesem konnte auf die organische Substanz geschlossen werden. Ab 15 cm nimmt der Kohlenstoffanteil stark ab. Bis 15 cm ist die organische Substanz mit ca. 36 Gewichtsprozenten stark angereichert. Des Weiteren waren in den Böden der Polygonzentren keine Kryoturbationsmerkmale zu erkennen, so dass sie nicht zu den *Turbels* gezählt werden. Die pH-Werte des *Historthels* im Polygonzentrum waren schwach sauer mit 6,2 bis 6,7. Im Polygonzentrum hingegen war die Lagerungsdichte sehr gering mit unter $0,5 \text{ g pro cm}^3$. Die Poren nahmen dafür aber einen sehr hohen Anteil ein mit bis zu 97 %. Die verfügbaren Phosphor- und Kaliumkonzentrationen nahmen mit der Tiefe stark ab. Der verfügbare Phosphor war im Polygonwall und Zentrum fast gleich mit rund 24 mg kg^{-1} TS im oberen Horizont. Das verfügbare Kalium war hingegen im Polygonzentrum höher als im Polygonwall mit bis zu 800 mg kg^{-1} TS im oberen Horizont.

ERGEBNISSE

Tabelle 5.2 Ausgewählte Merkmale der Boden im Polygon des Polygon von 2008

Typic Aquiturbels im Polygonwall und *Typic Historthel* im Polygonzentrum

Koordinatation: N 72° 22,113, E 126°29,001 Datum der Profilaufnahme: 23.7.2008 Tiefe des Wasserspiegels bei Profilaufnahme: 0 cm GOF Auftautiefe bei Profilaufnahme: 25,5 cm Lage im Gelände: Wall eines Eiskeilpolygons Vegetation: Moos-Seggen-Tundra Substrat: Holozäne fluviale Sande							Koordinatation: N 72° 22,186, E 126°28,903 Datum der Profilaufnahme: 23.7.2008 Tiefe des Wasserspiegels bei Profilaufnahme: 0 cm, GOF Auftautiefe bei Profilaufnahme: 28,5 cm Lage im Gelände: Zentrum eines Eiskeilpolygons Vegetation: nicht bestimmt Substrat: Schwach zersetzter Torf										
Horizont ⁴	Soil Tax Horizonte	Tiefe [cm]	Bodenfarbe	Durchwurzelungsintensität	Lagerungsdichte [g/cm ₃]	Porenvolumen [Vol %]	Korngrößenverteilung			Bodenart ₄	C _{org} [%] ₂	N [%] ₂	C/N ₂	pH [H ₂ O] ₂	Wassergehalt ₁	P _{verf.} [mg kg ⁻¹ TS] ₃	K _{verf.} [mg kg ⁻¹ TS] ₃
							Sand [%]	Schluff [%]	Ton [%]								
Polygonwall: <i>Typic Aquiturbel</i>																	
Aa	A	0-5	10YR2/1	stark	1.0±0.1	68±3	n.b.	n.b.	n.b.		10,0±3,4	0,3±0,1	37±10	6,6	37–65	23±14	296±210
Ahe/M/G	Bgjj	5-15	10YR5/1 10YR3/1	mittel	1.1±0.1	55±1	67±11	29±9	5±2	Su3	3,1±0,5	0,2±0,0	18±2	6,6	31–38	5±0	55±16
GO	Bgjj	15-24	10YR3/1	mittel	1.1±0.3	64±10	54±9	38±8	3±1	Su 3	2,9±0,1	0,2±0,0	16±1	6,2	33–38	3±1	30±5
Polygonzentrum: <i>Typic Historthels</i>																	
H	Oi	0-5	10YR3/2	stark	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.		18,6±2,9	0,6±0,1	33±2	6,3	80-87	24±9	804±224
Aa	Oeg	5-15	10YR3/2	schwach	0.5±0.1	87±3	n.b.	n.b.	n.b.		18,0±2,5	0,5±0,0	37±5	6,1	75–81	5±3	197±102
Aa	Oge	15-24	10YR3/2	schwach	0.1±0.0	97±2	n.b.	n.b.	n.b.		6,5±0,9	0,2±0,0	37±1	6,0	59-74	1±1	50±37

n.b.: nicht bestimmt, n.n. nicht nachgewiesen, (1) Mittelwerte aus den im Feld untersuchten Proben (2) Mittelwerte aus den Proben vor Ort gemessen, (3) Mittelwerte aus den Proben die nicht gefroren nach Hamburg transportiert wurden (4) Bodenart nach KA5

5.1.1.2 Böden der trockenen Flussterrasse

Im südlichen Teil der Insel sind die auf der höher gelegenen Flussterrasse gelegenen Polygone entwässert und versandet. Der Probenahmepunkt lag hier in der Nähe der Forschungsstation, ca. 3 m vom Kliff entfernt. Die Abbildung 5.4 gibt hier einen Überblick über die Lage der untersuchten Böden, in Abbildung 5.5 ist das Bodenprofil des *Typic Psammorthel* dargestellt und in der Tabelle 5.3 sind ausgewählte Bodeneigenschaften aufgeführt. Durch vergangene periodische Überflutungsereignisse werden die Böden stark geprägt von Sandbändern mit unterschiedlichem Gehalt an organischer Substanz (Abb 5.5). Die Böden wurden nach der US Soil Tax als *Typic Psammorthel*, nach der World Reference Base als Haplic Cryosol und nach der Russischen Klassifikation als Permafrost Alluvial Layered Primitive Sandy klassifiziert.

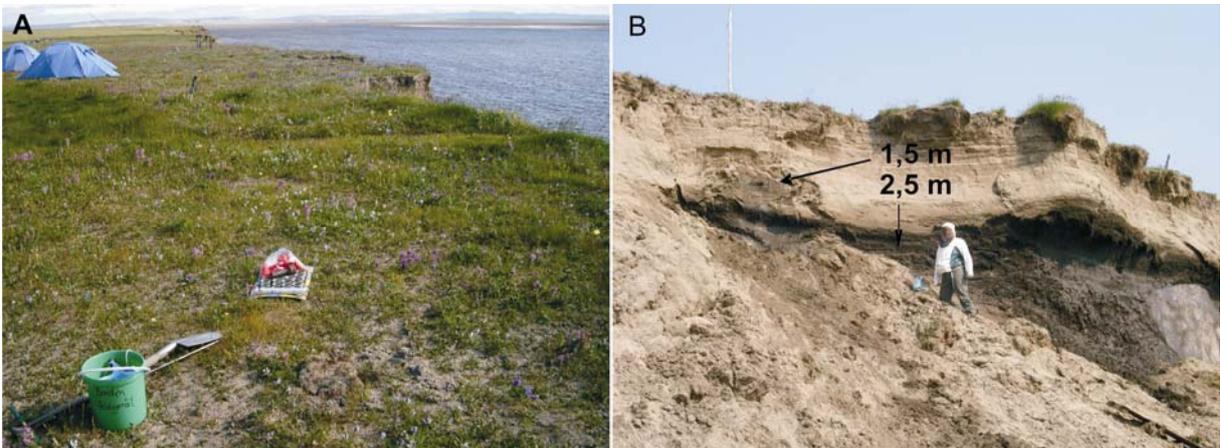


Abb. 5.4 Die Böden der trockenen Flussterrasse

Überblick über die Lage der untersuchten Böden der trockenen Flussterrasse (A) und dem darunter liegenden Kliff (B). Die Pfeile geben die Probenahmestellen in 1,5 und 2,5 m Tiefe am Kliff an.

Die *Typic Psammorthel* zeichnen sich dadurch aus, dass sie weder einen hohen Anteil an organischer Substanz beinhalten noch mehr als 35 % Steinfragmente. Die Lagerungsdichte war mit 1 bis 1,5 g/cm³ recht hoch, dazu passten die Porenvolumen von rund 50 %. Die Korngrößenverteilung war sehr konstant und lag bei über 90 % Sand, rund 5 % Schluff und 2 % Ton. Die Anteile des organischen Kohlenstoffs mit 0,6 bis 0,8 % und des Stickstoffs mit nur 0,1 % waren sehr gering. Die Probe aus 2,5 m Tiefe am Kliff wies einen höheren Anteil an organischer Substanz auf (2,9 % C_{org}). Die Böden waren schwach sauer und der Wassergehalt stieg mit der Tiefe an. Die Konzentrationen des verfügbaren Phosphors und Kaliums waren deutlich geringer als in der polygonalen Tundra. Der verfügbare Phosphor lag unter 10 mg pro kg Trockensubstanz und Kalium bei unter 100 mg pro kg.

Tabelle 5.3 Ausgewählte Merkmale des *Typic Psammorthel* auf der trockenen Flussterrasse

Koordination: N 72° 22,065, E 126°28,0290 Datum der Profilaufnahme: 24.7.2008 Auftautiefe bei Profilaufnahme: 55 cm Lage im Gelände: Im trockenen südlichen Flussterrassenbereich Vegetation: nicht bestimmt Substrat: Holozäne fluviatile Sande																	
Horizont ^a	Soil Tax Horizonte	Tiefe [cm]	Bodenfarbe ^b	Durchwurzelungsintensität	Lagerungsdichte [g/cm ³] _c	Porenvolumen [Vol%] _c	Korngrößenverteilung			Bodenart	C _{org} [%] _e	N [%] _e	C/N _e	pH [H ₂ O] _f	Wassergehalt [%] _f	P _{verf} [mg kg ⁻¹ TS] _d	K _{verf} [mg kg ⁻¹ TS] _d
							Sand [%] _d	Schluff [%] _d	Ton [%] _d								
Trockene Flussterrasse: <i>Typic Psammorthel</i>																	
Ah	A	0-5	10YR4/1	sehr stark	1,3±0,1	54±2	94±2	5±2	2±0	S	0,8±0,1	0,1±0,0	17±2	6,4	3 - 10	9±3	78±4
Ah Bw	Bw	5-15	10YR4/1 10YR3/1	stark	1,3±0,1	53±3	92±3	5±3	2±1	Ss	0,7±0,1	0,1±0,0	14±0	6,4	4 - 10	5±1	42±6
C	Ab/C	15-24	10YR3/1 10YR3/2	stark	1,5±0,0	49±2	93±1	5±0	3±1	Ss	0,6±0,0	0,1±0,0	12±1	6,4	6-11	3±2	23±3
Kliff																	
n.b.	n.b.	150	n.b.	n.b.	1,5±0,1	54±1	93	5	2	Ss	0,6±0,4	0,0±0,0	15±2	6,8	6 - 25	4	19
n.b.	n.b.	250	n.b.	n.b.	1,0±0,1	66±5	92	6	2	Ss	2,9±1,5	0,2±0,1	16±2	6,9	23 - 55	5	12

n.b.: nicht bestimmt, a: Horizontsymbole nach US Soil Tax, b: Fabtabelle nach Munsell, c: insgesamt 5 Stechringe, d: drei Parallele ungefroren transportiert, e: 3 Parallele, gefroren transportiert, f: vor Ort bestimmt. Die Proben des Kliffs wurden nicht in mehreren Parallelen genommen

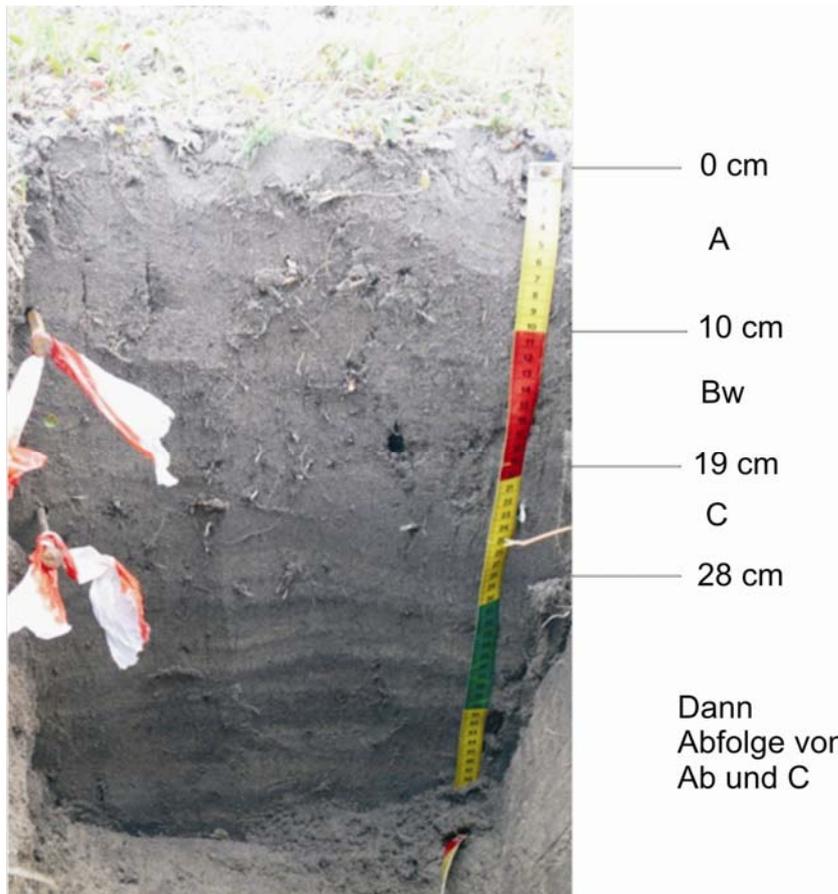


Abb. 5.5 Bodenprofil des untersuchten *Typic Psammorthel* der trockenen Flussterrasse.
 Die Einteilung in Bodenhorizonte erfolgt nach US Soil Tax. A: Mineralhorizont, B: Unterbodenhorizont
 C: Untergrundhorizont; b: überschüttet genetisch, w: in Farbe und Struktur geändert.

5.1.2 Böden der jüngeren Überflutungsebene

Die jüngere Überflutungsebene liegt im westlichen Teil der Insel Samoylov und zeichnet sich im Allgemeinen dadurch aus, dass sie jährlich im Frühjahrshochwasser ein bis mehrmals überflutet wird. Die große vegetationsfreie, sandige Strandfläche wird in dem relativ kurzen Vegetationsperiode von Mitte Juni bis Ende August langsam mit Vegetation bedeckt, die sich von der vegetationsbedeckten Überflutungsebene Richtung Strand ausdehnt. In dieser Arbeit wurden sowohl der Stand ohne Vegetationsbedeckung, als auch die Überflutungsebene, die ganz-jährig mit Vegetation bedeckt ist, untersucht.

5.1.2.1 Die Böden des Strandes

Die Abbildung 5.6 gibt einen Überblick über den Strand. Deutlich wird, dass der Strand keine Vegetation aufweist. Die Abbildung 5.7 zeigt das dazugehörige Bodenprofil. Auch hier ist eine deutliche Bänderung zwischen dunklen organikreichen und sandigen Schichten zu erkennen, die durch Überflutungsereignisse entstanden ist.



Abb. 5.6 Lage des Probenahmepunktes am Strandstandort

Mit einem Kasten ist der Probenahmeort gekennzeichnet. Im Hintergrund sind die Forschungsstation und ein Forschungsschiff des Lena-Delta Reservates zu sehen.

Der Boden wurde nach der US Soil Tax als *Psammentic Aquorthel* (ST), nach der WRB als Haplic Cryosol Reductaquic und nach der russischen Klassifikation als Permafrost Alluvial Layered Sandy beschrieben.

In der Tabelle 5.4 sind ausgewählte Bodeneigenschaften des Profils am Strand aufgeführt. Die Horizonte unterschieden sich vor allem in ihrem Anteil an organischer Substanz. Die obere organikreiche Schicht wies als Substrat ein Sandlehm auf (Slu), d.h. der Sandanteil lag bei rund 50 % und der Schluffanteil bei ca. 30 %. Die drei Parallelen unterschieden sich aber sehr stark, was an der Standardabweichung von zum Teil mehr als 50 % erkennbar ist.

Die Lagerungsdichte nahm mit der Tiefe von 1,5 auf 1,4 ab und das Porenvolumen wurde kleiner (von 60 % auf ca. 53 %). In der oberen Schicht war sowohl der Gehalt an organischem Kohlenstoff mit 2,3 % als auch das C/N-Verhältnis mit 15 höher als in der sandigen Schicht. Der Boden war neutral mit einem pH-Wert von 7 und der Wassergehalt nahm von über auf unter 20 % ab. Der verfügbare Gehalt an Phosphor und Kalium war im oberen Horizont fast drei Mal so hoch, wie in dem darunterliegenden (13 zu 5 mg kg⁻¹ bzw. 28 zu 12 mg kg⁻¹).

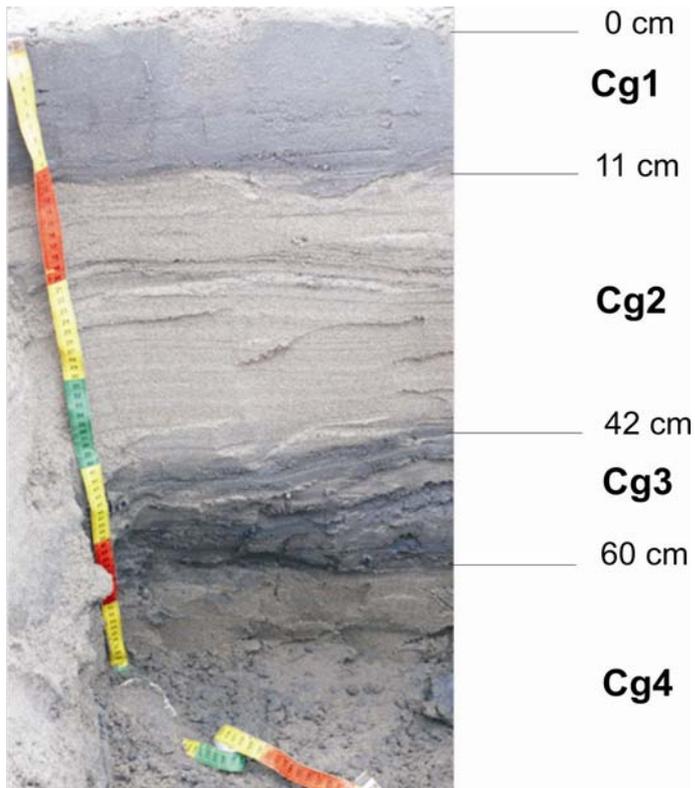


Abb. 5.7 Bodenprofil des untersuchten *Psammentic Aquorthel* am Strand
Die Einteilung in Bodenhorizonte erfolgt nach US Soil Tax. C: Untergrundhorizont; g: gleyig

5.1.2.2 Die Böden der Überflutungsebene

Die Böden der vegetationsbedeckten Überflutungsebene lagen im westlichen Teil der Insel und bilden keine Frostmuster aus. Die Vegetation bestand hauptsächlich aus Wollgras (*Eriophorum spec*), Kriechweiden (*Salix spec*) oder Birken (*Betula spec*). Die Böden der Überflutungsebene wurden nach der US Soil Tax als *Typic Psammorthel*, nach der WRB als Haplic Cryosol Oxyaquic und nach der russischen Bodenklassifikation als Permafrost Alluvial Layered Primitive Sandy klassifiziert. Die Böden der Überflutungsebene wurden, wie die Böden der trockenen Flussterrassen, als *Typic Psammorthel* klassifiziert. Beide Böden wurden durch ähnliche Prozesse gebildet. Die Schichtungen mit Sediment mit einem unterschiedlichen Gehalt an organischer Substanz sind durch periodische Überflutungsereignisse entstanden. Die Abbildungen 5.8 geben einen Überblick über den Beprobungsort.

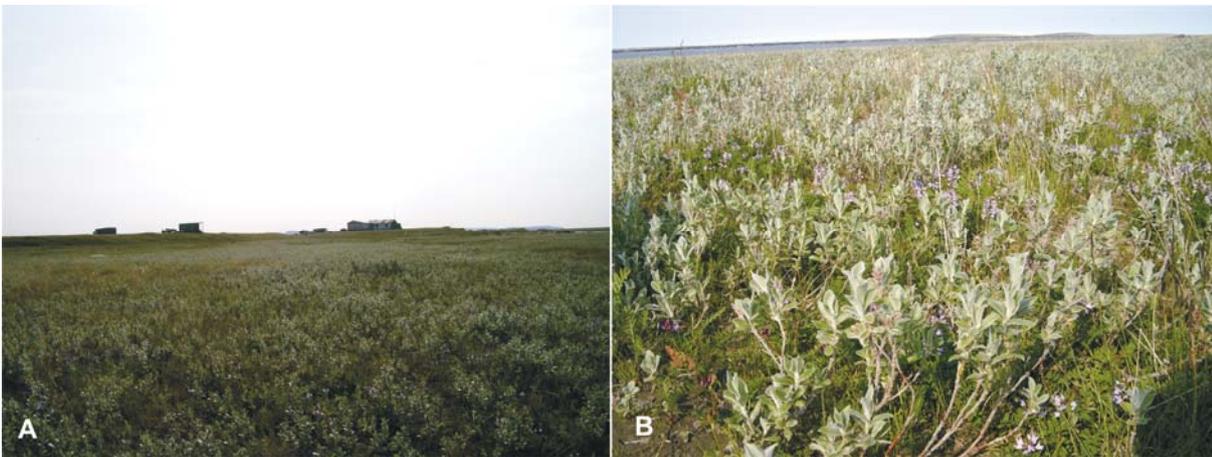


Abb. 5.8 Die Überflutungsebene

A: Überblick über die Lage des Probenahmeortes, im Hintergrund die Forschungsstation.
 B: Überflutungsebene mit Vegetation

In der Abbildung 5.9 wird die Horizontabfolge dargestellt und in der Tabelle 5.5 sind ausgewählte Bodeneigenschaften zusammengestellt. Die Horizonte unterschieden sich in die Lagerungsdichte, Porenvolumen und Korngrößen nur wenig. Die Lagerungsdichte nahm von 1,4 auf 1,2 g pro cm³ ab. Das Porenvolumen schwankt um 55 - 62 %. Die Bodenart liegt im Übergang von Reinsanden zu Schluffsand mit einem Sandgehalt von 84 bis 90 %. Auch der Kohlenstoff- und Stickstoffanteil nimmt nur sehr wenig mit der Tiefe ab, C liegt bei 1 % und N bei 0,1 %. Verfügbares Phosphor und Kalium fanden sich hauptsächlich im oberen Horizont, die Konzentrationen waren aber insgesamt deutlich geringer als in der polygonalen Tundra. Phosphor wies eine Konzentration von rund 10 mg pro kg und Kalium von 40 bis 25 mg pro kg (mit der Tiefe abnehmend) auf.

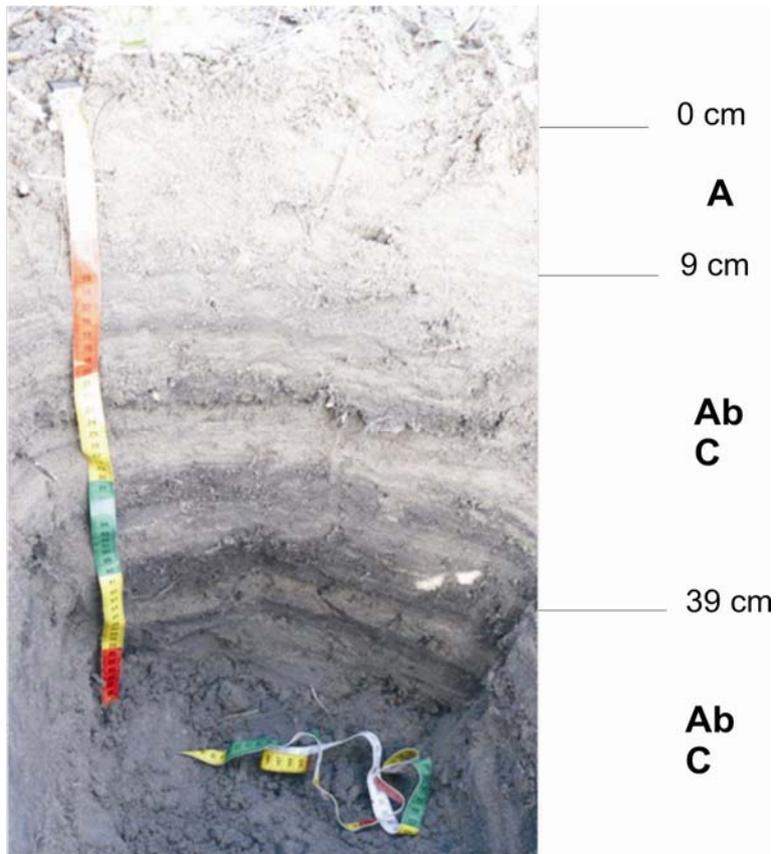


Abb. 5.9 Bodenprofile des untersuchten Typic Psammorthel in der Überflutungsebene
 Die Einteilung in Bodenhorizonte erfolgt nach US Soil Tax. A: Mineralhorizont, C: Untergrundhorizont;
 b: überschüttet genetisch

ERGEBNISSE

Tabelle 5.4 Ausgewählte Merkmale des *Psammentic Aquorthel* am Strand der jungen Überflutungsebene

<u>Koordination:</u> N 72° 22,125, E 126°27,568 <u>Datum der Profilaufnahme:</u> 28.7.2008 <u>Auftautiefe bei Profilaufnahme:</u> 62 cm							<u>Lage im Gelände:</u> In der jungen Überflutungsebene nahe des Flusses Lena <u>Vegetation:</u> Nicht vorhanden <u>Substrat:</u> Holozäne fluviatile Sande										
Horizont ^a	Soil Tax	Tiefe [cm]	Bodenfarbe ^b	Durchwurzelungsintensität	Lagerungsdichte [g/cm ³] ^c	Porenvolumen [Vol %] ^c	Korngrößenverteilung			Bodenart	C _{org} [%] ^e	N [%] ^e	C/N _e	pH [H ₂ O] ^f	Wassergehalt [%] ^f	P _{verf} [mg kg ⁻¹ TS] _d	K _{verf} [mg kg ⁻¹ TS] _d
							Sand [%]	Schluff [%]	Ton [%]								
tpM	Cg 1	0-5	10YR3/1	keine	1,5±0,0	60±8	50±13	32±18	4±1	Slu	2,3±0,6	0,2±0,0	15±1	6,9	28 - 40	13±2	38±1
II tpl C	Cg 2	10-20	10YR6/4	keine	1,4±0,1	53±4	96±1	2±0	0±0	ss	0,2±0,1	0,0±0,0	12±3	7,0	4 - 20	5±1	12±2

n.b.: nicht bestimmt, a: Horizontsymbole nach US Soil Tax, b: Fabtabelle nach Munsell, c: insgesamt 5 Stechringe, d: drei Parallele ungefroren transportiert, e: Mittelwerte aus den Proben, die während der Vegetationsperiode genommen wurden (4 Parallele), f: vor Ort bestimmt

Tabelle 5.5 Ausgewählte Merkmale des *Typic Psammorthel* in der Überflutungsebene

<u>Koordination:</u> N 72° 22,141, E 126° 28,067 <u>Datum der Profilaufnahme:</u> 28.7.2008 <u>Auftautiefe bei Profilaufnahme:</u> 72 cm							<u>Lage im Gelände:</u> In der jungen Überflutungsebene mit Vegetation <u>Vegetation:</u> Nicht bestimmt <u>Substrat:</u> Holozäne fluviatile Sande										
Horizont ^a	Soil Tax	Tiefe [cm]	Bodenfarbe ^b	Durchwurzelungsintensität	Lagerungsdichte [g/cm ³] ^c	Porenvolumen [Vol %] ^c	Korngrößenverteilung			Bodenart	C _{org} [%] ^e	N [%] ^e	C/N _e	pH [H ₂ O] ^f	Wassergehalt [%] ^f	P _{verf} [mg kg ⁻¹ TS] _d	K _{verf} [mg kg ⁻¹ TS] _d
							Sand [%]	Schluff [%]	Ton [%]								
aAh	A	0-5	10YR4/2	sehr stark	1.4±0.1	58±4	90±1	7±2	3±1	ss	0,9±0,1	0,1±0,0	14±1	7,3	10 - 15	8±1	42±23
aAh/a M1	A, Ab/C	5-15	10YR4/2 10YR3/1	sehr stark	1.3±0.1	56±6	84±6	12±4	2±1	Su2	1,0±0,4	0,1±0,0	16±2	7,2	11 - 15	8±1	26±10
aM1	C/ Ab	15-25	10YR4/2 10YR3/1	sehr stark	1.2±0.0	62±5	88±10	9±9	3±2	ss	1,0±0,7	0,1±0,0	14±4	7,1	6 - 28	6±1.8	29±12

n.b.: nicht bestimmt, a: Horizontsymbole nach US Soil Tax, b: Fabtabelle nach Munsell, c: insgesamt 5 Stechringe, d: drei Parallele ungefroren transportiert, e: Mittelwerte aus den Proben, die während der Vegetationsperiode genommen wurden (4 Parallele), f: vor Ort bestimmt

5.1.3 Beschreibung des untersuchten Permafrostaufschlusses am Kliff

Mit der Untersuchung des Permafrostaufschlusses (Abb. 3.4, Punkt 7) am Kliff auf Samoylov sollten das Vorkommen und die Aktivitäten der Ammoniak oxidierenden Mikroorganismen in unterschiedlichen Tiefen (und damit mit unterschiedlichem Alter) und somit auch in gefrorenen Permafrostschichten untersucht werden. Dazu wurde ein Küstenaufschluss bis in eine Tiefe von 4,9 m unter Geländeoberfläche beprobt (Abbildung 5.10). Bei der Probenahme wurden die locker anliegenden Sedimente 10 bis 30 cm entfernt, so dass eine senkrechte Wand entstand. Ab einer Tiefe von 4,1 m wurde der Permafrost aufgegraben und die Proben wurden aus dem Permafrost entnommen.

Der Aufschluss bestand aus holozänen fluviatilen Sanden, die in wechselnden Lagen unterschiedliche Anteile an Torf und zum Teil auch Holzreste enthielten. In Tabelle 5.6 sind ausgewählte Bodenmerkmale aufgeführt. Für die Korngrößenanalyse wurden nicht alle Horizonte untersucht, sondern nur die mit einem Anteil an organischen Kohlenstoff von unter 10 %. Bei den gemessenen Proben nahm der Sandanteil mit der Tiefe ab von über 97 % in 1,8 m Tiefe auf unter 35 % in 4,7 m Tiefe. Der Tonanteil nimmt dabei auf über 10 % zu. In Abbildung 5.11. ist die Korngrößenverteilung und die pH-Werte graphisch dargestellt.



Abb. 5.10 Das Samoylov Kliff als Küstenaufschluss auf der Insel Samoylov. Permafrost ab 4,1 m

ERGEBNISSE

Tabelle 5.6 Charakterisierung des Samoylov-Kliffs an einem Küstenausschluss der Insel Samoylov

Koordinaten: N 72°21'59.0'', E 126°29'37.4'' Datum der Probenahme: 21.08.2008 Auftautiefe: 55 cm Lage im Gelände: Küstenaufschluss an der Süd-Ost-Küste der Insel Samoylov, Lena-Delta Substrate: Torfhaltige holozäne fluviatile Sande												
Tiefe [m]	Horizont-tiefen	Beschreibung der Horizonte im Feld	Korngrößenverteilung ¹			Boden-art	C % ₃	N% ₃	C/N ₃	pH [H ₂ O] ₃	P _{verf.} [mg kg ⁻¹ TS] ₂	K _{verf.} [mg kg ⁻¹ TS] ₂
			Sand [%]	Schluff [%]	Ton [%]							
0,6 - 0,7	55 - 75	Humus reiches Sandband mit Torf	n.b.	n.b.	n.b.		5,8±0,1	0,4±0,0	16,3±0,4	5,6±0,3	2,56	40
1 - 1,1	75 – 165	Torf mit etwas Sand, braun, sehr trocken	n.b.	n.b.	n.b.		11,0±0,6	0,4±0,03	25,5±2,8	5,8±0,0	2,56	46
1,8 - 1,9	165 – 200	Sandband	97,10	1,87	2,07	Ss	0,4±0,0	0,0±0,0	16,2±3,1	5,9±0,2	2,01	11
2,1 - 2,2	200 - 230	Torf mit Schluff	n.b.	n.b.	n.b.		6,7±0,3	0,3±0,0	21,8±0,9	6,1±0,1	5,68	44
2,35 - 2,45	230 – 245	Sandband, viele Wurzeln	95,99	1,74	2,25	Ss	0,3±0,0	0,0±0,0	12,9±2,6	6,6±0,3	6,97	17
2,9 – 3	245 – 335	Torf, Schluff, starker Geruch	37,80	51,85	10,62	Uls	2,4±0,4	0,2±0,0	16,1±0,6	6,9±0,3	10,27	50
3,35 - 3,45	335 – 350	Torfband, braun	n.b.	n.b.	n.b.		10,8±0,7	0,3±0,0	31,6±1,1	7,1±0,4	6,60	55
3,9 – 4	350 – 410	Torf, Schluff, Holz, kleine Äste, stark durchwurzelt	39,77	49,80	10,46	Slu	3,2±0,2	0,2±0,0	18,1±0,0	7,3±0,3	9,72	48
4,7 - 4,8	450 - 490	Torf, Schluff, viel Holz, Holzbalken bei 44,5 m, Ø10 bis 15 cm	34,21	55,17	10,64	Uls	4,3±0,5	0,2±0,0	18,4±0,6	7,1±0,0	14,49	38

n.b. nicht bestimmt; 1: Nur ungefrorene Proben, 2: Nur aus gefroren transportierten Proben, 3.:Mittelwert aus zwei Parallelen aus gefrorenen und ungefrorenen transportierten Proben

Die Unterschiede in den Horizonten ergeben sich in erster Linie aus dem Gehalt an organischer Substanz. Es wechseln sich dunkle organikreichen torfige Sandlagen und helle sandige Horizonte ab. Der Anteil an organischem Kohlenstoff lag zwischen 0,5 und 11 %. Es war also Torf vorhanden, aber kein Horizont enthielt ausschließlich Torf als Substrat. Die C/N-Verhältnisse variierten dem entsprechend von knapp über 10 bis über 30. Der pH-Wert nahm mit der Tiefe zu und steigt von 5,6 auf 7,1. Es wurden nur geringe Gehalte an verfügbarem Phosphor und Kalium gemessen. Phosphor stieg kaum über 10 mg kg⁻¹ und Kalium kaum über 50 mg kg⁻¹ Trockensubstanz.

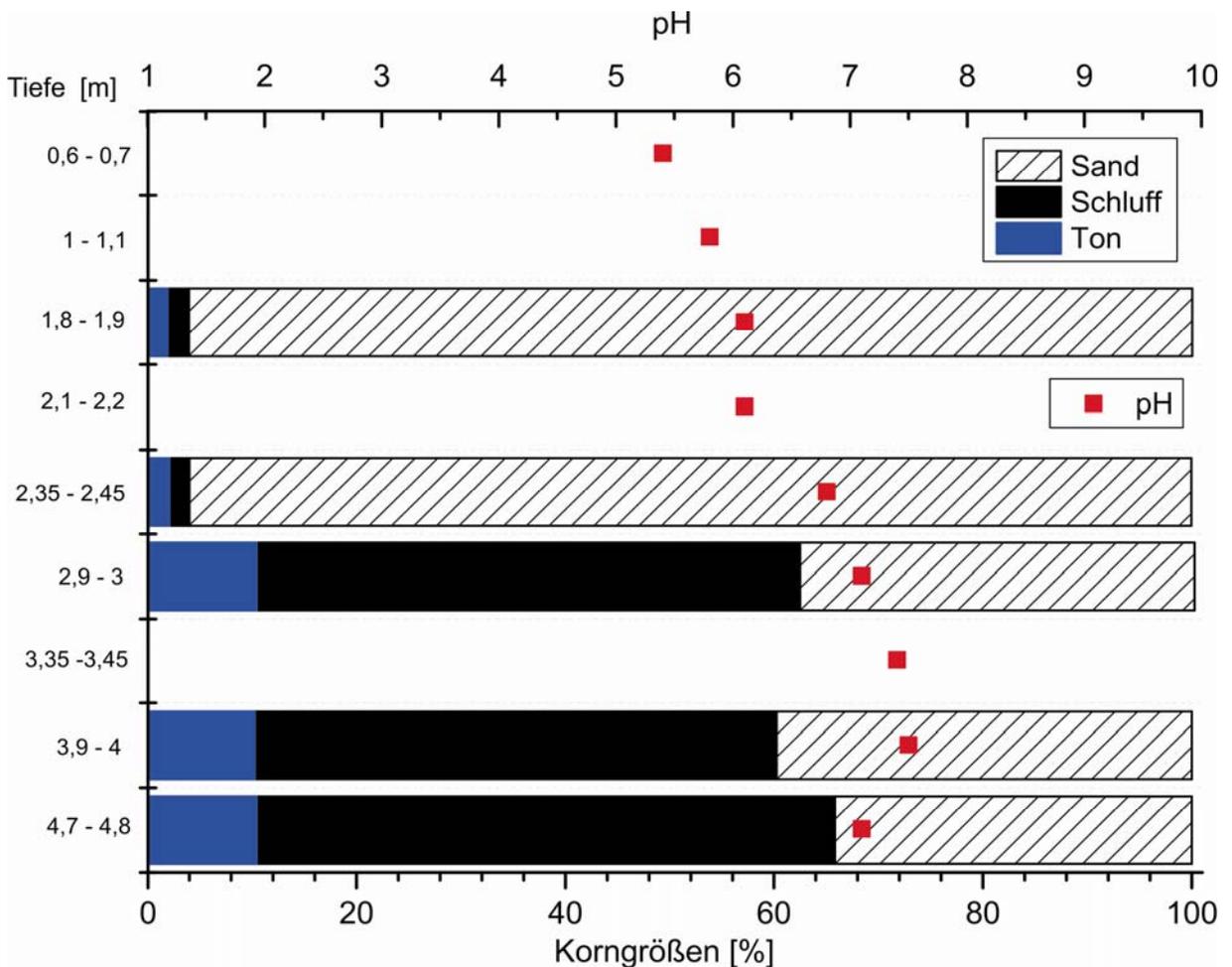


Abb. 5.11 Korngrößenverteilung und pH-Werte im Kliff.
Tiefenangaben in m. Probenahme im August 2008

5.2 Bodenkundliche Charakterisierung der Vergleichsböden im gemäßigten Klimat

Als ein Vergleichsstandort im gemäßigten Klimat dienten Böden am westlichen Ende der Hahnheide, nordöstlich von Hamburg. Die Vergleichsböden lagen im Auenbereich des Mühlenbachs. Die Abbildung 5.12 zeigt einen Überblick über den Probenahmeort.



Abb. 5.12 Überblick über den Probenahmeort in der Hahnheide.

A: Bild vom Frühling 2009. B: Bild von der Probenahme im Dezember 2009.

Die Abbildungen 5.13 bis 5.15 zeigen die Profile der drei unterschiedlichen Standorte. Die drei Böden wurden als Humusgley, Auengley und Anmoorgley nach der deutschen Bodenkundlichen Kartieranleitung (AG Boden, 2005) klassifiziert. In der Tabelle 5.7 sind ausgewählte Bodeneigenschaften angegeben. Maßgeblich unterschieden sie sich im Gehalt an organischer Substanz, die im Anmoorgley mit über 7 % C in dem Aa Horizont am höchsten war und im Auengley mit rund 2,5 % C am niedrigsten war. Grundsätzlich nahm der Kohlenstoffgehalt in allen Böden mit der Tiefe ab.

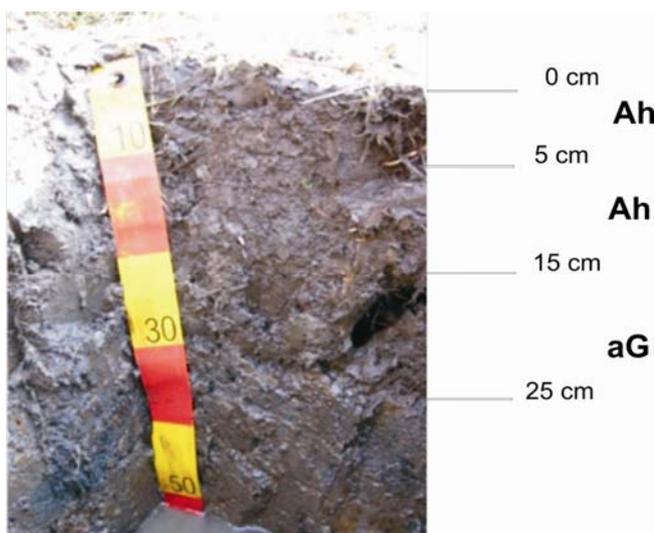


Abb. 5.13 Bodenprofils des Humusgley aus der Hahnheide.

Etwa 6 m vom Mühlenbach entfernt. Horizontsymbole aus der deutschen KA 5. Ah: humusreicher Oberbodenhorizont aG: Anmooriger G-Horizont (Grundwasser beeinflusst)

Die C/N-Verhältnisse waren im Humusgley und im Auengley sehr eng mit 10 bis 12. Im Anmoorgley liegen die C/N-Verhältnisse mit 13 bis 20 deutlich weiter. Die pH-Werte im Humus- und Auengley waren sehr schwach sauer mit 6 bis 6,6, im Anmoorgley waren sie allerdings mäßig sauer bei 4,6 bis 4,8. Die Wassergehalte lagen bei knapp über 50 bis 75 %.

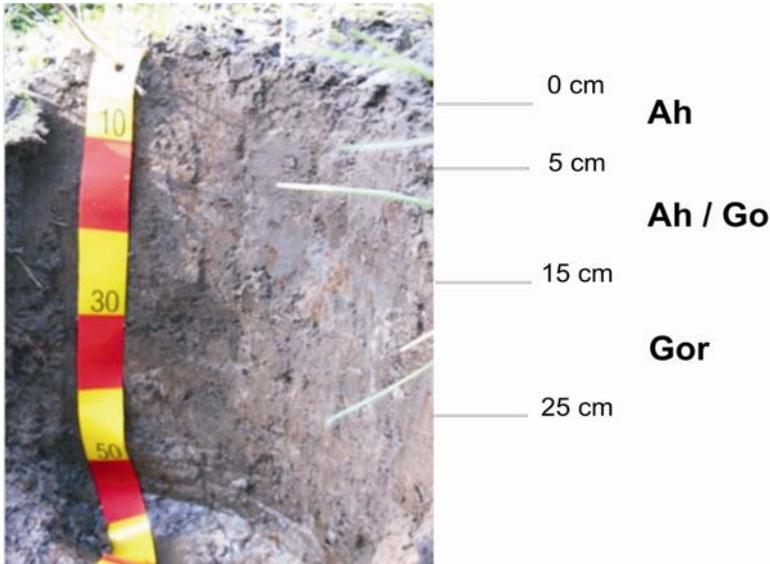


Abb. 5.14: Bodenprofils des Auengley aus der Hahnheide.

Direkt am Mühlenbach gelegen. Horizontsymbole aus der deutschen KA 5. Ah: humusreicher Oberbodenhorizont, Gor: G-Horizont (Grundwasser beeinflusst) mit Oxidations- und Reduktionsmerkmalen.

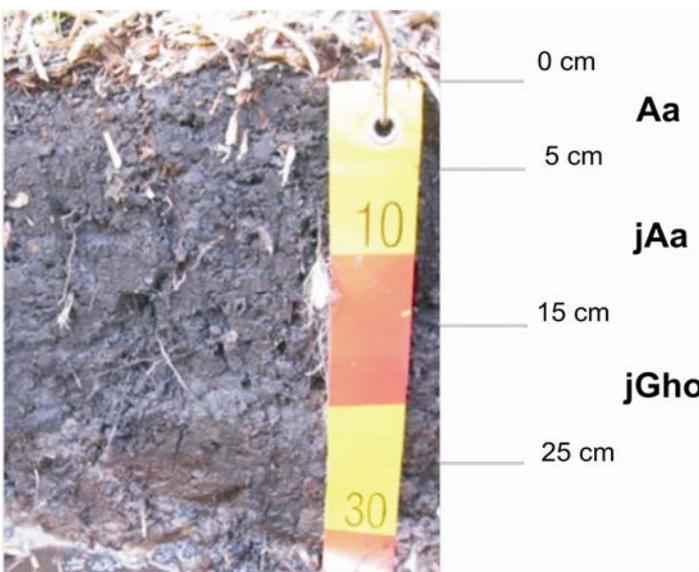


Abb. 5.15 Bodenprofils des Anmoorgley aus der Hahnheide.

Rund 30 m vom Mühlenbach entfernt gelegen. Horizontsymbole aus der deutschen KA 5. Aa: anmooriger Oberbodenhorizont, j: antropogen umgelagertes Naturprodukt, Gho: humusreicher und oxidierter G-Horizont (Grundwasser beeinflusst)

ERGEBNISSE

Tabelle 5.7 Ausgewählte Merkmale der Proben aus den Vergleichsböden der gemäßigten Klimaten

Koordinaten: N 53°37'26'', E 010°24'46'' Datum der Probenahme: 4.3.2009 bzw. 8.4.2009 Lage im Gelände: Westlicher Rand der Hahnheide, Auenbereich des Mühlenbachs Substrate: Gleye aus fluvitalen Sanden und Torfen											
Horizont _a	Tiefe [m]	Bodenfarbe _b	Durchwurzelungsintensität	C % ₃	N% ₃	C/N ₃	pH (H ₂ O) ₃	Wassergehalt [%]	Gelöste Anorganische Stickstoffverbindungen (DIN)		
									Ammonium_N [ngNg ⁻¹ TS ₂]	Nitrit-N [ngNg ⁻¹ TS ₂]	Nitrat-N [ngNg ⁻¹ TS ₂]
Profil 1 Humusgley											
Ah	0 - 5	7,5 YR 3/1	stark	6.3	0.5	12	6.2	53.4	0.09	n.n.	51.64
Ah	5 - 15	7,5 YR 3/1	stark	4.7	0.4	11	6.1	56.9	0.01	n.n.	51.68
aG	15 – 30	7,5 YR 3/2	mittel	4.3	0.4	11	6.0	56.8	0.00	n.n.	41.05
Profil 2 Auengley											
Ah	0 - 5	7,5 YR 2,5/2	n.b.	2.5	0.2	12	6.6	69.0	0.00	n.n.	60.16
Ah / Gor	5 - 15	Gley 1 3/10Y 2,5 YR 3/6	n.b.	2.3	0.2	12	6.5	72.2	0.01	n.n.	39.28
Gor	15 – 25	Gley 1 3/10Y 2,5 YR 3/6	n.b.	1.6	0.1	12	6.4	75.7	0.00	n.n.	23.34
Profil 3 Anmoorgley											
Aa	0 - 5	sw:schwarz	n.b.	8.5	0.6	13	4.8	52.6	1.77	n.n.	39.56
jAa	5 - 15	sw:schwarz	n.b.	7.0	0,4	16	4.6	60.6	0.66	n.n.	16.19
jGho	15 – 25	sw:schwarz	n.b.	5,6	0.3	21	4.8	68.6	0.48	n.n.	17.84

n.b.: nicht bestimmt. n.n.: unter Nachweisgrenze, a: Horizontsymbole nach KA5, b: Bodenfarbe bestimmt nach Munsel Tafel oder KA5. Keine Doppelbestimmung

5.3 Gelöste anorganische Stickstoffverbindungen (DIN)

5.3.1 DIN in den kalten Klimaten

5.3.1.1 Verteilung von DIN über die Vegetationsperiode in den Böden der verschiedenen geomorphologischen Einheiten

Im Sommer 2008 wurden im Lena-Delta, Sibirien, in der Vegetationsperiode von Mitte Juli bis Ende August aus den Böden unterschiedlicher geomorphologischer Einheiten (Abschnitt 3.1) Proben entnommen und die extrahierbaren pflanzenverfügbaren gelösten anorganischen Stickstoffverbindungen (DIN) vor Ort gemessen. Die Entnahme der Proben für die Untersuchungen erfolgte im active layer der Permafrostböden. Als active layer wird der oberste Bereich des Bodens bezeichnet, der während der Sommermonate auftaut und in dem die meisten biologischen Prozess ablaufen. Die Proben aus dem Kliff unterhalb der trockenen Flussterrasse bildeten eine Ausnahme, da die Proben zwar zum Entnahmezeitpunkt aufgetaut waren, aber mit 1,5 m und 2,5 m Tiefe deutlich unterhalb des active layer lagen. Über die Verteilung der DIN wurden Hinweise auf Umsatzraten der N-Mineralisation und Stickstofflimitierung gewonnen. Die Abbildung 5.16 zeigt in den einzelnen Untersuchungsgebieten die gemessenen N-Ammonium- und N-Nitrat-Werte.

