HELMHOLTZ
ZENTRUM FÜR
UMWELTFORSCHUNG
UFZ

Dissertation 09/2007

Die mikrobielle Methanoxidation in urbanen Böden als Ursache für Baumschäden

Bettina Soltmann

ISSN 1860-0387

Die mikrobielle Methanoxidation in urbanen Böden als Ursache für Baumschäden

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt
der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften der Technischen Universität Dresden

von
Dipl.-Biol. Bettina Soltmann

Tag der Einreichung: 16. Januar 2007
Tag der Disputation: 10. Mai 2007

Gutachter: Prof. I. Röske
Prof. U. Stottmeister
Dr. habil. E.-M. Klimanek

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1
1.1 Vegetationsschäden 1
1.1.1 Baumschäden durch Gasaustritte 1
1.2 Methan 5
1.2.1 Bedeutung von Methan 5
1.2.2 Methan – Quellen und Senken 6
1.2.3 Methanotrophe Bakterien 9
2 Zielsetzung 15
3 Material und Methoden 16
3.1 Untersuchungsgegenstand 16
3.1.1 Straßenstandorte 16
3.1.2 Pflanzgefäße 17
3.1.3 Probenahme und -vorbereitung 18
3.2 Materialien 18
3.2.1 Chemikalien 18
3.2.2 Organismen und deren Lagerung 18
3.3 Bodenphysikalische und–chemische Methoden 19
3.3.1 Gasanalysen 19
3.3.2 Bodenphysikalische Untersuchungen 19
3.3.3 Bodenchemische Methoden 20
3.3.3.1 Bestimmung des Gehaltes an pflanzenverfügbaren Nährstoffen 20
3.3.3.2 Isotopensignatur von Methan und Kohlendioxid 20
3.4 Bodenbiologische Methoden 21
3.5 Mikrobiologische Methoden 21
3.5.1 Nährmedien und Kultivierungsbedingungen 21
3.5.2 Herstellung einer Bodensuspension 22
3.5.3 Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (KBE) 23
3.5.4 Mikro-MPN methanotropher Bakterien 23
3.5.5 Bestimmung der Biomassekonzentration 23
3.5.6 BIOLOG 24
3.5.7 Anreicherung methanotropher Bakterien 24
3.5.8 Isolierung methanotropher Bakterien 25

3.5.9 Charakterisierung methanotropher Isolate 26
3.5.9.1 Bestimmung der sMMO-Aktivität *26*
3.5.9.2 Bestimmung spezifischer Enzymaktivitäten *27*
3.5.9.3 Bestimmung des Fettsäurespektrums *27*
3.5.9.4 Elektronenmikroskopische Untersuchung *27*
3.6 Molekularbiologische Methoden 28
3.6.1 DNA-Extraktion aus Bakterien 28
3.6.2 DNA-Extraktion aus dem Boden 28
3.6.3 DNA-Aufreinigung 29
3.6.4 DNA-Reinheits- und Konzentrationsbestimmung 29
3.6.5 PCR 30
3.6.6 Elektrophorese 32
3.6.7 Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE) 33
3.6.8 Silbernitratfärbung 35
3.6.9 Phylogenetische Einordnung 35

4 Ergebnisse 36
4.1 Standortcharakterisierung 36
4.1.1 Bodenluftzusammensetzung 36
4.1.2 Bodenphysikalische und –chemische Charakterisierung 41
4.1.3 Biologische Charakterisierung 42
4.2 Pflanzgefäße 45
4.2.1 Bodenluftzusammensetzung 45
4.2.2 Bodenphysikalische Charakterisierung 47
4.2.3 Bodenchemische Charakterisierung 48
4.2.4 Mikrobiologische Charakterisierung 50
4.3 Methanotrophe Isolate aus erdgasbeeinflußten Straßenböden 55
4.3.1 Anreicherung und Isolierung methanotropher Bakterien 55
4.3.2 Charakterisierung methanotropher Isolate 59
4.3.2.1 Morphologie *59*
4.3.2.2 Physiologie *63*
4.3.2.3 Biochemie *64*
4.3.2.4 Phylogenetische Einordnung *68*
4.4 Molekularbiologische Analyse erdgasbeeinflußten Bodens 70
4.4.1 DNA-Extraktion 70

4.4.2 Verteilung verschiedener Gattungen methanotropher Bakterien 72
4.5 Sanierungsansatz 79

5 Diskussion 84
5.1 Einfluß des Erdgases auf bodenphysikalische, -chemische und -biologische Kenngrößen 84
5.2 Methanotrophe Isolate aus erdgasbeeinflußten Straßenböden 90
5.2.1 Erdgasbeeinflußter Straßenboden als Habitat für Methanotrophe 90
5.2.2 Anpassungen der Isolate an das Habitat 91
5.2.3 Anreicherungs- und Isolierungsstrategien 93
5.3 Molekularbiologische Charakterisierung der methanotrophen Lebensgemeinschaft in Pflanzgefäßen 97
5.4 Sanierungsvorschläge für erdgasbeeinflußte Straßenböden 104

7 Zusammenfassung 109
8 Literatur 112

Abkürzungsverzeichnis

AMS	Ammoniummineralsalzmedium
aPA	alkalische Phosphatase
bp	Basenpaare
CAL	Calciumacetat-Calciumlaktat-Extraktion
C_{mik}	mikrobielle Biomasse
C_{org}	organischer Kohlenstoff
DCD	Dicyandiamid
DDBJ	Data Base of Japan
DGGE	Denaturierende Gradientengelelektrophorese
DHA	Dehydrogenase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOC	Dissolved organic carbon
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EC	Enzyme Commission Number
EDTA	Ethylendinitrilotetraesigsäure
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
FADH	Formaldehyddehydrogenase
FDH	Formiatdehydrogenase
GB	„Gasbakterium" (interne Bezeichnung)
GC-Gehalt	Gehalt an den Basen Guanin und Cytosin ((G+C/A+T+G+C)x100%)
GMD	gewogener mittlerer Durchmesser
GWP	greenhouse warming potential
ICM	intracytoplasmatische Membranen
ICP	induktiv gekoppeltes Plasma
K	Kapazität des Lebensraums
KBE	Kolonie bildende Einheiten
K_{oc}	Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
LN-NMS	Nitratmineralsalzmedium mit wenig Nitratstickstoff, ohne Kupferzusatz