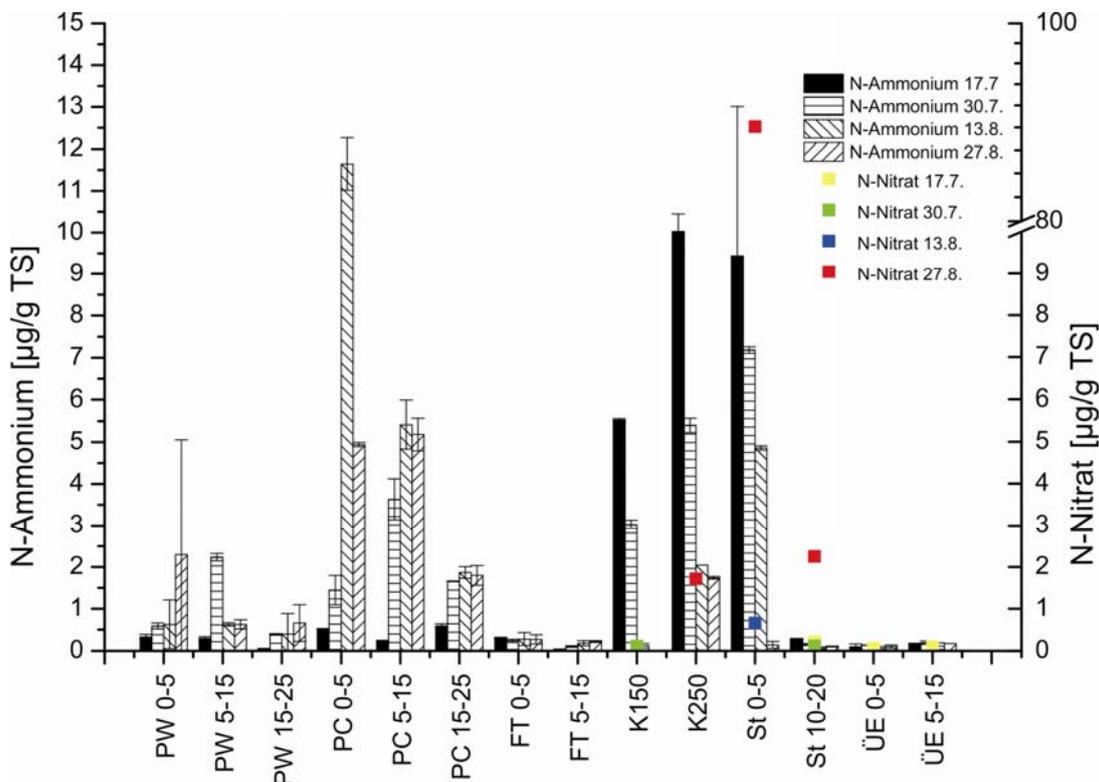


Abb. 5.16 N-Ammonium- und N-Nitratwerte der Böden der geomorphologischen Einheiten

Sie wurden in verschiedenen Bodentiefen an verschiedenen Probenahmeorten auf der Insel Samoylov im Lena-Delta in Nordostsibirien gemessen. Die Proben wurden zu vier unterschiedlichen Zeiten in der Vegetationsperiode von Mitte Juli bis Ende August 2008 entnommen. PW: Polygonwall; PC: Polygonzentrum; FT: Flussterrasse, K: Kliff; St: Strand; ÜE: Überflutungsebene. Die Zahlen geben die jeweilige Tiefe in cm an. Standardabweichung von 2 Parallelen in Doppelbestimmung.

Ammonium wurde während der gesamten Vegetationsperiode in den wassergesättigten Horizonten des Polygonzentrums mit der Zeit angereichert. In den Böden ohne Vegetationsbedeckung am Kliff und am Strand waren dagegen zu Beginn der Vegetationsperiode die Ammoniumwerte höher und nahmen mit der Zeit ab. Generell nahmen die Ammoniumkonzentrationen mit der Tiefe ab. Eine Ausnahme war das Kliff unterhalb der trockenen Flussterrasse. Hier wies die Probe in 2,5 m eine höhere Ammoniumkonzentration auf als in einer Tiefe von 1,5 m. In den sandigen Böden der trockenen Flussterrasse und der Überflutungsebene waren nur sehr geringe Konzentrationen an Ammonium nachzuweisen. N-Nitrat (farbige Punkte in Abbildung 5.15) wurde nur am Kliff und in der Überflutungsebene einschließlich Strand nachgewiesen. In den Böden ohne Vegetationsbedeckung (Kliff und Strand) kam es am Ende der Vegetationsperiode zu einer Anreicherung des Nitrates. In den oberen 5 cm des Strandbodens lag der Wert mit 150 mg/l über dem Grenzwert für Trinkwasser, der bei 50 mg/l liegt (TRINKWASSERVERORDNUNG, 2001).

In Abbildung 5.17 werden die N-Nitrit-Werte über die Vegetationsperiode dargestellt. Nitrit war nur in Spuren nachweisbar und lag unter $0,1 \mu\text{g g}^{-1}$ TS. Ende August, stiegen die Nitritkonzentrationen in der obersten Schicht des Standes auf fast $0,2 \mu\text{g g}^{-1}$ an. In dieser Probe wurden auch sehr hohe Nitratwerte gemessen.

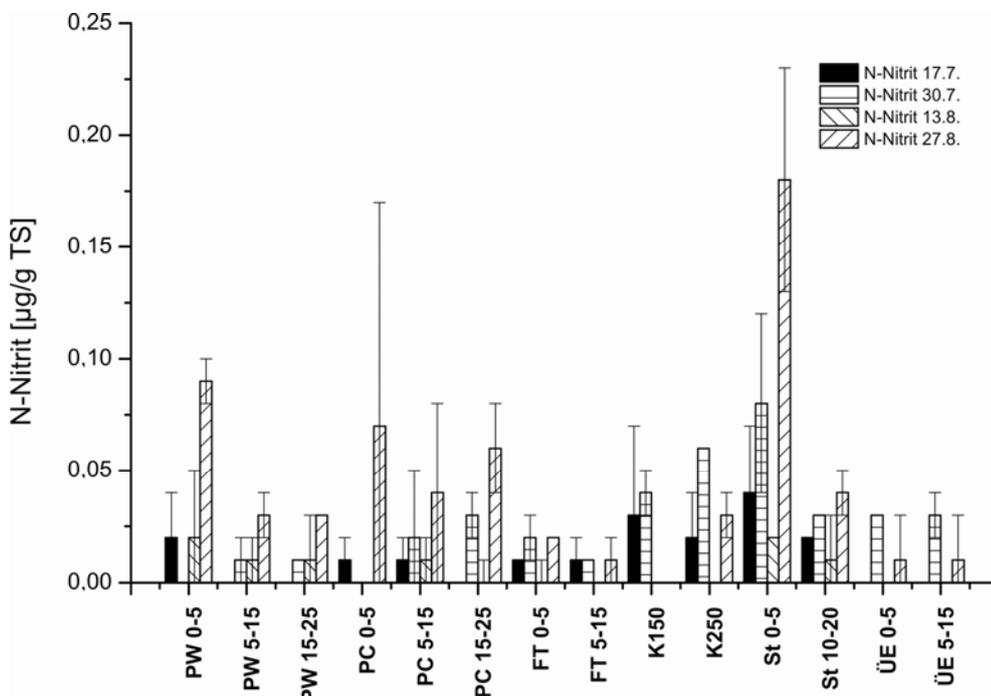


Abb 5.17 N-Nitrit-Werte der Böden der geomorphologischen Einheiten.

Sie wurden in verschiedenen Bodentiefen an verschiedenen Probenahmeorten auf der Insel Samoylov im Lena-Delta in Nordostsibirien gemessen. Die Proben wurden zu vier unterschiedlichen Zeiten in der Vegetationsperiode von Mitte Juli bis Ende August 2008 genommen. PW: Polygonwall, PC; Polygonzentrum, FT: Flussterrasse, K: Kliff, St: Strand, ÜE: Überflutungsebene. Die Zahlen geben die jeweilige Tiefe in cm wieder. Standardabweichung von 2 Parallelen in Doppelbestimmung.

Die Abbildung 5.18 zeigt die extrahierbaren gelösten anorganischen Stickstoffverbindungen (DIN), also die Summe aus N-Ammonium, N-Nitrit und N-Nitrat, über die Vegetationsperiode in den Untersuchungsgebieten. In den sandigen Böden der Flussterrasse (FT) und der Überflutungsebene (ÜE) wurden sehr geringe Konzentrationen an DIN gemessen, sie lagen kaum über $0,5 \mu\text{g g}^{-1}$ TS. Im organikreichen Kliff und am Strand lagen die DIN deutlich höher und nahmen aber im Kliff über die Vegetationsperiode ab. In der obersten Schicht des Strandes nahm die DIN Konzentration erst von $10 \mu\text{g g}^{-1}$ TS ab, um sich am Ende der Vegetationsperiode als N-Nitrat stark anzureichern. In der polygonalen Tundra unterscheiden sich der Polygonwall und das Polygonzentrum voneinander. Im Polygonwall nahmen die DIN über die Zeit zu bis maximal $2,5 \mu\text{g g}^{-1}$ TS in einer Tiefe von 0 - 5 cm. Im Polygonzentrum erreichten die DIN eine Konzentration bis zu $12,5 \mu\text{g g}^{-1}$ TS. Die Konzentrationen nahmen mit der Tiefe jeweils ab, was auf die abnehmende Sauerstoffversorgung zurückzuführen ist. Die verfügbaren Stickstoffverbindungen sind also abhängig vom Gehalt an organischer Substanz und vom Wassergehalt und damit einhergehend von der Sauerstoffverfügbarkeit. Zusätzlich hat die Vegetationsbedeckung einen Einfluss auf die Verfügbarkeit an DIN Verbindungen.

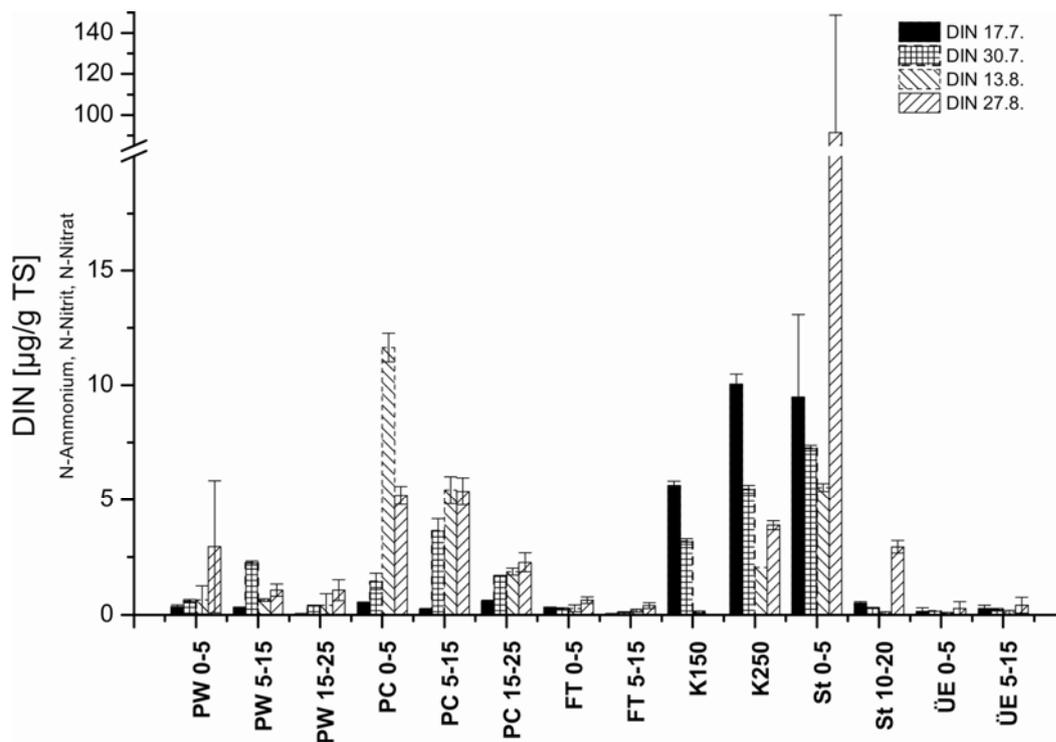


Abb. 5.18 DIN der Böden der geomorphologischen Einheiten.

Sie wurden in verschiedenen Bodentiefen an verschiedenen Probenahmeorten auf der Insel Samoylov im Lena-Delta in Nordostsibirien gemessen. Die Proben wurden zu vier unterschiedlichen Zeiten in der Vegetationsperiode von Mitte Juli bis Ende August 2008 genommen. PW: Polygonwall, PC; Polygonzentrum, FT: Flussterrasse, K: Kliff, St: Strand, ÜE: Überflutungsebene. Die Zahlen geben die jeweilige Tiefe in cm wieder. Standardabweichung von 2 Parallelen in Doppelbestimmung.

5.3.1.2 DIN Gehalte am Samoylov-Kliff

Zusätzlich zu den Messungen von DIN im active layer wurde die Tiefenverteilung von DIN am Kliff im Südosten Samoylovs gemessen (Abb. 3.5 Standort 7). Die Messung erfolgte an gefroren nach Hamburg transportierten Proben. Das Kliff wurde stufenweise bis zu einer Tiefe von fast 5 m beprobt. In Tabelle 5.8 sind die DIN Werte des Samoylov-Kliffs angegeben. Hauptsächlich lag der gelöste anorganische Stickstoff als Ammonium vor. Nitrit lag in allen Proben unterhalb der Nachweisgrenzen, Nitrat wurde nur in drei Proben nachgewiesen. Die verfügbaren DIN lagen in keinem Horizont über $20 \mu\text{g N g}^{-1}$ TS. Die Ammoniumkonzentrationen zeigen keinen deutlichen Trend und sind je nach Tiefe sehr unterschiedlich. In der obersten Probe in einer Tiefe von 60 bis 70 cm wurde mit $2,5 \mu\text{g N g}^{-1}$ TS als einzige Probe mehr Nitrat als Ammonium nachgewiesen. Nitrat wurde zusätzlich in den Tiefen von 2,4 m und 2,9 m detektiert. Die höchste DIN-Konzentration wurde in einer Tiefe von 2,35 bis 2,45 m mit $17,4 \mu\text{g g}^{-1}$ TS bestimmt.

Tabelle 5.8 Gelöste anorganische Stickstoffverbindungen des Samoylov-Kliffs.

Tiefe [m]	N-Ammonium	N-Nitrit	N-Nitrat	Gelöste anorganische Stickstoffverbindungen (DIN)
			[$\mu\text{g N g}^{-1}$ TS]	
0,6 - 0,7	1,42	n.n.	2,50	3,92
1 - 1,1	0,12	n.n.	n.n.	0,12
1,8 - 1,9	3,27	n.n.	n.n.	3,27
2,1 - 2,2	0,61	n.n.	n.n.	0,61
2,35 - 2,45	15,96	n.n.	1,43	17,39
2,9 - 3	8,09	n.n.	1,20	9,29
3,35 - 3,45	1,77	n.n.	n.n.	1,77
3,9 - 4	5,54	n.n.	n.n.	5,54
4,7 - 4,8	3,93	n.n.	n.n.	3,93

Angegeben sind die DIN-Gehalte aus Bodenextrakten, entnommen aus unterschiedlichen Tiefen vom Kliff an der südöstlichen Küste von Samoylov. Die Proben wurden gefroren transportiert.
n.n.: unter der Nachweisgrenze

5.3.2 DIN-Gehalte in den Böden der gemäßigten Klimaten

Zum Vergleich wurden auch in den Böden der gemäßigten Klimate die DIN-Verbindungen bestimmt. Als Vergleichsstandort wurden Böden in der Hahnheide gewählt (Abschnitt 3.2 und 5.2), dort wurden ähnliche Böden im Übergang von Auenböden zu Moorböden untersucht. In Tabelle 5.9 sind die extrahierbaren gelösten anorganischen Stickstoffverbindungen angegeben. Ammonium war in nur sehr geringen Konzentrationen nachweisbar oder lag unter der Nachweisgrenze. Die höchste Ammonium-Konzentration wurde mit $1,77 \mu\text{g N g}^{-1} \text{TS}$ in der obersten Schicht des Anmoorgleys nachgewiesen. Die Ammonium-Konzentration nahm mit der Tiefe ab. Nitrit wurde in keiner Probe detektiert. In allen Böden dominierte das Nitrat und nahm mit der Tiefe ab. Im Humusgley nahm die Konzentration von über $51 \mu\text{g N g}^{-1} \text{TS}$ auf $41 \mu\text{g}$ ab. Im Auengley war die Abnahme deutlicher, die Konzentration des Nitrates lag in der obersten Schicht bei über $60 \mu\text{g N g}^{-1} \text{TS}$ und nahm auf $23 \mu\text{g}$ ab. Im Anmoorgley nahm die Nitratkonzentration von fast $40 \mu\text{g N g}^{-1} \text{TS}$ auf $18 \mu\text{g}$ ab. Die gelösten anorganischen Stickstoffverbindungen entsprachen fast vollständig den Nitratkonzentrationen. Die DIN-Gehalte in den gemäßigten Klimaten sind deutlich höher als in den kalten Klimaten und liegen hauptsächlich als Nitrat vor.

Tabelle 5.9 Gelöste anorganische Stickstoffverbindungen der Böden der gemäßigten Klimate.

Tiefe [cm]	N-Ammonium [$\mu\text{g N g}^{-1} \text{TS}$]	N-Nitrit [$\mu\text{g N g}^{-1} \text{TS}$]	N-Nitrat [$\mu\text{g N g}^{-1} \text{TS}$]	(DIN) [$\mu\text{g N g}^{-1} \text{TS}$]
Profil 1 Humusgley				
0-5	0,09	n.n.	51,64	51,73
5-15	0,01	n.n.	51,68	51,69
15-25	n.n.	n.n.	41,05	41,05
Profil 2 Auengley				
0-5	n.n.	n.n.	60,16	60,16
5-15	0,01	n.n.	39,28	39,29
15-25	n.n.	n.n.	23,34	23,34
Profil 3 Anmoorgley				
0-5	1,77	n.n.	39,56	41,33
5-15	0,66	n.n.	16,19	16,85
15-25	0,48	n.n.	17,84	18,32

n.n.: unter der Nachweisgrenze. 2 Probenahmen im März/April 2009

5.4. Mineralisation

5.4.1 Bestimmung der Mineralisationsraten

In der Tabelle 5.10 sind die Mineralisationsraten aus den Jahren 2007 und 2008 aus dem kalten Klimat aus unterschiedlichen Monaten und mit verschiedenen Methoden zusammengefasst.

Grundsätzlich konnten sowohl positive als auch negative Mineralisationsraten gemessen werden. Positiver Raten bedeuten, dass über die Zeit mehr DIN gebildet wird, welches in Form von N-Ammonium oder N-Nitrat angereichert werden kann. Negative Raten bedeuten, dass über die Zeit das vorhandene oder gebildete DIN abnahm: dabei nahm meist das zu Beginn vorhandene N-Ammonium über die Zeit ab.

Die Mineralisationsraten aus 2007 lagen maximal bei $0,24 \mu\text{g DIN g}^{-1} \text{ TS d}^{-1}$ im *Typic Aquiturbel* des Polygonwalls in 5 bis 15 cm Tiefe. Die Raten der Proben, die im Juli genommen worden sind, lagen mit Ausnahme des Polygonwalls in der untersten Schicht im positiven Bereich. Auch in den *in-situ* Wasser gesättigten Horizonten des *Typic Historthel* des Polygonzentrums konnte eine positive Mineralisationsrate nachgewiesen werden, die aber mit der Tiefe geringer wurde und von $0,17 \mu\text{g g}^{-1} \text{ TS d}^{-1}$ auf $0,01 \mu\text{g g}^{-1} \text{ TS d}^{-1}$ abnahm. Die Mineralisationsrate der Proben im Polygonzentrum aus dem August zeigten fast nur negative Raten: nur im Polygonwall konnten in den Tiefen 5 - 15 und 15 – 25 cm positive Raten ermittelt werden. Diese Unterschiede vom Juli zum August können darauf hindeuten, dass die anfangs gebildete bzw. vorhandene DIN von Bodenmikroorganismen aufgenommen und in die Biomasse eingebaut wurden.

Die Mineralisationsraten aus 2008 sahen etwas anders aus. Im Polygonwall konnten weder im Juli noch im August positive Mineralisationsraten bestimmt werden. Die Raten im August waren allesamt negativ. Im Polygonzentrum nahmen die Raten im Juli mit der Tiefe zu und im August mit der Tiefe ab.

Der Mikrokosmosansatz zeigte ein etwas anderes Bild. Im Polygonwall waren die Mineralisationsraten negativ und die Werte der Raten wurden mit der Tiefe geringer. Im Zentrum hingegen waren die Raten positiv und in der obersten Schicht sehr hoch mit $10,97 \mu\text{g DIN g}^{-1} \text{ TS d}^{-1}$ und nahmen mit der Tiefe ab.

Tabelle 5.10 Mineralisationsraten der Böden aus 2007 und 2008

Probe- nahmeort	Tiefe [cm]	Brutversuch	Brutversuch	Brutversuch	Brutversuch	Mikrokosmos
		Juli 2007 In Hamburg	August 2007 In Hamburg	Juli 2008 vor Ort	August 2008 gefroren	August 2008 gefroren
Mineralisationsraten [$\mu\text{g DIN/ g TS/d}$]						
Polygonwall <i>Typic Aquiturbel</i>	0-5	0,01	-0,07	-0,77	-0,04	-0,24
	5-15	0,24	0,10	0,00	-0,03	-0,07
	15-25	-0,01	0,01	0,00	-0,01	0,01
	25-35	n.b.	-0,04	n.b.	n.b.	n.b.
Polygon- zentrum <i>Typic Hisorthel</i>	0-5	0,17	-0,00	-0,27	0,11	10,97
	5-15	0,06	-0,04	0,00	0,01	0,23
	15-25	0,01	-0,01	0,11	-0,18	0,04
	25-35	n.b.	-0,01	n.b.	n.b.	n.b.
Flussterrasse <i>Typic Psammorthel</i>	0-5	n.b.	n.b.	0,27	0,09	-0,04
	5-15	n.b.	n.b.	-0,24	0,06	-0,01
	15-25	n.b.	n.b.	n.b.	0,04	0,01
Kliff	150	n.b.	n.b.	0,86	-0,08	-0,03
	250	n.b.	n.b.	-0,16	-0,05	0,32
Strand <i>Psammentiv Aquorthel</i>	0-5	n.b.	n.b.	3,65	0,22	0,42
	10-20	n.b.	n.b.	0,27	0,00	n.b.
Überflutungs- ebene <i>Typic Psammorthel</i>	0-5	n.b.	n.b.	0,82	0,21	0,31
	5-15	n.b.	n.b.	0,27	n.b.	0,01
	15-25	n.b.	n.b.	n.b.	0,01	0,02

n.b. nicht bestimmt

In den Böden des Strandes, der Überflutungsebene und der trockenen Flussterrasse, die als *Typic Psammorthel* oder *Psammentiv Aquorthel* klassifiziert worden sind, sind im Juli hauptsächlich positive Raten gemessen worden. Die Raten der Böden aus dem August waren geringer. Die höchste Mineralisationsrate fand sich in der obersten Schicht des Strandes mit $3,65 \mu\text{g DIN g}^{-1} \text{ TS d}^{-1}$. Im Mikrokosmosansatz wurden die höchsten Raten in den organikreichen Schichten des Kliff ($2,9 \% C_{\text{org}}$) und Strandes ($2,5 \% C_{\text{org}}$) gemessen. Nur die Böden des Strandes und der Überflutungsebene wiesen in allen Fällen eine positive Mineralisationsrate auf. Hier wird also mehr organische Substanz in mineralische Stickstoffverbindungen umgewandelt als von den Mikroorganismen aufgenommen werden.

Die Mikroorganismen stehen am Strand auch *in situ* nicht in Konkurrenz mit Pflanzen, da es keine Vegetationsbedeckung gibt.

Mineralisationsraten des Samoylov-Kliffs

Die Mineralisationsraten der Bodenproben aus dem Samoylov-Kliff wurden mit den gefrorenen Proben bestimmt. In Tabelle 5.11 sind die Raten dargestellt. Alle bestimmten Raten sind positiv, d.h. es bildet sich geringe Mengen DIN über die Zeit.

Tabelle 5.11 Mineralisationsraten des Samoylov-Kliffs.

Probennummer	Tiefe [cm]	Mineralisationsraten [$\mu\text{g DIN g}^{-1} \text{TS d}^{-1}$]
CT 946	60-70	n.b.
CT 948	100-110	0.10
CT 950	180-190	0.06
CT 952	210-220	0.11
CT 954	235 – 245	0.07
CT 956	290 – 300	0.08
CT 958	335 – 345	n.b.
CT 960	390 – 400	0.15
CT 962	470 – 480	0.12

n.b. nicht bestimmt

Die Raten sind aber relativ gering. Die höchste Rate wurde in einer Tiefe von 4 m nachgewiesen, mit $0,15 \mu\text{g DIN g}^{-1} \text{TS d}^{-1}$. Auch in der Permafrostprobe aus 4,7 m wurde eine potentielle Mineralisationsrate von $0,12 \mu\text{g g}^{-1} \text{TS d}^{-1}$ gemessen.

5.4.2 Mineralisation im Mikrokosmos Ansatz

Exemplarisch sind im Folgenden die Verläufe der gelösten organischen und anorganischen Stickstoffverbindungen der Oberböden aus der polygonalen Tundra, der Flussterrasse und der Überflutungsebene, graphisch dargestellt. In den Böden der polygonalen Tundra waren die gelösten Stickstoffverbindungen viel höher als in den *Typic Psammorthels* der Flussterrasse und in der Überflutungsebene.

Im *Typic Aquiturbel* des Polygonwalls war die Mineralisationsrate negativ, dafür nehmen aber die gelösten organischen Stickstoffverbindungen (DON) über die Zeit zu (Siehe Abb. 5.19). Nach 42 Tagen war die Konzentration an DON auf mehr als $250 \mu\text{g pro g TS}$ angestiegen. Im *Typic Historthel* des Polygonzentrums ist die Mineralisationsrate mit $10,97 \mu\text{g g}^{-1} \text{TS d}^{-1}$ extrem hoch. Die Konzentrationen gelöster organischer

Stickstoffverbindungen waren im Inkubationszeitraum relativ hoch und zeigten aber keinen klaren Trend

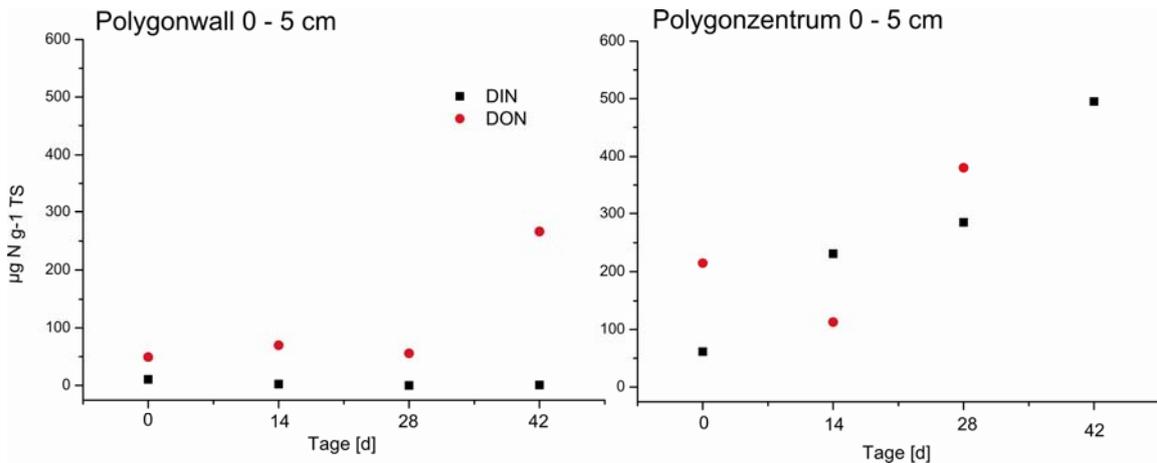


Abb. 5.19 DIN und DON Konzentrationen des Polygons

Dargestellt sind die DIN und DON des Polygonwalls und Polygonzentrums in jeweils 0 – 5 cm. Daten wurden im Mikrokosmos über die Zeit von 6 Wochen in der oberen Schichten des Polygon gewonnen.

In der Abbildung 5.20 sind die gelösten Stickstoffverbindungen der beiden *Typic Psammorthel* der trockenen Flussterrasse und der Überflutungsebene dargestellt. Trotz der relativ ähnlichen Eigenschaften, gab es doch Unterschiede zwischen den beiden Horizonten. Im Boden der Flussterrasse war die Mineralisationsrate im Mikrokosmosansatz negativ, dafür waren aber organischer Stickstoff über die Zeit nachweisbar, aber mit höchstens knapp über 15 µg g⁻¹ TS relativ gering. Der Oberboden aus der Überflutungsebene zeigte im Mikrokosmosansatz eine positive Mineralisationsrate, DON konnte nur zu Beginn der Inkubation mit einer Konzentration von knapp 69 µg g⁻¹ TS detektiert werden.

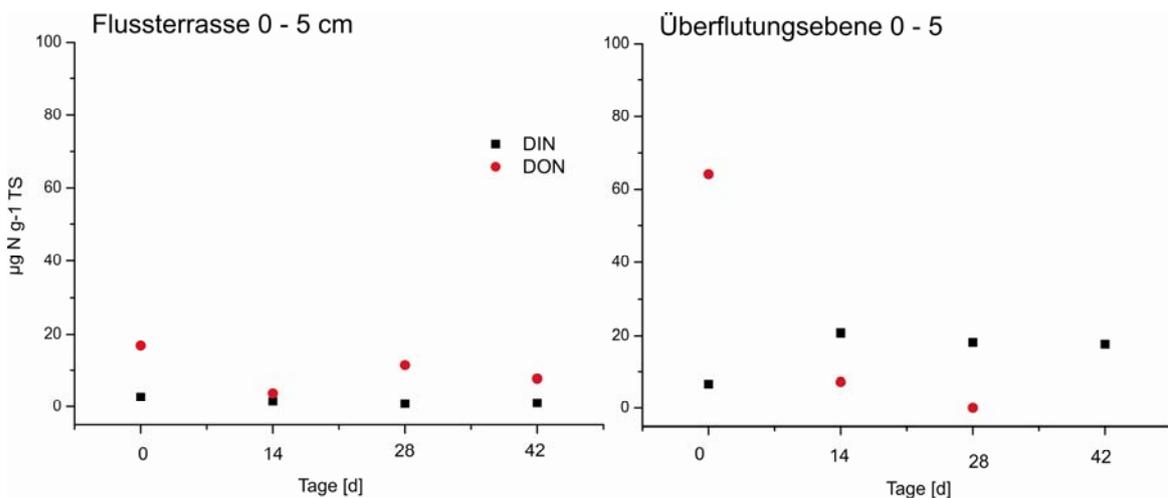


Abb. 5.20 DIN und DON Konzentrationen der Flussterrasse und der Überflutungsebene

Die Daten wurden im Mikrokosmos über die Zeit von 6 Wochen in der oberen Schichten der Flussterrasse und der Überflutungsebene ermittelt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass beide Methoden zur Bestimmung der Mineralisationsraten aus den verschiedenen Bodentypen der Insel Samoylov zu keinem eindeutigen Ergebnis kommen. Es besteht offensichtlich ein Zusammenhang zwischen Sauerstoffversorgung und Mineralisation der organischen Substanz, in den obersten Schichten waren die Raten höher. Ein Zusammenhang zwischen Raten und Bodentyp, Gehalt an organischer Substanz konnte nicht ermittelt werden.

5.5 Potentielle Nitrifikation

5.5.1 Gesamte potentielle Nitrifikation in den Böden der kalten Klimaten

Polygonale Tundra

Die potentielle Nitrifikation in den kalten Klimaten wurde modifiziert nach ISO DIN Norm bestimmt (Abschnitt 4.3.1). Vor Ort wurden die Proben *in situ* inkubiert, d.h. die Inkubation erfolgte in einer in den Boden eingelassenen Kiste, in der etwa Bodentemperatur herrschte. Im Labor in Hamburg erfolgte die Inkubation bei 6 °C, 18 °C und 28 °C. Die Proben wurden ungefroren nach Hamburg transportiert und dort vor Verarbeitung kühl gelagert. Insgesamt wurden die Proben mindestens für 6 Wochen inkubiert. In Abbildung 5.21 sind die potentiellen Nitrifikationsaktivitäten der Böden der polygonalen Tundra dargestellt.

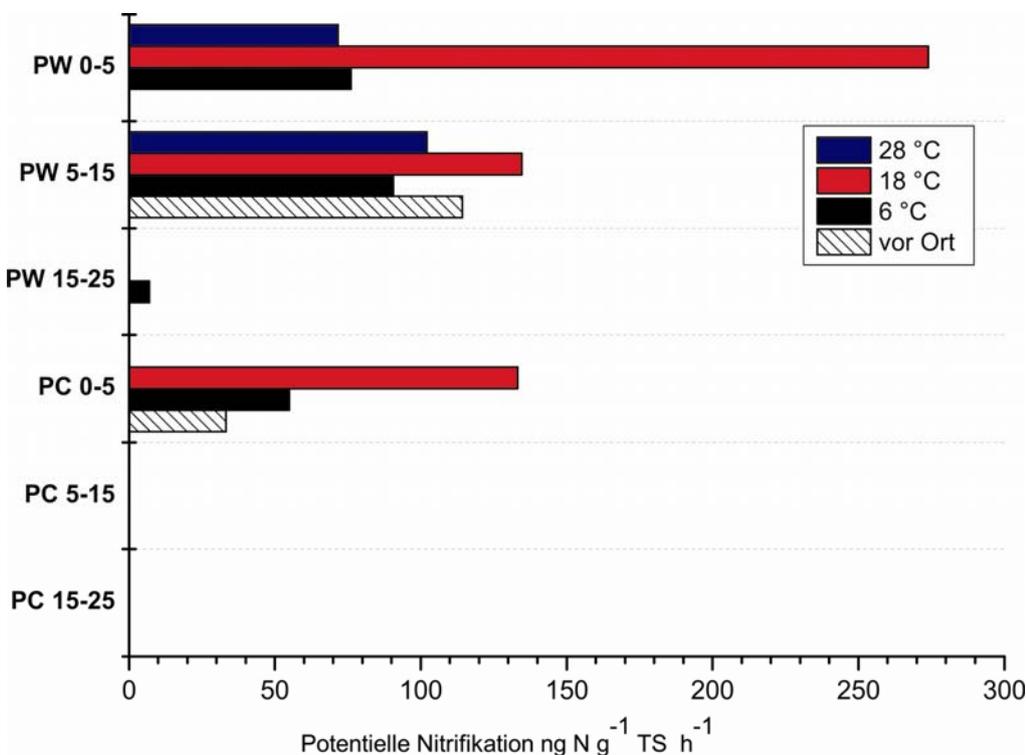


Abb. 5.21 Potentielle Ammoniakoxidation in Bodenproben der polygonalen Tundra.

PW: Polygonwall, PC: Polygonzentrum. Tiefe je 0 – 5, 5 – 15 und 15 – 25 cm. Probenahme Juli und August 2008. Die Aktivitätsmessung erfolgte über einen Zeitraum von 6 Wochen bei *in situ* Temperaturen vor Ort bzw. bei 6 °C, 18 °C und 28 °C. Inkubation in Hamburg nach ungefrorenem Transport.

Angegeben sind die bestimmten Raten vor Ort (Schwarz-Weiß), für eine Inkubationstemperatur von 28 °C (Blau), 18°C (Rot) und 6°C (Schwarz). Vor Ort wurden nur im Polygonwall in einer Tiefe von 5 - 15 cm und in der oberen organischen Auflage des Polygonzentrums potentielle Nitrifikationsraten nachgewiesen. Im Polygonwall lagen sie bei ca. 115 ng N g⁻¹ TS h⁻¹. Bereits bei Versuchen 2007 wurden potentielle Nitrifikationsraten nur in diesen Proben nachgewiesen (SANDERS et al. 2008). In den Laborversuchen nach einem mehrmonatigen angefrorenen Transport wurden potentielle Nitrifikationsraten auch in der organischen Auflage des Polygonwalls bestimmt. In allen Proben wurde die höchste potentielle Nitrifikation bei 18 °C gemessen. In der organischen Auflage des Polygonwalls liegt die Rate bei über 250 ng N g⁻¹ TS h⁻¹. Auffällig war hier, dass die Nitrifikationskapazität bei 6 °C und 28 °C bei ca. 70 ng N g⁻¹ TS h⁻¹ lag, sie war also bei 18 °C fast vier Mal so hoch. In einer Tiefe von 15 - 25 cm kann nur eine sehr geringe potentielle Nitrifikation bei 6 °C nachgewiesen werden. Bei den höheren Temperaturen konnte keine Ammoniakoxidation innerhalb von 6 Wochen gemessen werden.

Im Polygonzentrum wurde nur in der obersten Schicht von 0 – 5 cm potentielle Nitrifikation nachgewiesen. Bei einer Inkubationstemperatur von 18 °C sind die Raten so hoch wie im Polygonwall in 5 – 15 cm Tiefe. Die Raten bei 6 °C und vor Ort sind deutlich geringer und bei 18 °C Inkubationstemperatur wurde kein Ammoniak oxidiert.

Trockene Flussterrasse

In Abbildung 5.22 sind die potentiellen Nitrifikationsraten der Böden in der trockenen Flussterrasse angegeben. In allen Tiefen konnte potentielle Nitrifikation gemessen werden. Vor Ort wurde in der Tiefe von 15 - 25 cm keine potentielle Nitrifikation nachgewiesen. Die Raten waren am Kliff deutlich höher als in den Böden der Flussterrasse. Am Kliff wurde in 2,5 m Tiefe eine potentielle Nitrifikationsaktivität von fast 600 ng N g⁻¹ TS h⁻¹ vor Ort bestimmt, d.h. sie ist mehr als vier Mal höher die die Raten, die nach dem Transport bestimmt wurden. Im Boden der Flussterrasse nahmen die Aktivitäten mit steigender Inkubationstemperatur zu und mit der Tiefe ab. Im Kliff waren die Aktivitäten dagegen bei 18 °C höher als bei 28 °C. Bei 6 °C wurde keine potentielle Nitrifikation festgestellt. Die potentielle Ammoniakoxidation in der Flussterrasse entsprach in etwa denen im Polygonwall.

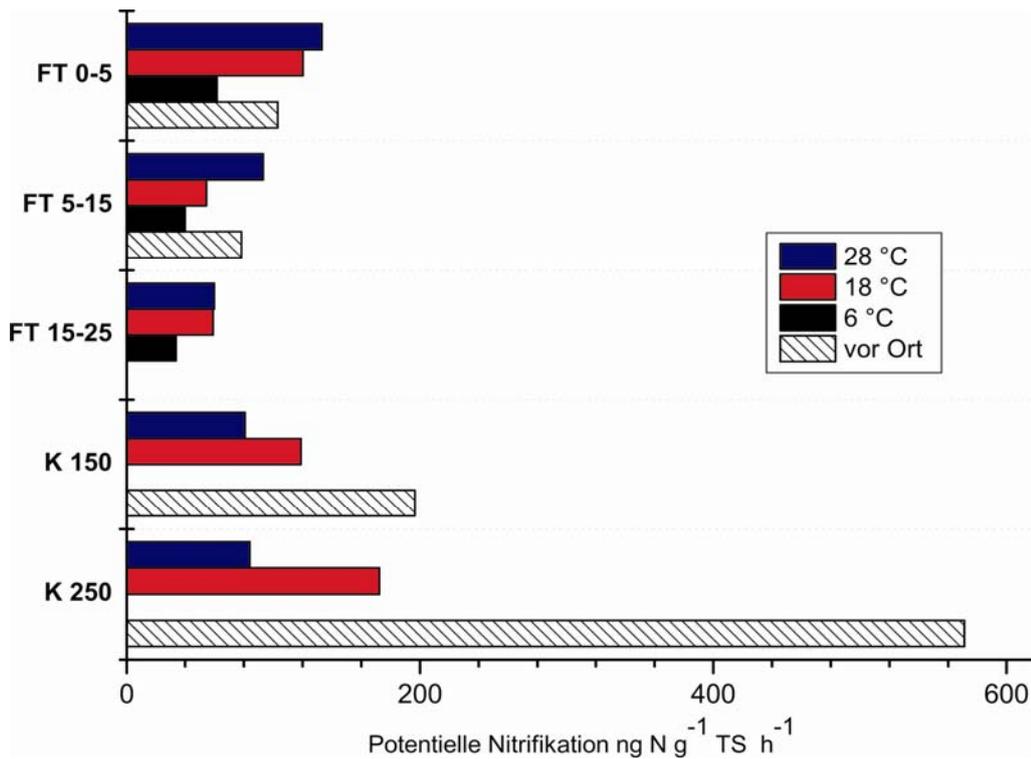


Abb. 5.22 Potentielle Ammoniakoxidation in Bodenproben der trockenen Flussterrasse.

FT: Flussterrasse, K: Kliff. Die Zahlen geben die Tiefe unter der Geländeoberfläche in cm an. Probenahme Juli und August 2008. Die Aktivitätsmessung erfolgte über einen Zeitraum von 6 Wochen bei *in-situ* Temperaturen vor Ort bzw. bei 6 °C, 18 °C und 28 °C. Inkubation in Hamburg nach ungefrorenem Transport.

Überflutungsebene

In Abbildung 5.23 sind die potentiellen Nitrifikationsaktivitäten der jüngeren Überflutungsebene angegeben. Auch hier wurde in allen Proben potentielle Nitrifikation nachgewiesen. Die höchste potentielle Nitrifikation wurde in der organikreichen Schicht des Strandes in einer Tiefe von 0 - 5 cm nachgewiesen. Diese Aktivität war die höchste vor Ort gemessene Aktivität aller untersuchten Proben und lag mit fast 600 ng N g⁻¹ TS h⁻¹ deutlich über den anderen Ammoniakoxidationsaktivitäten. Bei den transportierten Strandproben lagen die Aktivitäten bei 28 °C deutlich höher als bei 18 °C. Dagegen ist es auf der Überflutungsebene anderes herum: dort lag die Aktivität bei 18°C über der Aktivität bei 28 °C. Die potentiellen Aktivitäten bei 6 °C waren viel geringer und lagen bei unter 100 ng N g⁻¹ TS h⁻¹. Vor Ort konnten keine Raten in der Überflutungsebene in eine Tiefe von 15 – 25 cm nachgewiesen werden.

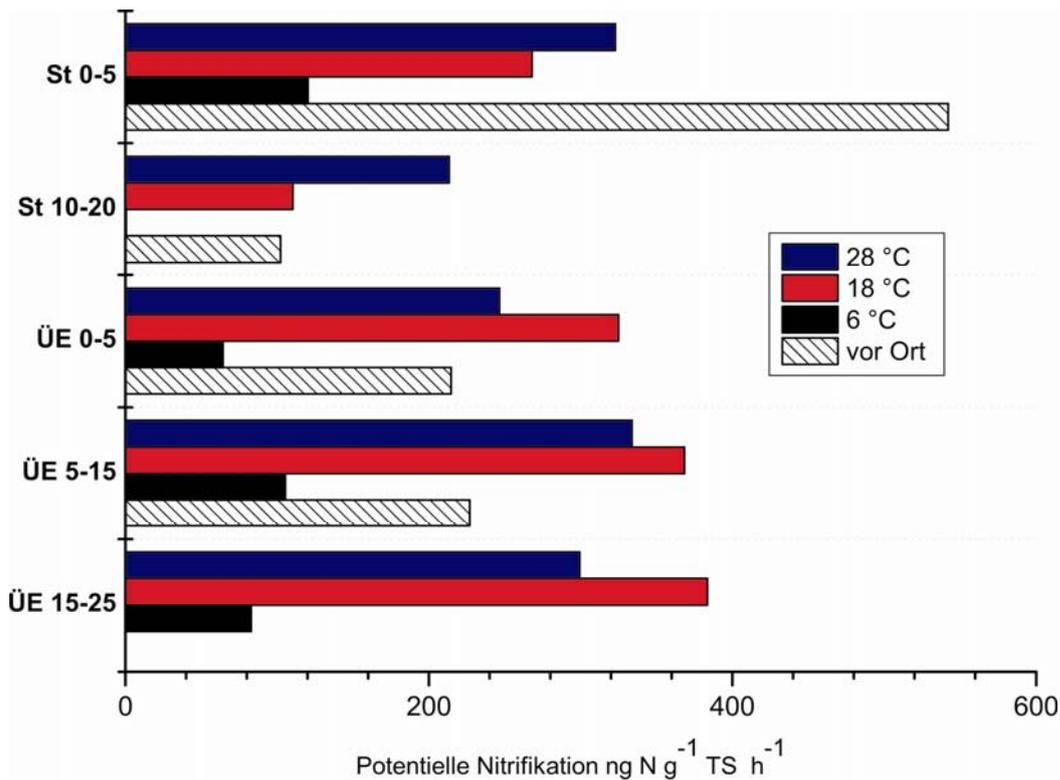


Abb. 5.23 Potentielle Ammoniakoxidation in Bodenproben der Überflutungsebene.

St: Strand, ÜE: Überflutungsebene Die Zahlen geben die Tiefe unter der Geländeoberfläche in cm an. Probenahme Juli und August 2008. Die Aktivitätsmessung erfolgte über einen Zeitraum von 6 Wochen bei *in-situ* Temperaturen vor Ort bzw. bei 6 °C, 18 °C und 28 °C. Inkubation in Hamburg nach ungefrorenem Transport.

Potentielle Nitrifikationsaktivitäten am Samolyov Kliff

Die potentiellen Nitrifikationsaktivitäten des Samolyovkliffs wurden nur nach dem Transport der Bodenproben und nicht vor Ort bestimmt. Abbildung 5.23 zeigt die potentiellen Aktivitäten bei 6 °C, 18 °C und 28 °C. In einer Tiefe bis 2,2 m wurde keine bzw. nur geringe potentielle Nitrifikation nachgewiesen. Ab einer Tiefe von 2,35 m wurden dagegen im Vergleich zu den übrigen Standorten auf Samoylov hohe Gesamtaktivitäten nachgewiesen. Höhere Aktivitäten wurden bei den Inkubationstemperaturen von 18 °C und 28 °C gemessen. Dagegen war bei einer Inkubationstemperatur von 6 °C nur in drei Proben potentielle Nitrifikation nachweisbar in 1,8 m, 2,4 m und 2,9 m Tiefe. Die Aktivitäten bei 6 °C waren aber nie höher als 50 ng N g⁻¹ TS h⁻¹. Die höchste potentielle Nitrifikation von fast 800 ng N g⁻¹ TS h⁻¹ wurde in einer Tiefe von 3,35 bis 3,45 m bei einer Temperatur von 28 °C nachgewiesen. Die Unterschiede der Raten bei 18 und 28 °C waren in den Tiefen von 3 m, 4 m und 4,8 m nicht so deutlich wie in 3,4 m. In einer Tiefe von 4 m war die potentielle Nitrifikation bei 18 und 28 °C fast gleich groß.

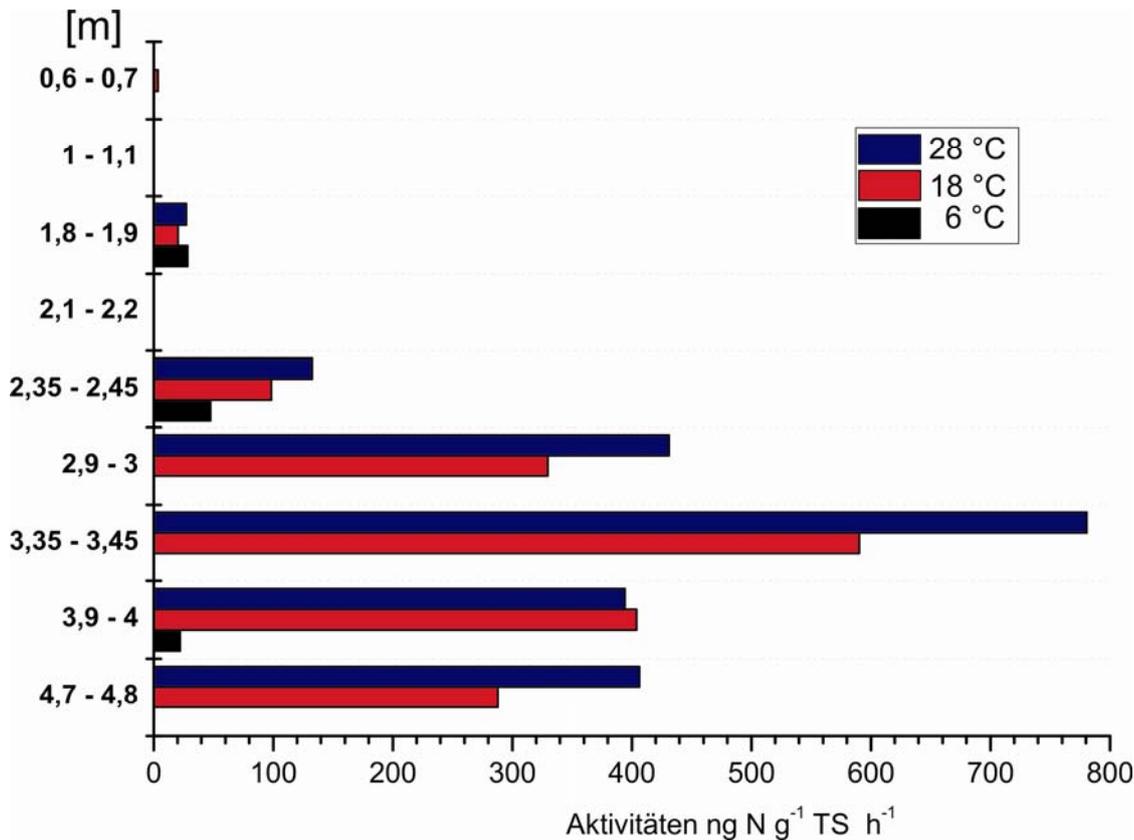


Abb. 5.24 Potentielle Ammoniakoxidation in Bodenproben des Samoylov-Kliffs.

Die Zahlen geben die Tiefe unter der Geländeoberfläche in cm an. Probenahme August 2008. Die Aktivitätsmessung erfolgte über einen Zeitraum von 6 Wochen bei 6 °C, 18 °C und 28 °C. Inkubation in Hamburg nach ungefrorenem Transport.

In der Abbildung 5.11 (s. Kap. 5.1.3) sind die pH-Werte aller Kliffproben und die Korngrößenverteilung der Proben angegeben, die einen Anteil von C_{org} von weniger als 5 % aufgewiesen haben. In Tabelle 5.6 sind die dazugehörigen Daten angegeben. Die Aktivitäten bei 18 °C korrelieren signifikant mit dem Tongehalt ($p < 0,05$, $R:0,757$) und dem pH-Wert ($p < 0,01$, $R:0,888$). Die Korrelation bei 28 °C ist noch deutlicher, mit dem Tongehalt ($p < 0,01$, $R:0,980$) und dem pH-Wert ($p < 0,01$, $R:0,860$). Das heißt, dass die Aktivitäten bei 18 °C und 28 °C mit zunehmendem Tongehalt größer werden und sich ein neutraler pH-Wert positiv auf die Aktivität auswirkt. Zwischen den Aktivitäten bei 6 °C und dem Tongehalt und dem pH-Wert besteht keine signifikante Korrelation. Die Aktivitäten korrelieren aber mit dem Gehalt an C_{org} ($p < 0,05$, $R:0,697$) und N ($p < 0,05$, $R:0,794$).

5.5.2 Archaeale potentielle Nitrifikation in den Böden der kalten Klimate

Der Nachweis von Ammoniakoxidationsaktivität von Archaeen (AOA) ist bis jetzt nicht standardisiert. In dieser Arbeit wurde die potentielle AOA Aktivität durch die Zugabe von Streptomycin als Antibiotikum zur Hemmung von Bakterien bestimmt. Es wurde davon ausgegangen, dass die gemessene Aktivität in Anwesenheit des Antibiotikums den AOA zugerechnet werden kann. Vor Ort wurden in Proben der trockenen Flussterrasse, des Strandes und der Überflutungsebene potentielle AOA Aktivitäten nachgewiesen. Die

Aktivitäten waren jedoch im Vergleich zu den Gesamtaktivitäten sehr gering und lagen in der Flussterrasse bei $3,27 \text{ ng N g}^{-1} \text{ TS h}^{-1}$ und in der Überflutungsebene bei $1,68 \text{ ng N g}^{-1} \text{ TS h}^{-1}$. In der Strandprobe war die Aktivität ähnlich hoch wie in anderen aktiven Proben ohne Zugabe von Streptomycin (Abschnitt 5.5.1). Die AOA Aktivität entsprach ungefähr einem Drittel der gesamten potentiellen Nitrifikation. Die Probe des Strandes in der obersten Schicht ohne Zugabe von Streptomycin wies eine Aktivität von fast $550 \text{ ng N g}^{-1} \text{ TS h}^{-1}$ auf. Unter Zugabe von Streptomycin lag die potentielle Nitrifikation bei fast $200 \text{ ng N g}^{-1} \text{ TS h}^{-1}$.

Bei den Messungen nach dem Transport nach Hamburg bei einer Inkubationstemperatur von $6 \text{ }^\circ\text{C}$, konnten die Ergebnisse von vor Ort reproduziert werden, zusätzlich konnte im Polygonwall potentielle AOA Aktivität nachgewiesen werden. Am Samoylov-Kliff wurde potentielle AOA Aktivität in einer Tiefe von $2,9 - 3 \text{ m}$, $3,35 - 3,45 \text{ m}$ und in $4,7 - 4,8 \text{ m}$ nachgewiesen, die potentielle AOA Aktivität war aber deutlich geringer als die Gesamtaktivität. Es wurde keine AOA Aktivitätsmessung bei $18 \text{ }^\circ\text{C}$ und $28 \text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt.

5.5.3 Temperaturabhängige potentielle Ammoniakoxidation

Zusätzlich zu den drei gewählten Inkubationstemperaturen ($6 \text{ }^\circ\text{C}$, $18 \text{ }^\circ\text{C}$, $28 \text{ }^\circ\text{C}$) bei der Messung der Ammoniakoxidationsaktivität aller Bodenproben (Abschnitt 5.5.1) wurden einzelne Proben zur Messung der Aktivitäten in Abhängigkeit eines Temperaturspektrums von $0 \text{ }^\circ\text{C}$ bis $40 \text{ }^\circ\text{C}$ untersucht. Dabei wurden die Probe aus dem Polygonwall in einer Tiefe von $5 - 15 \text{ cm}$ und die Probe aus der obersten Schicht des Strandes verwendet.

Temperaturanpassung: Polygonwall 5 -15 cm

In Abbildung 5.25 ist beispielhaft das Temperaturspektrum der potentiellen Ammoniakoxidation einer Probe aus dem Polygonwall aus einer Tiefe von $5 - 15 \text{ cm}$ dargestellt. Es wurde ein Temperaturgradient zwischen $8 \text{ }^\circ\text{C}$ und $36 \text{ }^\circ\text{C}$ angelegt. Es sind zwei Graphen aufgetragen: die schwarze Kurve zeigt das Spektrum der Probe, die ungefroren transportiert wurden und die rote Kurve zeigt das Spektrum der Probe, die bis zur Aufarbeitung gefroren war. Die höchste Aktivität eines Ansatzes wurde auf 100% und die anderen Aktivitäten zu dieser ins Verhältnis gesetzt. Die Temperaturspektren beider Proben zeigten einen ähnlichen Verlauf. Beide Proben wiesen eine relativ hohe Aktivität bei $8 \text{ }^\circ\text{C}$ auf, danach stieg die Aktivität mit steigender Temperatur kontinuierlich an. Das Temperaturoptimum war relativ breit und die Aktivität fiel rapide ab. Über das Temperaturminimum kann in diesem Ansatz keine Aussage gemacht werden, da die niedrigste Temperatur bei $8 \text{ }^\circ\text{C}$ lag und bei dieser Temperatur beide Proben noch hohe Aktivitäten zeigten, in etwa ein Viertel des Aktivitätsmaximums.

Das Spektrum der gefrorenen Probe war etwas enger als das der ungefrorenen Probe. Das Spektrum des Optimums reichte von 20 bis $30 \text{ }^\circ\text{C}$, ab $34 \text{ }^\circ\text{C}$ war keine potentielle

Nitrifikation mehr bestimmbar. Das Optimum der gefrorenen Probe zeigte keinen gradlinigen Verlauf, es gab einen Peak im Optimum bei 22 °C.

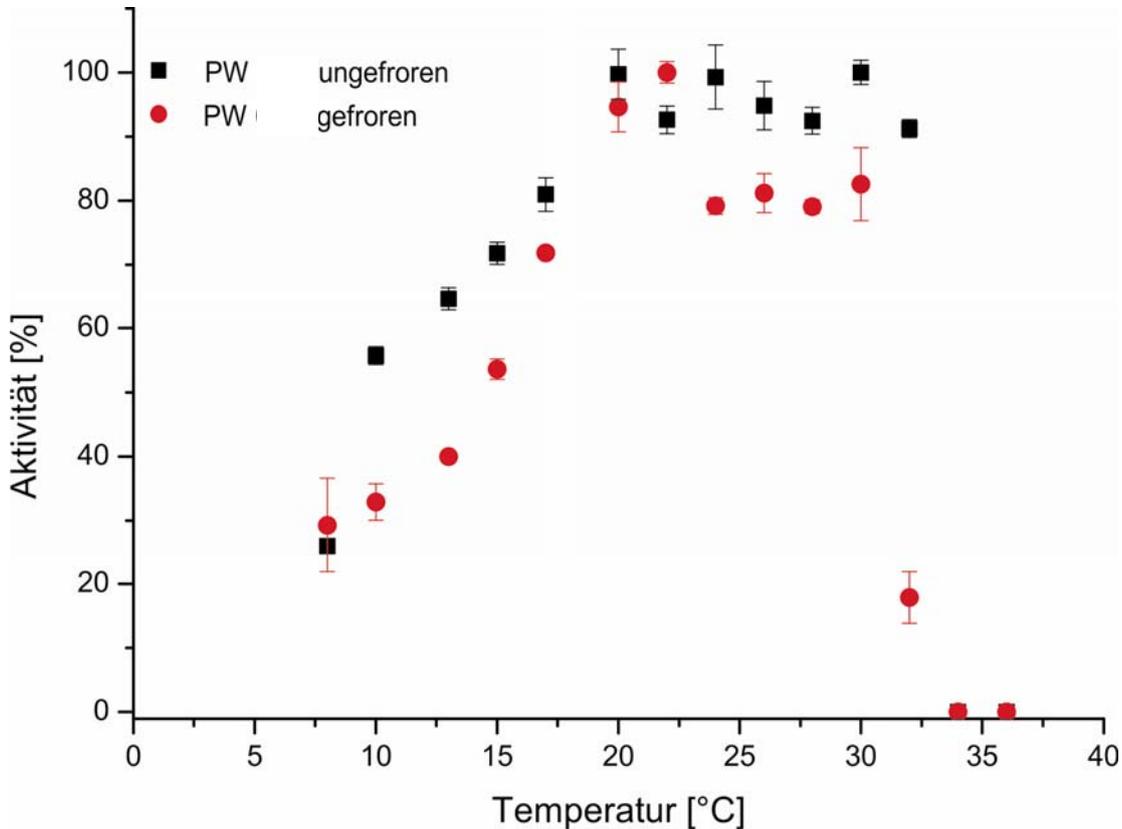


Abb. 5.25 Temperaturspektrum der potentiellen Ammoniakoxidation aus dem Polygonwall. Die Probe stammt aus dem Polygonwall in einer Tiefe von 5 bis 15 cm. Die Proben wurden gefroren bzw. ungefroren transportiert. Es wurden drei Parallele verwendet.

Temperaturanpassung: Strand 0 – 5 cm

Die Temperaturspektren der Strandproben aus einer Tiefe von 0 - 5 cm zeigten einen etwas anderen Verlauf (siehe Abbildung 5.26) als die Proben des Polygonwalls. Auch hier wurden unterschiedliche Proben desselben Standortes untersucht. Die beiden schwarzen Kurven zeigen das Temperaturspektrum der Bodenprobe aus dem Strand, die ungefroren nach Hamburg transportiert wurde. Die mit den runden Symbolen markierte Probe wurde mit Streptomycin behandelt, um die potentielle AOA Aktivität zu bestimmen. Die rote Kurve zeigt das Temperaturspektrum einer Bodenprobe die gefroren transportiert wurde.

Das Temperaturoptimum der ungefroren transportierten Strandprobe lag zwischen 22 und 30 °C. Das Minimum liegt bei ca. 7 °C, unter 13 °C fiel die Aktivität stark ab. Ab 35 °C ist keinerlei Aktivität mehr nachweisbar. Die AOA Aktivität wies ein Optimum bei 24 °C auf, die Aktivität entsprach aber nur 12 % der Gesamtaktivität ohne Zugabe von Streptomycin. Das

Temperaturspektrum der gefroren transportierten Probe hatte sich leicht verschoben. Das Temperaturoptimum bildete kein großes Plateau, sondern es gab einen Peak bei 32 °C, aber zwischen 25 °C und 32 °C lag die Aktivität über 95 %. Die Kurve sank zum Minimum stärker ab und bei 4 °C war nur noch eine sehr geringe Aktivität zu messen. Das Maximum lag über 36 °C.

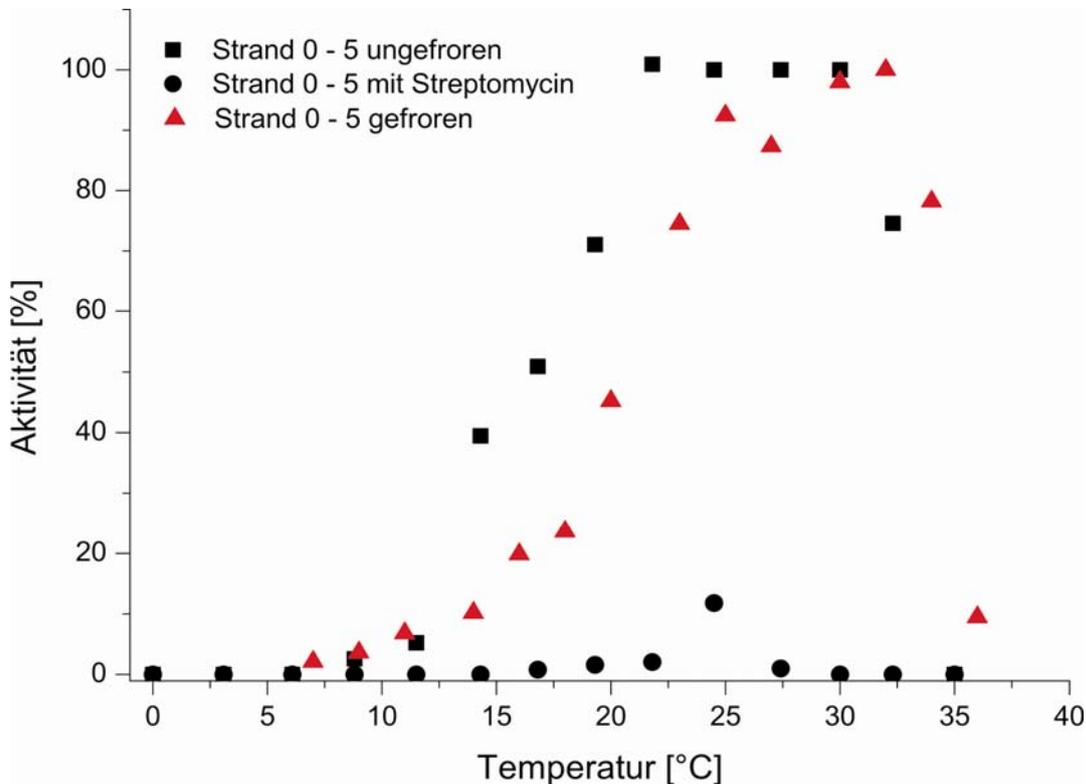


Abb. 5.26 Temperaturspektrum der potentiellen Nitrifikation im Strand in 0 bis 5 cm Tiefe. Tiefe: 0 – 5 cm unter GOF

5.5.4 Potentielle Nitrifikationsaktivität im gemäßigten Klimat

Auch für die Böden im gemäßigten Klimat wurde die potentielle Ammoniakoxidation bestimmt. Im Unterschied zu den Böden in den kalten Klimaten wurden die Raten der Böden aus der Hahnheide bei Raumtemperatur und wie nach der DIN Norm über den Zeitraum von wenigen Tagen und nicht Wochen, wie bei der Messung der Proben aus den kalten Klimaten, ermittelt. In Tabelle 5.12 ist die gemessene potentielle Ammoniakoxidation angegeben. Es wurden an zwei Probenahmedaten, im Frühling 2009 und Winter 2009 in drei verschiedenen Böden in drei Tiefen die potentielle Gesamtaktivität und die AOA Aktivität durch den Einsatz von Streptomycin gemessen. Die Messung erfolgte im Frühling über 192 Stunden (8 Tage). Im Winter wurde nur noch die Aktivität des Auengley bestimmt und zwar über 84 Stunden (3,5 Tage). Die potentielle Ammoniakoxidation war im Auengley generell am höchsten und nahm mit der Tiefe ab.

Tabelle 5.12 Potentielle Ammoniakoxidation der Böden der gemäßigten Klimate.

Tiefe [cm]	Horizonte _c	Probenahme März / April 2009		Probenahme Dezember 2009	
		Gesamt Ammoniakoxidation _a [ng N g ⁻¹ TS h ⁻¹]	AOA Aktivität _b [ng N g ⁻¹ TS h ⁻¹]	Gesamt Ammoniakoxidation _a [ng N g ⁻¹ TS h ⁻¹]	AOA Aktivität _b [ng N g ⁻¹ TS h ⁻¹]
Profil 1 Humusgley					
0-5	Ah	233±61	27	n.b.	n.b.
5-15	Ah	29±8	16	n.b.	n.b.
15-25	aG	5±0,5	1	n.b.	n.b.
Profil 2 Auengley					
0-5	Ah	358±11	52	312±4	145
5-15	Ah / Gor	101±7	24	194±4	123
15-25	Gor	37±1	14	n.b.	n.b.
Profil 3 Anmoorgley					
0-5	Aa	n.n.	n.n.	n.b.	n.b.
5-15	Aja	n.n.	n.n.	n.b.	n.b.
15-25	Gjho	n.n.	n.n.	n.b.	n.b.

A Für die Bestimmung der potentiellen Nitrifikation wurden 2 Parallele angesetzt. b Für die Bestimmung der AOA Aktivität gab es nur einen Ansatz. C nach KA5 n.b. nicht bestimmt. n.n. unter der Nachweisgrenze

Die höchste potentielle Ammoniakoxidation lag im obersten Horizont des Auengley bei ca. 360 ng N pro g TS und Stunde: sie nahm mit der Tiefe auf knapp 40 ng pro g TS und Stunde ab. Im Humusgley hingegen nahm sie von ca. 235 auf 5 ng pro g TS und Tag ab. Die AOA Aktivität wurde durch Zugabe des Antibiotikums Streptomycins bestimmt und war mehr als ein 5-faches geringer als die Gesamtaktivität bei der Bestimmung im Frühling 2009. Die Gesamtaktivitäten nach der Probenahme im Dezember lagen im Auengley in einem ähnlichen Bereich wie im Februar. Die AOA-Aktivität entsprach aber ungefähr einem Drittel der Gesamtaktivität. Der Anmoorgley zeigte keine potentielle Ammoniakoxidation.

5.6 Quantifizierungen von Nitrifikanten

Damit neben den potentiellen Ammoniakoxidationsaktivitäten auch eine Aussage über die Verbreitung und Größenordnungen der Nitrifikanten in den Böden der kalten Klimate gegeben werden kann, wurden die Lebendzellzahlen der Ammoniak oxidierenden Bakterien bzw. Archaeen (AOM) und Nitrit oxidierenden Bakterien (NOB) mittels MPN Technik (Most Probable Number) bestimmt (Abschnitt 4.4.3). Die Inkubation erfolgte bei zwei Temperaturen, um zu überprüfen, ob sich aufgrund der Inkubationstemperatur andere Zellzahlen bestimmen lassen. Die Inkubation erfolgte bei 6 °C (Abb. 5.27) und bei 22 °C (Abb. 5.28)

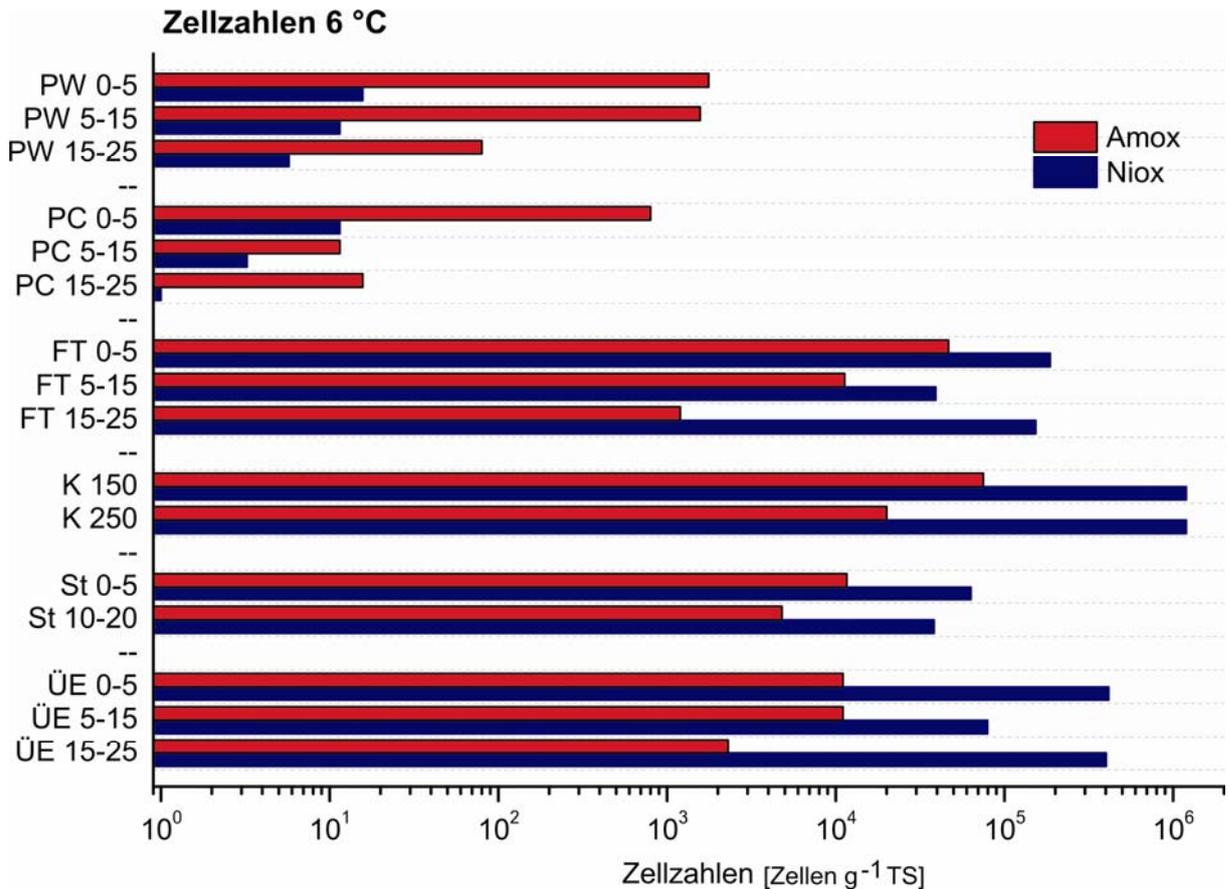


Abb. 5.27 Zellzahlen der Ammoniakoxidanten und Nitritoxidanten bei 6°C.

Ermittlung der Zellzahlen mit der MPN Methode. PW: Polygonwall, PC: Polygonzentrum, FT: Flussterrasse, K: Kliff, St: Strand, ÜE: Überflutungsebene. Die Skala der X-Achse ist logarithmisch angegeben.

Bei 6 °C sind die Zellzahlen in der polygonalen Tundra deutlich geringer als in den sandigen Böden der Überflutungsebene und der trockenen Flussterrasse. Die Zellzahlen liegen in der polygonalen Tundra zwischen 10¹ und 10³ Zellen pro g TS, in den sandigen Böden hingegen zwischen 10³ und 10⁶ Zellen pro g TS. Im Polygon sind die Zellzahlen der Ammoniakoxidanten deutlich höher als die der Nitritoxidanten. In den anderen Böden und auch bei einer höheren Inkubationstemperatur von 22 °C liegen die Zellzahlen der Nitritoxidanten über denen der Ammoniakoxidanten. Die Zellzahlen im Polygon liegen bei 22 °C deutlich höher als bei 6 °C.

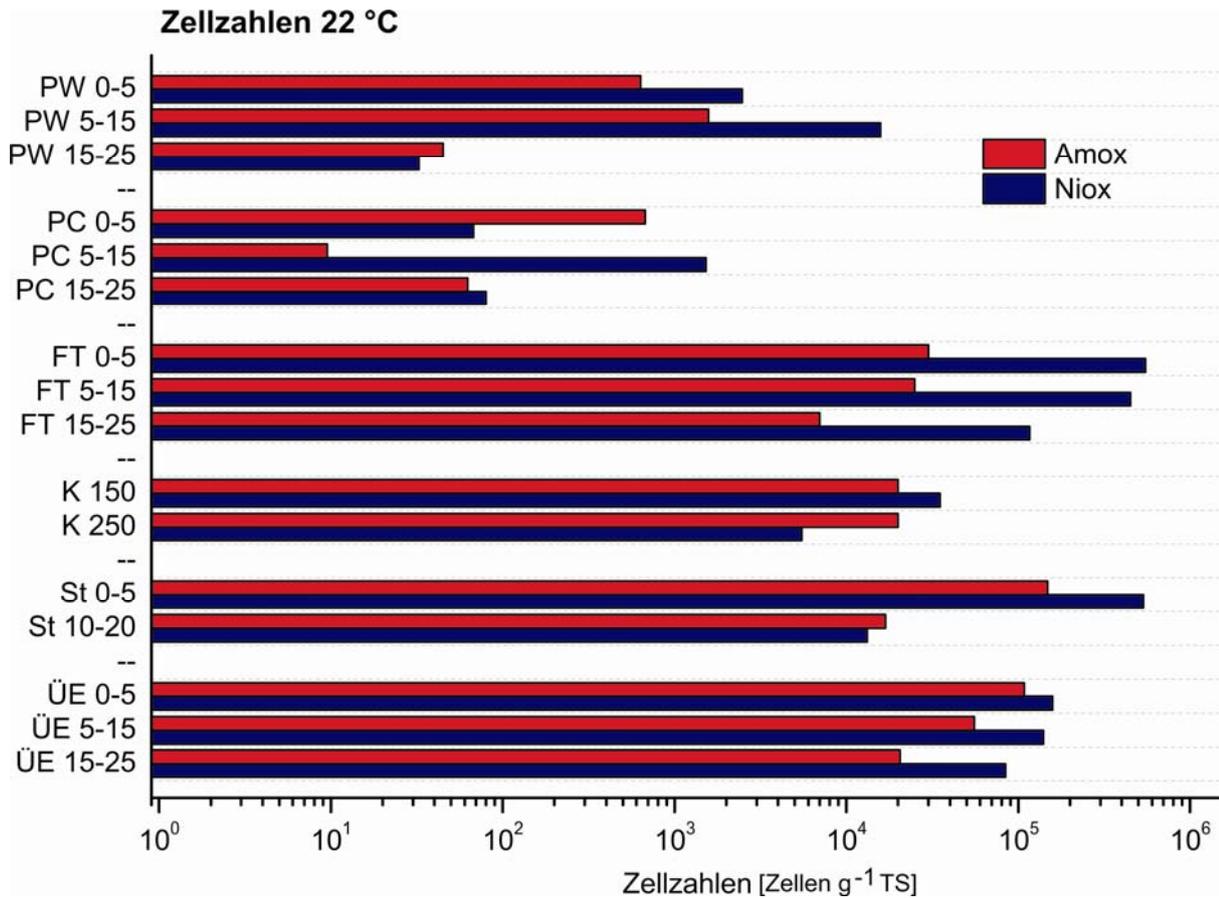


Abb. 5.28 Zellzahlen der Ammoniakoxidanten und Nitritoxidanten bei 22°C.
 Ermittlung der Zellzahlen mit der MPN Methode. PW: Polygonwall, PC: Polygonzentrum, FT: Flussterrasse, K: Kliff, St: Strand, ÜE: Überflutungsebene. Die Skala der X-Achse ist logarithmisch angegeben.

Die Abb. 5.29 stellt die Zellzahlen der Ammoniakoxidanten nach unterschiedlicher Behandlung dar. Die Zellzahlen der Nitrifikanten in der polygonalen Tundra waren im Allgemeinen sehr gering und lagen im 10^1 bis 10^3 Zellen pro g TS Bereich. Die untersuchten Proben von Mitte Juli, die mehr als ein Jahr vor der Bearbeitung kühl gelagert worden sind, zeigen eine 2 bis 3 Potenzen höher liegende Zellzahl als die relativ frisch bearbeiteten Proben. Die gefrorenen Proben zeigten die geringsten Zellzahlen. Die Zellzahlen der Ammoniakoxidanten lagen deutlich über den Zellzahlen der Nitritoxidanten. Bei 22°C sind die Zellzahlen im Allgemeinen höher als bei 6°C, Ausnahmen bildet hier der Polygonwall in 0 bis 5 cm. Dort liegen sie mit $1,8 \cdot 10^3$ Zellen pro g TS bei 6 °C fast eine Potenz höher als bei 22 °C mit $6,3 \cdot 10^2$ Zellen pro g TS. Auch im Polygonzentrum liegen die AOM Zellzahlen bei den Proben aus Mitte Juli ungefroren bei 6 °C höher als bei 22 °C.

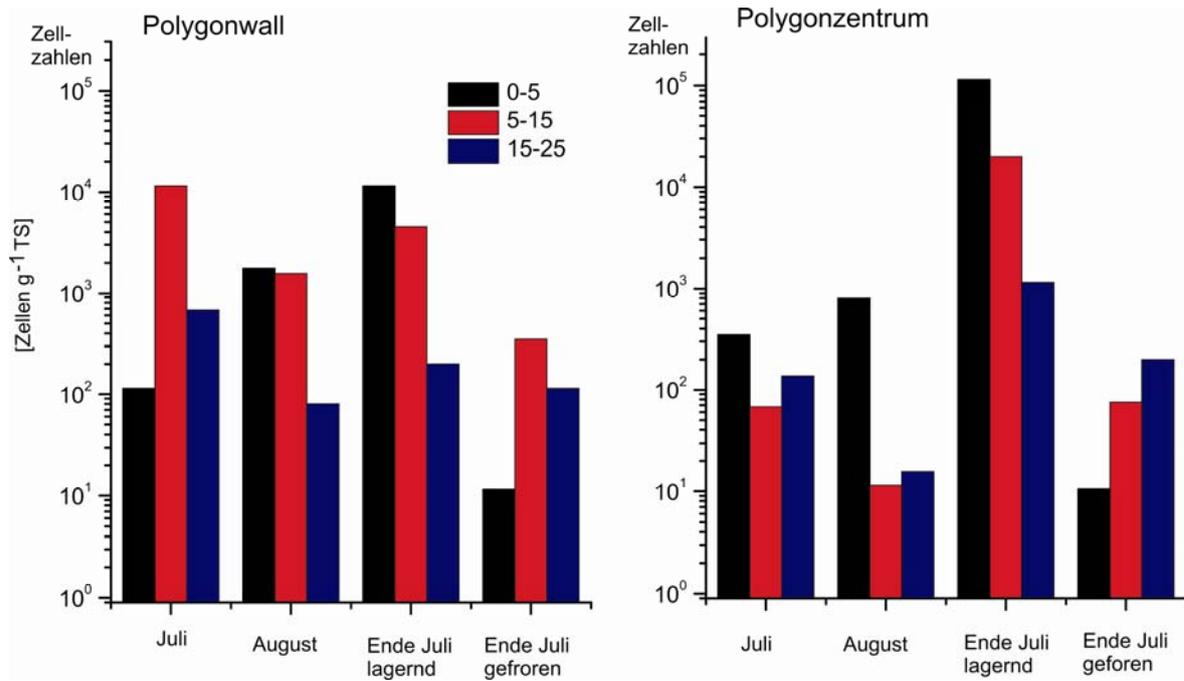


Abb. 5.29 Vergleichende Zellzahlen der Ammoniakoxidanten der Böden des Polygons

Inkubationstemperatur 6 °C. Probenahme (1) im Juli, (2) Ende August, (3) Ende Juli und 1 Jahr gelagert und (4) Ende Juli und geforen mehr als 1 Jahr gelagert. Die Skala der Y-Achse ist logarithmisch angegeben. Es sind Proben aus den drei Tiefen von 0 – 5, 5 – 15 und 15- 25 cm gegeben

Die Zellzahlen der nitrifizierenden Mikroorganismen im Kliff von Samoylov liegen zwischen $1,2 \cdot 10^1$ und $1,2 \cdot 10^6$ Zellen pro g TS (Abb. 5.30). Dabei ist auffällig, dass die Zellzahlen in der oberen active layer Schicht relativ hoch lagen mit bis zu $1,2 \cdot 10^6$ Zellen pro g TS bei 6 °C; bei 22 °C sind die Zellzahlen in der oberste Schicht geringer. In einer Tiefe von einem Meter sind die Zellzahlen relativ niedrig und nehmen dann in der Tiefe zu. Die Zunahme mit der Tiefe korreliert auch mit der potentiellen Nitrifikation, dem Tongehalt und den pH-Werten (Abschnitt 5.5.3). Dabei ist zu beachten, dass der Aktivitätstest keine bis sehr geringe Aktivitäten bis in eine Tiefe von über 2 Metern nachgewiesen hat. In der Probe aus der Schicht in einer Tiefe von 4,7 m, die im Permafrost genommen worden ist, sind die höchsten Zellzahlen der Ammoniak- und Nitritoxidanten bestimmt worden mit bis zu $1,2 \cdot 10^6$ Zellen pro g TS.

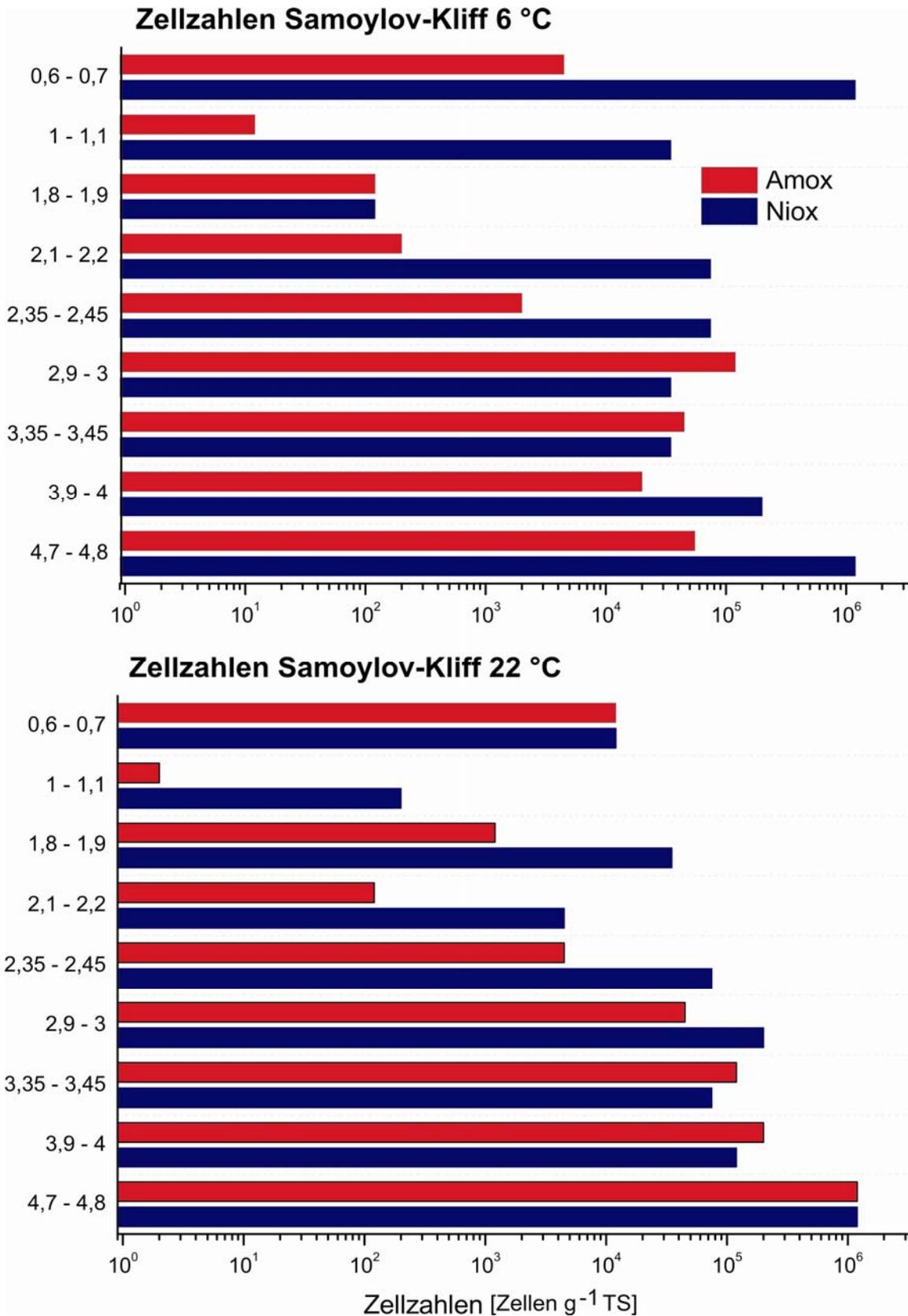


Abb. 5.30 Zellzahlen der der Ammoniakoxidanten und Nitritoxidanten im Samolyov Kliff. MPN Methode bei 6 °C und 22 °C. Die Skala der X-Achse ist logarithmisch angegeben. In der Y-Achse ist die Tiefe unter der Geländeoberfläche in m angegeben.

5.7. Molekularbiologische Befunde

Zur Charakterisierung der beteiligten Ammoniak oxidierenden Mikroorganismen wurden verschiedene molekularbiologische Methoden verwendet, wie DGGE, RT-PCR, Sequenzierungen und Berechnungen von phylogenetischen Stammbäumen. Dafür wurden zum einen die Naturproben aus den verschiedenen geomorphologischen Einheiten der Insel Samoylov auf ihre Diversität an AOA und AOB untersucht. Zum anderen wurden die Anreicherungskulturen bei verschiedenen Inkubationstemperaturen mittels DGGE analysiert und die angereicherten AOM wurden über Sequenzanalysen und physiologische Versuche (Abschnitt 5.7.4.) charakterisiert.

5.7.1. Diversität des bakteriellen und archaealen 16S-rRNA-Gens

Für die Diversitätsanalysen der Ammoniak oxidierenden Gemeinschaften wurden aus den gefroren transportierten Bodenproben DNA isoliert. In Abbildung 5.31 ist das DGGE-Profil der Ammoniak oxidierenden Betaproteobakterien (AOB) dargestellt.

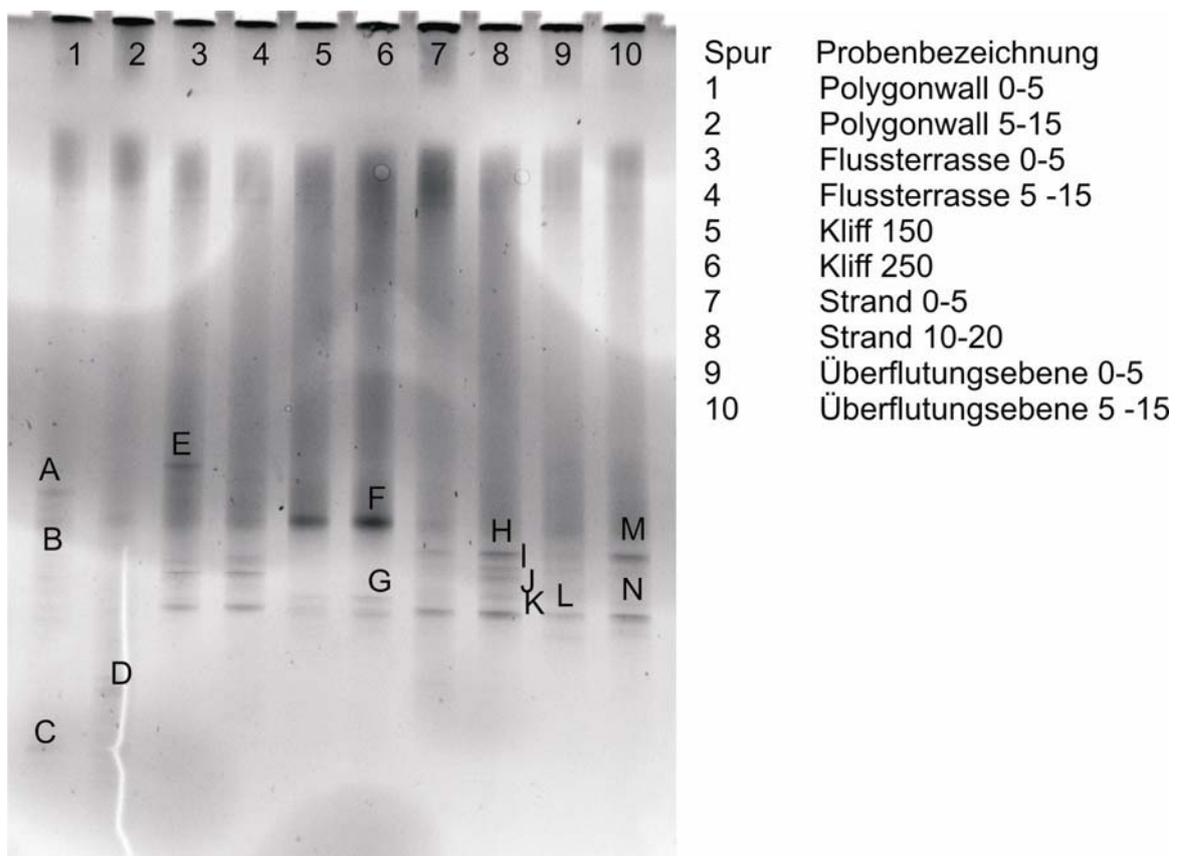


Abb. 5.31 DGGE-Profil der AOB aus den Böden der geomorphologischen Einheiten.

Für die DGGE wurde ein 8%iges Gel mit einem Gradient von 40 bis 70 % verwendet. Als Primer wurden die CTO Paare zum Nachweis von Betaproteobakterien (KOWALCHUK et al., 1997) verwendet (siehe Tabelle 4.6). Die Buchstaben stehen für ausgeschnittene Banden, die reamplifiziert und anschließend sequenziert worden sind. Die Zahlen geben die Spuren an. Die Zahlen der Probenbezeichnung gegen die Tiefe in cm an.

Es wurden insgesamt DNA aus 10 verschiedenen Bodenproben der geomorphologischen Einheiten verwendet: aus dem Polygonwall in 0 - 5 und 5 - 15 cm Tiefe, aus der Flussterrasse in den selben Tiefen, aus dem Kliff unterhalb der Flussterrasse in einer Tiefe von 150 und 250 cm, aus dem Strand in einer Tiefe von 0 - 5 und 10 - 20 cm und aus der Überflutungsebene auch in den Tiefen von 0 - 5 und 5 - 15 cm.

Die Diversität der Bakterien zeigte bis zu 5 distinkte Banden im Gel, die für 5 verschiedene Ammoniakoxidanten stehen. Zwischen den einzelnen Böden und Horizonten sind aber explizite Unterschiede zu erkennen. Die Proben aus dem Polygonwall zeigen ein deutlich anderes Muster als die übrigen Böden. Nur im Polygonwall konnten als bekanntes AOB *Nitrosomonas*-ähnliche Bakterien detektiert werden (Tabelle 5.13). In allen anderen Böden wurden unterschiedliche *Nitrospira*-ähnliche Bakterien als AOB nachgewiesen. Deutlich wird auch, dass nur anhand der DGGE-Banden, keine eindeutige Zuteilung zu einem spezifischen Vertreter erreicht werden kann, z.B. liegen die Banden H und M bzw. L und N zwar auf einer Höhe, die anschließende Sequenzierung ergab aber zwei unterschiedliche Sequenzen, die sich verschiedenen Bakterien zuordnen lassen. Im Kliff (Spur 5 und 6) stechen zwei Banden stark hervor (Bande F), sie werden nach dem Sequenzieren unbekanntem Betaproteobakterien zugeordnet. Die Bande B aus dem Polygonwall lag zwar auf der gleichen Höhe, kann aber keiner Gruppe zugeordnet werden: zu dem unbekanntem *Dunganello* besteht nur eine 94 %ige Übereinstimmung. In den Böden der trockenen Flussterrasse konnte kein bekanntes Ammoniak oxidierendes Bakterium nachgewiesen werden. Dabei wurden aber unbekannte Betaproteobakterien nachgewiesen, die evtl. auch Ammoniak oxidieren können. In der Überflutungsebene und am Strand wurden Vertreter der Gattung *Nitrospira* als AOB detektiert. Keine Bande konnte zu 100 % bekannten AOB zugeordnet werden.

Tabelle 5.13 Taxonomische Zuordnung der ausgeschnittenen Banden der Böden Samoylovs

Bezeichnung der DNA Bande	Probenbezeichnung	Höchste Übereinstimmung bei Sequenzvergleich	Prozentuale Übereinstimmung
A	Polygonwall 0-5	<i>EU155068.1</i> <i>Nitrosomonas clone A-46</i>	98%
B	Polygonwall 0-5	EF717990.1 Unkultiviertes <i>Dunganella sp</i>	94%
C	Polygonwall 0-5	EF019282.1 Nitrosomonadacea	99%
D	Polygonwall 5-15	DQ404614.1 Unbekanntes Bakterium FJ483763.1 <i>Nitrosospira sp.</i>	96% 95%
E	Flussterrasse 0-5	<i>EU070244</i> Unbekanntes <i>Betaproteobacterium</i>	97%
F	Kliff 250	HQ15224 Unbekanntes Bakterium	98%
G	Kliff 250	FJ694366 Unbekanntes Bakterium	98%
H	Strand 10-20	<i>EU127347</i> <i>Nitrosospira sp. Clone 168C6</i>	98%
I	Strand 10-20	<i>EU127347</i> <i>Nitrosospira sp. Clone 168C6</i>	98%
J	Strand 10-20	<i>EU127347</i> <i>Nitrosospira sp. Clone 168C6</i>	98%
K	Strand 10-20	<i>EU127347</i> <i>Nitrosospira sp. Clone 168C6</i>	98%
L	Überflutungsebene 0-5	AY722820 <i>Nitrosospira sp. clone C1-7</i>	95%
M	Überflutungsebene 5-15	EF455143.1 Unkultiviertes Bodenbakterium	95%
N	Überflutungsebene 5-15	AB107859.1 Unbekanntes <i>Betaproteobacteria</i>	98%

In Abbildung 5.32 ist ein phylogenetischer Stammbaum der einzelnen Banden mit ähnlichen Sequenzen dargestellt. Der Stammbaum basiert nur auf ca. 400bp des 16S rRNA-Gens. Mit eingerechnet sind die nächsten bekannten Sequenzen aus der Datenbank von bekannten und unbekanntem *Betaproteobakterien*. Der Stammbaum zeigte, dass die Banden A, H, K und L eindeutig zu den Ammoniak oxidierende Bakterien gehören. Bei den Banden D und C war die Zuteilung nicht eindeutig. Die Banden N, M, G, E und F liegen zwar in Clustern mit *Betaproteobakterien*, sie konnten aber nicht eindeutig Ammoniak oxidierenden Bakterien zugeordnet werden.

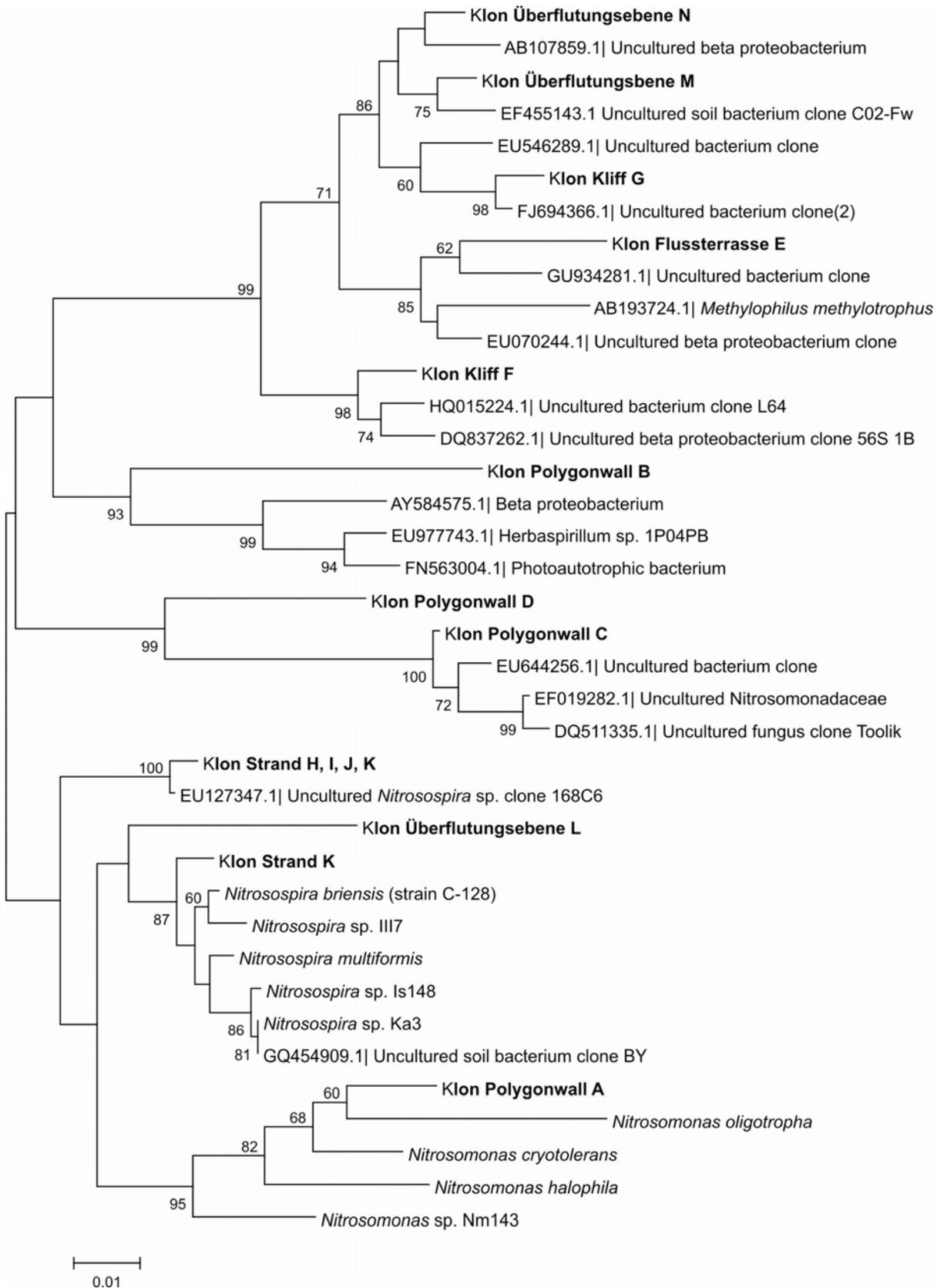


Abb. 5.32 Maximum-likelihood Tree basierend auf dem bakteriellen 16S rRNA Gen nach DGGE Analysen.

Zuordnung der Betaproteobakterien anhand von 400 bp. Bootstrap 1000. Die Banden aus dem DGGE sind fett markiert. Zur Berechnung des Stammbaumes diente das Programm Mega 5.

Für die Analyse der Ammoniak oxidierende Archaeen (AOA) wurden dieselben 10 Proben aus Polygonwall, Flussterrasse mit Kliff, Strand und Überflutungsebene verwendet wie oben beschrieben. Es wurden allerdings Primersets verwendet, die alle Archaeen erfassen sollten, dabei wurde eine nested PCR verwendet (Abschnitt 4.9.2). Die Diversität der Archaeen in den untersuchten Böden ist nach den DGGE nur sehr gering (Abb. 5.33). Es hatte sich, wenn überhaupt, nur eine distinkte Bande pro Probe ausgebildet. Im Polygonwall 0 - 5 cm, in den Proben aus der Flussterrasse und aus der Überflutungsebene in 0 - 5 cm hatten sich eine distinkte Bande auf der gleichen Höhe gebildet: diese wurde unkultivierten Archaeen zugeordnet (Tabelle 5.14). In den anderen Proben hatten sich zwar Banden gebildet, die aber nicht distinkt ausgebildet wurden. In Spur 11 wurde als Referenz die DNA des AOA „*Candidatus Nitrosospaera gargensis*“ aufgetragen, die eine deutliche Bande bildete. In den anderen Spuren waren auf der Höhe des „*Candidatus Nitrosospaera gargensis*“ keine Banden distinkt ausgeprägt. Die nicht ganz distinkte Bande R in der Spur 17, in die DNA aus dem Kliff aufgetragen wurde, konnte einem unbekanntem methanogenen Archaeon zugeordnet werden.

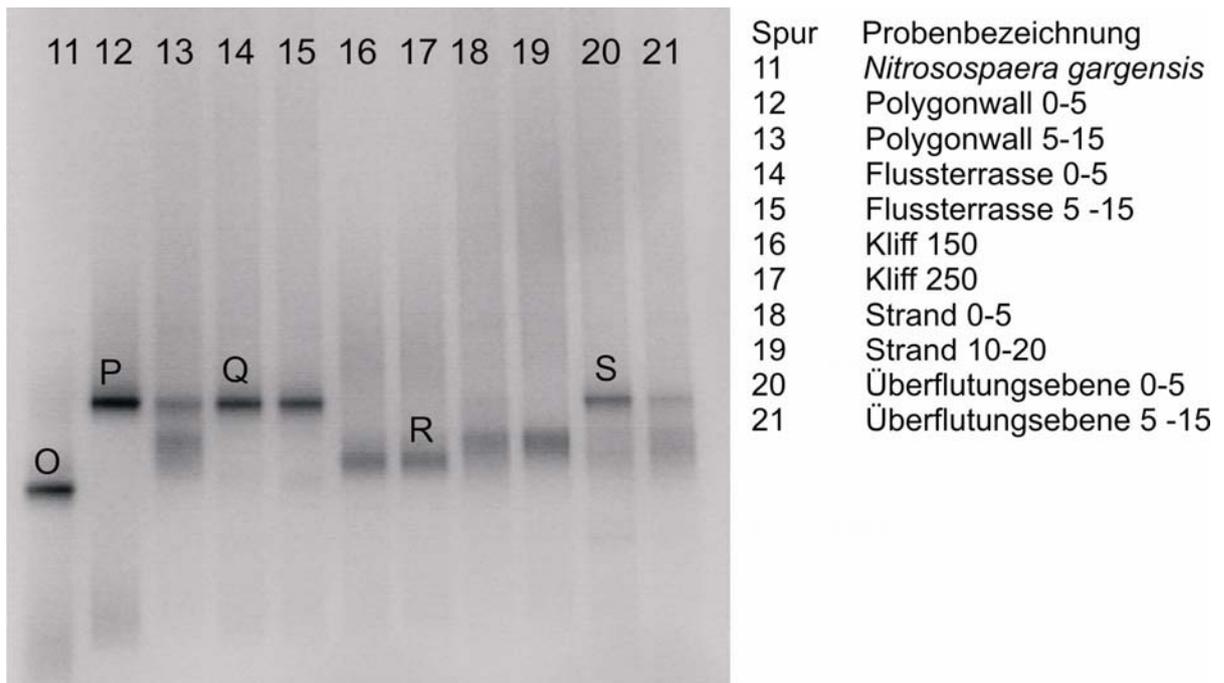


Abb.5.33 DGGE Profil von Archaea aus den Böden der geomorphologischen Einheiten.

Für die DGGE wurde ein 8%iges Gel mit einem Gradienten von 40 bis 70 % verwendet. Es wurde eine nested PCR mit Archaea Primern durchgeführt. (siehe Tabelle 4.7). Die Buchstaben stehen für ausgeschnittene Bande, die reamplifiziert und anschließend sequenziert worden sind. Die Zahlen geben die Spuren an. Die Zahlen der Probenbezeichnung geben die Tiefe in cm an.

Tabelle 5.14 Taxonomische Zuordnung der 16S rRNA-Gen Sequenzen der Archaea

Bezeichnung der DNA Bande	Proben-bezeichnung	Höchste Übereinstimmung bei Sequenzvergleich	Prozentuale Übereinstimmung
O	Nitrososphaera gargensis	<i>Candidatus</i> Nitrososphaera gargensis	99%
P	Polygonwall 0-5	Unkultiviertes Archaeon Nitrososphaera gargensis	97% 92%
Q	Flussterrasse 0-5	Unkultiviertes Archaea Nitrososphaera gargensis	97% 92%
R	Kliff 250	Unkultiviertes Crenarchoata anaerobic methanogenic archaeon	99% 98%
S	Überflutungsebene 0-5	Unkultiviertes Archaeon Nitrososphaera gargensis	100% 94%

Der phylogenetische Stammbaum, der in Abbildung 5.34 dargestellt ist, zeigt deutlich, dass sich die DNA aus den Banden Q, P und S die aus Überflutungsebene, Wall und Flussterrasse stammen in den 1.1 b Soil Cluster der Crenarchaeota einteilen lassen. Die Bande R aus dem Kliff fällt nicht in dieses Cluster, sondern in ein methagogenes Cluster.

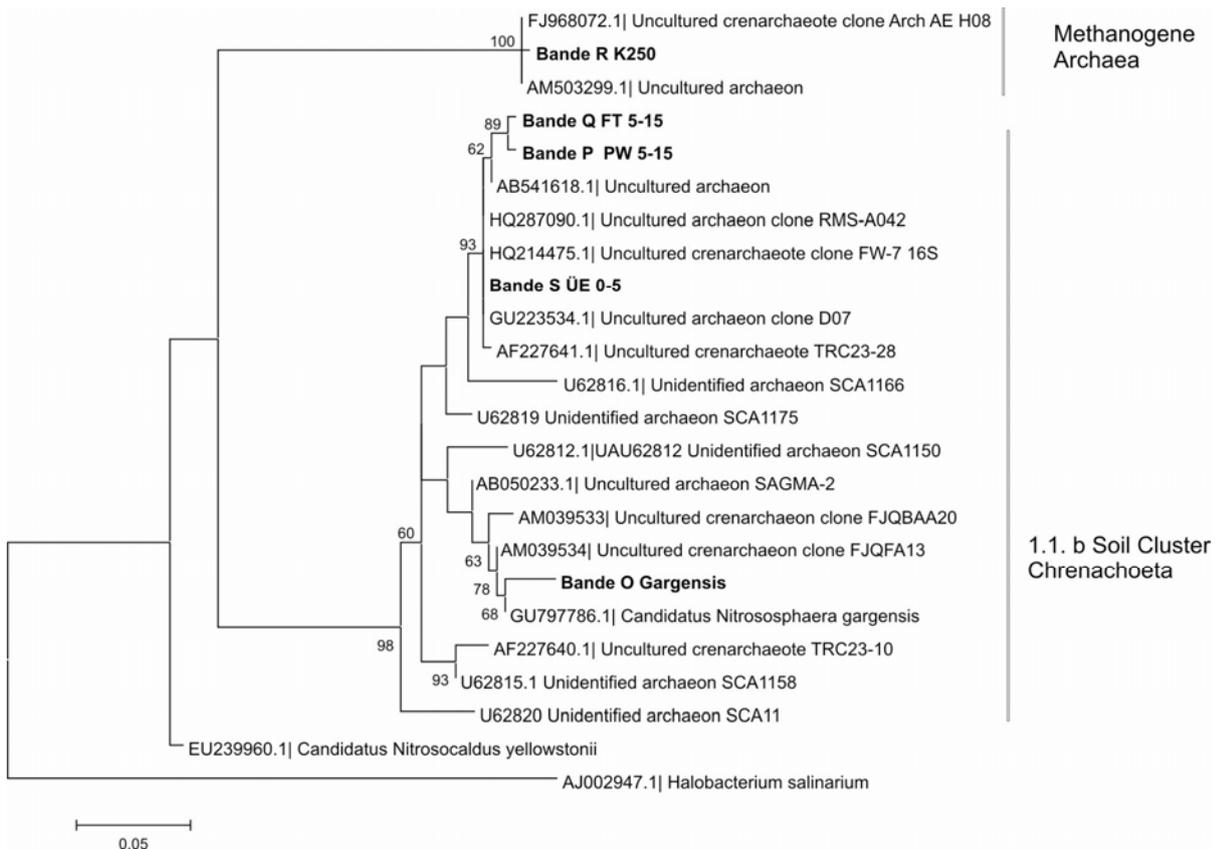


Abb. 5.34 Maximum-Likelihood Stammbaum der Archaea basierend auf dem 16S-rRNA-Gen Zuordnung der Archaea anhand von 400 bp. Bootstrap 1000. Die Banden aus dem DGGE sind fett markiert. Zur Berechnung des Stammbaumes diente das Programm Mega 5. K250: Kliff in 250 cm, FT 5-15: Flussterrasse in 5 – 15 cm Tiefe, PW 5-15: Polygonwall in 5 – 15 cm Tiefe, UE 0-5: Überflutungsebene 0 – 5 cm Tiefe.

5.7.2 Nachweis AOB und AOA mittels der Ammoniakmonooxygenase (AMO)

Die DNA der Bodenproben aus den verschiedenen geomorphologischen Einheiten und des Samoylovkliffs wurden auf die Existenz des Schlüsselenzyms, der bakteriellen und archaealen Ammoniakmonooxygenase, untersucht. In Tabelle 5.15 ist angegeben, in welchen Proben mittels Primersets von ROTTHAUWE et al. (1997) und TREUSCH et al. (2005), das Gen der Untereinheit A der AMO nachgewiesen wurde. Dabei wurde die isolierte DNA verwendet, die auch in Abschnitt 5.7.1.1 für die DGGE-Analysen eingesetzt worden ist. Die Detektierbarkeit der *amoA*-Gene ist ein Hinweis auf die Ammoniak oxidierende Bakterien (AOB) und Archaeen (AOA) im Boden.

Tabelle 5.15 Untersuchung des *amoA*-Gens in den Umweltproben

Ort	Tiefe [cm]	Bakterielle <i>amoA</i>	Archaeale <i>amoA</i>
Polygonwall	0-5	+	-
Polygonwall	5-15	+	-
Polygonwall	15-25	+	-
Polygonzentrum	0-5	-	-
Polygonzentrum	5-15	-	-
Polygonzentrum	15-25	-	-
Flussterrasse	0-5	+	+
Flussterrasse	5-15	+	+
Flussterrasse	15-25	n.b.	n.b.
FT Kliff	150	+	-
FT Kliff	250	n.b.	n.b.
Strand	0-5	+	+
Strand	10-20	n.b.	n.b.
Überflutungsebene	0-5	+	+
Überflutungsebene	5-15	+	+
Überflutungsebene	15-25	n.b.	n.b.
Samoylov-Kliff	60 - 70	+	-
Samoylov-Kliff	100 - 110	-	-
Samoylov-Kliff	180 - 190	-	-
Samoylov-Kliff	210 - 220	-	+
Samoylov-Kliff	235 - 245	-	+
Samoylov-Kliff	290 - 300	-	-
Samoylov-Kliff	335 - 345	+	+
Samoylov-Kliff	390 - 400	+	+
Samoylov-Kliff	470 - 480	-	-

n.b. nicht bestimmt

In den Böden der geomorphologischen Einheiten der Insel Samoylov sind die Hauptvertreter der Ammoniak oxidierenden Mikroorganismen die Bakterien; diese konnten in allen Böden mit Ausnahme des Polygonzentrums nachgewiesen werden. Dagegen wurden die AOA nicht in den Böden der Polygonalen Tundra nachgewiesen, in allen anderen Böden wurden sie hingegen detektiert.

Im Samoylov-Kliff wurden Proben aus unterschiedlichen Tiefen untersucht. In den Oberflächen nahen Proben in 60 cm wurden nur Bakterien (AOB), in 210 und 230 cm dagegen nur Archaeen (AOA) detektiert. In den tiefen Proben von 340 und 390 cm wurden beide Gruppen nachgewiesen. In der Permafrost Probe in einer Tiefe von 470 cm konnte über die *amoA*-Gen weder AOB noch AOA detektiert werden.

5.8 DGGE Analysen der Anreicherungskulturen

Verschiedene Anreicherungskulturen von Ammoniak oxidierenden Mikroorganismen aus Bodenproben der Jahre 2004, 2005, 2007 und 2008 wurden mittels DGGE untersucht. Im Mittelpunkt standen die Kulturen aus den Polygonen, aber auch aus den anderen geomorphologischen Einheiten der Insel Samoylov und aus dem Küstenaufschluss am Samoylov-Kliff. Die Inkubationen erfolgten bei 4 bzw 6 °C, 10 °C und 28 °C. Der Anreicherungsprozess der Kulturen war zum Teil bis zu 6 Jahre fortgeschritten. Es wurde aus den Anreicherungskulturen für die folgenden Untersuchungen DNA isoliert.

5.8.1 Anreicherungen bei 4 °C

Bei 4 °C bzw. 6 °C wurden Anreicherungskulturen aus der polygonalen Tundra und dem Samoylov-Kliff von 2004, Proben aus dem Polygon von 2007 und Proben der unterschiedlichen geomorphologischen Einheiten der Insel Samoylov 2008 angezogen. In Abbildung 5.35 und 5.36 sind die DGGE-Profile zu erkennen und in der Tabelle sind die aufgetragenen Proben eingetragen.

In den Kulturen aus 2004 (Abb. 5.35 links) hat sich nach einem Inkubationszeitraum von 5 Jahren der gleiche Hauptorganismus angereichert. Die mit A gekennzeichnete Bande konnte eindeutig der Gattung *Nitrosospira* zugeordnet werden (Tabelle 5.16). Der nächste bekannte *Nitrosospira* sp. 9RS stammt aus einem sauren Sulfatboden (SATOH et al. 2007).

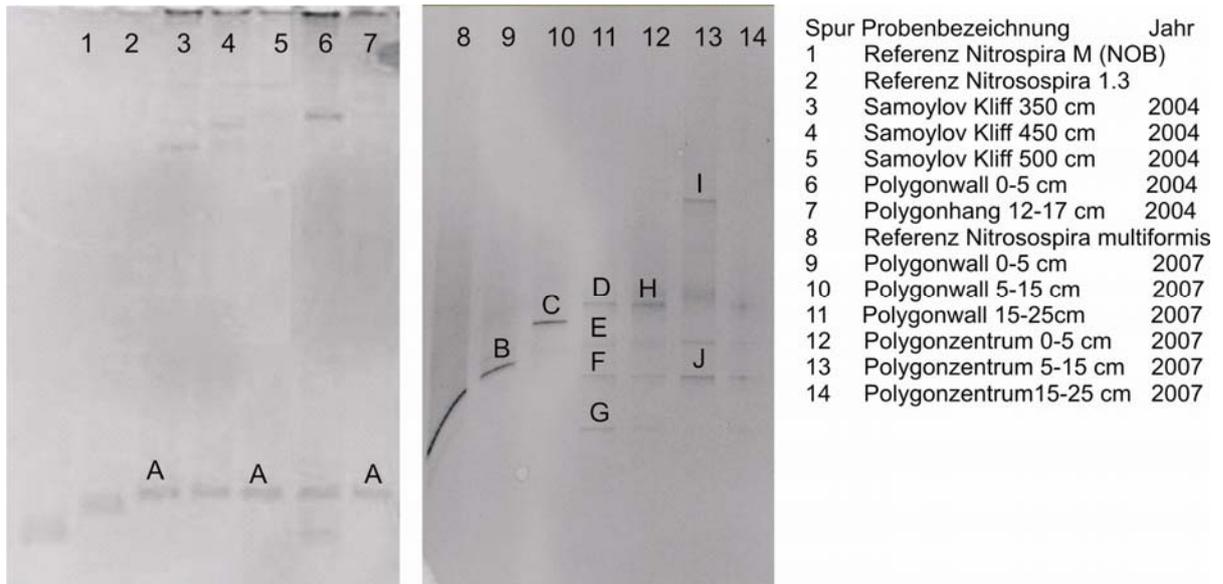


Abb. 5.35 DGGE-Profile von Anreicherungskulturen bei 4-6 °C .

Die Anreicherungen stammen aus Bodenproben aus den Jahren 2004 und 2007 aus der Polygonalen Tundra und dem Samoylov-Kliff. Rechts Anreicherung über 5 Jahre und links Anreicherung über 2 Jahre. Die Inkubation erfolgte bei 4 bzw. 6°C. Das 8%ige Gel hat eine 40 bis 70 %igen Gradienten. Als Primerset wurde die Kombination 341GC F/907R verwendet

Alle ausgeschnittenen Banden auf der Höhe von A wiesen die gleiche Sequenz auf, so dass diese in Tabelle 5.18 zusammengefasst wurden. Zu einem früheren Zeitpunkt des Anreicherungsprozesses wurde ein gemeinsames Wachstum mit dem Nitritoxidanten „*Candidatus Nitrotoga arctica*“ nachgewiesen (Daten werden nicht gezeigt).

Die Anreicherung der Proben aus 2007 erfolgte über 1,5 Jahren bei 6 °C (Abb. 5.35). Die Diversität der Bakterien ist höher als nach mehrjährigen Inkubationen aus den Jahren 2004. Der Hauptvertreter der Ammoniak oxidierenden Bakterien gehört zu der Gattung *Nitrosospira*. In fast allen Kulturen erfolgte die Anreicherung gemeinsam mit einem Vertreter von Nitrit oxidierenden Bakterien, in diesem Fall *Nitrobacter*-ähnlichen Bakterien (Tab. 5.16). Die Anreichungskulturen aus den oberen Schichten des Polygonwalls zeigen nur eine Bande im Gel, die einem anderen *Nitrosospira* zugeordnet werden konnte. Neben den eindeutig den AOB und NOB zuzuordnenden Banden, wurden die Banden D, H und I als Alphaproteobakterien identifiziert.

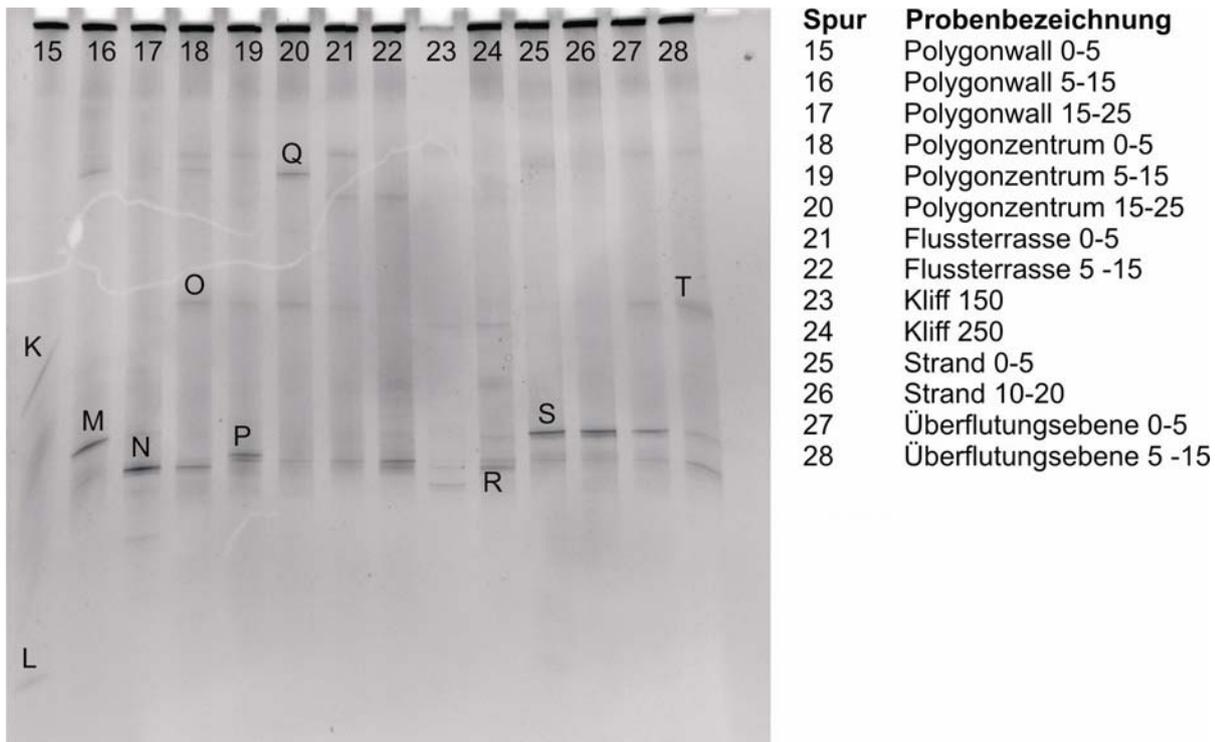


Abb. 5.36 DGGE-Profile von Anreicherungskulturen bei 6 °C von 2008.

Die Kulturen stammen aus Bodenproben der geomorphologischen Einheiten der Insel Samoylov. Der Anreicherungsprozess war 1, 5 Jahre vorangetrieben. Die Inkubation erfolgte bei 6°C. Das 8%ige Gel hat einen 40 bis 70 %igen Gradienten. Als Primerset wurde die Kombination 341GC F/907R verwendet. Die Zahlen der Probenbezeichnung gegen die Tiefe in cm an.

Die Anreicherungskulturen der verschiedenen geomorphologischen Einheiten wurden bereits vor Ort angesetzt und anfangs bei *in-situ*-Temperaturen angereichert. Der weitere Anreicherungsprozess wurde im Labor bei konstanten 6°C fortgesetzt (Abb.5.36). Insgesamt erfolgte die Anreicherung fast 2 Jahre.

Die Diversität in den Anreicherungskulturen ist relativ gering. Die Bandenabfolge in den Anreicherungskulturen der Böden ist sehr ähnlich. Als Hauptvertreter der AOB wurden mindestens drei verschiedene *Nitrosospira* identifiziert. In der Tabelle 5.16 und der Abbildung 5.36 werden fast alle Banden *Nitrosospira* zugeordnet und sie ordnen sich im Baum auch unterschiedlich an. Nur in der Probe aus dem Polygonwall in 0 - 5 cm wurden Vertreter anderer Gruppen nachgewiesen, wie die Bande K, die sich einem Methanoxidierer zuordnen lässt und die Bande L, die zu einem häufigen Bodenorganismus *Rhodococcus erythropolis* passt. Im Polygonzentrum wurde die Bande P als *Paucibacter sp.* identifiziert, der zu den Betaproteobakterien gehört und auch häufig in Böden vorkommt.

Tabelle 5.16 Taxonomische Zuordnung der Sequenzen bei 4 °C.

Bezeichnung der DNA Bande	Probenbezeichnung	Jahr	Höchste Übereinstimmung bei Sequenzvergleich	Prozentuale Übereinstimmung
A	Samylov-Kliff 350 / 450 PW 0-5	2004	<i>Nitrosospira 9RS</i>	99%
B	Polygonwall 0 5	2007	<i>Nitrosospira sp</i>	99%
C	Polygonwall 5 - 15	2007	<i>Nitrosospira D11</i>	100%
D	Polygonwall 15 - 25	2007	Alphaproteobakterium	99%
E	Polygonwall 15 - 25	2007	<i>Nitrobacter hamburgensis</i>	98%
F	Polygonwall 15 - 25	2007	<i>Nitrosospira Nsp 1</i>	100%
G	Polygonwall 15 - 25	2007	<i>Athrobacter sp.</i>	99%
H	Polygonzentrum 0 - 5	2007	Alphaproteobakterium	98%
I	Polygonzentrum 5 - 15	2007	Alphaproteobakterium	99%
J	Polygonzentrum 5 - 15	2007	<i>Nitrosospira Nsp 1</i>	100%
K	Polygonwall 0 - 5	2008	Unkultiviertes Methylophilaceae	99%
L	Polygonwall 0 - 5	2008	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	100%
M	Polygonwall 5 - 15	2008	<i>Nitrosospira D11</i>	99%
N	Polygonwall 15 - 25	2008	<i>Nitrosospira Nsp 2</i>	99%
O	Polygonzentrum 0 - 5	2008	<i>Nitrosospira sp</i>	99%
P	Polygonzentrum 5 - 15	2008	<i>Paucibacter sp.</i>	99%
Q	Polygonzentrum 15 - 25	2008	<i>Nitrosospira sp.</i>	99%
R	Kliff 250	2008	<i>Nitrosospira sp.</i>	99%
S	Strand 0 - 5	2008	<i>Nitrosospira sp.</i>	99%
T	Überflutungsebene 5-15	2008	<i>Nitrosospira sp</i>	99%

Insgesamt wurden bei den Anreicherungen bei 4 bzw. 6 °C mindestens 4 verschiedene Vertreter der Gattung *Nitrosospira* nachgewiesen. Außerdem konnten die Bande D, E und H Vertretern der Gattung *Nitrobacter* und im Allgemeinen den Alphaproteobakterien zugeordnet werden. Als heterotrophe Mikroorganismen konnten *Athrobacter*-ähnliche Bakterien oder auch *Paucibacter*-ähnliche Bakterien nachgewiesen werden. In der Abb. 5.37 ist ein Neighbour Joining Stammbaum der Sequenzen aus dem DGGE-Profil dargestellt. Es wurden zusätzlich die ähnlichsten Sequenzen aus der NCBI Datenbank mit zur Berechnung des Stammbaums herangezogen.

ERGEBNISSE

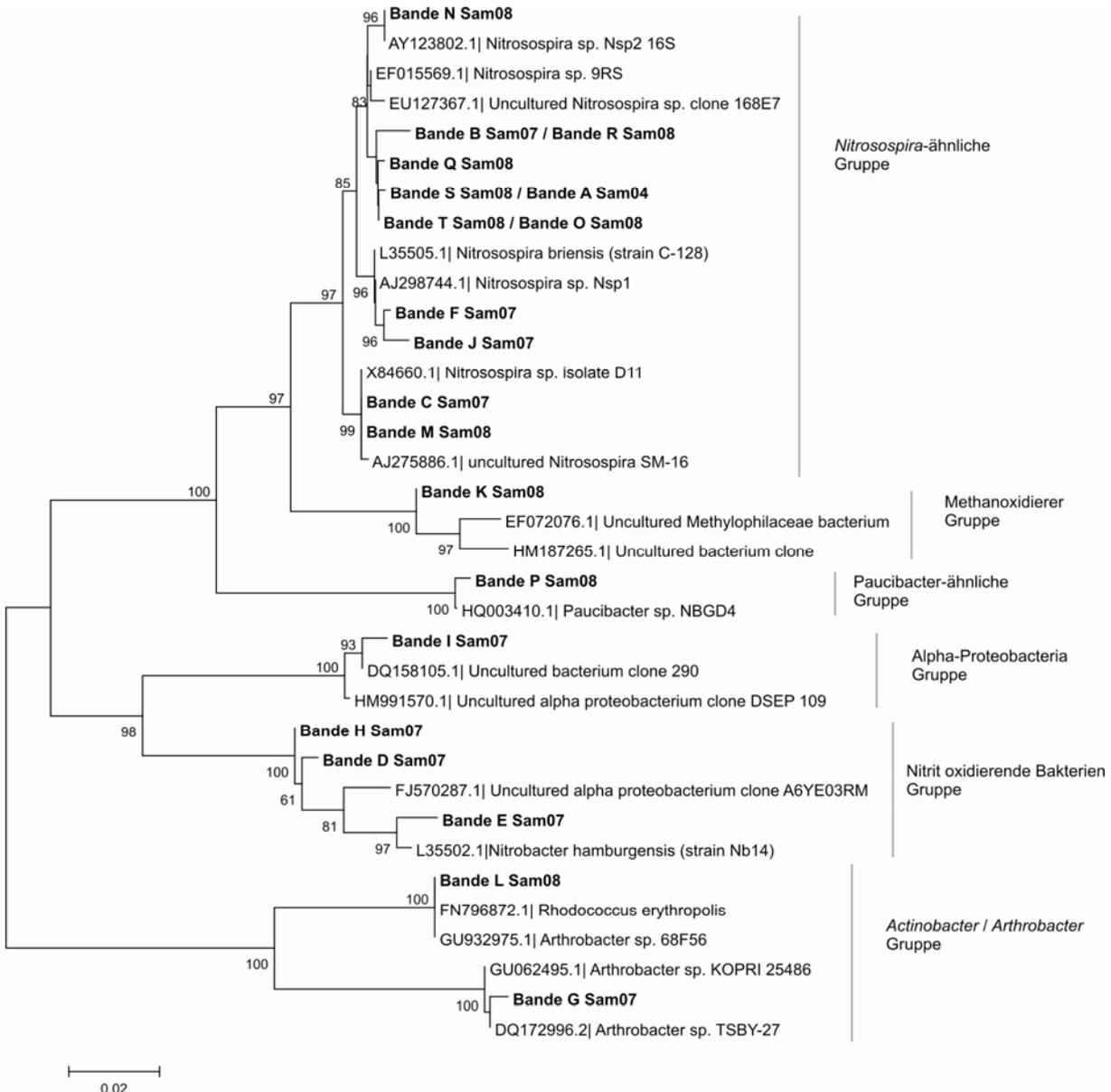


Abb. 5.37 Neighbour Joining Stammbaum der DGGE-Banden aus den Anreicherungen bei 4 bzw. 6°C.

Errechnet wurde der Stammbaum mit der Software MEGA 5 mit einem Bootstrap von 1000. Er basiert auf ca. 460 bp. Zur Berechnung des Stammbaumes diente das Programm Mega 5.

5.8.2 Anreicherungen bei 10 °C

Die Anreicherungen bei 10 °C stammen aus Bodenproben der polygonalen Tundra, die am Polygonwall, Polygonhang und Polygonzentrum im Sommer 2004 entnommen wurden. Der Anreicherungsprozess dauerte bis zu vier Jahre. Die Anreicherungskulturen wurden mittels DGGE untersucht (Abb. 5.38) und ein Teil der Banden wurde sequenziert (Tab.5.17). In der Abb. 5.37 sind Anreicherungen nach 3 Jahren bzw. 4 Jahren aufgezeigt. Nach 3 Jahren Anreicherungsprozess sind noch relativ viele Banden pro Spur vorhanden, wobei jede Bande ein Bakterium repräsentiert. Die oberen Banden wurden keinen Nitrifikanten zugeordnet. Nach 4 Jahren sind deutlich weniger Banden pro Spur erkennbar, gerade im oberen Bereich bildeten sich nur sehr schwach Banden heraus. In fast allen Anreicherungskulturen wird eine Bande auf der gleichen Höhe ausgebildet. Als dominierendes Ammoniak oxidierendes Bakterium (AOB) wurde auch bei dieser Inkubationstemperatur ein *Nitrosospira* identifiziert. Zu Beginn des Anreicherungsprozesses wurde neben Ammoniakoxidanten auch Nitritoxidanten der Gattung *Nitrosospira* (Bande C) mit angereichert. Die Nitritoxidanten gingen aber mit voranschreitendem Anreicherungsprozess verloren. Als heterotrophe Begleitorganismen wurden Vertreter der Gattungen *Arthrobacter* (Bande F), *Actinobacter* (Bande G) und *Flavobacter* (Bande D) identifiziert.

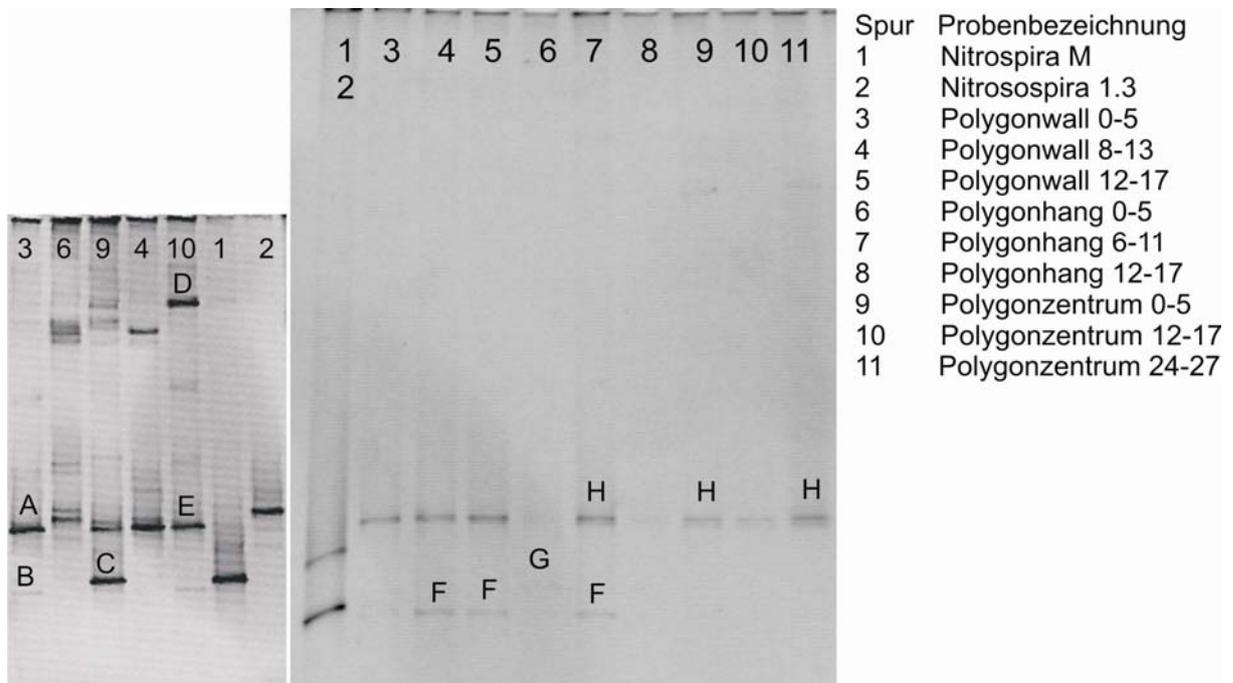


Abb. 5.38 DGGE Profil der Anreicherungen von Ammoniakoxidanten aus einem Polygon.

Links Anreicherung nach 3 Jahren und rechts Anreicherung nach 4 Jahren. Die Kulturen stammen aus dem Wall, Hang und Zentrum des Polygons. Als Referenten wurden *Nitrosospira moscoviensis* und *Nitrosospira 1.3* aufgetragen. Die mit Buchstaben gekennzeichneten Banden wurden sequenziert. Die Zahlen der Probenbezeichnung gegen die Tiefe in cm an.

Die Anreicherungskultur aus dem Polygonwall in einer Tiefe von 12 - 17 cm wurde für weitere Untersuchungen verwendet und charakterisiert. Dazu wurde für phylogenetische Untersuchungen die 16S rRNA Gensequenzen kloniert mit Hilfe des Primersets von LANE, 1991 (Abschnitt 4.9.2) und die optimale Wachstumstemperatur ermittelt.

Tabelle 5.17 Taxonomische Zuordnung der Sequenzen bei 10°C

Bezeichnung der DNA Bande	Probenbezeichnung	Höchste Übereinstimmung bei Sequenzvergleich	Prozentuale Übereinstimmung
A	Polygonwall 0-5	<i>Betaproteobaterium</i>	90%
B	Polygonwall 0-5	<i>Nitrosospira</i>	99%
C	Polygonzentrum 0-5	<i>Nitrosospira</i>	99%
D	Polygonzentrum 12-17	<i>Flavobacter</i>	99%
E	Polygonzentrum 12-17	<i>Nitrosospira</i>	97%
H	Polygonhang 6-11, Polygonzentrum 0-5, Polygonzentrum 24-27	<i>Nitrosospira</i>	99%
F	Polygonwall 8-13, Polygonwall 12-17, Polygonhang 6-11	<i>Arthrobacter</i>	99%
G	Polygonhang 0-5	<i>Actinobacter</i>	99%

5.8.3 Anreicherungen bei 28 °C

Auch die Ammoniakoxidanten Anreicherungskulturen, die bei einer Inkubationstemperatur von 28 °C angereichert wurden, stammten aus der polygonalen Tundra und wurden seit 2005 über einen Zeitraum von mehr als 3 Jahren inkubiert.

In Abbildung 5.39 sind im linken DGGE auf zwei Ebene in den Spuren 3 bis 8 distinkte Banden ausgebildet worden. Für die obere Bande wurde beispielhaft die Bande A reampilifiziert und sie wurde den Nitritoxidanten *Nitrosospira* zugeordnet (Tabelle 5.18). Die Bande B konnte als Ammoniakoxidant *Nitrosospira* identifiziert werden. Nach der Behandlung der Anreicherungskultur mit Natriumchlorat zur Hemmung der Nitritoxidanten, wurden nach weiteren 6 Monaten Inkubation nur noch *Nitrosospira* als Ammoniakoxidant in den Kulturen nachgewiesen (Abb. 5.39 Rechts, Bande E).

Auch bei 28°C Inkubationstemperatur war der dominierende AOB ein Vertreter der Gattung *Nitrosospira*. Die Anreicherung erfolgte anfänglich gemeinsam mit dem NOB Vertreter *Nitrosospira*

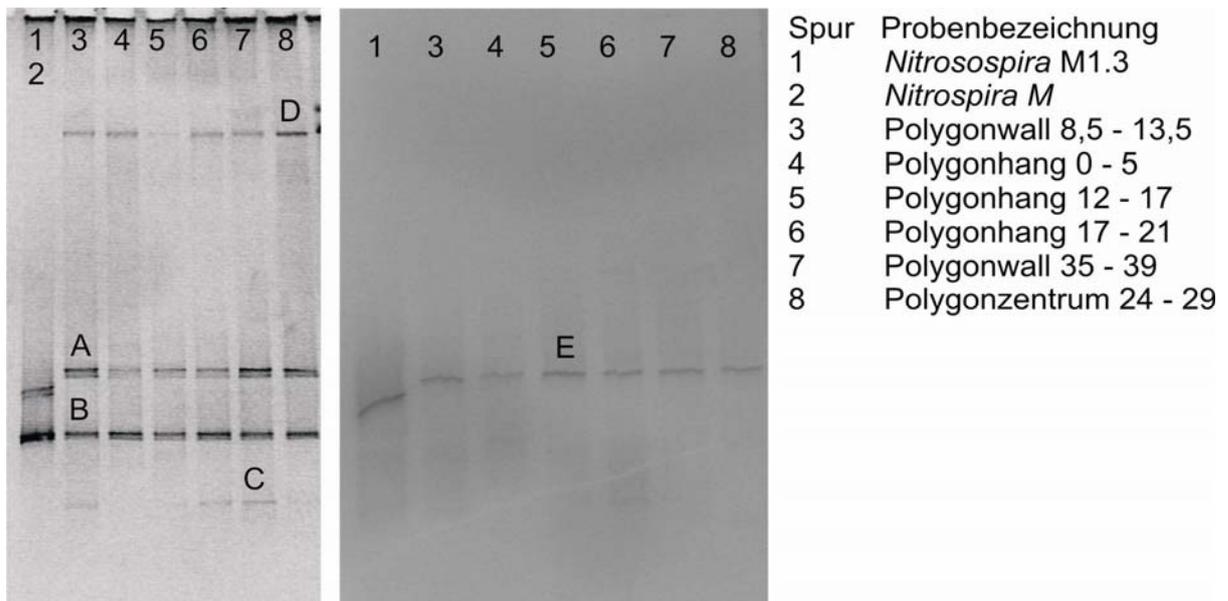


Abb. 5.39 DGGE Profil der Anreicherungen bei 28°C.

Links Anreicherung nach 3 Jahren und rechts Anreicherung nach mehr als 3,5 Jahren. Die Kulturen wurden zwischen den DNA Isolierungen mit Natriumchlorat behandelt, um die Nitritoxidanten zu hemmen. Die Zahlen der Probenbezeichnung gegen die Tiefe in cm an.

Als heterotropher Begleitorganismen wurde wiederum ein Vertreter der *Arthrobacter* (Bande C) identifiziert. Nach der Behandlung mit Natriumchlorat wurde nur noch der AOB angereichert. Die Anreicherungskultur aus dem Polygonhang in 12-17 cm Tiefe, die als *Nitrosospira* identifiziert worden ist, wurde für weitere Untersuchungen, wie Bestimmung des Temperaturoptimums, phylogenetische Analysen oder mikroskopischen Aufnahmen genutzt.

Tabelle 5.18 Taxonomische Zuordnung der Sequenzen aus 28 °C

Bezeichnung der DNA Bande	Probenbezeichnung	Höchste Übereinstimmung bei Sequenzvergleich	Prozentuale Übereinstimmung
A	Polygonwall 8,5 bis 13,5	<i>Nitrosospira</i>	99%
B	Polygonwall 8,5 bis 13,5	<i>Nitrosospira</i>	99%
C	Polygonwall 35-39	<i>Arthrobacter</i>	99%
D	Polygonzentrum 24-29	Betaproteobaterium	90%
E	Polygonhang 12-17	<i>Nitrosospira</i>	99%

5.9 Taxonomie der untersuchten Ammoniak oxidierenden Mikroorganismen (AOM)

Für die taxonomische Einteilung der untersuchten Ammoniak oxidierenden Bakterien und Archaeen wurden die 16S-rRNA-Gene und die *amoA*-Gene als Grundlage für die Berechnung von Stammbäumen benutzt. In Tabelle 5.19 sind die Quellen der benutzten Sequenzen und wie sie ermittelt wurden angegeben. Dabei wurden für den auf dem 16S-rRNA-Gen basierenden bakteriellen Stammbaum die Sequenzen von 4 unterschiedlichen

Anreicherungskulturen benutzt, die vorher durch die DGGE Analysen untersucht wurden. Die Anreicherungskulturen stammen aus unterschiedlichen Böden und wurden bei unterschiedlichen Temperaturen angezogen. Dazu gehören zwei Proben aus dem Polygon: erstens aus dem Polygonwall aus 12 - 17 cm Tiefe und bei 10 °C angereichert, zweitens aus dem Polygonhang auch aus 12 - 17 cm Tiefe und einer Inkubationstemperatur von 28 °C. Die dritte und vierte Probe wurden bei 4 °C angereichert und stammen aus dem Strand aus einer Tiefe von 0 - 5 cm und aus dem Samoylov-Kliff aus einer Tiefe von 350 cm. Für den Stammbaum des *amoA*-Gens stammen die Sequenzen aus der durch RT PCR gewonnen und anschließend klonierten DNA von der Bodenprobe aus dem Auengley in 5 - 15 cm Tiefe und aus der Anreicherungskultur aus dem Polygonhang in 12 - 17 cm Tiefe und bei 28 °C Inkubationstemperatur.

Tabelle 5.19 Naturproben und Anreicherungskulturen für die Taxonomie der AOB und AOA.

Probenbezeichnung	Probenart	16S-rRNA-Gen		<i>AmoA</i> - Gen	
		bakteriell	archaeal	bakteriell	archaeal
Polygonwall12-17 (W12-17)	Anreicherungskultur 10 °C	+			
Polygonhang 12-17 (11)	Anreicherungskultur 28 °C	+		+	(PT RCR)
Samolyov Kliff 350 (3306)	Anreicherungskultur 4°C	+			
Strand 0-5 (CT0811)	Anreicherungskultur 4°C	+			
	Boden		+		+(geforen) +(ungeforen)
Überflutungsebene 0-5	Boden				+
Überflutungsebene 5-15	Boden				+
Auengley Hahnheide 5-15	Anreicherungskultur 18°C		+		+
	Boden			+	+
				(RT PCR)	(RT PCR)

Für die Stammbaumberechnung der Archaeen wurden Sequenzen von Proben aus dem Strand in 0 - 5 cm Tiefe, aus einer Anreicherungskultur bei 4 °C oder direkt aus den Böden gewonnen. Aus Bodenproben aus der Überflutungsebene in 0 - 5 und 5 - 15 cm Tiefe wurde das archaeale *amoA*-Gen benutzt. Aus dem Auengley in der Hahnheide in 5 - 15 cm Tiefe wurden Sequenzen aus Anreicherungskulturen bei 18 °C für archaeale Stammbäume und aus dem Originalboden über Reverse Transkriptase (RT) PCR für die bakteriellen und archaealen *amoA*-Stammbäume.

5.9.1 Taxonomie der AOB

16S-rRNA-Gen basierter Stammbaum

In dem Stammbaum (Abb. 5.40) sind alle *Nitrosospira*-ähnlichen Sequenzen, die aus vier verschiedenen Anreicherungskulturen stammen, mit den bekannten *Nitrosospira* Arten verrechnet.

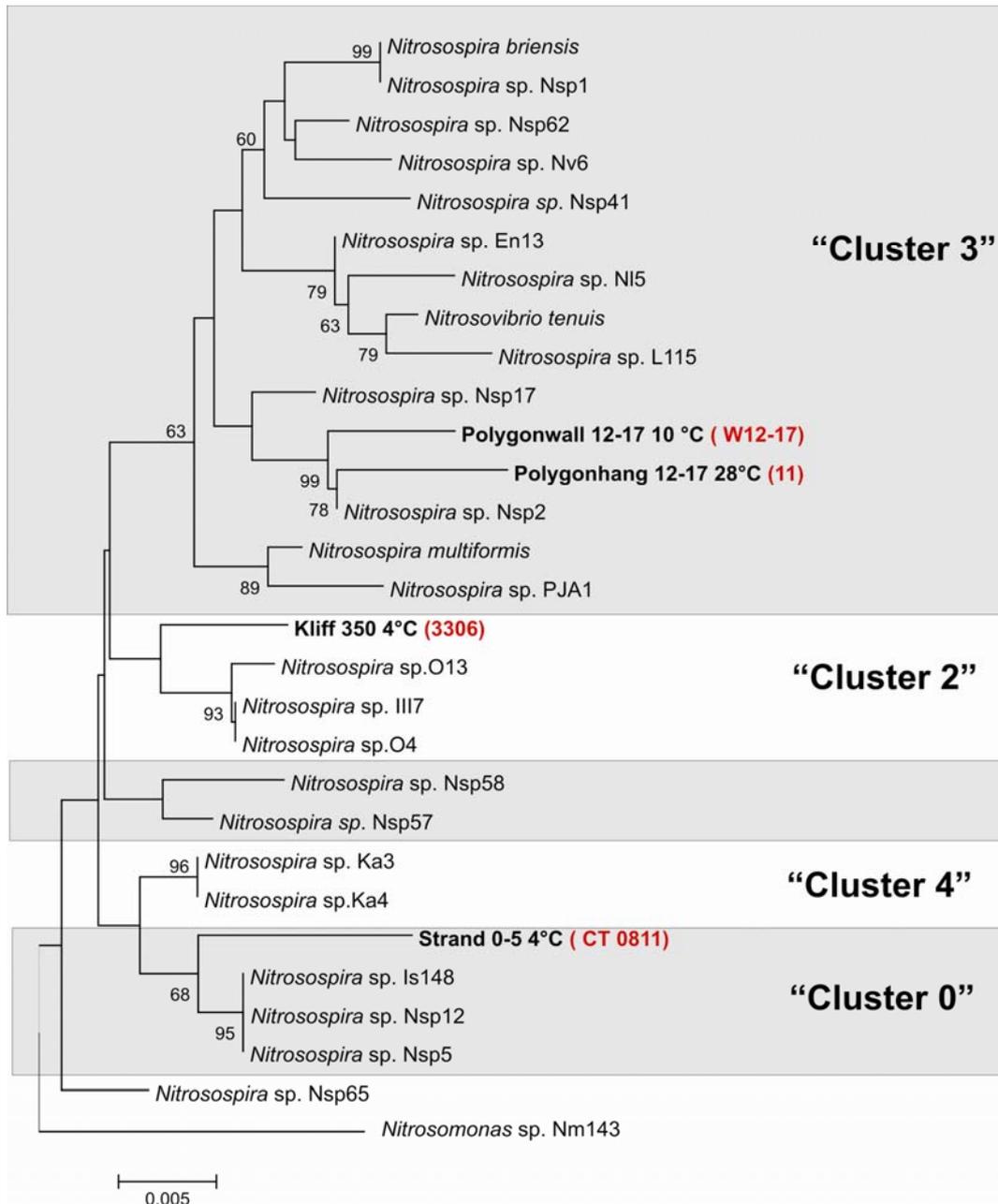


Abb. 5.40 16S-rRNA-Gen basierender Maximum-Likelyhood phylogenetischer Baum der *Nitrosospira*.

Der Baum basiert auf der Einteilung der Cluster der *Nitrosospira* von PURKHOLD 2003. Eingerechnet sind die 16S-rRNA-Gensequenzen der Anreicherungskulturen. Errechnet wurde der Stammbaum mit der Software MEGA 5 mit einem Bootstrap von 1000. Eingerechnet sind 16S-RNA-Gen-Sequenzen von vier Anreicherungskulturen mit 1000 bp.

Es wurden die beiden Kulturen aus dem Polygonwall und Polygonhang, die Kultur aus dem Kliff und die Kultur aus dem Strand ausgewählt, da über die DGGE Analysen und mikroskopischen Untersuchung starke Anzeichen dafür gefunden wurden, dass in diesen Kulturen verschiedene *Nitrospira*-ähnliche Bakterien angereichert worden sind. Der Baum basiert auf der Clustereinteilung von PURKHOLD, 2003. Die vier Anreicherungskulturen stammen aus dem Cluster 0, 2 und 3. Dem Cluster 3 werden die meisten beschriebenen Kulturen zugeordnet. Die Clustereinteilung der *Nitrospira* ist nicht unumstritten, da sie eine sehr große Sequenzähnlichkeit aufweisen. Die Ähnlichkeit liegt bei 96,1 % und ist damit weit enger als bei den *Nitrosomonas*-Arten.

amoA-Gen basierender Stammbaum

In Abbildung 5.41 ist ein *amoA*-Gen basierender Maximum-Likelihood Stammbaum abgebildet, der die Sequenzen enthält, die mit Hilfe der RT PCR ermittelt worden sind. Mit der RT PCR werden nur Sequenzen der Gene erfasst, die zu dem Extraktionszeitpunkt exprimiert waren. Aus der Anreicherungskultur aus dem Polygonhang 12 - 17 cm bei 28 °C wurde der Klon D als ein *Nitrospira*-ähnliches Bakterium nachgewiesen. Die Klone A und C aus der Hahnheide gehören auch zu den *Nitrospira*-ähnlichen Bakterien. Der Klon B war ein *Nitrosomonas*-ähnliches Bakterium. Die *amoA*-Gene der *Nitrospira* bilden keine Subcluster (Purkhold, 2003)

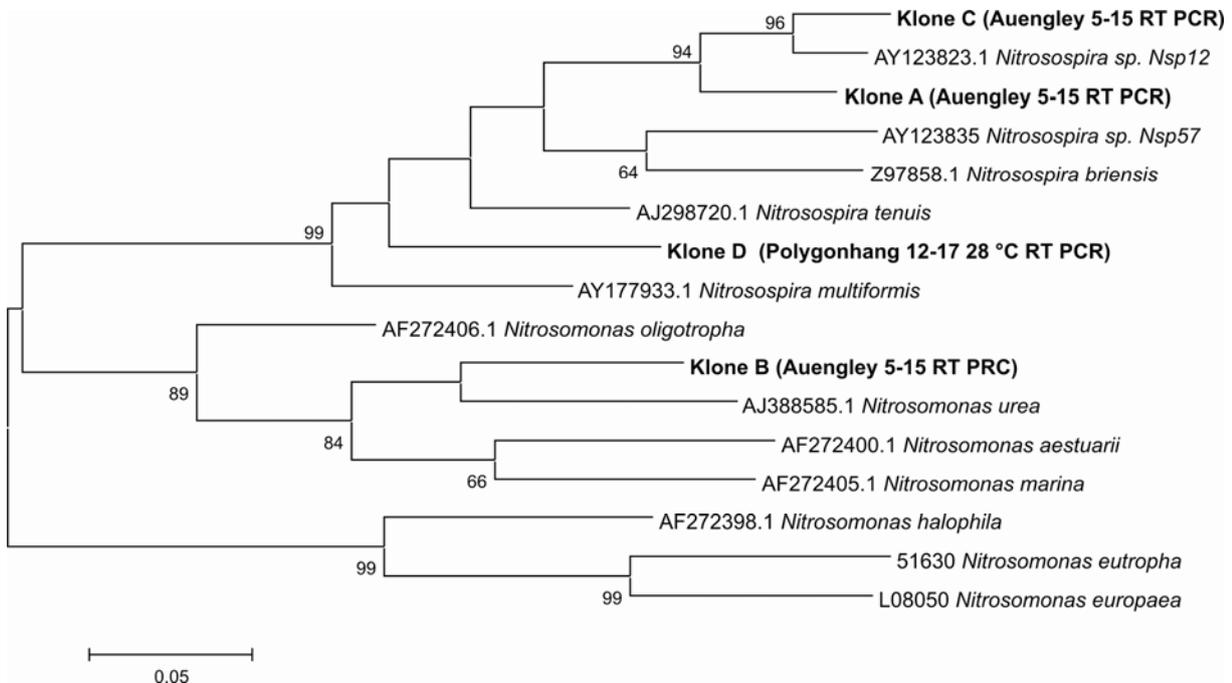


Abb. 5.41 Auf dem bakteriellem *amoA*-Gen basierender Maximum Likelihood Stammbaum. Die eingerechneten Sequenzen stammen aus PT PCR Untersuchungen der Kultur Polygonwall 12-17 cm aus Sibirien und aus dem Boden des Auengleys aus der Hahnheide. Errechnet wurde der Stammbaum mit der Software MEGA 5 mit einem Bootstrap von 1000.

5.9.2 Taxonomie der AOA

In dem Stammbaum (Abb. 5.42) sind die Crenarchaeota-Sequenzen aus der Vergleichsprobe aus der Hahnheide und aus dem Strand aus Samoylov eingerechnet. Die DNA aus der Hahnheide stammt aus der Anreicherungskultur bei 18 °C, die kloniert worden ist. Die Sequenzen der Strandprobe wurden aus der Bodenprobe gewonnen und anschließend kloniert. Alle untersuchten Sequenzen fallen in die Gruppe 1.1.b, die als „Soil-Group“ beschrieben worden ist. Der AOA aus der Hahnheide ist näher verwandt mit dem „*Candidatus Nitrososphaera gargensis*“ als die Proben aus dem Strand aus Samoylov. Diese Klone fallen in Bereiche des Stammbaums, aus dem es noch einen kultivierten Vertreter gibt.

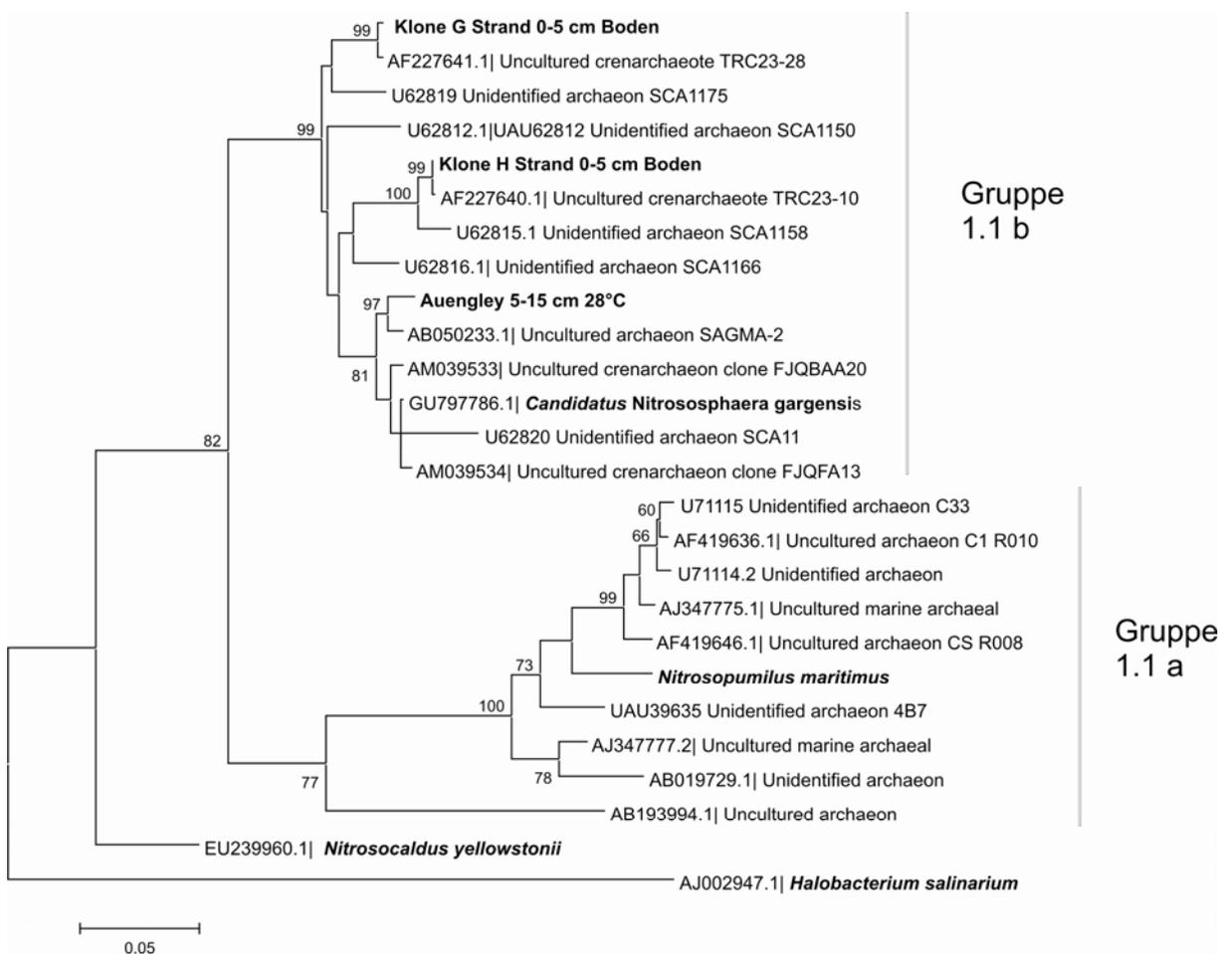


Abb. 5.42 Auf dem 16S-rRNA-Gen basierender Maximum-Likelihood phylogenetischer Baum der AOA.

Errechnet wurde der Stammbaum mit der Software MEGA 5 mit einem Bootstrap von 1000.

Der auf *amoA* basierende Stammbaum der Archaeen (Abb. 5.43) enthält die bekannten Gattungen der Crenarchaeota *Nitrosopumilus*, *Nitrosocaldus* und *Candidatus Nitrososphaera*. Es wurden die Sequenzen aus der Hahnheide mit berechnet, die durch die RT PCR aus dem Boden gewonnen worden sind, d.h. die zum Probenahmezeitpunkt exprimiert waren (Hahnheide RT Klone E und F), zum anderen die *amoA*-Sequenzen aus einer Anreicherungskultur bei 18°C nach der Behandlung mit Ampicilin, auch aus dem

Auengley in 5 - 15 cm Tiefe. Zusätzlich sind noch *amoA*-Sequenzen aus den Böden des Strandes und der Überflutungsebene der Insel Samoylov eingerechnet worden. Die Sequenzen liegen alle in verschiedenen Clustern. Alle Sequenzen liegen in anderen Clustern als die bekannten AOA.

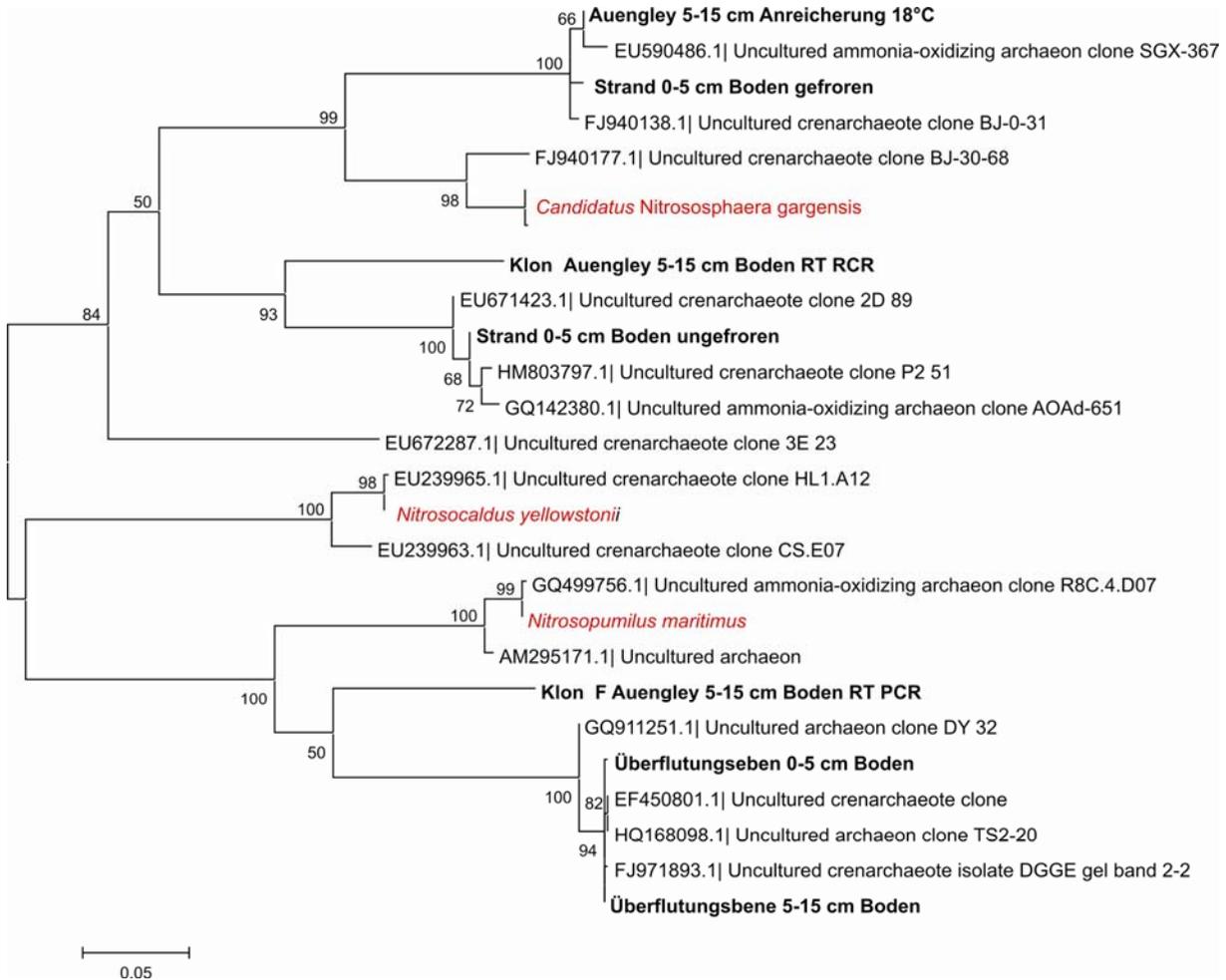


Abb. 5.43 Auf dem *amoA*- Gen basierender Maximum-Likelihood phylogenetischer Baum der AOA.

Die eingerechneten Sequenzen stammen aus PT PCR aus dem Boden des Auengleys aus der Hahnheide. Es wurden *amoA*-Sequenzen aus Böden des Strandes und der Überflutungsebene und aus der Anreicherungskultur der Auengley 5 - 15 cm bei 18°C benutzt. Errechnet wurde der Stammbaum mit der Software MEGA 5 mit einem Bootstrap von 1000. Die Sequenzen hatten eine Länge von 600 bp.

5.10 Charakterisierungen der Anreicherungskulturen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden aus mehreren Bodenproben Anreicherungskulturen angezogen. Die Anreicherungskulturen, die näher beschrieben werden sind in der Tabelle 5.20 aufgeführt. Es ist nicht gelungen, aus diesen Kulturen die Ammoniak oxidierenden Bakterien oder Archaeen zu isolieren. Über die molekularbiologischen Untersuchungen konnten in allen untersuchten Anreicherungskulturen die Ammoniakoxidanten identifiziert werden. In den beiden Kulturen aus dem Kliff, den Proben aus dem Strand auf Samoylov und in der Kultur aus dem Auengley in 5 - 15 cm Tiefe wurden AOB und AOA gemeinsam angereichert. In den Kulturen aus dem Polygon (Wall und Hang in 12-17 cm Tiefe) wurde der Ammoniakoxidant als *Nitrosospira*-ähnliches Bakterium identifiziert. Im Folgenden werden diese Anreicherungskulturen morphologisch und physiologisch weiter charakterisiert. In der Tabelle 5.20 sind die Herkunft, das Beprobungsjahr und die Inkubationstemperatur angegeben.

Tabelle 5.20 Überblick über die untersuchten Anreicherungskulturen.

Probenbezeichnung	Tiefe [cm]	Jahr	Temperatur [°C]	DGGE 16S-rRNA	amoA		EM	IF	FISH	Temperatur-optimum
					AOB	AOA				
3304	Samoylov-Kliff	240-250	2004	4 - 6		+	+	+		
3306	Samoylov-Kliff	350-360	2004	4 - 6	+	+	+	+		+
W0-5	Polygon-wall	0-5	2004	4 - 6		+				+
W 12-17	Polygon-wall	12-17	2004	10	+	+				+
11	Polygonhang	12-17	2005	28	+	+		+	+	+
CT08 11	Strand	0-5	2008	4 - 6	+	+			+	+
CT08 40	Strand	0-5	2008	18		+	+			
HHH 5-15	Hahnheide, Auengley	5-15	2009	28		+	+			+

5.10.1 Morphologische Eigenschaften der Anreicherungskulturen

Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Mit verschiedenen Methoden der Elektronenmikroskopie (EM) wurden die Anreicherungskulturen aus dem Kliff Samoylov in einer Tiefe von 240 - 250 cm und 350 - 360 von 2004 und die Anreicherungskultur aus dem Polygonhang in 12 - 17 cm Tiefe von 2005 untersucht. Die Kliffprobe wurde anhand von DGGE Analysen als *Nitrosospira*-ähnliches Bakterium identifiziert. In der Abbildung 5.44 sind EM Aufnahmen der Anreicherungskultur aus dem Kliff dargestellt.

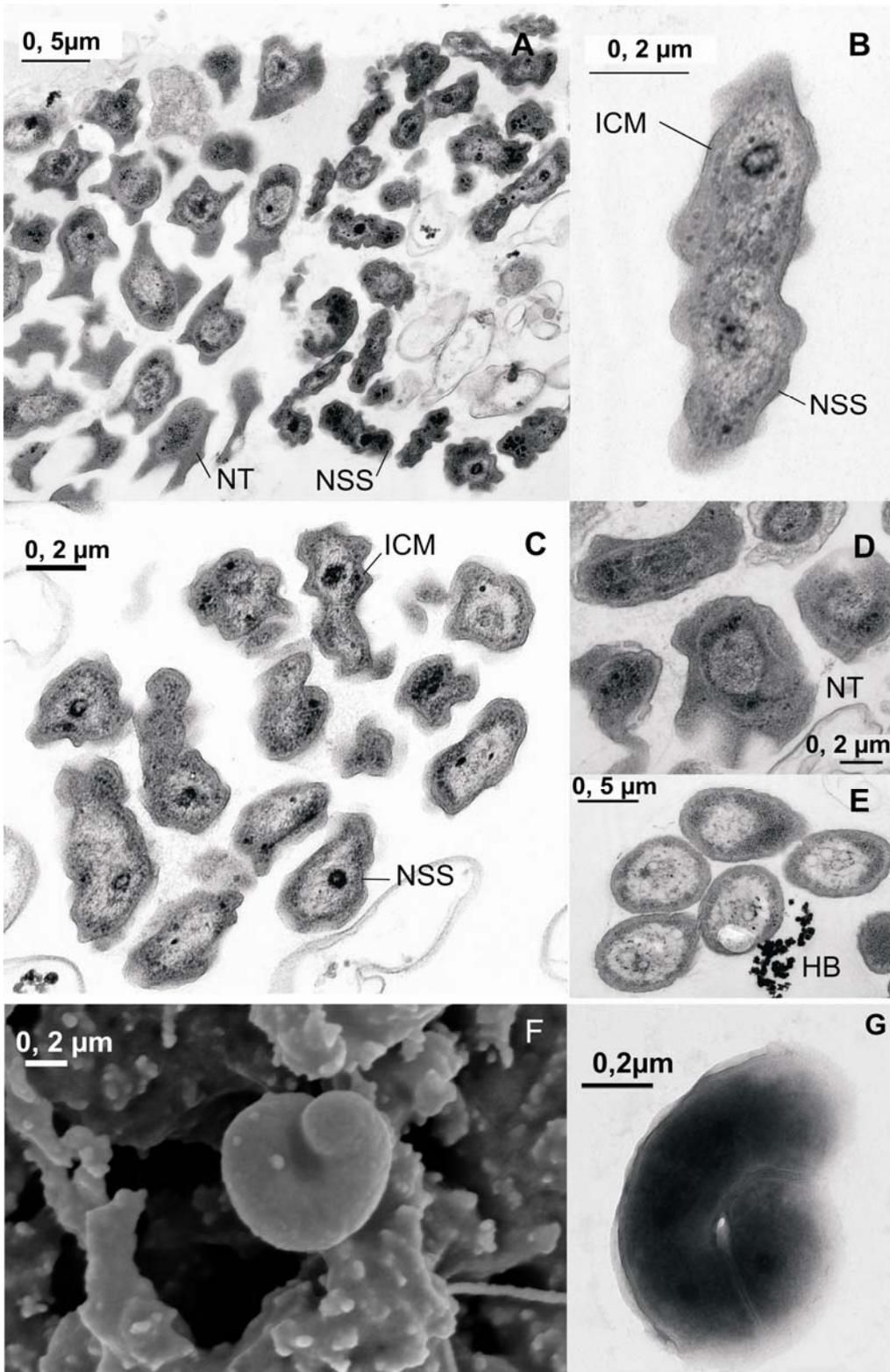


Abb. 5.44 Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Anreicherungskultur aus dem Samoylovkliff

A: Kolonien von rechts *Nitrosospira*-ähnlichen Bakterien und links *Nitrotoga*-ähnlichen Bakterien, B: Großaufnahme eines *Nitrosospira*-ähnlichen Bakteriums, C: Kolonien von *Nitrosospira*-ähnlichen Bakterien, D: *Nitrotoga*-ähnliche Bakterien, E: Vermutlich heterotrophe Bakterien, evtl. *Arthrobacter*-ähnliche Bakterien, F: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des *Nitrosospira*-ähnlichen Bakteriums, G: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme im Negativstain eines *Nitrosospira*-ähnlichen Bakteriums. 22.000 bis 80.000 fache Vergrößerung NSS: *Nitrosospira*-ähnliche Bakterien, NS: *Nitrosospira*-ähnliche Bakterien, NT: *Nitrotoga*-ähnliche Bakterien, HB: Heterotrophe Bakterien, ICM: intercytoplasmatische Membranen

Die Aufnahmen zeigen in den Bildern A, B und C gewundene Stäbchenzellen, die in etwa eine Länge von 1 bis 1,5 μm und einen Durchmesser von ca. 0,2 μm haben. An den Zellwänden weisen die Zellen intercytoplasmatische Membranen (ICM) auf. Diese Zellen können dadurch als *Nitrosospira*-ähnlich Bakterien charakterisiert werden. Die Bakterien lagen in Mikrokolonien vor, die mit extrazellulären polymerischen Substanz (EPS) umgeben war. Im Bild A ist deutlich zu erkennen, dass die Mikrokolonien der Ammoniak oxidierenden und Nitrit oxidierenden Bakterien räumlich nah aneinander lagen. Die Zellen der *Nitrosospira* können aber sehr unterschiedliche Formen annehmen und sich pleomorph verändern (Bild C).

Als Nitrit oxidierendes Bakterium wurde ein *Nitrotoga*-ähnliches Bakterium (Bild D) detektiert. Die *Nitrotoga*-ähnlichen Zellen sind charakterisiert durch ein großes Periplasma und sie weisen keine intercytoplasmatische Membranen (ICM) auf, die z.B. für andere Nitrit oxidierende Bakterien wie *Nitrobacter spec.* charakteristisch sind.

Im Bild F ist eine rasterelektronische Aufnahme der Anreicherungskultur aus dem Samoylov-Kliff 2004 in 350 cm Tiefe nach der Behandlung mit Streptomycin dargestellt. Mit den REM Aufnahmen können Oberflächen der Bakterien sichtbar gemacht werden. In der Abbildung ist ein Spirillen-förmiger Mikroorganismus erkennbar. Der Durchmesser beträgt ca. 0,25 μm breit. Die Länge ist nicht eindeutig erkennbar. Im Bild G sind transmissionselektronische Aufnahmen derselben Kultur dargestellt. Diese ist nach einer Negativkontrastierung entstanden. Sowohl in den REM- als auch in den Negativstain-Aufnahmen sind *Nitrosospira*-ähnliche Bakterien zu erkennen.

Die Anreicherungskultur aus dem Polygonhang in 12 - 17 cm Tiefe von 2005 wurde bei 28 °C angezogen. Wie die DGGE Analysen mit anschließender Sequenzierung ergeben haben erfolgte auch hier eine gemeinsame Anreicherung von einem Ammoniakoxidanten und einem Nitritoxidanten. Der AOB wurde als *Nitrosospira*-ähnlich und der NOB als *Nitrospira*-ähnlich identifiziert (siehe DGGE und Stammbaum Abb. 5.41). In Abbildung 5.45 sind TEM Aufnahmen der Anreicherungskultur zu sehen. Die Bilder A und B zeigen mehrere *Nitrosospira*-ähnliche Zellen, die die typischen Spirillen formen aufweisen. Zusätzlich sind in den Aufnahmen kokkenartige Zellen zu sehen, die eventuell heterotrophe Mikroorganismen sein könnten. In Abbildung C ist ein Aggregat von *Nitrospira*-ähnlichen Bakterien zu sehen, die über EPS zusammengehalten werden.

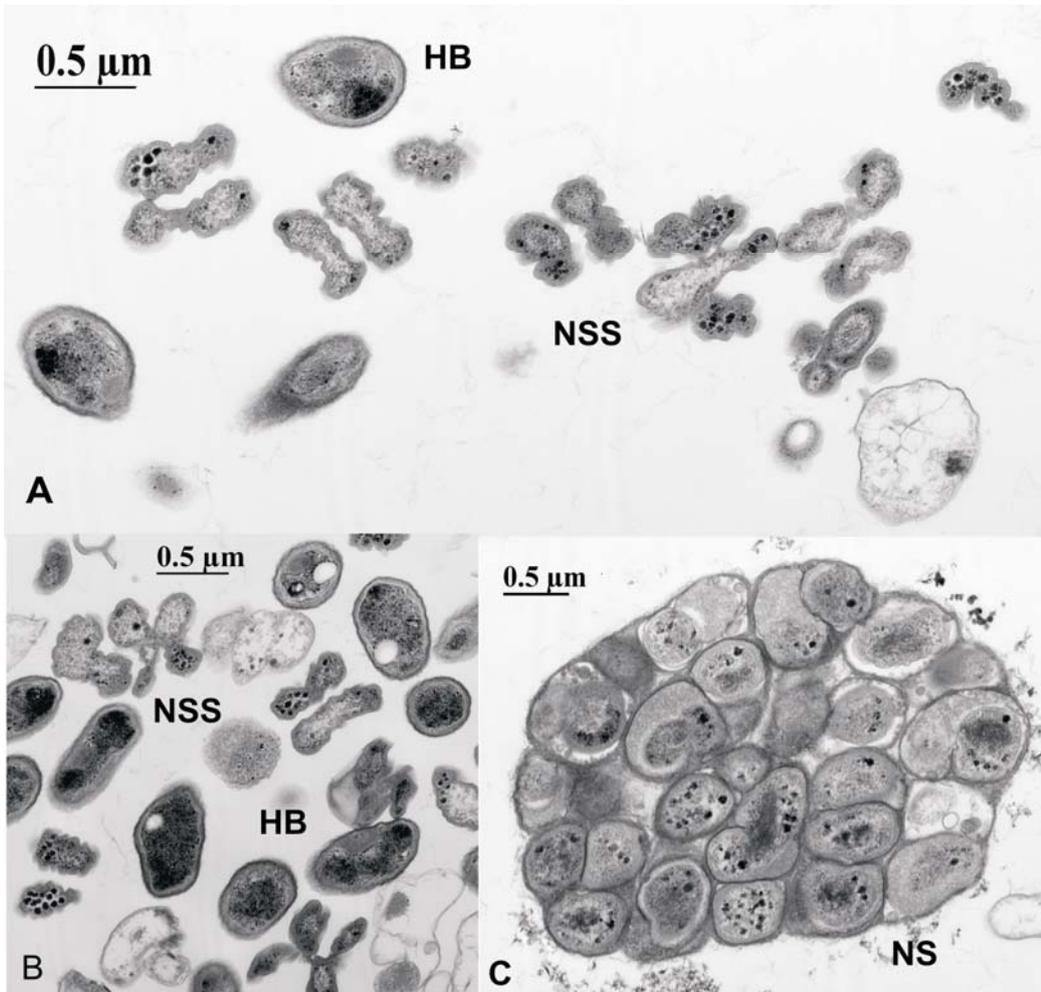


Abb. 5.45 Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Anreicherungskultur aus dem Polygonhang.

A und B: Gemeinsame Aufnahme von *Nitrosospira*-ähnlichen Bakterien und anderen wahrscheinlich heterotrophen Bakterien C: Aggregat von *Nitrosospira*-ähnlichen Bakterien in EPS: 20.000 bis 30.000 fache Vergrößerung. NSS: *Nitrosospira*, NS: *Nitrospira*, HB: Heterotrophe Bakterien.

5.10.2 Lichtmikroskopische Untersuchungen der Anreicherungskulturen

Mit Hilfe der Immunfluoreszenz (IF) Technik sollten die Ammoniak oxidierenden Bakterien in den Anreicherungskulturen identifiziert werden. Dazu wurden fixierte Zellen mit polyklonalen Antikörpern gegen die *amoA*-Untereinheit die Gattung *Nitrosomonas* und mit polyklonalen Antikörpern gegen die *amoB*-Untereinheit behandelt, die alle Ammoniakoxidanten der Betaproteobakterien erfasst (FIENCKE & BOCK 2004). Der *amoA*-Antikörper ist mit einem Cy2 Farbstoff gekoppelt, der grünes Licht emittiert und der *amoB*-Antikörper ist mit einem Cy3 Farbstoff markiert, der rotes Licht emittiert (Abschnitt 4.6).

Anreicherungskultur aus dem Samylov-Kliff aus 2004 in 350 cm Tiefe

In der Anreicherungskultur des Samolyov-Kliffs wurden sowohl Ammoniak oxidierende Bakterien als auch Ammoniak oxidierende Archaeen über das *amoA*-Gen nachgewiesen. Abbildung 5.46 zeigt Aufnahmen dieser Anreicherungskultur, die trotz Behandlung mit Streptomycin Ammoniakoxidation zeigte. Da jedoch keine Zellen mit den *amoA*-Antikörpern gefärbt wurden, sind sie nicht der Gattung *Nitrosomonas* zuzuordnen.

In der oberen Bildreihe ist ein Aggregat von Zellen zu sehen, in dem viele gleichförmige Zellen zu erkennen sind, die auch größten Teils mit dem *amoB*-Antikörper gefärbt worden sind. In 1A sind die Zellen nach der DAPI Färbung gezeigt, DAPI färbt alle intakten Zellen. Die Zellen sind also Ammoniak oxidierende Bakterien. Sie haben einen Durchmesser von ca. 1 μm .

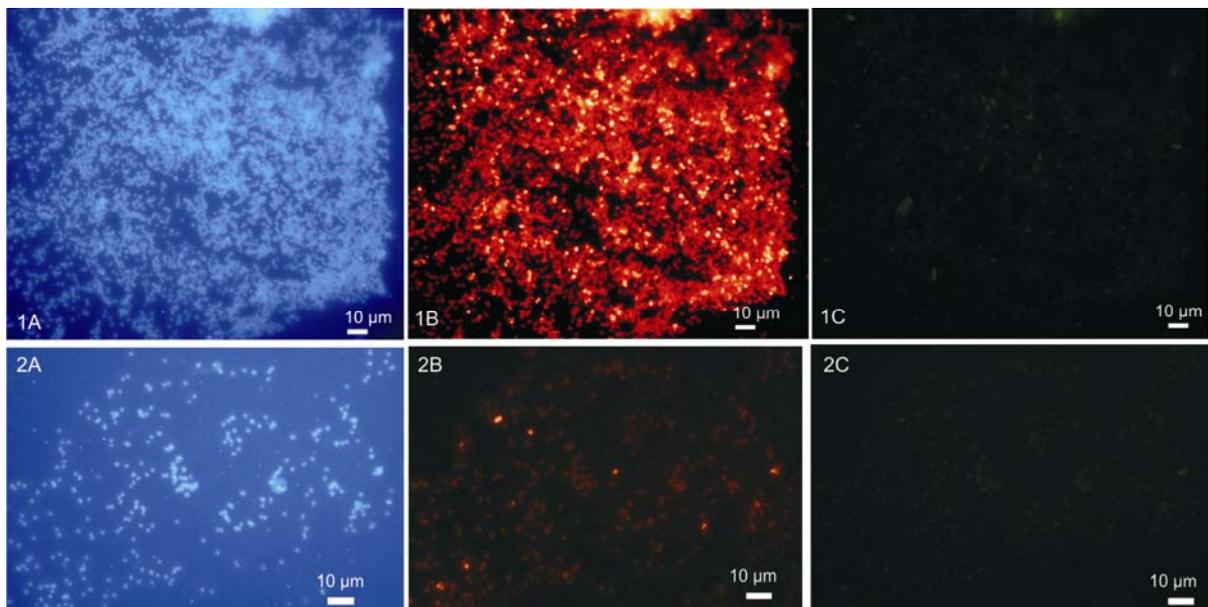


Abb. 5.46 IF Färbung der Anreicherungskultur aus dem Samolyov Kliff.

Färbung mit Antikörpern gegen *amoA* und *amoB*. 1A: DAPI-Färbung eines Zellaggregates der Anreicherungskultur, 1B: IF Färbung mit *amoB*-Antikörper der gleichen Zellen, 1C: IF Färbung mit *amoA*-Antikörper, 2A: DAPI-Färbung von einzelnen Zellen der Anreicherungskultur, 2B: IF Färbung mit *amoB*-Antikörper der gleichen Zellen, 1C: IF Färbung mit *amoA*-Antikörper. Größenbalken 10 μm .

Im unteren Bild der Abbildung 5.46 (2A bis 2C) sind vor allem einzelne Zellen zu erkennen, von denen nur wenige eindeutig mit dem *amoB*-Antikörper gefärbt sind. D.h. die Mehrzahl der Zellen sind keine Ammoniak oxidierenden Betaproteobakterien. Die nicht gefärbten Zellen könnten sowohl Ammoniak oxidierende Archaeen sein, als auch andere z.B. heterotrophe Mikroorganismen, die über Reinheitskontrollen nachgewiesen worden sind.

In Abbildung 5.47 sind die DAPI-gefärbten Zellen aus der Anreicherungskultur aus dem Kliff ohne Zugabe von Streptomycin und nach einer Verdünnung von 10^{-4} zu sehen. Die meisten Zellen wiesen eine gebogene Stäbchenform auf. Einige andere Zellen waren dagegen kurze

nicht gebogene Stäbchen. Diese Flips könnten die schon identifizierten *Nitrosospira*-ähnlichen Bakterien sein (siehe REM- und Negativstain- Aufnahmen).

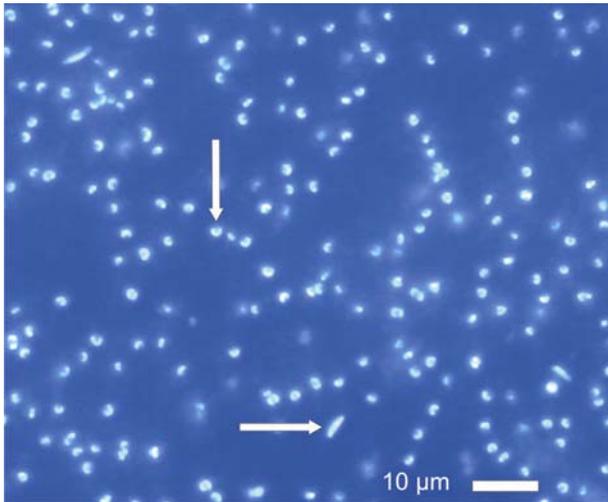


Abb. 5.47 DAPI-Färbung der Anreicherungskultur vom Samoylov-Kliff

Größenbalken 10 μm . Pfeil oben markiert ein gebogenes Stäbchen. Pfeil unten markiert längeres nicht gebogenes Stäbchen. Anreicherung nach einer Verdünnung von 10^{-4} .

Anreicherungskultur aus dem Strand auf Samoylov

Die Abbildung 5.48 zeigt DAPI-Aufnahmen der Anreicherungskultur aus dem Strand in 0 – 5 cm Tiefe und bei einer Inkubationstemperatur von 4 bzw. 6 °C. In der Anreicherung befanden sich nach ca 1,5 Jahren Inkubation noch viele unterschiedlich morphologisch ausgeprägte Zellen. Neben kleinen Kokken und Kurzstäbchen, waren unterschiedlich lange Stäbchen zu erkennen. Einige diese Stäbchen zeigten Begeißelung. Die Bakterien bildeten Flocken und lagerten sich in wahrscheinlich EPS gestützten Konglomeraten zusammen.

Die IF-Färbung ist nicht eindeutig. In Abbildung 5.48 sind Bilder mit DAPI-Färbung und mit den *amoB*-Antikörpern zu sehen. In dieser Darstellung sind auch wieder sehr kleine Kokken, auch im vergrößerten Ausschnitt, zu sehen und sehr lange Stäbchen. Die langen Stäbchen sind alle durch den *amoB*- Antikörper gefärbt worden und scheinen also Ammoniak-oxidierende Betaproteobakterien zu sein. Die ganz kleinen Kokken – mit dem Pfeil gekennzeichnet - sind mit dem *amoB*-Antikörper nicht gefärbt. Es könnte also sein, dass diese kleinen Kokken Ammoniak oxidierende Archaeen sind.

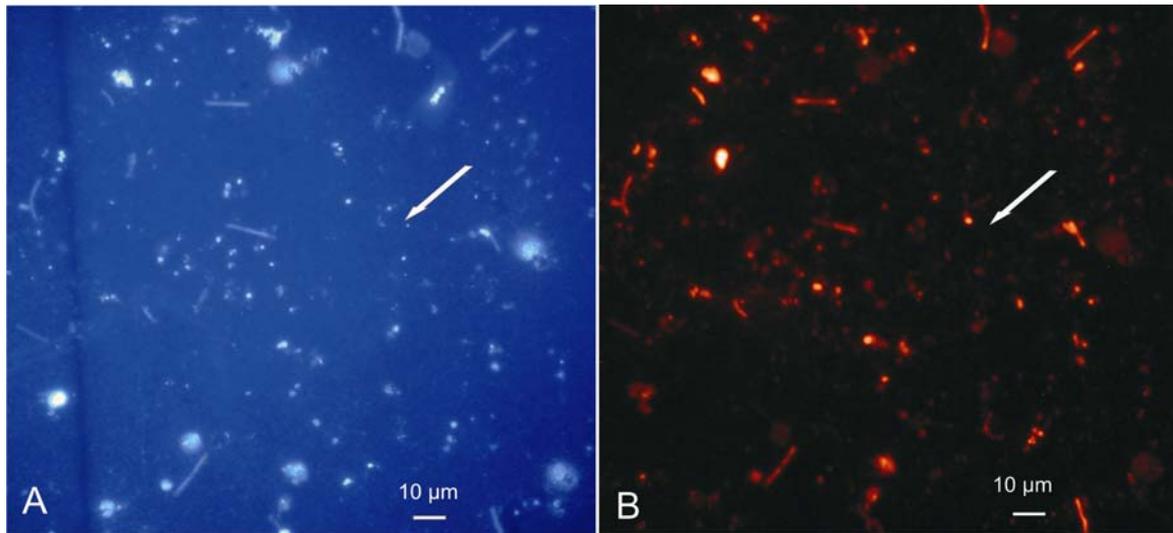


Abb. 5.48 IF Färbung der Anreicherungskultur aus dem Strand.

Färbung mit Antikörpern gegen *amoB*. Inkubationstemperatur bei 4 - 6 °C. A: DAPI-Färbung, B: Rotfluoreszenz gegen die *amoB*-Antikörper. Pfeil markiert eine Kokke, die nicht mit dem Antikörper gefärbt ist. Größenbalken 10 µm.

Anreicherungskultur aus dem Polygonhang in 12-17 cm

Die Anreicherungskultur stammt aus dem Polygonhang in 12 - 17 cm Tiefe und wurde bei 28 °C kontinuierlich seit 2005, also mehr als 4 Jahre angereichert. Mittels DGGE und Sequenzierung wurde der dominierende Ammoniakoxidant als *Nitrosospira*-ähnliches Bakterium identifiziert (Abschnitt 5.7.3). Es wurde kein Ammoniak oxidierendes Archaeon in der Kultur nachgewiesen. In Abbildung 5.49 sind Überblicksaufnahmen der Anreicherungskultur nach DAPI-Färbung und Behandlung mit dem *amoB*-Antikörper dargestellt. Es wurden fast alle DAPI gefärbten Zellen auch durch den Antikörper gefärbt.

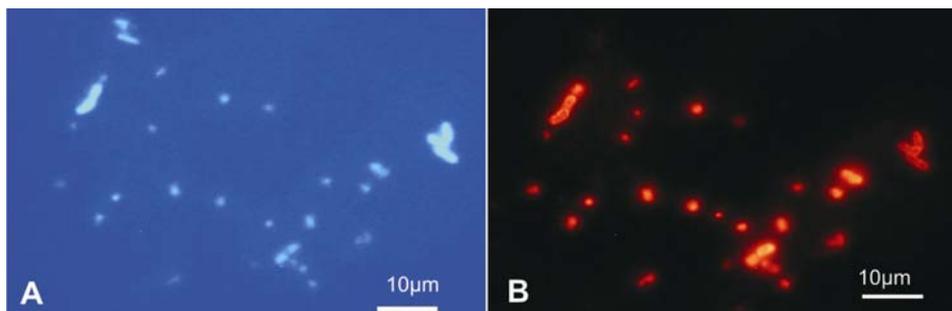


Abb. 5.49 IF Färbung der Anreicherungskultur aus dem Polygonhang.

Färbung mit Antikörpern gegen *amoB*. Je A. DAPI-Färbung, B: Rotfluoreszenz gegen die *B*-Antikörper. Größenbalken 10 µm.

Anreicherungskultur aus dem Auengley in 5 bis 15 cm Tiefe

Die untersuchte Anreicherungskultur stammt aus dem Auengley in 5 - 15 cm Tiefe aus dem Vergleichsstandort Hahnheide im gemäßigten Klima und wurde bei 28 °C fast 1 Jahr inkubiert. In dem Boden wurde sowohl bakterielle als auch archaeale Ammoniakoxidation nachgewiesen (Abschnitt 5.9.1 und 5.9.1) und es wurden über die RT PCR sowohl

Ammoniak oxidierende Bakterien, die zu den *Nitrosospira* und *Nitrosomonas* gehören, als auch Ammoniak oxidierende Archaeen, die in das beschriebene Bodencluster 1.1.b fallen (Abschnitt 5.9.2) detektiert. Die Anreicherungskultur wurde filtriert (\varnothing 0,2 μm) und mit Ampicillin und Vancomycin behandelt. In der Kultur war anschließend nur noch das archaeale *amoA*-Gen nachweisbar und es waren hauptsächlich sehr kleine kokkoide Zellen zu erkennen (Abb. 5.50 A und B), die größtenteils auch mit der Archaea spezifischen FISH-Sonde gefärbt worden sind. Der Durchmesser lag deutlich unter 0,5 μm . Diese Kokken sind wahrscheinlich die Ammoniak oxidierenden Archaeen in dieser Anreicherungskultur. Neben den Kokken waren noch kurze Stäbchen in der Kultur zu sehen, die aber nur weniger als 10 % der Zellen ausmachten. Diese wurde nicht mit der FISH-Sonde gefärbt (Abb. 5.50 C und D).

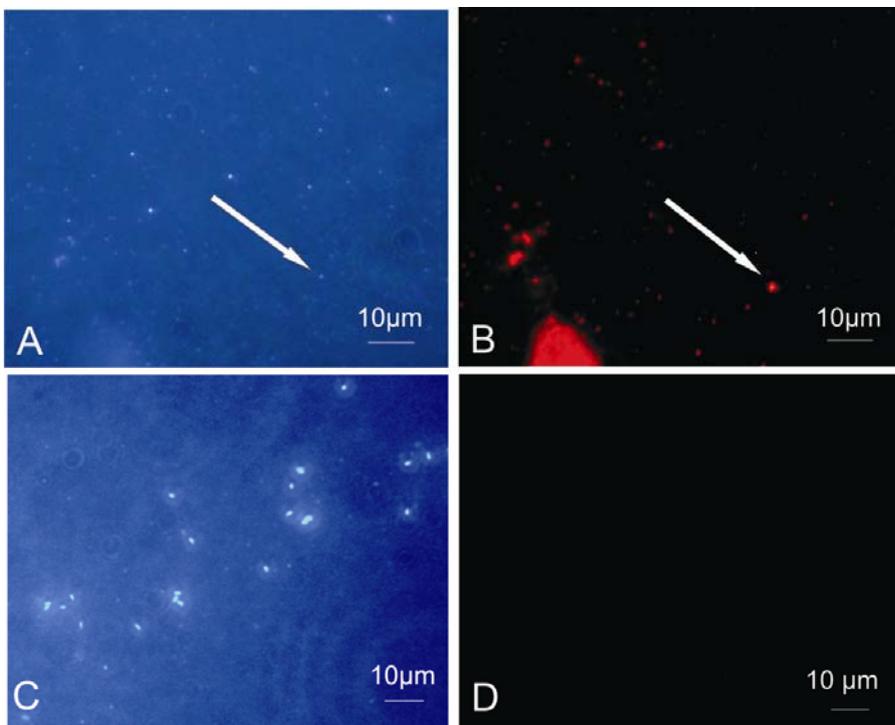


Abb. 5.50 FISH-Färbung der Anreicherungskultur aus dem Auengley.

Als Sonde wurde die ARCH 915 verwendet, die alle Archaeen erfasst. A: DAPI Färbung von sehr kleine Kokken. B: FISH-Färbung der gleichen Zellen. C: DAPI-Färbung von größeren Stäbchen der Anreicherungskultur. D: FISH-Färbung derselben Zellen. Pfeile markieren gefärbte sehr kleine kokkoide Zelle. Vergrößerungsbalken 10 μm .

5.10.3 Temperaturanpassung als physiologische Eigenschaft der AOM

Die angezogenen Anreicherungskulturen sollen anhand ihrer Temperaturanpassung genauer charakterisiert werden. Mit dem Temperaturoptimum und der Anpassung an die kalten Temperaturen kann eingeschätzt werden, ob die angereicherten Ammoniakoxidanten auch im natürlichen Habitat von Bedeutung sind. Dafür wurden die Anreicherungskulturen (Tabelle 5.19), die bei 4 – 6 °C angereichert wurden, aus dem Polygonwall 0 - 5 cm, Strand 0 - 5 cm und Samoylov-Kliff 350 cm, untersucht. Außerdem wurde die Anreicherungskultur aus dem Polygonwall 12 – 17 cm, die bei 10 °C angereichert wurde und die Kultur aus dem Polygonhang 12 - 17 cm, die bei 28 °C angereichert wurde analysiert. In allen Anreicherungskulturen außer dem Polygonwall 0 - 5 cm wurden *Nitrosospira*-ähnliche Bakterien als AOB charakterisiert (Abschnitt 5.9.2). Das Optimum wurde anhand von Nitritbildung innerhalb von bis zu 6 Wochen bestimmt (Abschnitt 4.6.4).

Anreicherungen bei 4 bis 6 °C

In Abbildung 5.51 sind die Graphen der Temperaturanpassungen der Anreicherungskulturen angegeben. Im oberen Abschnitt A sind die angegeben, die bei 4 – 6 °C angereichert wurden. Die Kultur aus dem Strand (Rote Kurve), die mehr als 1,5 Jahre bei 6 °C angereichert wurde, zeigt ein sehr enges Temperaturspektrum. Das Optimum liegt bei 24 – 27 °C, das Minimum liegt in diesem Ansatz bei 13 °C. Die Kulturen aus dem Polygonwall 0 - 5 cm (grüne Kurve) und die Kultur als dem Kliff in 350 cm Tiefe (blaue Kurve) wurden mehr als 5 Jahre bei 4 bzw. 6 °C angereichert. Der Polygonwall zeigt ein Optimum bei 20 - 26°C und das Kliff bei 17 – 23 °C. Bei 4 °C zeigen sie 5 bzw. 10 % der maximalen Aktivitäten. Alle drei Anreicherungskulturen zeigen bei über 32 °C keine Aktivitäten mehr. Die Temperaturanpassung scheint sich mit Inkubationsdauer zu verbessern.

Anreicherungen bei 10 bzw. 28 °C

In Abbildung 5.51 Abschnitt B sind die Temperaturspektren der Anreicherungskulturen aus dem Polygonwall und Polygonhang aus je 12 - 17 cm, die bei 10 bzw. 28 °C angereichert wurden. Die beiden angereicherten *Nitrosospira* sind laut Stammbaum genetisch sehr eng miteinander verwandt (Abschnitt 5.9.2). Die Kultur aus dem Polygonwall, die bei 10 °C mehr als 5 Jahre angereichert wurde, zeigt ein Temperaturoptimum zwischen 20 und 32 °C, das Minimum liegt ungefähr bei 7 °C, über 34 °C zeigt die Kultur keine Aktivitäten mehr. Im Gegensatz dazu, zeigt die Kultur als dem Polygonhang, die 4 Jahre bei 28 °C angereichert wurde, ein engeres Temperaturspektrum. Das Optimum lag zwischen 21 und 26 °C, das Maximum unter 30 °C, unter 13 °C wurde auch keine Aktivität mehr gemessen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich Ammoniak oxidierende Mikroorganismen bei niedrigen Temperaturen von 4 bis 10 °C anreichern lassen, diese aber ein Temperaturoptimum im mesophilen Bereich über 20 °C haben.

Das angereicherte Ammoniak oxidierende Archaeon aus der Hahnheide zeigte ein Temperaturoptimum deutlich über 25 °C (Daten nicht gezeichnet).

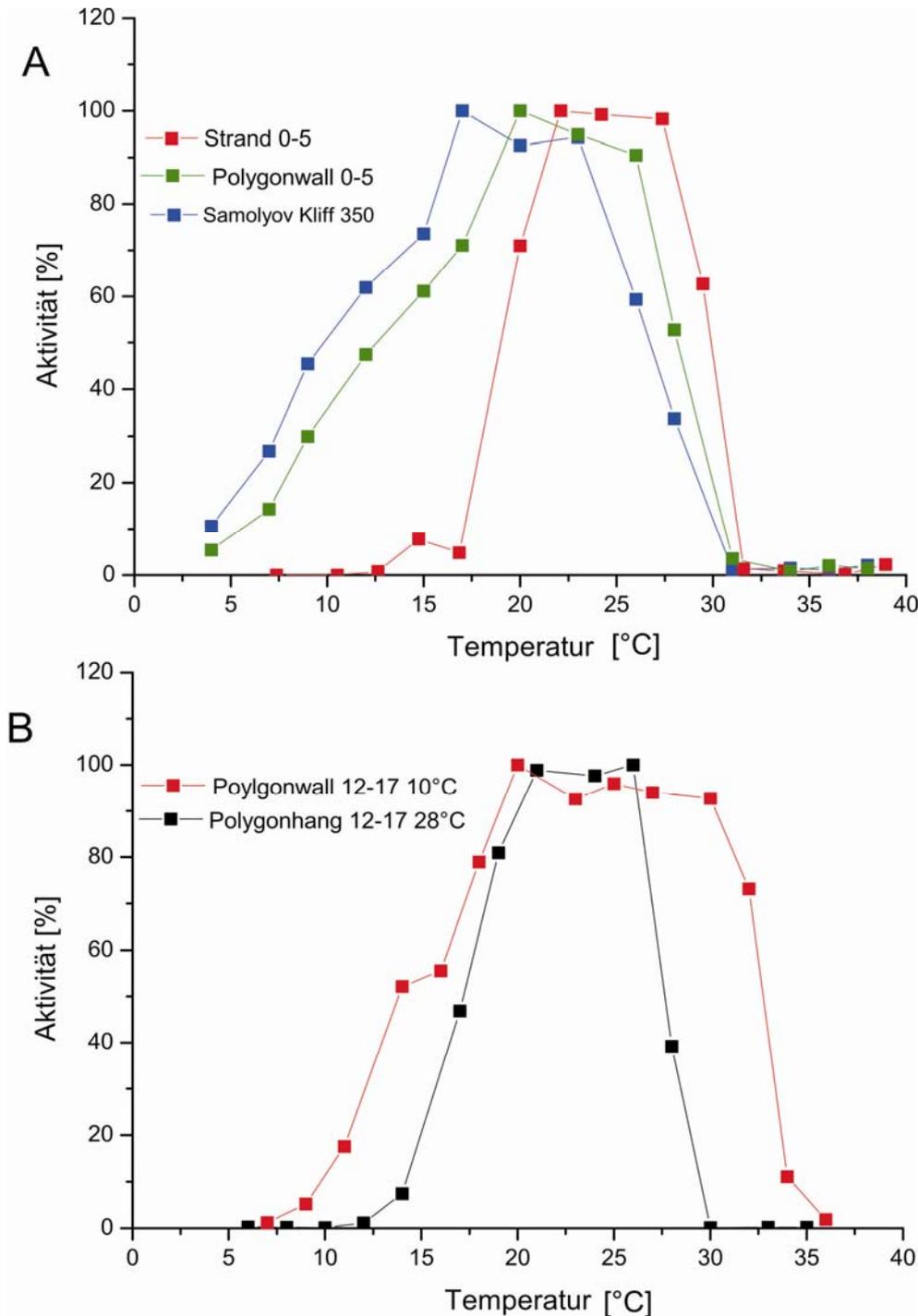


Abb. 5.51 Temperaturoptimum der untersuchten Anreicherungskulturen als Sibirien.
 A Anreicherungskulturen aus dem Strand 0- 5 (rote Kurve), aus dem Polygonwall 0-5 (grüne Kurve), aus dem Samoylov-Kliff 350 (blaue Kurve). B Anreicherungskulturen aus dem Polygonwall 12-17 (schwarze Kurve) und aus dem Polygonhang (rote Kurve). Es sind jeweils die Aktivitäten in % gegen die Temperatur aufgetragen. Aktivitätsbestimmung über maximal 6 Wochen.

5.11 Zusammenfassender Überblick der Ergebnisse

Um einen umfassenden Überblick über die Ergebnisse der untersuchten Bodenproben und Anreicherungskulturen hinsichtlich der Vorkommen und Aktivität der Ammoniak oxidierenden Mikroorganismen zu geben, werden die Charakterisierungsergebnisse noch einmal komprimiert vorgestellt. In Tabelle 5.21 sind die Ergebnisse der untersuchten Bodenproben dargestellt. Angegeben sind die Ammoniakoxidation-Aktivitäten bei unterschiedlichen Temperaturen, die MPN-Zahlen der Ammoniakoxidanten, die Darstellung ob die Identifizierung der AOB oder AOA über DGGE und anschließende Sequenzierungen oder über die *amoA*-Gene nachgewiesen wurden, sowie das ggf. bestimmte Temperaturoptimum. In Tabelle 5.22 sind die Charakterisierungsergebnisse der Anreicherungskulturen aufgeführt. Dabei sind neben der Inkubationstemperatur, sowohl die durch DGGE ermittelten AOB als auch die durch Sequenzierungen des 16S-rRNA-Gens ermittelten AOM angegeben. Zusätzlich ist auch angegeben, ob über das *amoA*-Gen AOB oder AOA detektiert wurden. Außerdem sind die Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchungen dargestellt und die ermittelten Temperaturoptima.

Die höchsten Ammoniakoxidation-Aktivitäten wurden in der jungen Überflutungsebene inklusive Strand und am Samoylov-Kliff ab einer Tiefe von 2,35 cm nachgewiesen, diese passen auch zu den hohen Zellzahlen, die über die MPN-Methode gemessen wurden. In den Böden Samoylovs wurden als dominierende Ammoniak oxidierende Bakterien Vertreter der Gattung *Nitrosospira* nachgewiesen. Es ergaben sich aber auch Hinweise auf bisher unbekannte AOB. In einigen Böden, vor allem den sandigen Böden des Strandes und Überflutungsebene wurden auch Ammoniak oxidierende Archaeen nachgewiesen. Im Samoylov-Kliff konnte die Ammoniakoxidation noch keinen AOM zugeordnet werden. Es gab sogar Schichten in denen Ammoniakoxidation bestimmt wurde, aber kein *amoA*-Gen nachgewiesen e. Dabei ist die Probe aus 470 bis 480 cm hervorzuheben, da diese aus dem Permafrost stammt, deutliche potentielle Nitrifikation zeigt und auch hohe MPN-Zahlen bestimmt wurden. Ein Temperaturoptimum wurde nur für zwei Proben bestimmt: Im Polygonwall lag es zwischen 20 und 32 °C und am Strand zwischen 20 und 35 °C. Dabei könnte das Ammoniak oxidierende Archaeon für die höhere Temperatur verantwortlich sein.

Die Ergebnisse der Untersuchungen der Anreicherungskulturen zeigen deutlich, dass in erster Linie die *Nitrosospira* angereichert werden. Die unterschiedlichen eingesetzten Methoden vervollständigen das Gesamtbild der Ammoniak oxidierenden Mikroorganismen. Die Anreicherungen geben aber nicht unbedingt das Bild der untersuchten Naturproben wider.

ERGEBNISSE

Tabelle 5.21 Gesamtübersicht über die Ergebnisse der untersuchten Bodenproben.

Herkunft	Abkürzungen	Tiefe [cm]	Ammoniakoxidation Aktivitäten ¹ [ng g ⁻¹ TS d ⁻¹]					MPN ₂		DGGE + Sequenzierung		amoA PCR		Temperatur-optimum
			6 °C	18 °C	28 °C	Gesamt	AOA	6 °C	22 °C	AOB	AOA	AOB	AOA	
Polygon-wall Standort 3	PW 0-5	0-5	+	+++	+			3	2	<i>Nitrosomonas</i> (Ns)	1.1b Cluster	+	-	20-32°C
	PW 5-15	5-15	+	++	++			3	3	<i>Nitrospira</i> (Nsp)		+	-	
	PW 15-25	15-25	+	-				1	1			+	-	
Polygon-zentrum Standort 3	PC 0-5	0-5	+	++				2	2			-	-	
	PC 5-15	5-15	-	-				1	0			-	-	
	PC 15-25	15-25	-	-				1	4			-	-	
Fluss-terrasse Standort 4	FT 0-5	0-5	+	++	++			4	4	Kein bekannter	1.1b Cluster	+	+	
	FT5-15	5-15	+	+	++			4	4	Kein bekannter		+	+	
	FT 15-25	15-25	+	+	+			3	3					
Kliff Standort 4	K 150	150	-	++	+			4	4	Kein bekannter		+	-	
	K 150	250	-	++	+			4	3	Kein bekannter				
Strand Standort 6	St 0-5	0-5	+	+++	+++	550	200	4		Kein bekannter	1.1b Cluster	+	+	20-35°C
	St 10-20	10-20	-	+	++			3	3	<i>Nitrospira</i> (Nsp)				
Überflutungsebene Standort 5	ÜE0-5	0-5	+	+++	++			4	4	<i>Nitrospira</i> (Nsp)	1.1b Cluster	+	+	
	ÜE 5-15	5-15	+	+++	+++			4	4	Kein bekannter	1.1b Cluster	+	+	
	ÜE 15-25	15-25	+	+++	+++			5	4					
Samoylov-Kliff Standort 7		60-70	-	+	-			3	4			+	-	
		100-110	-	-	-			1				-	-	
		180-190	+	+	+			2	3			-	+	
		210-220	-	-	-			2	2			-	+	
		235-245	+	+	++			3	3			-	-	
		290-300	+	+++	+++			5	4			-	-	
		335-345	++	++++	++++			4	5			+	+	
		390-400	+	+++	+++			4	5			+	+	
	470-480	++	+++	+++			4	5			-	-		
Hahnheide Auengley		0-5				312	145					+	+	
		5-15				194	123			Ns, Nsp	1.1b Cluster	+	+	
		15-25				-	-					+	+	

1: + unter 100, ++ über 100, +++ über 250, ++++ über 500 [ng g⁻¹TS d⁻¹]. 2: Es sind die Potenzen angegeben

ERGEBNISSE

Tabelle 5.22 Gesamtübersicht über die Ergebnisse der untersuchten Anreicherungskulturen

Probennummer	Herkunft	Tiefe [cm]	Jahr	Inkubations-temp. [°C]	DGGE	amoA PCR		16 S rDNA	EM	IF	FISH	Temperatur-optimum [°C]
						AOB	AOA					
3304	Kliff	240-250	2004	4 – 6	<i>Nitrosospira</i>	+	+		<i>Nitrosospira</i> und <i>Nitrotoga</i> Anreicherungen			
3306	Kliff	350-360	2004	4 – 6	<i>Nitrosospira</i>	+	+	<i>Nitrosospira</i> Cluster 2		Beta AOB		17 - 23
W 0-5	Polygon-wall	0-5	2004	4-6	<i>Nitrosospira</i>	+	-					20 - 26
W 12-17	Polygon-wall	12-17	2004	10	<i>Nitrosospira</i>	+	-	<i>Nitrosospira</i> Cluster 3		Beta AOB		20 – 32
11	Polygonhang	12-17	2005	28	<i>Nitrosospira</i>	+	-	<i>Nitrosospira</i> Cluster 3	<i>Nitrosospira</i> mit <i>Nitrospira</i> Anreicherungen	Beta AOB		21 – 26
CT0811	Strand	0-5	2008	4 - 6	<i>Nitrosospira</i>	+	+	<i>Nitrosospira</i> Cluster 0		Beta AOB		24 – 27
CT0840	Strand	0-5	2008	18		+						
HHH 5-15	Hahnheide Auengley	5-15	2009	28		+	+	Crenarchaeota Cluster 1.1b			Archaeen	

6. DISKUSSION

6.1 Permafrostböden und die Prozesse des Stickstoffkreislaufes

Generell sind der Stickstoffkreislauf und die beteiligten Teilprozesse in arktischen Böden noch nicht ausreichend verstanden. Es ist bisher sehr wenig über die Stickstoffdynamik und ihre Kontrolle durch die bodenbezogenen Steuergrößen in kalter Umgebung und der besonders kurzen Vegetationsperiode bekannt. Daher sind auch nur wenige Daten über die Stickstoffdynamik in der Arktis verfügbar. Einzelne Untersuchungen gibt es in Alaska, Svalbard (Norwegen) und in der russischen Tundra (WEINTRAUB & SCHIMEL 2005, BARDGETT et al. 2007). Für Russland gibt es einige Studien in Westsibirien (GUNDELWEIN 1998, KAISER et al. 2005, MEYER et al. 2006) oder auf der Taimyr Halbinsel (WOLFE et al. 1999). Arbeiten über den Kohlenstoffkreislauf und die Emissionen der Treibhausgase Kohlendioxid (CO₂) und Methan (CH₄), die eine große Relevanz für den Klimawandel haben, standen in den letzten Jahren deutlich mehr im Fokus (IPCC 2001, KUTZBACH et al. 2004, WAGNER et al. 2005, ZIMOV et al. 2006, KNOBLAUCH et al. 2008).

6.1.1 Stickstoffumsätze aufgrund kleinräumige Variabilität der Böden Samoylovs

Die Analyse und Klassifikation der verschiedenen Permafrostböden im Lena-Delta zeigten eine hohe Variabilität der Bodentypen und ihrer Eigenschaften (SANDERS et al. 2010), was ein besonderes Merkmal der arktische Tundren ist (TARNOCAI et al. 2009). Obwohl die Insel Samoylov mit 5 km² recht klein ist, repräsentiert sie den östlichen Teil des Deltas. Es gibt zwei große unterschiedliche Landschaftseinheiten in den geomorphologischen Einheiten: die obere Flussterrasse mit der polygonalen Tundra und die tiefer gelegene Überflutungsebene. Die Böden dieser Einheiten weisen unterschiedliche Eigenschaften bei der Körnung, Porung, Dichte, Gehalt an organischer Substanz und Wasser auf. Die Böden der Flussterrasse, speziell die *Historthels* der Polygonzentren, besitzen einen hohen Anteil an organischer Substanz. In den Polygonzentren wird Torf akkumuliert, der mit mineralischer Substanz durchsetzt ist. Von Torf wird nur dann gesprochen, wenn der Kohlenstoffanteil über 15 % liegt. Der Torfanteil in den untersuchten Böden ist aber nicht so hoch. Das führt zu einer Klassifizierung der Böden als *Typic Historthel* und nicht als ein *Typic Fibristel*, die nach US Soil Taxonomie einen Organikanteil von über 80 Volumenprozent in den oberen 50 cm aufweisen müssten. Die Ursache für den höheren Mineralanteil im Polygonzentrum ist eine gelegentliche Überschwemmung durch Hochfluten der Lena während des Frühjahrs. Dabei lagert sich frisches sandiges Sediment ab, wodurch der Torfanteil der Böden sinkt. Ebenso kommen äolische Feinsandablagerungen als weitere Quelle für Mineralpartikel in Frage.

Auch die Böden der Überflutungsebene weisen einen hohen Anteil an organischer Substanz auf, dabei sind aber sowohl die Qualität als auch der Ursprung anders als in der

Flussterrasse. Die organische Substanz der Böden im Polygonzentrum wird *in-situ* durch die Vegetation gebildet und akkumuliert sich als Torf. Die Torfbildung zeigt, dass die Mineralisation durch die vorherrschende Staunässe reduziert ist und deshalb die organische Substanz nicht vollständig abgebaut wird. Das organische Material in der Überflutungsebene ist allochtonen Ursprungs durch Flussumlagerungen. Grundsätzlich ist der Stickstoff in Böden hauptsächlich im organischen Material gebunden, so dass die unterschiedliche Qualität der organischen Substanz in den Böden auch Rückschlüsse auf die Qualität des Stickstoffes zu lassen. In subarktischen Tundraböden in Kanada liegt ca. 70 % des Stickstoffes gebunden vor, ca. 25 % sind gelöste organische Stickstoffverbindungen (DON) wie Aminosäuren und unter 5 % sind gelöste anorganische N-Verbindungen (DIN) (BUCKERIDGE et al. 2010).

6.1.2 Verteilung der gelösten anorganischen Stickstoffverbindungen (DIN)

Das verfügbare Ammonium in den Böden Samoylovs stammt hauptsächlich aus der N-Mineralisation und N-Fixierung und kann entweder von Pflanzen und Mikroorganismen zum Aufbau von Biomasse aufgenommen werden oder es wird von nitrifizierenden Mikroorganismen aerob über Nitrit zu Nitrat oxidiert. Eine weitere Möglichkeit des Ammoniumabbaus ist der ANAMMOX-Prozess, bei dem Ammonium anaerob mit Nitrit zu N₂ oxidiert wird (STROUS et al. 1997). Allerdings ist bis jetzt noch nicht geklärt, ob dieser Prozess auch in Permafrostböden abläuft und wenn ja, welchen Anteil er an der Ammoniumoxidation einnimmt (MARGESIN & PENTON 2009). Die untersuchten Böden unterscheiden sich hauptsächlich in ihrem Wassergehalt und somit in der Sauerstoffverfügbarkeit, dem Gehalt an organischer Substanz und der Vegetationsbedeckung. Ammonium wurde während der Vegetationsperiode nur in den Böden mit anaeroben Bedingungen wie dem Polygonzentrum gefunden. In diesem war, außer in den obersten 5 cm, keine potentielle Nitrifikation messbar und es wurden relativ hohe Methan-Konzentrationen nachgewiesen (KUTZBACH et al. 2004), allerdings konnte eine hohe potentielle Mineralisationsrate unter aeroben Bedingungen bestimmt werden (siehe 5.4.). Es bildeten sich neben DIN auch hohe Konzentrationen an gelösten organischen Stickstoffverbindungen (DON) im Polygonzentrum während der aeroben N-Mineralisationsbestimmung. Die organische Substanz des Polygonzentrums scheint also unter aeroben Bedingungen gut abbaubar zu sein (siehe 5.4.).

Im Gegensatz dazu nahm in den sauerstoffreichen, sandigen bzw. sandig-lehmigen Böden des Strandes und der Schichten am Kliff unterhalb der Flussterrasse die Ammoniumkonzentration über die Vegetationsperiode ab. In diesen Bodenproben wurden sehr hohe Nitrifikationsraten (siehe 5.5.1) gemessen und es existiert keine Vegetationsbedeckung (siehe 5.1.2). Es ist offensichtlich, dass die Verfügbarkeit des

Ammoniums von dem Gehalt an organischer Substanz abhängig ist. In den Böden und Horizonten mit höherem Anteil an organischer Substanz wurde als Produkt der N-Mineralisation Ammonium gemessen.

Die beiden *Typic Psammorthels* der Flussterrasse und der Überflutungsebene zeigten sehr niedrige Ammoniumkonzentrationen über die Vegetationsperiode. In der Überflutungsebene konnten dafür aber geringe Mengen an Nitrat gemessen werden, was sowohl mit der höheren Mineralisationsrate als auch mit der höheren potentiellen Nitrifikation zu erklären ist. In der Flussterrasse war der Gehalt an organischer Substanz geringer. Sowohl der C_{org} -Gehalt als auch die Ammoniumkonzentrationen nahmen generell mit der Tiefe ab.

Da Nitrit ein Zwischenprodukt der Nitrifikation bzw. der Denitrifikation ist, wird es normalerweise nur in Spuren in aeroben Habitaten detektiert (KNOWLES 2000). In Studien werden daher nur sehr selten Nitritkonzentrationen quantifiziert (BURNS et al. 1995, 1996). Das Nitrit akkumuliert, wenn der zweite Schritt der Nitrifikation, die Nitritoxidation, gehemmt ist oder sie langsamer als gewöhnlich abläuft. Dies geschieht z.B. durch geringeren Sauerstoffpartialdruck in Böden mit einem hohen Wassergehalt oder in basischer Umgebung (PHILIPS et al. 2002). Nitrit kann sich auch bei nicht vollständiger Denitrifikation anreichern (SMITH 1997). Hohe pH-Werte und hohe Ammoniumkonzentrationen können Nitrit oxidierende Bakterien selektiv hemmen und führen so zu einer Akkumulation des Nitrits (SMITH 1997). In dieser Arbeit wurde Nitrit in allen untersuchten Böden in Spuren nachgewiesen. Es konnte keine eindeutige Ursache für das Auftreten von Nitrit festgestellt werden.

Nitrat wird nur als Endprodukt der Nitrifikation nachgewiesen, da es keine Deposition von Nitrat über die Lena in die Böden Samoylovs gegeben hat. Im Flusswasser der Lena konnten an verschiedenen Beprobungstagen aus 2007 bis 2009 keine messbaren Nitratkonzentrationen nachgewiesen werden. Die Nachweisgrenze lag hier bei 0,1 mM (Daten werden nicht gezeigt). Daher kann Nitrat in den Böden nur akkumulieren, in denen (1) Ammonium durch Mineralisation der organischen Substanz gebildet wird, (2) Nitrifikation stattfindet, (3) der Verbrauch des Nitrates durch Denitrifikation gehemmt ist und (4) die Aufnahme über Assimilationsprozesse nicht oder nur in geringem Maße stattfindet. Die höchsten Nitratkonzentrationen wurden in den alluvialen Böden der jungen Überflutungsebene inklusive Strand und in den Schichten des Kliffs, in denen auch die höchste potentielle Nitrifikation ermittelt wurde, nachgewiesen. In den Böden mit Vegetation wurde nur zu Beginn der Vegetationsperiode Nitrat detektiert, da das gebildete Nitrat sofort von den Pflanzen aufgenommen wird und deshalb nicht mehr nachweisbar ist. Während der Phase des Auftauens kommt es zu Beginn der Vegetationsperiode zu einer Auswaschung von Nährstoffen und N-Verbindungen aus den Permafrostböden (SCHMIDT et al. 2007). Dass

Nitrat gebildet wird, zeigen die Werte der potentiellen Nitrifikation, die in allen Böden mit Ausnahme der wassergesättigten Polygonzentren gemessen wurde. Im Gegensatz dazu findet Nitratakkumulation in den sauerstoffreichen Böden ohne Vegetationsbedeckung im Strandbereich statt. Als mögliche Ursachen sind die hohen N-Mineralisationsraten, die potentielle Nitrifikation oder fehlende Stickstoffaufnahme zu nennen und es lassen sich keine Hinweise auf Denitrifikation finden. In den obersten Bodenlagen des Strandstandortes akkumuliert sogar so viel Nitrat (~ 130 mg/l oder $\sim 90 \mu\text{g g}^{-1}$ TS), dass der Trinkwassergrenzwert von 50 mg/l überschritten wurde.

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass DIN verfügbar und in allen Böden Samoylovs in unterschiedlicher Zusammensetzung nachweisbar ist. DIN war aber hauptsächlich als Ammonium messbar. Die Nitritkonzentrationen waren im Allgemeinen sehr gering und Nitrat wurde nur in Böden ohne Vegetation angereichert.

6.1.3 N-Limitierung in den Permafrostböden

ABER (1992) bezeichnet ein Ökosystem als Stickstoff-limitiert, wenn unter anderem 100 % des verfügbaren anorganischen Stickstoff als Ammonium vorliegt, die Böden ein hohes C/N-Verhältnis haben und wenn eine hohe CH_4 -, aber keine N_2O Produktion vorhanden ist. Im Gegensatz dazu sind N-gesättigte Ökosysteme charakterisiert durch hohe N_2O , aber geringe CH_4 Produktion und enge C/N-Verhältnisse. Die DIN liegen hauptsächlich als Ammonium (50 bis 75 %) und nur zu 25 bis 50 % als Nitrat vor. Generell gelten arktische Ökosysteme als N-limitiert und nur geringe Konzentrationen an gelöstem und Gesamtstickstoff sind messbar (SCHIMEL et al. 1996). WEINTRAUB und SCHIMEL (2003) weisen daraufhin, dass auch andere Faktoren wie Bodentemperatur und Feuchtigkeit das Wachstum von Mikroorganismen beschränken können. Zusätzlich ist in arktischen Tundra-Ökosystemen die Nettoprimärproduktion (NPP) generell Nährstoff limitiert (SHAVER & CHAPIN 1980, SHAVER et al. 1998). Deshalb stehen in N-limitierten Ökosystemen Pflanzen und Mikroorganismen im Wettbewerb um die nur wenig vorhandenen Stickstoffverbindungen wie DIN, Aminosäuren oder anderen organischen Stickstoffverbindungen (SCHIMEL & BENNETT 2004).

Für Permafrostböden in den arktischen Tundragebieten des Lena-Deltas ist eine interessante Fragestellung, ob die Prozesse in den Böden N-limitiert sind, oder ob andere Faktoren wie Temperatur oder Bodenfeuchtigkeit einen größeren Einfluss haben. In Anlehnung an die Definition von ABER (1992) sind die Böden der polygonalen Tundra also die *Typic Aquiturbel* des Polygonwalls und die *Typic Historthel* des Polygonzentrums N-limitiert, da nur Ammonium über die Vegetationsperiode messbar war und die C/N-Verhältnisse im Polygonzentrum und in der organischen Auflage des Polygonwalls mit ca. 35 relativ weit waren. Zusätzlich wurden Methanemissionen der polygonalen Tundra berichtet (WAGNER et al. 2003, KUTZBACH et al. 2004).

Im *Psammentic Aquorthel* des Strandes und in den Proben des Kliffs unterhalb des *Typic Psammenorthel* der trockenen Flussterrasse, die keine Vegetationsbedeckung aufweisen, wurde neben Ammonium auch Nitrat nachgewiesen. Der Gesamtkohlenstoff- und Gesamtstickstoffgehalt war deutlich höher und die C/N-Verhältnisse relativ eng, somit war die organische Substanz gut abbaubar. Die Prozesse in diesen Böden sind nicht Stickstofflimitiert, da in erster Linie keine Konkurrenz der Mikroorganismen mit Pflanzen besteht. REPO und Kollegen (2009) haben über große N₂O Emissionen in kryoturbaten Torfböden in Tundragebieten berichtet, die dann entstehen, wenn die Vegetationsbedeckung nicht vollständig vorhanden ist. Da es in der Tundra mehrere Phänomene geben kann, die zur Vegetationslosigkeit führen, wie im Delta an Stränden oder durch sogenannten blanken Torf (REPO et al. 2009), sind diese Beobachtungen wichtig für nachfolgende Abschätzungen der N₂O Emissionen. Interessant ist dabei, dass aus Ökosystemen, die N-limitiert sind, der benötigte Nährstoff eventuell an Hotspots emittiert wird. Hier sind weitere Untersuchungen notwendig, die N₂O-Messungen an den möglichen Emissionspunkten, wie dem Strand oder dem Polygonwall, beinhalten.

Die anderen Böden der Überflutungsebene und der Flussterrassen, die als *Typic Psammorthel* klassifiziert sind, weisen nur geringe Ammoniumkonzentrationen und kein Nitrat auf. Sie haben mit 14 bis 16 ähnliche C/N-Verhältnisse und scheinen daher auch N-limitiert zu sein.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Prozesse der untersuchten Böden mit Vegetationsbedeckung wahrscheinlich stickstofflimitiert sind, speziell die Böden der polygonalen Tundra, die einen Anteil von über 60 % der Böden der Insel Samoylov darstellen (HUBBERTEN et al. 2006). SCHNEIDER et al. (2009) kalkulierten, dass mehr als 28,5 % des Lena-Deltas mit Tundra bedeckt ist, die durch Seggen und Moose dominiert ist, dass 30 % des Deltas aus Wasserkörpern bestehen und dass fast 6 % des Deltas aus Gebieten ohne Vegetation bestehen.

6.1.4 Die Prozesse im Küstenaufschluss am Samoylov-Kliff

Der Küstenaufschluss am Samoylov-Kliff gibt einen Überblick über die abgelagerten Sedimente und die aufgewachsenen Torfschichten während des Holozäns. Sie sind mehr als 3000 Jahre alt (ZIMMERMANN 2006). Die Sedimentabfolgen des Samoylov-Kliffs sind durch abwechselnde Überflutungsereignisse und das Aufwachsen der Torfschichten in der polygonalen Tundra entstanden. In den weniger organikreichen Schichten (unter 5 % C_{org}) verändern sich die Bodenarten mit der Tiefe von reinem Sand (ss) zu lehmigem Schluff (Uls), d.h., dass sowohl der Ton als auch der Schluffanteil zugenommen haben. Die Sedimente der Insel Samoylov sind holozän abgelagert (SCHWAMBORN et al. 2002). Die Umbildung der Bodenarten ist auf Frost- und Kryoturbationereignisse zurückzuführen, d.h. durch Frier- und

Tau-Zyklen werden die Quarze der Sande aufgesprengt. Der eingespülte oder eingewehte Sand kann durch den Torf bis zur Permafrosttafel durchrieseln und sich dort akkumulieren. Dies ist deutlich in den Polygonzentren zu erkennen, wo der C_{org} -Gehalt in der Schicht über der Permafrosttafel deutlich geringer ist, als in den Schichten darüber. Die pH-Werte nehmen mit der Tiefe von schwach sauer bis neutral zu, was auf den steigenden Tongehalt und den sinkenden Anteil an Pflanzenresten zurückzuführen ist.

In den einzelnen Lagen des Kliffs wurden nur geringe Mengen an DIN nachgewiesen, hauptsächlich lag der Stickstoff dort als Ammonium vor. In einigen wenigen Schichten konnte auch Nitrat detektiert werden. Im Kliff wurden geringe aber positive Mineralisationsraten mit $0,05$ bis $0,15 \mu\text{g g}^{-1} \text{ TSd}^{-1}$ nachgewiesen. Das könnte darauf hindeuten, dass *in situ* nur geringe Umsatzraten vorliegen. In anderen Studien in der arktischen Tundra waren die N-Mineralisationsraten deutlich höher, die Untersuchungsgebiete lagen allerdings auch südlicher als das Lena-Delta. So sind zum Beispiel in der kanadischen Subarktis Raten zwischen 12 - $90 \mu\text{g g}^{-1} \text{ TSd}^{-1}$ gemessen worden (BUCKERIDGE et al. 2010). Auf der Gydansky Halbinsel in Russland und in einem Transekt in Westsibirien wurden N-Mineralisationsraten von 5 - $25 \mu\text{g g}^{-1} \text{ TSd}^{-1}$ nachgewiesen (KAISER et al. 2005, MEYER et al. 2006). Die Abhängigkeit der Mineralisation vom Gehalt an organischer Substanz wurde bereits an anderer Stelle hergeleitet. Im Küstenaufschluss korreliert die Mineralisation nicht mit dem C_{org} -Gehalt oder dem C/N-Verhältnis, deshalb hat auch die Qualität der organischen Substanz einen entscheidenden Einfluss auf die N-Mineralisation und die beteiligten Mikroorganismen (BUCKERIDGE et al. 2010).

Die im Labor gemessene potentielle Ammoniakoxidation nahm mit der Tiefe bei einer Inkubationstemperatur von 18 °C bzw. 28 °C zu (siehe 5.5.1). Sie korrelierten deutlich mit der Zunahme des Tongehaltes und dem steigenden pH-Wert. Die Aktivitäten bei einer Inkubationstemperatur von 6 °C nehmen zwar auch mit der Tiefe zu, sie korrelieren aber nur mit dem pH-Wert und nicht mit dem Tongehalt. Die Zunahme der Aktivitäten mit der Tiefe am Küstenaufschluss ist deshalb interessant, da sie in den Böden, die von oben bis zur Permafrosttafel untersucht wurden (Abbildung 3.5. Standorte 1 – 6), mit der Tiefe abnehmen. Hier können mehrere Faktoren eine Rolle spielen: Die Temperatur ist durch den nahen Permafrost wahrscheinlich niedriger, durch die seitliche Sonneneinstrahlung könnte die Temperatur am Kliff zunehmen. Eventuell kann die Sauerstoffverfügbarkeit durch den seitlichen Aufschluss eine Rolle spielen, da der Sauerstoffeintrag auf zwei Wege erfolgen kann, von oben und von der Seite.

Die niedrigen DIN Konzentrationen und N-Mineralisationsraten deuten auf einen niedrigen Umsatz *in-situ* hin. Es scheint aber so zu sein, dass die hohen Ammoniakoxidationsaktivitäten der Mikroorganismen durch den Einfluss der Tongehalte und den neutralen pH-

Werten im Labor stimuliert worden sind. Die mit der MPN-Methode ermittelten Zellzahlen geben keine eindeutigen Hinweise darauf, dass die Aktivitäten mit der Tiefe zunehmen (Abschnitt 5.6), sie nehmen zwar mit der Tiefe zu, die höchsten Zellzahlen wurden aber in der obersten Schicht ermittelt. Die Nitrifikationsraten nehmen mit allgemeinem sinkendem pH-Wert ab (ALLISON & PROSSER 1993), obwohl auch in sauren Böden Nitrifikation beobachtet wurde (DE BOER & KOWALCHUK 2001). Der hohe Tongehalt stimuliert die Nitrifikation, da die Ammoniumionen gut an die Tonminerale gebunden werden können und nach und nach ausgetauscht werden können. Ein positiver Zusammenhang zwischen Ton und Nitrifikation konnte bereits mehrfach nachgewiesen werden (MACURA & STOTZKY 1980, POWELL & PROSSER 1991).

Eine besondere Aufmerksamkeit lag auf der Bodenprobe, die aus gefrorenen Permafrost entnommen wurde, in einer Tiefe von 4,7 bis 4,8 m. Sie zeigte relativ hohe Aktivitäten bei 18 °C und 28 °C, bei 6 °C wies sie die höchste potentielle Aktivität von allem am Kliff genommenen Proben auf. Sie wurde in allen Fällen so behandelt wie die Proben aus den oberhalb liegenden active layer Schichten. Die Mineralisationsraten waren relativ gering. Die durchgeführten Untersuchungen könnten nicht eindeutig klären, ob die Ammoniakoxidanten in diesen Proben nur aktiviert wurden, oder ob sie auch im Permafrost tatsächlich aktiv sind. Es konnte in dieser Probe über das *amoA*-Gen weder AOB noch AOA nachgewiesen werden. Offen bleibt die Frage, ob es sich um ein gänzlich unbekanntes Ammoniakoxidant handelt. Die Proben zeigten insgesamt eine Lag-Phase von höchstens 20 Tagen, aber bei einer Inkubationstemperatur von 18 °C und 28 °C wurde keine Lag-Phase beobachtet. Die lange Transportzeit nach Deutschland könnte als eine Art Regenerationszeit gedeutet werden. Die untersuchten Proben am Kliff zeigen aber deutliche Unterschiede zu Proben, die aus einem Bohrkern auf der Insel stammten. In dem Bohrkern konnten keinerlei Hinweise auf potentielle Nitrifikation gefunden werden. Es scheint, dass die Schichten am Kliff anders beeinflusst sind, als der Bohrkern in der Mitte der Insel. Vielleicht ist im Permafrost bereits eine höhere Sauerstoffverfügbarkeit gegeben und der Boden wird im Sommer wärmer. Das würde darauf hindeuten, dass die Ammoniakoxidanten auch im Permafrost zumindest eine Grundaktivität zeigen.

6.2 Die mikrobielle Diversität in den Permafrostböden

Die verzögerte potentielle Ammoniakoxidationsaktivität in der Permafrostprobe aus dem Kliff lässt darauf schließen, dass sich die AOM *in situ* in einem Ruhestadium ohne Ammoniakumsatz befinden. Die Aktivitäten der Proben aus dem Vergleichsstandort in der Hahnheide zeigten keinerlei Lag-Phase, ihre Ammoniakoxidation startete sofort. Es ist allerdings wahrscheinlich, dass die Ammoniakoxidanten während der Ruhestadiums einen eingeschränkten Reparatur- oder Erhaltungsstoffwechsel aufrechterhalten. Vollkommene

Stoffwechsellinaktivität vermindert die Überlebensdauer von Bakterien im Permafrost, auch von Sporen und Cysten, da so z.B. DNA-Schäden durch die Hintergrund-Gamma-Strahlung aus den Gesteinsmineralen nicht repariert werden können (PONDER 2005). Im Permafrost herrschen dauerhaft Temperaturen von ca. minus 10 °C. Bei diesen Temperaturen wurde in Laborversuchen Aktivität verschiedener Bakterienarten (RIVKINA et al. 2000) und sogar vereinzelt ein sehr langsames Wachstum beobachtet (BAKERMANS et al. 2003, BREEZEE et al. 2004).

Der Stoffwechsel von Bakterien im Permafrost ist zusätzlich durch die extreme Trockenheit des gefrorenen Habitats eingeschränkt. Bei –10 °C existieren nur 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 Ammoniakoxidanten kommt hinzu, dass der sibirische Permafrost ein weitgehend anaerobes Habitat ohne Kontakt zum Luftsauerstoff darstellt (SHI et al. 1997, VOROBYOVA et al. 1997).

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 vermutlich nicht statt, da die Bakterien kaum wachsen (SHI et al. 1997). Im Permafrost lebt wahrscheinlich vielmehr eine „Gemeinschaft der Überlebenden“ (FRIEDMANN 1994, zitiert in VISHNIVETSKAYA et al. (2000)), bestehend aus den Widerstandsfähigsten der ursprünglichen Gemeinschaft vor dem Einfrieren.

6.2.1 Diversität in Permafrostböden

Die Relevanz der Aktivität von Bakterienpopulationen in den dauerhaft gefrorenen Permafrostzonen kann sicherlich anhand der geringen Aktivitäten der angereicherten AOM bei Temperaturen nahe des Gefrierpunktes als sehr niedrig eingestuft werden (GOUNOT 1986, 1991). Dagegen weisen die Auftauhorizonte (active layer) eine große Diversität an AOM auf, gerade im Hinblick auf die prognostizierte globale Temperaturerwärmung und die seit vielen Jahren gemessene Zunahme der Mächtigkeit der saisonalen Auftauzone (HUBBERTEN & SCHIRRMESTER 2006) hat der active layer eine wichtige Funktion für die N-Umsätze in Permafrostböden. Der active layer der untersuchten Böden von Samoylov erreichte Mächtigkeiten von 30 bis 70 cm und kann besonders in den Sommermonaten beachtliche biologische Umsätze generieren (VISHNIVETSKAYA et al., 2006).

Durch Schmelzwasser gelangen die in den Auftauschichten entstandenen Umsetzungsprodukte auch in tiefere Zonen des Bodens. Nach FIEDLER et al. (2004) zeigte ein Boden im nassen Polygonzentrum aus Samoylov bereits in 5 cm Tiefe Redoxpotenziale von -50 bis -150 mV. Diese niedrigen Redoxwerte bestätigen, dass Sauerstoff für die AOM zu einem limitierenden Faktor werden kann. Für den active layer beschrieb KUTZBACH (2006), dass die in diesen Habitaten dominierende *Carex aquatilis* ein ausgedehntes Aerenchymgewebe in den Blättern, Wurzeln und Rhizomen besitzt und daher auch oberflächennahen Sauerstoff in tiefere Zonen der Rhizosphäre bringen kann (KUTZBACH et al. 2007). Dies kann von z.B. Methan oxidierenden Bakterien (MOB) genutzt werden (ZIMMERMANN 2006, LIEBNER et al. 2009), scheint aber für AOM nicht nutzbar zu sein, da in den Polygonzentren keine Oxidation des Ammoniak beobachtet werden konnte. Eventuell stehen die MOB und AOM auch in direkter Konkurrenz.

In Böden wird der Stickstoffkreislauf hauptsächlich von Mikroorganismen kontrolliert. Diese mikrobiellen Gemeinschaften unterscheiden sich in den verschiedenen Tundren z.B. in Alaska (WALLENSTEIN et al. 2007). Die Diversität der Ammoniak oxidierenden Mikroorganismen in den untersuchten Böden Samoylows war auf Gattungsebene nicht sehr hoch. Die AOB gehören vor allem zu der Gattung *Nitrosospira* und es wurden AOA detektiert, die zu den Crenarchaeota zählen. Im Allgemeinen dominiert die Gattung *Nitrosospira* in Böden (KOWALCHUK & STEPHEN 2001) und sie ist ubiquitär in natürlichen Habitaten verbreitet (HIORNS et al. 1995, HASTINGS et al. 1998, WHITBY et al. 1999). Die *Nitrosospira* sind phylogenetisch eine junge Entwicklungslinie (KOOPS & POMMERENING-RÖSER 2001). Es wurden mindestens fünf verschiedene *Nitrosospira*-ähnliche Bakterien über Klonierung in den verschiedenen Permafrostböden gefunden, in der Bodenprobe des Strands (0-5 cm) wurden sogar drei unterschiedliche *Nitrosospira*-ähnliche Bakterien nachgewiesen. (siehe 5.9.1). Mindestens vier verschiedene *Nitrosospira*, die in drei unterschiedliche phylogenetische Cluster fallen, konnten angereichert werden (5.9.2). Nur im Polygonwall wurden *Nitrosomonas*-ähnliche Bakterien direkt im Boden nachgewiesen, die aber nicht angereichert werden konnten. LIEBNER et al. (2008) hatten bereits ähnliche Nitrosomonaden über eine Klonbank nachgewiesen. Der Gattung *Nitrosospira* werden einige Eigenschaften zugerechnet, die für eine gute Anpassung an die speziellen Bedingungen des Permafrostes sprechen. Die Gattung *Nitrosospira* ist z.B. gut an niedrige Substrat- und Nährstoffkonzentrationen angepasst (KLEMEDTSSON et al. 1999, DE BOER & KOWALCHUK 2001). Sie kommen auch in Böden mit sauren pH-Werten vor (DE BOER et al. 1995). AVRAHAMI UND CONRAD (2005) geben an, dass vor allem *Nitrosospira* an die kalte Bedingungen angepasst sind und das Ammoniakoxidanten-Populationen durch Temperatur beeinflussbar sind (AVRAHAMI et al. 2003).

6.2.3 Unterscheidung AOB und AOA

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass beide Organismengruppen - die Ammoniak oxidierenden Bakterien und Archaeen - in den Böden Samoylovs vorkommen. Seit den ersten Hinweisen über die Existenz der AOA sind viele Spekulationen und Arbeiten über ihre Bedeutung für die Nitrifikation und den gesamten Stickstoffkreislauf publiziert worden. Es gibt Untersuchungen, die die bloße Existenz zeigen (LEININGER et al. 2006, HERRMANN et al. 2008), bei anderen Arbeiten stand die Expression des Schlüsselenzym im Mittelpunkt (NICOL et al. 2008, JIA & CONRAD 2009). Aktuell gibt es Publikationen, die versuchen, die Aktivitäten der AOB und AOA zu trennen und Aussagen über die Bedeutung für Ökosysteme zu treffen (TAYLOR et al. 2010). Es sind jedoch noch sehr viele unterschiedliche kultivierungsabhängige und -unabhängige Methoden notwendig, um eindeutig die Aktivitäten und damit die Bedeutung der beiden Gruppen abschätzen zu können. Über die klassischen Anreicherungsverfahren ist eine einfache Trennung kaum möglich. Aber in dieser Arbeit wurden die Anreicherungsbedingungen so verändert, dass zum Beispiel die Substratkonzentration für die AOA Anreicherung auf 0,5 µM deutlich gesenkt (HATZENPICHLER et al. 2008) oder unterschiedliche Spurenelemente im Medium verwendet wurden (persönliche Mitteilung Dr. EVA SPIECK). Da die Morphologie und die Größen der in dieser Arbeit untersuchten AOA (Durchmesser 0,5 µm) und der AOB (Länge 1,5 µm) unterschiedlich sind, kann durch Filtration eine Trennung in der Kultur vorangetrieben werden. Generell sind die bis jetzt beschriebenen AOA kleiner als AOB. Neben der Filtration wurde auch der Einsatz von Antibiotika genutzt, um AOA und AOB voneinander zu trennen. Es wurde neben Streptomycin, was vor allem bei der Bestimmung der potentiellen Nitrifikation eingesetzt wurde, auch die Wirkung von Vancomycin und Ampicillin geprüft. Aber durch keinen dieser Hemmstoffe konnten die Aktivitäten aus Bodenproben einer der beiden Gruppen eindeutig zugeordnet werden. Allerdings konnten bei der Untersuchung der Reinkultur *Nitrosospira multiformis* Aktivitäten trotz Zugabe von Vancomycin und Ampicillin nachgewiesen werden. Ein Antibiotikum, das AOA in ihrer Aktivität spezifisch hemmt, ist noch nicht beschrieben worden. Dabei wurden einige Antibiotika untersucht, die speziell gegen Archaeen wirken (KEMNITZ 2004). Der Einsatz von Antibiotika war aber sehr hilfreich bei der Anreicherung der AOA. So konnte in einer eigenen Anreicherungskultur aus der Hahnheide durch Zugabe von Ampicillin und Filtration der AOA als alleiniger Ammoniakoxidant angereichert werden.

6.2.4 Wer ist wann aktiv? Die Bewertung der RT PCR Ergebnisse

Mit der Methode der Reversen Transkriptase PCR können die zu einem Zeitpunkt exprimierten Enzyme untersucht werden. Diese Methode kann für Anreicherungskulturen oder auch für Umweltproben benutzt werden. Aus den Anreicherungskulturen wird die

Gesamt-RNA isoliert, so dass man alle Enzyme erhält, die zum Wachstum unter den Anreicherungsbedingungen benötigt werden. Die isolierte Gesamt-RNA wird in cDNA umgeschrieben und diese dann als Template für spezifische PCR z.B. des *amoA*-Gens der Archaeen oder Bakterien benutzt. In den untersuchten Anreicherungskulturen aus dem Polygonwall bei 28 °C und einer Kliffprobe aus 3,5 m Tiefe konnte nur das *amoA*-Gen der Bakterien amplifiziert werden (siehe 5.9.2), obwohl in der Kliff-Anreicherungskultur sowohl die bakterielle als auch die archaeale *amoA*-Gene über die DNA nachgewiesen worden sind. Unter den Anreicherungsbedingungen dominierten also die *Nitrosospira*-ähnlichen Bakterien gegenüber den AOA. Das kann ein Grund sein, warum mit den bisherigen Standardmethoden während der Anreicherung und Isolierung der Ammoniakoxidanten immer nur die bekannten AOB nachgewiesen wurden. Es wäre also sinnvoll, hier die Anreicherungsbedingungen nach stärker zu Gunsten der AOA anzupassen, eventuell durch noch niedrigere Substratkonzentrationen, veränderte pH-Wert oder andere Spurenelemente. Die Biochemie der AOA scheint sich von den AOB deutlich zu unterscheiden (WALKER et al. 2010), was dann auch die Anpassung an bestimmte Nischen erklären könnte (ERGUDER et al. 2009).

Mit Hilfe der RT PCR lassen sich nicht nur Aussagen, über die aktiven Mikroorganismen in Anreicherungskulturen machen, sondern auch über die aktiven AOA oder AOB in Böden. Es wurde die Gesamt-RNA aus einer Probe aus dem Auengley vom Vergleichsstandort in der Hahnheide isoliert. Diese Probe wurde ausgewählt, da sie in Vorversuchen die höchste Aktivität zeigte und diese auch in Anwesenheit von Streptomycin fast 50 % der Gesamtaktivität messbar waren und ausmachte (siehe 5.5.4). Nach der RT PCR mit den Primern für das *amoA*-Gen der AOB und AOA gab es ein schwaches Signal für die AOB und ein sehr deutliches für die AOA. Es lag also von beiden Enzymen zu diesem Zeitpunkt die abgelesene mRNA vor. Das Vorhandensein beider exprimierten *amoA* Gene deutet also darauf hin, dass im Auengley sowohl AOB und AOA gleichzeitig aktiv sind, aber eventuell unterschiedliche Nischen besetzt haben. Um die unterschiedliche Dominanz der aktiven AOA und AOB zu untersuchen, wäre eine Bestimmung der Kopien-Anzahl der *amoA*-Gene mit Hilfe der real time PCR notwendig gewesen, was aber im Rahmen dieser Arbeit nicht realisiert werden konnte.

Die größere Abundanz des archaealen *amoA*-Gens wird als Hinweis für eine bedeutendere Rolle der Archaeen bei der Nitrifikation gesehen (SCHLEPER 2010). Die Interpretation dieser hohen Abundanz und die damit eingehende Bedeutung für Ökosystem und den globalen Stickstoffkreislauf muss vorsichtig erfolgen (PROSSER & NICOL 2008). Die bloße Anwesenheit eines funktionellen Gens bedeutet nicht, dass die Funktion auch ausgeführt wird. Das Gen könnte nur unter seltenen Kombinationen von Umweltfaktoren exprimiert werden oder das

Produkt des *amoA*-Gens hat eine alternative Funktion für das Ökosystem für die Ammoniakoxidation, was sowohl für Archaeen als auch Bakterien gelten kann (PROSSER & NICOL 2008).

In diesem Zusammenhang ist die Frage interessant, welche Nischen von den Archaeen besetzt werden können. STOPNISEK et al. (2010) sehen folgende selektive Vorteile für die AOA: Sie kommen dort hauptsächlich vor, wo die Ammoniak-Konzentrationen sehr gering sind und die Hauptquelle des Ammoniums die N-Mineralisation von organischer Substanz ist. Dies sind Böden, die nicht oder nur wenig gedüngt werden, aber einen hohen Anteil an organischer Substanz aufweisen. Die Ammoniakoxidation der AOA kann auch noch bei niedrigem pH-Wert stattfinden. MARTENS-HABBENA et al. (2009) haben nachgewiesen, dass der marine *Nitrosopumilis maritimus* eine sehr hohe Substrataffinität aufweist und daher auch bei niedrigen Substratkonzentrationen oder -verfügbarkeit z.B. durch niedrige pH-Werte noch hohe Umsatzraten erreichen kann. Unterstützung für diese These kommt z.B. von HÖFFERLE et al. (2010), die nachgewiesen haben, dass hohe Ammoniak Konzentrationen die AOB mehr beeinflussen als die AOA. CHEN et al. (2008) fanden heraus, dass Düngung nur einen geringen Effekt auf die AOA hat, die eher durch Wurzelausscheidungen beeinflusst werden, was wiederum auf einen mixotrophen oder heterotrophen Metabolismus hindeutet. Ähnliches beobachteten DI et al. (2010), die im Mikrokosmos nach Zugabe von Harnstoff Wachstum von AOB, aber nicht von AOA, nachweisen konnten.

Es muss berücksichtigt werden, dass die mesophilen Crenarchaeota eventuell potentielle alternative Stoffwechselwege oder Wachstumsstrategien aufweisen. Ihre Abundanz basiert vielleicht nicht auf der Ammoniakoxidation, sondern auf mixotrophen oder heterotrophen Wachstum. Dies würde einer ähnlichen Situation wie bei den Nitrit oxidierenden Bakterien entsprechen, diese weisen auch eine höhere Abundanz als die bakteriellen AOB auf, was auf ihr mixotrophes Wachstum zurückgeführt werden kann (PROSSER & NICOL 2008).

Warum dominieren die AOA nicht auch in der sibirischen Tundra? Nach den Nischenbestimmungen erfüllt das Habitat die meisten Voraussetzungen für eine größere Bedeutung der Ammoniak oxidierenden Archaeen. Das untersuchte Habitat weist nur geringe Mengen an Ammonium auf, die Hauptquelle des Ammoniums ist die Mineralisation, da es keinen Düngereinfluss gibt und der Anteil an organischer Substanz relativ hoch ist. Die pH-Werte sind neutral bis schwach sauer. Aber der entscheidende Faktor, der bisher kaum eine Rolle in den Untersuchungen gespielt hat, ist die Temperatur. Bisher wurden die isolierten oder angereicherten AOA vor allem aus marinen Habitaten (KÖNNEKE et al. 2005) oder geothermalen Habitaten (DE LA TORRE et al. 2008, HATZENPICHLER et al. 2008) gewonnen. An kalten Standorten wurden die AOA bisher vor allem in marinen Proben nachgewiesen (CHRISTMAN 2009) und nur vereinzelt in Böden (OCHSENREITER et al. 2003).

Die AOA scheinen die kalten Temperaturen nicht so gut zu tolerieren wie die AOB. Die Temperaturoptima der AOA Anreicherungen liegen deutlich höher als die der AOB und unter Zugabe von Streptomycin konnte an eigenen Proben des Strandstandortes nur bei 25 °C Aktivität nachgewiesen werden.

Die Ammoniak oxidierenden Bakterien und Archaeen sind phylogenetisch sehr weit voneinander entfernt. Sie wiesen signifikante Unterschiede in der Zellphysiologie und Struktur auf, z.B sind die AOA deutlich kleiner als die AOB oder haben eine andere Substrataffinität. Die bakterielle Ammoniakmonooxygenase (AMO) ist ein multifunktionales Enzym, welches Methan, Kohlenmonoxid oder einige organische Verbindungen oxidieren kann. Das bedeutet aber nicht, dass diese Substrate auch als Substrat in Laborkulturen verwendet werden können. Zur Zeit ist wenig darüber bekannt, ob die archaeale AMO auch alternative Substrate oxidieren kann, aber die signifikanten Unterschiede in der Basenabfolge und der daraus folgenden Aminosäuresequenz könnte Konsequenzen für die funktionelle Diversität haben (PROSSER & NICOL 2008).

6.3 Temperaturanpassung

Die untersuchten AOM Gemeinschaften in den Böden des Polygonwalls (5 – 15 cm) und des Strandes (0 – 5 cm) zeigten ein Temperaturoptimum zwischen 20 und 35 °C. Die Aktivität nahm unter 10 °C stark ab. Es war aber trotzdem möglich aus allen Bodenproben, bei 4 °C Anreicherungskulturen herzustellen. Damit kann die Temperaturanpassung ihrer potentiellen Aktivitäten als psychrotolerant bezeichnet werden, d.h. die AOM-Gemeinschaften haben zwar wie mesophile Organismen ein Optimum von über 20 °C, sie sind aber bei niedrigen Temperaturen noch aktiv (MADIGAN & MARTINKO 2006). Auch für andere Bakterienarten aus dem Permafrost wurden hauptsächlich mesophile bzw. psychrotoleranten Temperaturanpassungen berichtet (SHI et al. 1997, VOROBYOVA et al. 1997, PONDER 2005).

Die untersuchten Anreicherungskulturen in dieser Arbeit zeigten ein Temperaturoptimum zwischen 20 und 32 °C, dabei ist es relativ unabhängig, ob sie bei 4, 10, 18 oder 28 °C angezogen worden sind. Die Kultur aus dem Polygonwall 12 - 17 cm wurde mehr als 5 Jahre bei 10 °C inkubiert und zeigte trotzdem ein höheres Optimum als die Kultur aus dem Polygonhang, die 4 Jahre bei 28 °C angereichert worden ist. Beide *Nitrosospira*-ähnlichen Bakterien aus den Kulturen liegen phylogenetisch eng beieinander und fallen ins Cluster 3 (s. Kap 5.9.1). Dabei weisen die Ammoniakoxidanten der Kulturen und auch der Böden, in denen die AOA dominieren, ein höheres Temperaturoptimum auf, wie der Boden des Strandes (s. Kap. 5.5.3) und die Anreicherungskultur aus dem Strand (s. Kap. 5.10.3). Die unterschiedlichen Anreicherungskulturen aus dem Kliff (350 bis 360 cm), Polygonhang (12 - 17 cm) und Strand (0 - 5 cm) werden alle zu den *Nitrosospira* gezählt, liegen aber in unterschiedlichen Clustern (s. Kap. 5.9.2) und weisen dennoch ähnliche

Temperaturanpassungen auf. Die Anreicherungskultur aus der Hahnheide mit einem AOA, hat ein Temperaturoptimum deutlich über 25 °C.

Da die Monoxygenasen der AOB und MOB phylogenetisch relativ eng miteinander verwandt sind (HOLMES et al. 1995), ist es interessant, dass sich die Temperaturanpassung der AOM ähnlich wie die der Methan oxidierenden Bakterien (MOB) in den Böden aus der nordostsibirischen Tundra darstellt (ZIMMERMANN 2006, KNOBLAUCH et al. 2008). Die Nitrit oxidierenden Bakterien (NOB) in den Permafrostböden zeigen eine deutlichere Anpassung an die kalten Temperaturen (SANDERS 2006, ALAWI 2007). Der „*Candidatus Nitrotoga arctica*“ wurde aus einem Polygon auf Samoylov angereichert und wurde in fast allen Anreicherungskulturen, die bei unter 10 °C inkubiert worden sind, nachgewiesen (ALAWI et al. 2007). Das neue Betaproteobakterium zeigt ein Temperaturoptimum bei 15 °C und wies bei 4 °C noch 30 % der maximalen Aktivität auf. Das Maximum lag bei über 20 °C, somit ist der „*Candidatus Nitrotoga arctica*“ streng genommen nicht psychrophil, aber die Grenzen können als fließend betrachtet werden, so dass er sich als moderat psychrophil bezeichnen lässt.

Anders als in den terrestrischen Habitaten sind die Ammoniakoxidanten in marinen Habitaten deutlich besser an die kalten Bedingungen angepasst. THAMDRUP & FLEISCHER (1998) beschreiben, dass die Kälteanpassung am stärksten bei der Nitrifikation ausgeprägt ist. In marinen Sedimenten in Svalbard, Norwegen, weist die Nitrifikation ein Temperaturoptimum bei 14 °C auf. Das deutet daraufhin, dass dieser Prozess von psychrophilen Bakterien durchgeführt wird. Es sind bisher aber nur mesophile Ammoniak oxidierende Bakterien beschrieben worden, außer dem *Nitrosomonas cryotolerans* (JONES et al. 1988). Das Temperaturoptimum des *Nitrosomonas cryotolerans* liegt entweder bei 22 °C oder 30 °C, abhängig davon, ob es bei 5 °C oder 25 °C angezogen wurde (JONES & MORITA 1985). Die untersuchten aktiven Ammoniakoxidanten aus Svalbard sind aber nicht kultiviert worden (THAMDRUP & FLEISCHER 1998). In gemäßigten Küstensedimenten haben die AOB ein Temperaturoptimum für die Nitrifikation bei über 22 °C bei in situ Temperaturen von 3 bis 12 °C (HENRIKSEN & KEMP 1988). In den kalten arktischen marinen Habitaten sind vor allem *Nitrosospira* aktiv (BANO & HOLLIBAUGH 2000, HOLLIBAUGH et al. 2002). Auch das ist ein Hinweis darauf, dass Vertreter dieser jungen Gattung an die Bedingungen in den kalten Habitaten gut angepasst sind.

6.4 Möglicher Einfluss des Klimawandels auf die Stickstoffumsetzung

Seit der Klimakonferenz in Rio de Janeiro 1992 und des Verabschiedens des Kyotoprotokoll 1997 sind die Diskussionen um die Folgen der prognostizierten Klimaveränderung und der globalen Erderwärmung ständig fortgeschritten. In den IPCC Berichten wurden mehrere Szenarien beschrieben, die bei verschiedenen Temperaturanstiegen eintreten könnten

(IPCC 2001, 2007). Die Prozesse in den Permafrostgebieten sind nicht mit in die Diskussion und Beschreibung aufgenommen worden. Ein Schlüsselfaktor für die Beurteilung der Wichtigkeit der zahlreichen Feedback-Szenarios sind die Auswirkungen der Stickstoffmineralisation (DAVIDSON 1995), oft ist Stickstoff ein limitierender Faktor in arktischen Ökosystemen (CHAPIN & BLEDSOE 1992). Aber er ist ein Faktor, vom dem erwartet wird, den Abbau von organischen Material unter wärmeren Klimabedingungen zu erhöhen (NADELHOFFER et al. 1992, HOBBIIE & CHAPIN 1996), was zu einer verstärkten Emission von CO₂ und CH₄ führen kann. Die globale Erwärmung kann zusätzlich dazu führen, dass es zu einer Entkopplung der pflanzlichen und bodenmikrobiologischen Prozesse und damit zu einem Anstieg des Stickstoffverlustes kommen kann (DAVIDSON 1995). Höhere N-Mineralisation zusammen mit höheren Bodentemperaturen und besserer Sauerstoffversorgung, könnte zu einer höheren Produktion von Nitrat und dessen Auswaschung führen (WOLFE et al. 1999).

Die N-Mineralisationsraten in dieser Arbeit haben gezeigt, dass die N-Umsetzung bei steigender Temperatur und bei höherer Sauerstoffversorgung zunehmen kann. In NADELHOFFER et al. (1992) wurde dargestellt, dass die N-Mineralisation in der arktischen Tundra deutlich geringer ist als in den warmen oder gemäßigten Klimaten. Was aber grundsätzlich dafür sprechen kann, dass beim Anstieg der Bodentemperatur und Verlängerung der Vegetationsperiode die N-Mineralisation stark ansteigen kann. WEINTRAUB & SCHIMMEL (2003) haben nachgewiesen, dass in Tundraböden die organische Substanz potentiell gut mineralisierbar ist.

Modelle wie die von PASTOR & POST (1988) und von SCHIMMEL et al. (1990) entwickelten prognostizieren, dass der Treibhausgas induzierte Temperaturanstieg für mehr Abbau von organischen Material sorgen wird, die N-Mineralisation steigern wird und daher zu einer größeren Primärproduktion in den nördlichen Breiten führt. Daher kann auch der ansteigende Kohlenstoffausstoß aus den nördlichen Böden zu einem positiven Feedback bezogen auf die globale Erderwärmung führen (VITOUSEK & HOWARTH 1991).

Wenn also die Prozesse in den Böden der arktischen Tundra vor allem die Nettoprimärproduktion N-limitiert ist, kann es durch den Klimawandel verursacht zu einer größeren Versorgung mit verfügbarem Stickstoff kommen. Folgen könnten die vermehrte Biomassenproduktion sein, aber auch die Zunahme der Mineralisationsprozesse, da auch diese dann nicht mehr nährstofflimitiert sind.

In der Bewertung des globalen Stickstoffkreislaufes kam es in den letzten Jahren zu einem Paradigmenwechsel. Gerade durch den Eingriff des Menschen in den Stickstoffkreislauf, in erster Linie durch Düngung, kommt es immer mehr zu einer Übersättigung von Ökosystemen

mit Stickstoffverbindungen mit negativen Auswirkungen für die Umwelt, wie z.B. Nitratauswaschungen. Das Eingreifen des Menschen hat also negative Einflüsse auf den Stickstoffkreislauf, und damit auch verbunden auf den Kohlenstoffkreislauf und das Klima (GRUBER & GALLOWAY 2008). Inwieweit die Stickstoffsättigung in den gemäßigten Klimaten auch auf die Prozesse in den nördlichen Breiten Einfluss hat, z.B. durch den Anstieg der N-Deposition, muss geklärt werden.

Wenn Wasser und andere Nährstoffe jedoch im Gegensatz zum Stickstoff zu limitierenden Faktoren werden, erreichen solche Ökosysteme einen Zustand der „Nährstoffübersättigung“ (Hypereutrophierung) (SMITH & SMITH 2009). Steigt die Nährstoffzufuhr dann noch weiter an, kommt es zu einer Vielzahl von Veränderungen im Bodenhaushalt und in den Bodeneigenschaften, wodurch zahlreiche biologische Abläufe in den Pflanzen gestört werden. Erhöhte Phosphoreinträge verursachen in Gewässerökosystemen ebenfalls eine Hypereutrophierung und eine explosionsartige Planktonvermehrung (SMITH & SMITH 2009). Die potentielle Rolle der Stickstoffdüngung scheint klar zu sein: Die Produktivität vieler natürlicher Ökosysteme weltweit ist limitiert durch den fehlenden verfügbare Stickstoff (VITOUSEK & HOWARTH 1991).

Es ist anzunehmen, dass die Stickstoffproduktion in den nächsten Jahrzehnten ansteigen wird: Die anthropogene N_2 -Fixierung ist wichtig für die Nahrungsmittelproduktion und daher auch für die Bevölkerung und den Lebensstandard (GALLOWAY et al. 1995). Die Stickstoffdeposition muss ein wichtiger Teil der „Global Change“ Analysen werden und die Herausforderung des aktuellen Managements unseres Planeten mit betrachtet werden (NORBY 1998). Ein Ansteigen der Stickstoff-Verfügbarkeit würde eine größere Kohlenstoffeinlagerung in Pflanzen bedeuten. Wenn also die Pflanzenproduktivität in der Tundra durch die höhere Verfügbarkeit von Nährstoffen, insbesondere von Stickstoff, den Pflanzen erlauben würde mehr C pro Unit N einzubauen und zu speichern, könnte z.B. mehr Holz aufgebaut werden, das weitere C/N-Verhältnisse aufweist (SHAVER & CHAPIN 1980, SHAVER et al. 1992, HOBBIIE 1996), was eine Verschiebung der Baumgrenze nach Norden mit sich bringen kann. In den meisten Ökosystemen ist die N Verfügbarkeit von unterschiedlichen Aspekten der physikalischen und chemischen Umwelt kontrolliert, einschließlich der Verfügbarkeit anderer Nährstoffe, der Temperatur und der Feuchtigkeit (VITOUSEK & HOWARTH 1991). Die bessere Verfügbarkeit von Stickstoff in den Permafrostböden durch eine erhöhte Mineralisationsrate im Zuge der Klimaerwärmung, könnte wiederum dazu führen, dass mehr CO_2 fixiert wird. Dazu besteht also weiterer Forschungsbedarf.

7. SCHLUSSBETRACHTUNG UND AUSBLICK

Die vorliegende Arbeit liefert erste Einblicke in die Stickstoffumsätze der sibirischen Tundrenböden im Lena-Delta. Neben den potentiellen Mineralisation- und Nitrifikationsraten wurden erste Ergebnisse über die Mikroorganismengemeinschaften der Ammoniakoxidanten geliefert. Diese Ergebnisse könnten als Grundlage weiterer Forschung auf diesem Gebiet dienen. Dabei standen mikrobiologische, bodenkundliche und biogeochemische Methoden im Mittelpunkt einer interdisziplinären Arbeit, mit denen die Kernfragen beantwortet werden sollten.

Mit der Denaturierenden Gradienten Gelelektrophorese (DGGE) sollten in dieser Arbeit die Diversität der AOM sowohl in den Böden als auch den Anreicherungskulturen monitorisiert werden. Diese Methode ist für die AOB weniger gut geeignet wie z.B. für die Nitrit oxidierenden Bakterien (ALAWI 2003, SANDERS 2006). Bei der Untersuchung der AOB mussten die Ergebnisse immer durch Sequenzierungen abgesichert werden. Denn es gab das Phänomen, dass Banden auf gleicher Höhe, verschiedene Sequenzen aufwiesen, aber auch, dass Banden auf verschiedenen Höhen, die gleichen Sequenzen hatten. Hier muss in Zukunft mehr Arbeiten über Klonbanken oder Ähnlichem erfolgen.

Mit den mikrobiologischen und molekularbiologischen Methoden konnte die mikrobielle Gemeinschaft der Ammoniak oxidierenden Organismen bestimmt werden. Die Gattung *Nitrosospira* dominiert in den untersuchten Permafrostböden und die Diversität innerhalb dieser Gattung ist relativ groß. Es wurden auch Ammoniak oxidierende Archaeen nachgewiesen, die aber nicht in allen untersuchten Bodenproben vorkamen, sondern maßgeblich in den alluvial beeinflussten Sedimenten der Überflutungsebene. Welche Rolle diese in den Permafrostregionen spielen, konnte nicht abschließend geklärt werden.

Die Kultivierung und Anreicherungen der Ammoniakoxidanten ist eine wichtige Methode, um die Ammoniakoxidanten zu charakterisieren. Die *Nitrosospira* aus Sibirien oder das Ammoniak oxidierende Archaeon aus der Hahnheide konnten sehr stark angereichert werden. Eine vollständige Isolierung steht noch aus. Die Herstellung neuer Reinkulturen ist sehr wichtig für die Weiterentwicklung neuer und bestehender Methoden, wie zum Beispiel das Ableiten neuer Primer für verschiedene PCR Anwendungen. In einigen Bodenproben konnte zwar potentielle Nitrifikation bestimmt werden, diese konnte aber keinen bekannten Vertretern der AOB oder AOA zugeordnet werden. Umso mehr Reinkulturen existieren, desto besser können Primer abgeleitet werden.

Es waren ineinandergreifende Methoden notwendig, um Aussagen, über N-Umsetzungen, über die beteiligten Ammoniakoxidanten und ihre Diversität machen zu können. Es ist z.B. nicht gelungen die Aktivität der AOB und AOA tatsächlich voneinander zu unterscheiden. Es

sollten weitere Untersuchungen mit der Verwendung von Hemmstoffen wie verschiedenen Antibiotika durchgeführt werden, um eine eindeutige Methode zu etablieren.

Die Bestimmung der Raten der N-Umsetzung und die molekularbiologischen Untersuchungen wie z.B. DGGE-Analysen oder Klonbanken, führten bereits zu einem guten Erkenntnisgewinn. Dabei ist es aber anzustreben, dass durch die Untersuchungen der exprimierten Gene, auch Aussagen über die aktiven Mikroorganismen während der Vegetationsperiode gemacht werden können. Es wäre wünschenswert, wenn weiterführende Untersuchungen die RT PCR auch mit Proben aus den Tundrenböden durchführen würden.

In Zukunft sollte an die ersten Ergebnisse der Stickstoffumsätze in Nordostsibirien angesetzt werden. Die organische Substanz ist generell abbaubar und der Abbau derselben kann mit zunehmender Sauerstoffversorgung beschleunigt werden. Die Nitrifikationsraten sind von der Temperatur abhängig und steigen mit zunehmender Temperatur an. Als nächster Schritt wäre die Untersuchung der *In-situ*-Umsatzraten sehr sinnvoll. Dabei wäre es z.B. folgerichtig, Methoden der Isotopenanalyse zu etablieren. Dabei kann die Messung der Stickstoff- als auch der Sauerstoffisotope von Interessen sein. Gleichzeitig könnten Batch-Versuche mit ¹⁵N markierten Substraten vorgenommen werden. Damit könnte geklärt werden, ob die Nitrifikation z.B. zur N₂O Emission beiträgt, oder ob Hinweise auf anaerobe Ammoniumoxidation (Anammox) in den Böden bestehen.

Um die klimarelevanten Fragen zu beantworten, ist es wichtig ist es, die potentiellen und tatsächlichen N₂O Emissionen zu ermitteln. Sind die Zahlen von REPO et al. (2009) und ELBERLING et al. (2010) nur Einzelfälle gewesen, oder sind die arktischen Ökosysteme grundsätzlich natürlich Quellen von N₂O Emissionen? Werden sie durch die prognostizierte Klimaerwärmung verstärkt?

Die Ergebnisse und Daten aus interdisziplinären Projektstudien wie dieser Arbeit auf biogeochemischen, bodenkundlichen und mikrobiologischen Grundlagen, liefern einen wichtigen Beitrag für die zukünftige Entwicklung von Modellen über die Stickstoffumsätze in Permafrostböden.

LITERATUR

- Aber, J. D. 1992. Nitrogen cycling and nitrogen saturation in temperate forest ecosystems. *Trends in Ecology & Evolution* 7:220-224.
- Ad-Hoc-AGBoden. 2005. Bodenkundliche Kartieranleitung. 5. Auflage Hannover.
- Alawi, M. 2003. Beispiele für die Anwendung der Denaturierenden Gradienten Gelelektrophorese (DGGE) bei der Differenzierung von lithoautotrophen, Nitrit oxidierenden Bakterien. Diplomarbeit. Universität Hamburg.
- Alawi, M. 2007. Diversität Nitrit oxidierender Bakterien in Böden des nordsibirischen Permafrostes und Sedimenten der Laptev-See. Dissertation. Universität Hamburg.
- Alawi, M., A. Lipski, T. Sanders, E. M. Pfeiffer & E. Spieck. 2007. Cultivation of a novel cold-adapted nitrite oxidizing betaproteobacterium from Siberian Arctic. *ISME* 1:256–264.
- Aleem, M. I. H. 1966. Generation of reducing power in chemosynthesis II. Energy-linked reduction of pyridine nucleotides in the chemoautotroph, *Nitrosomonas europaea*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology and Biological Oxidation* 113:216-224.
- Alef, K. 1991. Methodenhandbuch Bodenmikrobiologie. *Ecomed Verlagsgesellschaft, Landsberg/Lech*.
- Allison, S. M. & J. I. Prosser. 1993. Ammonia oxidation at low pH by attached populations of nitrifying bacteria. *Soil Biology and Biochemistry* 25:935-941.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers & D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215:403-410.
- Amann, R. L., W. Ludwig & K.-H. Schleifer. 1995. Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. *Microbiological Reviews* 59:143 - 169.
- Arthur, J. W., C. W. West, K. N. Allen & S. F. Hedtke. 1987. Seasonal toxicity of ammonia to five fish and nine invertebrate species. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 38:324-331.
- Auguet, J.-C. & E. O. Casamayor. 2008. A hotspot for cold crenarchaeota in the neuston of high mountain lakes. *Environmental Microbiology* 10:1080-1086.
- Avrahami, S. & R. Conrad. 2003. Patterns of Community Change among Ammonia Oxidizers in Meadow Soils upon Long-Term Incubation at Different Temperatures. *Applied and Environmental Microbiology* 69:6152 - 6164.
- Avrahami, S. & R. Conrad. 2005. Cold-temperate climate: a factor for selection of ammonia oxidizers in upland soil? *Can. J. Microbiol* 51:709-714.
- Avrahami, S., Conrad, R. & Braker, G. 2002. Effect of Soil Ammonium Concentration on N₂O Release and on the Community Structure of Ammonia Oxidizers and Denitrifiers *Applied and Environmental Microbiology* 68:5685 - 5692.
- Avrahami, S., W. Liesack & R. Conrad. 2003. Effects of temperature and fertilizer on activity and community structure of soil ammonia oxidizers. *Environmental Microbiology* 5:691 - 705.
- Bakermans, C., H. L. Ayala-del-Rio, M. A. Ponder, T. Vishnivetskaya, D. Gilichinsky, M. F. Thomashow & J. M. Tiedje. 2006. *Psychrobacter cryohalolentis* sp. nov. and *Psychrobacter arcticus* sp. nov., isolated from Siberian permafrost. *Int J Syst Evol Microbiol* 56:1285-1291.
- Bakermans, C., A. I. Tsapin, V. Souza-Egipsy, D. A. Gilichinsky & K. H. Nealsen. 2003. Reproduction and metabolism at -10°C bacteria isolated from Siberian permafrost. *Environmental Microbiology* 5:321 - 326.
- Bano, N. & J. T. Hollibaugh. 2000. Diversity and Distribution of DNA Sequences with Affinity to Ammonia-Oxidizing Bacteria of the β Subdivision of the Class Proteobacteria in the Arctic Ocean. *Applied and Environmental Microbiology* 66:1960 - 1996.
- Bardgett, R. D., R. an der Wal, I. S. Jónsdóttir, H. Quirk & S. Dutton. 2007. Temporal variability in plant and soil nitrogen pools in a high-Arctic ecosystem. *Soil Biology & Biochemistry*:2120-2137.
- Bartosch, S., C. Hartwig, E. Spieck & E. Bock. 2002. Immunological Detection of Nitrospira-like Bacteria in Various Soils. *Microbial Ecology* 43:26-33.
- Bartosch, S., I. Wolgast, E. Spieck & E. Bock. 1999. Identification of Nitrite-Oxidizing Bacteria with Monoclonal Antibodies Recognizing the Nitrite Oxidoreductase. *Applied and Environmental Microbiology* 65:4126 - 4133.
- Belser, L. W. 1984. Bicarbonate Uptake by Nitrifiers: Effects of Growth Rate, pH, Substrate Concentration, and Metabolic Inhibitors. *Appl. Environ. Microbiol.* 48:1100-1104.
- Beman, J. M., B. N. Popp & C. A. Francis. 2008. Molecular and biogeochemical evidence for ammonia oxidation by marine Crenarchaeota in the Gulf of California. *ISME J* 2:429-441.
- Bock, E. & H.-P. Koops. 1992. The genus *Nitrobacter* and related genera. In Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.-H.(eds.), *The Prokaryotes*, 2nd Ed., Vol.3, Springer-Verlag, New York.2302-2309.

- Bock, E. & M. Wagner.** 2003. Oxidation of Inorganic Nitrogen compounds as an Energy Source. In: Dworkin, M. et al. (eds.), *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*, 3rd ed., release 3.13, Springer Verlag, New York; <http://link.springer-ny.com/link/service/books/10125/>. .
- Boer, W. & H. J. Laanbroek.** 1989. Ureolytic nitrification at low pH by *Nitrosospira spec.* . *Archives of Microbiology* **152**:178-181.
- Bouwman, A. F., I. Fung, E. Matthews & J. John.** 1993. Global analysis of the potential for N₂O production in natural soils. *Global Biogeochem. Cycles* **7**:557-597.
- Breezee, J., N. Cady & J. T. Staley.** 2004. Subfreezing Growth of the Sea Ice Bacterium *Psychromonas ingrahamii*. *Microbial Ecology* **47**:300-304.
- Brochier-Armanet, C., B. Boussau, S. Gribaldo & P. Forterre.** 2008. Mesophilic crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. *Nature reviews* **6**:245-252.
- Buckeridge, K., E. Zufelt, H. Chu & P. Grogan.** 2010. Soil nitrogen cycling rates in low arctic shrub tundra are enhanced by litter feedbacks. *Plant and Soil* **330**:407-421.
- Burns, L. C., R. J. Stevens & R. J. Laughlin.** 1996. Production of nitrite in soil by simultaneous nitrification and denitrification. *Soil Biology and Biochemistry* **28**:609-616.
- Burns, L. C., R. J. Stevens, R. V. Smith & J. E. Cooper.** 1995. The occurrence and possible sources of nitrite in a grazed, fertilized, grassland soil. *Soil Biology and Biochemistry* **27**:47-59.
- Burrell, P. C., C. M. Phalen & T. A. Hovanec.** 2001. Identification of Bacteria Responsible for Ammonia Oxidation in Freshwater Aquaria. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:5791-5800.
- Carney, K. M., P. A. Matson & B. J. M. Bohannan.** 2004. Diversity and composition of tropical soil nitrifiers across a plant diversity gradient and among land-use types. *Ecology Letters* **7**:684-694.
- Cavicchioli, R.** 2010. Archaea - timeline of the third domain. *Nat Rev Micro* **9**:51-61.
- Chang, Y.-J., A. K. M. A. Hussain, J. R. Stephen, M. D. Mullen, D. C. White & A. Peacock.** 2001. Impact of herbicides on the abundance and structure of indigenous β -subgroup ammonia-oxidizer communities in soil microcosms. *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**:2462-2468.
- Chapin, D. M. & C. S. Bledsoe.** 1992. Nitrogen fixation in Arctic plant communities. In Chapin, F.S., Jefferies, R.L., Reynolds, J.F., Shaver, G.R. and Svoboda, J., editors, *Arctic ecosystems in a changing climate*, San Diego: Academic Press, .301–319.
- Chen, X.-P., Y.-G. Zhu, Y. Xia, J.-P. Shen & J.-Z. He.** 2008. Ammonia-oxidizing archaea: important players in paddy rhizosphere soil? *Environmental Microbiology* **10**:1978-1987.
- Christman, G. D.** 2009. Abundance, Diversity, and activity of ammonia-oxidizing prokaryotes in the coastal arctic Ocean in summer und wintertime. Dissertation. University of Delaware.
- Cleveland, C. C., A. R. Townsend, D. S. Schimel, H. Fisher, R. W. Howarth, L. O. Hedin, S. S. Perakis, E. F. Latty, J. C. Von Fischer, A. Elseroad & M. F. Wasson.** 1999. Global patterns of terrestrial biological nitrogen (N₂) fixation in natural ecosystems. *Global Biogeochem. Cycles* **13**:623-645.
- Compton, J. E., L. S. Watrud, L. Arlene Porteous & S. DeGroot.** 2004. Response of soil microbial biomass and community composition to chronic nitrogen additions at Harvard forest. *Forest Ecology and Management* **196**:143-158.
- Coolen, M. J. L., G. Muyzer, W. I. C. Rijpstra, S. Schouten, J. K. Volkman & J. S. Sinninghe Damsté.** 2004. Combined DNA and lipid analyses of sediments reveal changes in Holocene haptophyte and diatom populations in an Antarctic lake. *Earth and Planetary Science Letters* **223**:225-239.
- Corbin, J. L.** 1984. Liquid Chromatographic-Fluorescence Determination of Ammonia from Nitrogenase Reactions: A 2-Min Assay. *Applied and Environmental Microbiology* **47**:1027-1030.
- Davidson, E. A.** 1995. Linkages between carbon and nitrogen cycling and their implications for storage of carbon in terrestrial ecosystems. In Woodwell, G.M. and Mackenzie, F.T., editors, *Biotic feedbacks in the global climatic system. Will warming feed the warming?*, Oxford: Oxford University Press.219–230.
- De Boer, W., P. J. A. K. Gunnewiek, M. Veenhuis, E. Bock & H. J. Laanbroek.** 1991. Nitrification at Low pH by Aggregated Chemolithotrophic Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:3600-3604.
- De Boer, W., P. A. Klein Gunnewiek & H. J. Laanbroek.** 1995. Ammonium-oxidation at low pH by a chemolithotrophic bacterium belonging to the genus *Nitrosospira*. *Soil Biology and Biochemistry* **27**:127-132.
- De Boer, W. & G. A. Kowalchuk.** 2001. Nitrification in acid soils: micro-organisms and mechanisms. *Soil Biology and Biochemistry* **33**:853-866.
- De La Torre, J. R., C. B. Walker, A. E. Ingalls, M. Könneke & D. A. Stahl.** 2008. Cultivation of a thermophilic ammonia oxidizing archaeon synthesizing crenarchaeol. *Environmental Microbiology* **10**:810-818.

- DeLong, E. F.** 1992. Archaea in coastal marine environments. *PNAS* **89**:5685 - 5689.
- DeLong, E. F.** 1998. Everything in moderation: Archaea as 'non-extremophiles'. *Current Opinion in Genetics & Development* **8**:649-654.
- Deveviagin, A. & V. Kunitsky.** 2004. Periglacial studies around Cape "Mamontov Klyk" / Geographical and geological background. In: Schirrmester, L. (Hrsg.): Expeditions in Siberia in 2003. *Reports on Polar and Marine Research* **489**:63-66.
- Di, H. J., K. C. Cameron, J. P. Shen, C. S. Winefield, M. O'Callaghan, S. Bowatte & J. Z. He.** 2010. Ammonia-oxidizing bacteria and archaea grow under contrasting soil nitrogen conditions. *FEMS Microbiology Ecology* **72**:386-394.
- DIN11265.** 1996. Bodenbeschaffenheit - Bestimmung der spezifischen elektrischen Leitfähigkeit *Deutsches Institut für Normung e.V., Beuth Verlag, Berlin.*
- DIN11274.** 1998. Bodenbeschaffenheit - Bestimmung des Wasserrückhaltevermögens - Laborverfahren *Deutsches Institut für Normung e.V., Beuth Verlag, Berlin.*
- DIN11461.** 2001. Bodenbeschaffenheit - Bestimmung des Wassergehalts des Bodens als Volumenanteil mittels Stechzylinder - Gravimetrisches Verfahren *Deutsches Institut für Normung e.V., Beuth Verlag, Berlin.*
- DIN15685.** 2001. Bodenbeschaffenheit - Bestimmung der potentiellen Nitrifizierung - Schnellverfahren mittels Ammoniumoxidation. *Deutsches Institut für Normung e.V., Beuth Verlag, Berlin.*
- DIN18123.** 1983. Baugrund; Untersuchung von Bodenproben – Bestimmung der Korngrößenverteilung. DIN-Taschenbuch 113. *Deutsches Institut für Normung e.V., Beuth Verlag, Berlin.*
- DIN19683-1 & 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.*
- DIN19684-1.** 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.*
- Dorador, C.** 2007. Microbial diversity in high altitude wetlands of the Chilean altiplano: phylogeny, diversity and function. Thesis, University of Kiel, Kiel.
- Dorador, C., A. Busekow, I. Vila, J. Imhoff & K.-P. Witzel.** 2008. Molecular analysis of enrichment cultures of ammonia oxidizers from the Salar de Huasco, a high altitude saline wetland in northern Chile. *Extremophiles* **12**:405-414.
- Egli, K., U. Fanger, P. J. J. Alvarez, H. Siegrist, J. R. van der Meer & A. J. B. Zehnder.** 2001. Enrichment and characterization of an anammox bacterium from a rotating biological contactor treating ammonium-rich leachate. *Archives of Microbiology* **175**:198-207.
- Eighmy, T. & P. L. Bishop.** 1989. Distribution and role of bacterial nitrifying populations in nitrogen removal in aquatic treatment systems. *water research* **23**:947-955.
- Elberling, B., H. H. Christiansen & B. U. Hansen.** 2010. High nitrous oxide production from thawing permafrost. *Nature Geosci* **3**:332-335.
- Elovskaya, L.** 1987. Classification and diagnostics of Yakutia permafrost soils. Yakutsk, Sakha (in Russian).
- Erguder, T. H., N. Boon, L. Wittebolle, M. Marzorati & W. Verstraete.** 2009. Environmental factors shaping the ecological niches of ammonia-oxidizing archaea. *FEMS Microbiology Reviews* **33**:855-869.
- FAO.** 2006. Food and Agriculture Organisation: World reference base for soil resources 2006. 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 Siberian. *Soil Science Society of America Journal* **68**:1002 - 1011.
- Fiencke, C. & E. Bock.** 2004. Genera-Specific Immunofluorescence Labeling of Ammonia Oxidizers with Polyclonal Antibodies Recognizing Both Subunits of the Ammonia Monooxygenase. *Microbial Ecology* **47**:374-384.
- Fiencke, C., C. Knoblauch, A. Hadenfeld & B. Hintze.** 2009. Bodenkundliche Geländeübung. Im Naturschutzgebiet Hahnheide. Sommersemester 2009. *Exkursionsführer. Universität Hamburg.*
- Fiencke, C., E. Spieck & E. Bock.** 2005. Nitrifying bacteria. In D. Werner, and W. E. Newton (eds.), Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology, and the environment. Springer, The Netherlands, Dordrecht. **12**:255-276.
- Fischer, S. G. & L. S. Lerman.** 1979. Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis. *Cell* **16**:191-200.

- Fischer, S. G. & L. S. Lerman. 1983. DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **80**:1579-1583.
- Francis, C. A., K. J. Roberts, M. Beman, A. E. Santoro & B. B. Oakley. 2005. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *PANS* **102**.
- Frankenland, P. F. & G. C. Frankenland. 1890. the nitrifying process and its specific ferment. Part 1. *Phil. Trans. R. Soc. Biol.* **181**:105 - 109.
- Fuhrman, J. A., K. McCallum & A. A. Davis. 1992. Novel major archaeobacterial group from marine plankton. *nature* **356**:148-149.
- Galloway, J. N., W. H. Schlesinger, H. Levy, II, A. Michaels & J. L. Schnoor. 1995. Nitrogen fixation: Anthropogenic enhancement-environmental response. *Global Biogeochem. Cycles* **9**:235-252.
- Ganzert, L., F. Bajerski, K. Mangelsdorf, A. Lipski & D. Wagner. 2010. *Arthrobacter livingstonensis* sp. nov. and *Arthrobacter cryotolerans* sp. nov., salt- and psychrotolerant species isolated from Livingston Island, Antarctica. *Int J Syst Evol Microbiol*:ijs.0.021022-021020.
- Ganzert, L., G. Jurgens, U. Münster & D. Wagner. 2007. Methanogenic communities in permafrost-affected soils of the Laptev Sea coast, Siberian Arctic, characterized by 16S rRNA gene fingerprints. *FEMS Microbiology Ecology* **59**:476-488.
- Gerdes, B., R. Brinkmeyer, G. Dieckmann & E. Helmke. 2005. Influence of crude oil on changes of bacterial communities in Arctic sea ice. *FEMS Microbiology Ecology* **53**:129 - 139.
- Golovacheva, R. S. 1976. Thermophilic nitrifying bacteria from hot springs. *Microbiology* **45**:329-331.
- Goreau, T. J., W. A. Kaplan, S. C. Wofsy, M. B. McElroy, F. W. Valois & S. W. Watson. 1980. Production of NO₂⁻ and N₂O by Nitrifying Bacteria at Reduced Concentrations of Oxygen. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**:526-532.
- Gounot, A.-M. 1986. Psychrophilic and psychrotrophie microorganisms. *Experientia* **42**:1192 - 1197.
- Gounot, A.-M. 1991. Bacterial life at low temperature: physiological aspects and biotechnological implications. *Journal of Applied Bacteriology* **71**:386-397.
- Gruber, N. & J. N. Galloway. 2008. An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. *nature* **451**:293-296.
- Gundelwein, A. 1998. Eigenschaften und Umsetzung organischer Substanz in nordostsibirischen Permafrostböden. Dissertation. Universität Hamburg.
- Hagedorn, F. & P. Schleiippi. 1999. Determination of total dissolved nitrogen by persulfate oxidation. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **163**:81-82.
- Hallam, S. J., K. T. Konstantinidis, N. Putnam, C. Schleper, Y.-i. Watanabe, J. Sugahara, C. Preston, J. de la Torre, P. M. Richardson & E. F. DeLong. 2006. Genomic analysis of the uncultivated marine crenarchaeote *Cenarchaeum symbiosum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**:18296-18301.
- Harms, H., H.-P. Koops, H. Martiny & M. Wullenweber. 1981. d-Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase and polyhedral inclusion bodies in *Nitrosomonas spec.* *Archives of Microbiology* **128**:280-281.
- Hastings, R. C., C. Butler, I. Singleton, J. R. Saunders & A. J. McCarthy. 2000. Analysis of ammonia-oxidizing bacteria populations in acid forest soil during conditions of moisture limitation. *Letters in Applied Microbiology* **30**:14-18.
- Hastings, R. C., J. R. Saunders, G. H. Hall, R. W. Pickup & A. J. McCarthy. 1998. Application of Molecular Biological Techniques to a Seasonal Study of Ammonia Oxidation in a Eutrophic Freshwater Lake. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:3674-3682.
- Hatzenpichler, R., E. V. Lebedeva, E. Spieck, K. Stoecker, A. Richter, H. Daims & M. Wagner. 2008. A moderately thermophilic ammonia-oxidizing crenarchaeote from a hot spring. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**:2134-2139.
- Head, I. M., W. D. Hiorns, T. M. Embley, A. J. McCarthy & J. R. Saunders. 1993. The phylogeny of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria as determined by analysis of 16S ribosomal RNA gene sequences. *J Gen Microbiol* **139**:1147-1153.
- Heinrich, D. & M. Hergt. 1991. dtv-Atlas zur Ökologie. 2. Auflage. Deutscher Taschenbuch Verlag, München.
- Henriksen, K. & W. M. Kemp. 1988. Nitrification in estuarine and coastal marine sediments. In: Nitrogen Cycling in Coastal Marine Environments (Blackburn, T.H. and Sorensen, J., Eds.) John Wiley and Sons, New York.:207-249.
- Herrmann, M., A. M. Saunders & A. Schramm. 2008. Archaea Dominate the Ammonia-Oxidizing Community in the Rhizosphere of the Freshwater Macrophyte *Littorella uniflora*. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:3279-3283.
- Hiorns, W. D., R. C. Hastings, I. M. Head, A. J. McCarthy, J. R. Saunders, R. W. Pickup & G. H. Hall. 1995. Amplification of 16S ribosomal RNA genes of autotrophic ammonia-oxidizing

- bacteria demonstrates the ubiquity of *Nitrosospiras* in the environment. *Microbiology* **141**:2793-2800.
- Hobara, S., C. McCalley, K. Koba, A. Giblin, M. Weiss, G. Gettel & G. Shaver.** 2006. Nitrogen Fixation in Surface Soils and Vegetation in an Arctic Tundra Watershed: A Key Source of Atmospheric Nitrogen. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research* **38**:363-372.
- Hobbie, J. E. & E. A. Hobbie.** 2006. ¹⁵N in symbiotic fungi and plants estimates nitrogen and carbon flux rates in arctic tundra. *Ecology* **87**:816-822.
- Hobbie, S. & F. Chapin.** 1996. Winter regulation of tundra litter carbon and nitrogen dynamics. *Biogeochemistry* **35**:327-338.
- Hobbie, S. E.** 1996. Temperature and Plant Species Control Over Litter Decomposition in Alaskan Tundra. *Ecological Monographs* **66**:503-522.
- Hobbie, S. E., J. P. Schimel, S. E. Trumbore & J. R. Randerson.** 2000. Controls over carbon storage and turnover in high-latitude soils. *Global Change Biology* **6**:196-210.
- Höfferle, Š., G. W. Nicol, L. Pal, J. Hacin, J. I. Prosser & I. Mandić-Mulec.** 2010. Ammonium supply rate influences archaeal and bacterial ammonia oxidizers in a wetland soil vertical profile. *FEMS Microbiology Ecology* **74**:302-315.
- Holland, E. A., F. Dentener, B. H. Braswell & J. Sulzman.** 1999. Contemporary and pre-industrial global reactive nitrogen budgets. *Biogeochem.* **46**:7-43.
- Hollibaugh, J. T., N. Bano & H. W. Ducklow.** 2002. Widespread Distribution in Polar Oceans of a 16 S rRNA Gene Sequence with Affinity to *Nitrosospira*-Like Ammonia-Oxidizing Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **68**:1478-1484.
- Holmes, A. J., A. Costello, Lidstrom & J. C. Murrell.** 1995. Evidence that particulate methane monooxygenase and ammonia monooxygenase may be evolutionarily related. *FEMS Microbiology Letters* **132**:203 - 208.
- Hooper, A. B.** 1968. A nitrite-reducing enzyme from *Nitrosomonas europaea* Preliminary characterization with hydroxylamine as electron donor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **162**:49-65.
- Hooper, A. B. & K. R. Terry.** 1974. Photoinactivation of Ammonia Oxidation in *Nitrosomonas*. *J. Bacteriol.* **119**:899-906.
- Hubberten, H.-W. & L. Schirrmeister.** 2006. Rolle des Permafrostes bei der Landschaftsbildung in der Arktis und Subarktis. *Warnsignale aus den Polarregionen : wissenschaftliche Fakten Hrsg.: José L. Lozán ... Hamburg : Büro "Wiss. Auswertungen"*:48-53.
- Hubberten, H., D. Wagner, E. M. Pfeiffer, J. Boike & A. Y. Gukov.** 2006. The Russian-German Research Station Samoylov, Lena Delta - A key Site for the Polar Research in the Siberian Arctic. *Polarforschung*:111-116.
- IPCC.** 2001. Intergovernmental Panel on Climate Change : Climate Change 2001: The Scientific Basis. *Cambridge University Press, Cambridge*.
- IPCC.** 2007. Climate Change 2007: Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, The Physical Basis of Climate Change: <http://www.ipccwg2.org/index.html>.
- Ishii, K., M. Fukui & S. Takii.** 2000. Microbial succession during a composting process as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Journal of Applied Microbiology* **89**:768-777.
- Jetten, M. S. M., O. Sliemers, M. Kuypers, T. Dalsgaard, L. Niftrik, I. Cirpus, K. Pas-Schoonen, G. Lavik, B. Thamdrup, D. Paslier, H. J. M. Camp, S. Hulth, L. P. Nielsen, W. Abma, K. Third, P. Engström, J. G. Kuenen, B. B. Jørgensen, D. E. Canfield, J. S. Sinninghe Damsté, N. P. Revsbech, J. Fuerst, J. Weissenbach, M. Wagner, I. Schmidt, M. Schmid & M. Strous.** 2003. Anaerobic ammonium oxidation by marine and freshwater planctomycete-like bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* **63**:107-114.
- Jetten, M. S. M., M. Strous, K. T. van de Pas-Schoonen, J. Schalk, U. G. J. M. van Dongen, A. A. van de Graaf, S. Logemann, G. Muyzer, M. C. M. van Loosdrecht & J. G. Kuenen.** 1998. The anaerobic oxidation of ammonium. *FEMS Microbiology Reviews* **22**:421-437.
- Jetten, M. S. M., M. Wagner, J. Fuerst, v. Loosdrecht, K. M., G. & M. Strous.** 2001. Microbiology and application of the anaerobic ammonium oxidation ('anammox') process. *Current Opinion in Biotechnology* **12**:283-288.
- Jia, Z. & R. Conrad.** 2009. Bacteria rather than Archaea dominate microbial ammonia oxidation in an agricultural soil. *Environmental Microbiology* **11**:1658-1671.
- Jiang, H., H. Dong, B. Yu, G. Lv, S. Deng, N. Berzins & M. Dai.** 2009. Diversity and Abundance of Ammonia-Oxidizing Archaea and Bacteria in Qinghai Lake, Northwestern China. *Geomicrobiology Journal* **26**:199-211.
- Jiang, Q. Q. & L. R. Bakken.** 1999. Comparison of *Nitrosospira* strains isolated from terrestrial environments. *FEMS Microbiology Ecology* **30**:171-186.

- Jones, R. D. & R. Y. Morita. 1985. Low-temperature growth and whole-cell kinetics of a marine ammonium oxidizer. *Marine Ecology - Prozess Series* **21**:239 - 243.
- Jones, R. D., R. Y. Morita, H.-P. Koops & S. W. Watson. 1988. A new marine ammonium-oxidizing bacterium, *Nitrosomonas cryotolerans* sp. Nov. *Can. J. Microbiol* **34**:1122 - 1128.
- Junier, P., V. Molina, C. Dorador, O. Hadas, O.-S. Kim, T. Junier, K.-P. Witzel & J. Imhoff. 2010. Phylogenetic and functional marker genes to study ammonia-oxidizing microorganisms (AOM) in the environment. *Applied Microbiology and Biotechnology* **85**:425-440.
- Juretschko, S., G. Timmermann, M. Schmid, K.-H. Schleifer, A. Pommerening-Röser, H.-P. Koops & M. Wagner. 1998. Combined Molecular and Conventional Analyses of Nitrifying Bacterium Diversity in Activated Sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-Like Bacteria as Dominant Populations. *Applied and Environmental Microbiology* **64**:3042 - 3051.
- Kaiser, C., H. Meyer, C. Biasi, O. Rusalimova, P. Barsukov & A. Richter. 2005. Storage and mineralization of carbon and nitrogen in soils of a frost-boil tundra ecosystem in Siberia. *Appl. Soil Ecol* **29**:173-183.
- Karner, M. B., E. F. DeLong & D. M. Karl. 2001. Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. *nature* **409**:507-510.
- Kemnitz, D. 2004. Charakterisierung unkultivierter Archaea aus Böden. Dissertation. Universität Göttingen.
- Killham, K. 1986. Heterotrophic nitrification. In: Prosser, I.J. (Hrsg.) *Nitrification*, IRL Press, Oxford. 117 - 126.
- Klemedtsson, L., Q. Jiang, A. Kasimir Klemedtsson & L. Bakken. 1999. Autotrophic ammonium-oxidising bacteria in Swedish mor humus. *Soil Biology & Biochemistry* **31**:839-847.
- Knoblauch, C., U. Zimmermann, M. Blumenberg, W. Michaelis & E. M. Pfeiffer. 2008. Methane turnover and temperature response of methane-oxidizing bacteria in permafrost-affected soils of northeast Siberia. *Soil Biology & Biochemistry* **40**:3004-3013.
- Knowles, R. 2000. Nitrogen Cycle. *Encyclopedia of Microbiology* **3**.
- Kobabe, S. 2005. Charakterisierung der mikrobiellen Lebensgemeinschaft eines sibirischen Permafrostbodens. Dissertation. 2005.
- Kobabe, S., D. Wagner & E.-M. Pfeiffer. 2004. Characterisation of microbial community composition of a Siberian tundra soil by fluorescence in situ hybridisation. *FEMS Microbiology Ecology* **50**:13-23.
- Könneke, M., A. E. Bernhard, J. R. de la Torre, C. B. Walker, J. B. Waterbury & D. A. Stahl. 2005. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *nature* **437**:543.
- Koops, H.-P. & H. Harms. 1985. Deoxyribonucleic acid homologies among 96 strains of ammonia-oxidizing bacteria. *Archives of Microbiology* **141**:214-218.
- Koops, H.-P., U. Purkhold, A. Pommerening-Röser, G. Timmermann & M. Wagner. 2006. The Lithoautotrophic Ammonia-Oxidizing Bacteria In: *The prokaryotes*. 778-811.
- Koops, H. P. & A. Pommerening-Röser. 2001. Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species. *FEMS Microbiology Ecology* **37**:1-9.
- Kowalchuk, G. A., Z. S. Naoumenko, P. J. L. Derix, A. Felske, J. R. Stephen & I. A. Arkhipchenko. 1999. Molecular Analysis of Ammonia-Oxidizing Bacteria of the beta Subdivision of the Class Proteobacteria in Compost and Composted Materials. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:396-403.
- Kowalchuk, G. A. & J. R. Stephen. 2001. Ammonia-oxidizing Bacteria: A Model for Molecular Microbial Ecology. *Annu. Rev. Microbiol* **55**:585-529.
- Kowalchuk, G. A., J. R. Stephen, W. DeBoer, J. I. Prosser, T. M. Embley & J. W. Woldendorp. 1997. Analysis of Ammonia-Oxidizing Bacteria of the β Subdivision of the Class *Proteobacteria* in Coastal Sand Dunes by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Sequencing of PCR-Amplified 16 S Ribosomal DNA Fragments. *Applied and Environmental Microbiology* **63**:1489 - 1497.
- Kowalchuk, G. A., A. W. Stienstra, Heilig, J. R. Stephen & J. W. Woldendorp. 2000. Changes in the community structure of ammonia-oxidizing bacteria during secondary succession of calcareous grasslands. *Environmental Microbiology* **2**:99-110.
- Kuenen, J. G. & M. S. M. Jetten. 2001. Extraordinary anaerobic ammonium-oxidizing bacteria. *ASM News* **67**:456-463.
- Kutzbach, L. 2006. The Exchange of Energy, Water and Carbon Dioxide between Wet Arctic Tundra and the Atmosphere at the Lena River Delta, Northern Siberia. *Dissertation, Universität Hamburg*.
- Kutzbach, L., D. Wagner & E.-M. Pfeiffer. 2004. Effect of microrelief and vegetation on methane emission from wet polygonal tundra, Lena Delta, Northern Siberia. *Biogeochemistry* **69**:341-362.

- Kutzbach, L., C. Wille & E. M. Pfeiffer. 2007. The exchange of carbon dioxide between wet arctic tundra and the atmosphere at the Lena River Delta, Northern Siberia. *Biogeosciences* 4:869-890.
- Lam, P., M. M. Jensen, G. Lavik, D. F. McGinnis, B. Müller, C. J. Schubert, R. Amann, B. Thamdrup & M. M. M. Kuypers. 2007. Linking crenarchaeal and bacterial nitrification to anammox in the Black Sea. *PNAS* 104:7104-7109.
- Landesvermessungsamt Schleswig-Holstein. 2004. Topographische Karte. Normalausgabe. 2328 Trittau.
- Lane, D. J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. E. S. a. M. Goodfellow. Chichester, United Kingdom, John Wiley & Sons::115-175.
- Laverman, A., A. Speksnijder, M. Braster, G. Kowalchuk, H. Verhoef & H. van Verseveld. 2001. Spatiotemporal stability of an ammonia-oxidizing community in a nitrogen-saturated forest soil. *Microbial Ecology* 42:35-45.
- Leininger, S., T. Urich, M. Schloter, L. Schwark, J. Qi, G. W. Nicol, J. I. Prosser, S. C. Schuster & C. Schleper. 2006. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *nature* 442:806-809.
- Liebner, S., Harder, J. & Wagner, D. 2008. Bacterial diversity and community structure in polygonal tundra soils from Samoylov Island, Lena Delta, Siberia. *International Microbiology* 11:195-202.
- Liebner, S., K. Rublack, T. Stuehrmann & D. Wagner. 2009. Diversity of Aerobic Methanotrophic Bacteria in a Permafrost Active Layer Soil of the Lena Delta, Siberia. *Microb Ecol* 57:25-35.
- Mack, M. C., E. A. G. Schuur, M. S. Bret-Harte, G. R. Shaver & F. S. I. Chapin. 2004. Ecosystem carbon storage in arctic tundra reduced by long-term nutrient fertilization. *nature* 431:440-443.
- Macura, J. & G. Stotzky. 1980. Effect of montmorillonite and kaolinite on nitrification in soil. *Folia Microbiologica* 25:90-105.
- Madigan, M. T. & J. M. Martinko. 2006. Brock Mikrobiologie. 11. überarbeitete Auflage. Pearson Studium. München.
- Margesin, R. & C. R. Penton. 2009. Anaerobic Ammonium Oxidation (Anammox). Pages 149-158 Permafrost Soils. Springer Berlin Heidelberg.
- Martens-Habbena, W., Berube, P.M., Urakawa, H., de la Torre, J.R. & Stahl, D. 2009. Ammonia oxidation kinetics determine niche separation of nitrifying Archaea and Bacteria. *Nature Letters* 146:976-981.
- Meincke, M., E. Bock, D. Kastrau & K. M.H. 1992. Nitrite oxidoreductase from *Nitrobacter hamburgensis*: redox center and their catalytic role. *Arch. Microbiol* 158:572 – 578.
- Messing, J. 1983. New M13 Vectors for Cloning. *Methods in Enzymology* 101:20-78.
- Meyer, H., C.Kaiser, C. Biasi, R. Hämmerle, O. Rusalimova, N. Lashchinsky, C. Baranyi, H. Daims, P. Barsukov & A. Richter. 2006. Soil Carbon and nitrogen dynamics along a latitudinal transect in Western Siberia, Russia. *Biogeochemistry* 81:239 - 252.
- Mintie, A. T., R. S. Heichen, K. Cromack, Jr., D. D. Myrold & P. J. Bottomley. 2003. Ammonia-Oxidizing Bacteria along Meadow-to-Forest Transects in the Oregon Cascade Mountains. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:3129-3136.
- Mobarry, B. K., M. Wagner, V. Urbain, B. E. Rittmann & D. A. Stahl. 1996. Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria [published erratum appears in *Appl Environ Microbiol* 1997 Feb;63(2):815]. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2156-2162.
- Morita, R. Y. 1975. Psychrophilic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 39: 144-167.
- Morita, R. Y. 2000. Low-Temperature Environments. *Encyclopedia of Microbiology* 3:93 - 98.
- Mulder, A., A. A. van de Graaf, L. A. Robertson & J. G. Kuenen. 1995. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiology Ecology* 16:177-184.
- Munsell. 1975. Munsell Soil Color charts. Baltimore.
- Muyzer, G., T. Brinkhoff, U. Nübel, C. Santegoeds, H. Schäfer & C. Wawer. 1998. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. *Mol. Microbial Ecol. Manual* 3.4.4:1 - 27.
- Muyzer, G., E. C. de Waal & A. G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:695-700.
- Muyzer, G. & K. Smalla. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* 73:127 - 141.
- Nadelhoffer, K. J., A. E. Giblin, G. R. Shaver & J. A. Laundre. 1991. Effects of temperature and substrate quality on element mineralization in six arctic soils. *Ecology* 72:242-253.
- Nadelhoffer, K. J., A. E. Giblin, G. R. Shaver & A. E. Linkins. 1992. Microbial processes and plant nutrient availability in Arctic soils. In Chapin, F.S., Jefferies, R.L., Reynolds, J.F., Shaver, G.R.

- and Svoboda, J., editors, Arctic ecosystems in a changing climate, San Diego: Academic Press.281–300.
- Nicol, G. W., S. Leininger, C. Schleper & J. I. Prosser.** 2008. The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria. *Environmental Microbiology* **10**:2966 - 2978.
- Norby, R. J.** 1998. Nitrogen deposition: a component of global change analyses. *New Phytologist* **139**:189-200.
- Ochsenreiter, T., Drazenka Selezi, Achim Quaiser, L. Bonch-Osmolovskaya & C. Schleper.** 2003. Diversity and abundance of Crenarchaeota in terrestrial habitats studied by 16S RNA surveys and real time PCR. *Environmental Microbiology* **5**:787-797.
- Ostroumov, V. E. & C. Siegert.** 1996. Exobiological aspects of mass transfer in microzones of permafrost deposits. *Advances in Space Research* **18**:79-86.
- Ovreas, L., L. Forney, F. L. Daae & V. Torsvik.** 1997. Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:3367-3373.
- Painter, H. A.** 1986. Nitrification in the treatment of sewage and wastewaters. In J. I. Prosser (ed.), Nitrification, vol. 20. IRL Press, Oxford, United Kingdom.:185–211.
- Pastor, J. & W. M. Post.** 1988. Response of northern forests to CO₂-induced climate change. *nature* **334**:55-58.
- Perreault, N. N., D. T. Andersen, W. H. Pollard, C. W. Greer & L. G. Whyte.** 2007. Characterization of the Prokaryotic Diversity in Cold Saline Perennial Springs of the Canadian High Arctic. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:1532-1543.
- Pfeiffer, E. M.** Vorlesung: Böden der kalten Klimate. Universität Hamburg.
- Philips, S., H. J. Laanbroek & W. Verstraete.** 2002. Origin, causes, and effects of increased nitrite concentrations in aquatic environments. *Rev Environ Sci Biotechnol* **1**:115–141.
- Pinck, C.** 2001. Immunologische Untersuchungen am Schlüsselenzymsystem der Ammoniakoxidanten. Dissertation. Universität Hamburg.
- Pommerening-Röser, A., G., Rath & H.-P. Koops.** 1996. Phylogenetic diversity within the genus Nitrosomonas. *Syst. Appl. Microbiol.* **19**:344–351.
- Ponder, M. A., Gilmour, S.J., Bergholz, P.W., Mindock, C.A., Hollingsworth, R., Thomasshow, M.F. & Tiedje, J.M.** 2005. Characterization of potential stress responses in ancient Siberian permafrost psychroactive bacteria. *FEMS Microbiology Ecology* **53**:103 - 115.
- Porter, K. G. & Y. S. Feig.** 1980. The Use of DAPI for Identifying and Counting Aquatic Microflora. *Limnology and Oceanography* **25**:943-948.
- Post, W. M., J. Pasto, P. J. Zinke & A. G. Stangenberger.** 1985. Global patterns of soil nitrogen storage. *nature* **317**:613-616.
- Powell, S. J. & J. I. Prosser.** 1991. Protection of Nitrosomonas europaea colonizing clay minerals from inhibition by nitrapyrin. *J Gen Microbiol* **137**:1923-1929.
- Prosser, J. I. & G. W. Nicol.** 2008. Relative contributions of archaea and bacteria to aerobic ammonia oxidation in the environment. *Environmental Microbiology* **10**:2931 - 2941.
- Purkhold, U.** 2003a. Untersuchungen zur Phylogenie und Verbreitung Ammoniak oxidierender Bakterien. Dissertation. Universität München.
- Purkhold, U., A. Pommerening-Röser, S. Juretschko, M. C. Schmid, H.-P. Koops & M. Wagner.** 2000. Phylogeny of All Recognized Species of Ammonia Oxidizers Based on Comparative 16S rRNA and amoA Sequence Analysis: Implications for Molecular Diversity Surveys. *Applied and Environmental Microbiology* **66**:5368-5382.
- Purkhold, U., Wagner, M., Timmermann, G., Pommerening-Röser, A. & Koops, H.-P.** . 2003b. 16S rRNA and amoA-based phylogeny of 12 novel betaproteobacterial ammonia-oxidizing isolates: extension of the dataset and proposal of a new lineage within the nitrosomonades. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**:1485-1494.
- Regan, J. M., G. W. Harrington & D. R. Noguera.** 2002. Ammonia- and Nitrite-Oxidizing Bacterial Communities in a Pilot-Scale Chloraminated Drinking Water Distribution System. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:73-81.
- Reigstad, L. J., A. Richter, H. Daims, T. Urich, L. Schwark & C. Schleper.** 2008. Nitrification in terrestrial hot springs of Iceland and Kamchatka. *FEMS Microbiology Ecology* **64**:167-174.
- Remde, A. & R. Conrad.** 1990. Production of nitric oxide in Nitrosomonas europaea by reduction of nitrite *Archives of Microbiology* **154**:187-191.
- Repo, M. E., S. Susiluoto, S. E. Lind, S. Jokinen, V. Elsakov, C. Biasi, T. Virtanen & P. J. Martikainen.** 2009. Large N₂O emissions from cryoturbated peat soil in tundra. *Nature Geoscience* **2**:189-192.
- Reynolds, E. S.** 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Bio.* **17**:208-212.

- Rittmann, B. E. & R. Whiteman. 1994. Bioaugmentation: a coming of age. *Biotechnology and Bioengineering* 1:12-16.
- Rivkina, E., E. I. Friedman, C. P. McKay & D. Gilichinsky. 2000. Metabolic Activity of Permafrost Bacteria below the Freezing Point. *Applied and Environmental Microbiology* 66:3230-3233.
- Rodionov, A., H. Flessa, M. Grabe, O. A. Kazansky, O. Shibistova & G. Guggenberger. 2007. Organic carbon and total nitrogen variability in permafrost-affected soils in a forest tundra ecotone. *European Journal of Soil Science* 58:1260-1272.
- Roshydromet. 2010. (Russian Federal Service for Hydrometeorology and Environment Monitoring). Weather Information for Tiksi. <http://www.worldweather.org/107/c01040.htm> (World Meteorological Organization).
- Rotthauwe, J.-H., K.-P. Witzel & W. Liesack. 1997. The Ammonia Monooxygenase Structural Gene amoA as a Functional Marker: Molecular Fine-Scale Analysis of Natural Ammonia-Oxidizing Populations. *Applied and Environmental Microbiology* 63:4704-4712.
- Russell, N. & N. Fukunaga. 1990. A comparison of thermal adaptation of membrane lipids in psychrophilic and thermophilic bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 75:171-182.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis & H. A. Erlich. 1988. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science* 239:487 - 491.
- Saitou, N. & M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
- Sanders, T. 2006. Vergleichende Untersuchungen kälteliebender nitrifizierender Bakterien aus Permafrostböden im Lena Delta, Sibirien Diplomarbeit, Universität Hamburg.
- Sanders, T., C. Fiencke & E. M. Pfeiffer. 2010. Small-scale variability of dissolved inorganic nitrogen (DIN), C/N ratios and ammonia oxidizing capacities in various permafrost affected soils of Samoylov Island, Lena River Delta, Northeast Siberia. *Polarforschung* 80:23-35.
- Sanders, T., C. Fiencke, E. Spieck & E.-M. Pfeiffer. 2008. Detection and enrichment of ammonia oxidizers from permafrost soils of Siberia. In: Kane, D.L., and K.M. Hinkel (eds). Ninth International Conference on Permafrost. Institute of Northern Engineering, University of Alaska Fairbanks 2:1567-1571.
- Satoh, K., C. Itoh, D.-J. Kang, H. Sumida, R. Takahashi, K. Isobe, S. Sasaki & T. Tokuyama. 2007. Characteristics of newly isolated ammonia-oxidizing bacteria from acid sulfate soil and the rhizosphere of leucaena grown in that soil. *Soil Science & Plant Nutrition* 53:23-31.
- Schimel, D. S., W. J. Parton, T. G. F. Kittel, D. S. Ojima & C. V. Cole. 1990. Grassland biogeochemistry: Links to atmospheric processes. *Climatic Change* 17:13-25.
- Schimel, J. P. & J. Bennett. 2004. Nitrogen mineralization: challenges of a changing paradigm. *Ecology* 85:591-602.
- Schimel, J. P., K. Kielland & F. S. Chapin III. 1996. Nutrient availability and uptake by tundra plants. In *Landscape Function and Disturbance in Arctic Tundra*. Eds. JF Reynolds and JD Tenhunen. Springer, Berlin, Heidelberg:203-221.
- Schleper, C. 2007. Ammonium-oxidizing Archaea. *Biospektrum* 6:620 - 621.
- Schleper, C. 2010. Ammonia oxidation: different niches for bacteria and archaea? *ISME J* 4:1092-1094.
- Schlichting, E., H. Blume & K. Stahr. 1995. *Bodenkundliches Praktikum*. Blackwell Wissenschaftsverlag, Berlin.
- Schmid, M., U. Twachtmann, M. Klein, M. Strous, S. Juretschko, M. Jetten, J. W. Metzger, K.-H. Schleifer & M. Wagner. 2000. Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation. *Syst. Appl. Microbiol.* 23:93-106.
- Schmidt, S. K., E. K. Costello, D. R. Nemergut, C. C. Cleveland, S. C. Reed, M. N. Weintraub, A. F. Meyer & A. M. Martin. 2007. Biogeochemical Consequences of rapid microbial turnover and seasonal succession in soil. *Ecology* 88:1379-1385.
- Schneider, J., Grosse, G. & Wagner, D. 2009. Land cover classification of tundra environments in the Arctic Lena Delta based on Landsat 7 ETM+ data and its application for upscaling of methane emissions. *remote sensing of environment* 113:380-391.
- Schwamborn, G., V. Rachold & M. N. Grigoriev. 2002. Late Quaternary sedimentation history of the Lena Delta. *Quaternary International* 89:119-134.
- Schwoerbel, J. 1993. Einführung in die Limnologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Shaver, G. R., W. D. Billings, F. S. I. Chapin, A. E. Giblin, K. J. Nadelhoffer, W. C. Oechel & E. B. Rastetter. 1992. Global Change and the Carbon Balance of Arctic Ecosystems. *BioScience* 42:433-441.
- Shaver, G. R. & F. S. Chapin, III. 1980. Response to Fertilization by Various Plant Growth Forms in an Alaskan Tundra: Nutrient Accumulation and Growth. *Ecology* 61:662-675.

- Shaver, G. R., L. C. Johnson, D. H. Cades, G. Murray, J. A. Laundre, E. B. Rastetter, K. J. Nadelhoffer & A. E. Giblin. 1998. Biomass and CO₂ Flux in Wet Sedge Tundras: Responses to Nutrients, Temperature, and Light. *Ecological Monographs* **68**:75-97.
- Sheffield, V. C., D. R. Cox, L. S. Lerman & R. M. Myers. 1989. Attachment of a 40-base-pair G + C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**:232-236.
- Shi, T., R. H. Reeves, D. A. Gilichinsky & E. I. Friedmann. 1997. Characterisation of Viable Bacteria from Siberian Permafrost by 16S rDNA Sequencing. *Microb Ecol* **33**:169-179.
- Smith, R. V., Doyle, R.:m:, Burns, L.C. & Stevens, R.J. . 1997. A Model for nitrite accumulation in Soils. *Soil. Biol. Biochem.* **29**:1241-1247.
- Smith, T. M. & R. L. Smith. 2009. Ökologie. 6. aktualisierte Auflage. Pearson Studium.
- SoilSurveyStaff. 2006. Keys to Soil Taconomy. United States Department of Agriculture & Natural Resources Conservation Service, Washington, D.C.
- SPARCgroup, J. Boike, B. Bolton, M. Grüber, M. Langer, S. Muster, K. Piel, T. Sachs, G. Stoof, S. Westermann & M. Scheritz. 2008. A high resolution orthorectified picture of Samoylov. In J. Boike, D.Y. Bolshiyarov, L. Schirmer und S. Wetterich (eds.): Russian-German Cooperation SYSTEM LAPTEV SEA, The Expedition Lena-New Siberian Islands 2007during the international polar year 2007/2008. *Berichte zur Polar und Meeresforschung. AWI Bremerhaven.* **584**:12-15.
- Spieck, E. & Bock, E. (1998) Taxonmische, physiologische und ökologische Vielfalt nitrifizierender Bakterien. *Biospektrum* **4**: 25-31.
- Spurr, A. R. 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastr. Res.* **26**:31-43.
- Stehr, G., B. Böttcher, P. Dittberner, G. Rath & H.-P. Koops. 1995. The ammonia-oxidizing nitrifying population of the River Elbe estuary. *FEMS Microbiology Ecology* **17**:177-186.
- Stephen, J. R., Y.-J. Chang, S. J. Macnaughton, G. A. Kowalchuk, K. T. Leung, C. A. Flemming & D. C. White. 1999. Effect of Toxic Metals on Indigenous Soil beta -Subgroup Proteobacterium Ammonia Oxidizer Community Structure and Protection against Toxicity by Inoculated Metal-Resistant Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:95-101.
- Steven, B., R. Lèveillé, W. Pollard & L. Whyte. 2006. Microbial ecology and biodiversity in permafrost. *Extremophiles* **10**:259-267.
- Stolz, J. F. & P. Basu. 2002. Evolution of Nitrate Reductase: Molecular and Structural Variations on a Common Function. *ChemBioChem* **3**:198-206.
- Stopnisek, N., C. Gubry-Rangin, S. Hofferle, G. W. Nicol, I. Mandic-Mulec & J. I. Prosser. 2010. Thaumarchaeal ammonia oxidation in an acidic forest peat soil is not influenced by ammonium amendment. *Appl. Environ. Microbiol.*:AEM.00595-00510.
- Strous, M., J. A. Fuerst, E. H. M. Kramer, S. Logemann, G. Muyzer, K. T. van de Pas-Schoonen, R. Webb, J. G. Kuenen & M. S. M. Jetten. 1999. Missing lithotroph identified as new planctomycete. *nature* **400**:446-449.
- Strous, M., E. Van Gerven, P. Zheng, J. G. Kuenen & M. S. M. Jetten. 1997. Ammonium removal from concentrated waste streams with the anaerobic ammonium oxidation (Anammox) process in different reactor configurations. *water research* **31**:1955-1962.
- Stüven, R., M. Vollmer & E. Bock. 1992. The impact of organic matter on nitric oxide formation by *Nitrosomonas europaea*. *Archives of Microbiology* **158**:439-443.
- Suzuki, I., U. Dular & S. C. Kwok. 1974. Ammonia or Ammonium Ion as Substrate for Oxidation by *Nitrosomonas europaea* Cells and Extracts. *J. Bacteriol.* **120**:556-558.
- Takahashi, R., T. Ohmori, K. Watanabe & T. Tokuyama. 1993. Phosphoenolpyruvate carboxylase of an ammonia-oxidizing chemoautotrophic bacterium, *Nitrosomonas europaea* ATCC 25978. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **76**:232-234.
- Tamegai, H., R. Aoki, S. Arakawa & C. Kato. 2007. Molecular analysis of the nitrogen cycle in deep-sea microorganisms from the Nankai Trough: genes for nitrification and denitrification from deep-sea environmental DNA. *Extremophiles* **11**:269-275.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei & S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* **24**:1596-1599.
- Tarnocai, C., J. G. Canadell, E. A. G. Schuur, P. Kuhry, G. Mazhitova & S. Zimov. 2009. Soil organic carbon pools in the northern circumpolar permafrost region. *Global Biogeochem. Cycles* **23**:GB2023.
- Taylor, A. E., L. H. Zeglin, S. Dooley, D. D. Myrold & P. J. Bottomley. 2010. Evidence for different contributions of archaea and bacteria to the ammonia-oxidizing potential of diverse Oregon soils. *Appl. Environ. Microbiol.*:AEM.01324-01310.

- Teske, A., E. Alm, J. M. Regan, B. E. Tittmann & S. D.A.** 1994. Evolutionary Relationships among Ammonia- and Nitrite-Oxidizing Bacteria. *J. Bacteriology* **176**:6623 - 6630.
- Thamdrup, B. & S. Fleischer.** 1998. Temperature dependence of oxygen respiration, nitrogen mineralization, and nitrification in Arctic sediments. *Aquatic Microbial Ecology* **15**:191-199.
- Treusch, A. H., S. Leininger, A. Kletzin, S. C. Schuster, H.-P. Klenk & C. Schleper.** 2005. Novel genes for nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. *Environmental Microbiology* **7**:1985 - 1995.
- Utaker, J. B., L. Bakken, Q. Q. Jiang & I. F. Nes.** 1996. Phylogenetic analysis of seven new isolates of ammonia-oxidizing bacteria based on 16S rRNA gene sequences. Elsevier, München, ALLEMAGNE.
- van de Graaf, A. A., A. Mulder, P. de Bruijn, M. S. Jetten, L. A. Robertson & J. G. Kuenen.** 1995. Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:1246-1251.
- van der Gucht, K., T. Vandekerckhove, N. Vloemans, S. Cousin, K. Muylaert, K. Sabbe, M. Gillis, S. Declerk, L. de Meester & W. Vyverman.** 2005. Characterization of bacterial communities in four freshwater lakes differing in nutrient load and food web structure. *FEMS Microbiology Ecology* **53**:205-220.
- Vanechoutte, M.** 1996. DNA fingerprinting techniques for microorganisms. *Molecular Biotechnology* **6**:115-142.
- VDLUFA(Hrsg.).** 1991. Methodenbuch. Bd. 1. Die Untersuchung von Böden. 4.Auflage, VDLUFA-Verlag. Darmstadt.
- Venter, J. C., Remington, K., Heidelberg, J. F., Halpern, A.L. Rusch, D., Eisen, J.A., Wu, D., Paulsen, I.; Nelson, K.E. ; Nelson, W. , Derrick E. Fouts, D.E., Levy, S., Knap, A.H., Lomas, M.W., Nealson, K., White, O., Jeremy Peterson, J. , Hoffman, J. , Parsons, R., Baden-Tillson, H., Pfannkoch, C., Rogers, Y.-H. & Smith; H.O.** 2004. Environmental Genome Shotgun Sequencing of the Sargasso Sea. *Science* **304**.
- Vishnivetskaya, T., S. Kathariou, J. McGrath, D. Gilichinsky & J. M. Tiedje.** 2000. Low-temperature recovery strategies for the isolation of bacteria from ancient permafrost sediments. *Extremophiles* **4**:165-173.
- Vitousek, P. M., J. D. Aber, R. W. Howarth, G. E. Likens, P. A. Matson, D. W. Schindler, W. H. Schlesinger & D. G. Tilman.** 1997. Technical Report: Human Alteration of the Global Nitrogen Cycle: Sources and Consequences. *Ecological Applications* **7**:737-750.
- Vitousek, P. M. & R. W. Howarth.** 1991. Nitrogen limitation on land and in the sea: How can it occur? *Biogeochemistry* **13**:87-115.
- Vorobyova, E., V. Soina, M. Gorlenko, N. Minkovskaya, N. Zalinova, A. Mamukelashvili, D. Gilichinsky, E. Rivkina & T. Vishnivetskaya.** 1997. The deep cold biosphere: facts and hypothesis. *FEMS Microbiology Reviews* **20**:277-290.
- Voytek, M. A., J. C. Priscu & B. B. Ward.** 1999. The distribution and relative abundance of ammonia-oxidizing bacteria in lakes of the McMurdo Dry Valley, Antarctica. *Hydrobiologia* **401**:113-130.
- Wagner, D., S. Kobabe, E.-M. Pfeiffer & H. W. Hubberten.** 2003. Microbial Controls on Methane Fluxes from Polygonal Tundra of the Lena Delta, Siberia. *Permafrost and Periglacial Processes* **14**:173-185.
- Wagner, D., A. Lipski, A. Embacher & A. Gattinger.** 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., G. Rath, H.-P. Koops, J. Flood & R. Amann.** 1996. In Situ analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants. *Water Science and Technology* **34**:237-244.
- Walker, C. B., J. R. de la Torre, M. G. Klotz, H. Urakawa, N. Pinel, D. J. Arp, C. Brochier-Armanet, P. S. G. Chain, P. P. Chan, A. Gollabgir, J. Hemp, M. Hügler, E. A. Karr, M. Könneke, M. Shin, T. J. Lawton, T. Lowe, W. Martens-Habbena, L. A. Sayavedra-Soto, D. Lang, S. M. Sievert, A. C. Rosenzweig, G. Manning & D. A. Stahl.** 2010. Nitrosopumilus maritimus genome reveals unique mechanisms for nitrification and autotrophy in globally distributed marine crenarchaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**:8818-8823.
- Wallace, W. & D. J. D. Nicholas.** 1969. The biochemistry of nitrifying microorganisms. *Biol. Rev.* **44**:359-391.
- Wallenstein, M. D., S. McMahon & J. Schimel.** 2007. Bacterial and fungal community structure in Arctic tundra tussock and shrub soils. *FEMS Microbiology Ecology* **59**:428-435.
- Washburn, A. L.** 1979. Geocryology. A Survey of Periglacial Processes and Environments. Arnold, London.
- Watanabe, T., S. Asakawa, A. Nakamura, K. Nagaoka & M. Kimura.** 2004. DGGE method for analyzing 16S rDNA of methanogenic archaeal community in paddy field soil. *FEMS Microbiology Letters* **232**:153-163.

- Watson, S. W.** 1974. Nitrobacteraceae. In R. E. Buchanan and N. E. Gibbons (ed.), *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 8th ed. Williams & Wilkins, Baltimore.:450-456.
- Webster, G., T. M. Embley & J. I. Prosser.** 2002. Grassland Management Regimens Reduce Small-Scale Heterogeneity and Species Diversity of Beta-Proteobacterial Ammonia Oxidizer Populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:20-30.
- Weintraub, M. N. & J. P. Schimel.** 2003. Interactions between Carbon and Nitrogen Mineralization and Soil Organic Matter Chemistry in Arctic Tundra Soils. *Ecosystems* **6**:129-143.
- Weintraub, M. N. & J. P. Schimel.** 2005. The seasonal dynamics of amino acids and other nutrients in Alaskan Arctic tundra soils. *Biogeochemistry* **73**:359-380.
- Whitby, C. B., J. R. Saunders, J. Rodriguez, R. W. Pickup & A. McCarthy.** 1999. Phylogenetic Differentiation of Two Closely Related Nitrosomonas spp. That Inhabit Different Sediment Environments in an Oligotrophic Freshwater Lake. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:4855-4862.
- Winogradsky, S.** 1890. Recherches sur les organismes de la nitrification. *Ann. Inst. Pasteur* **4**:213-331.
- Woese, C. R., E. Stackebrandt, W. G. Weisburg, B. J. Paster, M. T. Madigan, V. J. Fowler, C. M. Hahn, P. Blanz, R. Gupta, K. H. Mealson & G. E. Fox.** 1984a. The phylogenie of the purple bacteria: the α -subdivision. *Syst.Appl.Microbioal.* **5**.
- Woese, C. R., W. G. Weisburg, C. M. Hahn, B. J. Paster, L. B. Zablen, B. J. Lewis, T. J. Macke, W. Ludwig & E. Stackenrandt.** 1985. The phylogenie of the purple bacteria: the γ .subdivision. *Syst.Appl.Microbioal.* **6**:25-33.
- Woese, C. R., W. G. Weisburg, B. J. Paster, C. M. Hahn, R. S. Tanner, N. R. Krieg, H.-P. Koops, H. Harms & E. Stackenrandt.** 1984b. The phylogenie of purple bacteria: the β -subdivision. *Syst.Appl.Microbioal.* **5**:327-336.
- Wolfe, B. B., T. W. D. Edwards & R. Aravena.** 1999. Changes in Carbon and nitrogen cycling during tree-line retreat recordind in the isotopic content of lacustrine organic matter, western Taimyr Peninsula, Russia. *Holocene* **9**:215-222.
- Wuchter, C., B. Abbas, M. J. L. Coolen, L. Herfort, J. van Bleijswijk, P. Timmers, M. Strous, E. Teira, G. J. Herndl, J. J. Middelburg, S. Schouten & J. S. Sinninghe Damsté.** 2006. Archaeal nitrification in the ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**:12317-12322.
- Yergeau, E., H. Hogues, L. G. Whyte & C. W. Greer.** 2010. The functional potential of high Arctic permafrost revealed by metagenomic sequencing, qPCR and microarray analyses. *ISME J* **4**:1206-1214.
- Zimmermann, U.** 2006. Methanoxidierende Bakteriengemeinschaften in Böden und Sedimenten des sibirischen Permafrostes. Dissertation. Universität Hamburg.
- Zimov, S. A., E. A. G. Schuur & F. S. I. Chapin.** 2006. Permafrost and the Globale Carbon Budget. *Science* **312**:1612-1612.
- Zubrzycki, S.** 2008. Geographisch-bodenkundliche Untersuchungen zur Charakterisierung von rezenten und Paläoböden des sibirischen Permafrostes im Bereich der Laptewsee. Diplomarbeit. Universität Hamburg.
- Zumpft, W. G.** 1992. The denitrifying prokaryotes In: Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., and Schleifer, K.-H. (eds.). *The Prokaryotes 2nd ed., Springer Verlag, New York*:554-582

VERÖFFENTLICHUNGEN

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht.

1. **Sanders, T., Fiencke, C., Spieck, E. & Pfeiffer, E.-M.** (2008) Detection and enrichment of ammonia oxidizers from permafrost soils of Siberia. In: Kane, D.L., and K.M. Hinkel (eds.). Ninth International Conference on Permafrost. Institute of Northern Engineering, University of Alaska Fairbanks 2: 1567-1571.
2. **Sanders, T., Fiencke, C. & Pfeiffer, E. M.** (2010) Small-scale variability of dissolved inorganic nitrogen (DIN), C/N ratios and ammonia oxidizing capacities in various permafrost affected soils of Samoylov Island, Lena River Delta, Northeast Siberia. *Polarforschung* 80: 23-35.

Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei **Prof. Dr. Eva-Maria Pfeiffer** bedanken. Sie hat von Anfang an ein großes Vertrauen in mich und meine Arbeit gehabt und mich durch ihre Begeisterung für den Boden und den Permafrost - die kalten Klimate mit ganz anderen Augen sehen lassen. Sie hat daran geglaubt, dass aus einer Mikrobiologin eine echte Bodenbuddlerin werden kann.

Besonders danke ich auch **PD Dr. Eva Spieck** für die Begutachtung der Arbeit und für die Möglichkeit ihre Anreicherungen weiterzuführen und ihr Labor in Klein Flottbek zu benutzen. Sie hat mir schon als Hiwi und als Diplomandin die Geheimnisse im Umgang mit den eigenwilligen Nitrifikanten vermittelt.

Dr. Claudia Fiencke danke ich dafür, dass sie an mich gedacht hat. Claudia hatte immer ein offenes Ohr für mich, auch wenn ihre vier Liebsten mehr Aufmerksamkeit bekommen mussten. Sie hat sich immer wieder in meine Arbeit vertieft und durch wichtige Korrekturen zur Veröffentlichung beigetragen. Eine besonders schöne Erfahrung war es, mit Ihr im Feld zu sein.

Prof Dr. Wolfgang Streit danke ich dafür, dass ich in der Mikrobiologie ein zweites kleines zu Hause gefunden habe.

In den Laboren des Instituts für Bodenkunde und in der Mikrobiologie hatte ich viel Unterstützung diverser Art. Mein besonderer Dank geht natürlich an **Birgit Grabellus**. Ohne sie wären meine bodenkundlichen Analysen und so vieles Andere nicht möglich gewesen. Außerdem geht der Dank an die fleißigen Bienen auch studentische Hilfskräfte genannt: **Annika, Annelie, Marisa, Yvonne, Bartosch, Niklas** und alle anderen die ich vergessen habe. Ebenso möchte ich mich bei **Susanne Kopelke** für viele Tipps und Tricks, bei **Birgit Schwinge** für diverse Analysen, bei **Wilfried Gläseker** für das Bereitstellen von Material und seine überaus aufbauende Art, bei **Volker** und **Andreas** für die Hilfe mit der HPLC bedanken.

Dr. Mirjam Perner danke ich, dass ich in ihrem Labor die RT PCR Arbeiten durchführen konnte, dass sie immer ein offenes Ohr hatte und für die netten Abende beim DoKo.

Bei **Dr. Martina Herrmann** möchte ich mich bedanken, dass sie mir die Möglichkeit gegeben hat, bei Ihr die Real Time PCR zu erlernen, obwohl ich sie dann nie angewendet habe.

Außerdem bedanke ich mich bei allen DoktorandInnen und DiplomandInnen, die meine Zeit in der Bodenkunde und in der Mikrobiologie so nett gemacht haben. Zu nennen sind hier: **Sabine (2x), Nico, Katja, Sandra, Boris, Marion, Inken, Seba, Anne, Pete, Inga, Ingke, Lars, Nico** und viel andere mehr. Mein besonderer Dank geht an die **Keuterin**, die alle Höhen und Tiefen mit durchlebt hat und viel Zeit fürs Lesen meiner Arbeit investiert hat. Der **anderen Sabine** danke ich auch fürs Lesen und für die sportliche Ertüchtigung.

Im Besonderen danke ich **Mashal Alawi**, dass er mich in alle Geheimnisse der Molekularbiologie und speziell der DGGE eingeführt hat. Außerdem möchte ich **Ulf** danken für das intensive Korrekturlesen meiner Arbeit.

Meine Arbeit hat nicht nur im Labor und am Schreibtisch stattgefunden, sondern auch auf einer der schönsten Inseln der Welt –Samoylov. Die Arbeiten während der Expedition wären ohne die Unterstützung von **Waldemar Schneider** und **Günther Molo Stooft** niemals möglich gewesen. Ansonsten danke ich allen Expeditionskollegen für die tolle Zeit: **Sebastian Zubrzyski, Moritz Langer, Dirk Wagner, Julia Boilke, Susanne Liebner, Nico Bornemann, Christian Knoblauch, Marita, Maren, Konny, die VIPs** und all den anderen.

Dem **Alfred-Wegner-Institut (AWI)** gilt mein Dank, dass mir die Expeditionen in die Arktis ermöglicht worden sind. Der Universität Hamburg danke ich für die Finanzierung meines Promotionsstipendiums und der DFG und CLISAP danke ich für die Weiterfinanzierung. Der SCISS Schule danke ich für die Aufnahme in ihre Reihen.

Allen MitarbeiterInnen und Studierenden des Instituts für Bodenkunde danke ich für die gute Atmosphäre im Haus.

Meinem **Vater** und **Rita** danke ich für die Unterstützung während meines Studiums, auch wenn sie nicht immer verstanden haben, was ich eigentlich mache. Meinen Geschwistern danke ich, dass es sie gibt. Meinen Freunden und speziell meiner Mädels WG danke ich, dass ihr immer für mich da seid. Und **Tommi** sag ich DANKE für alles.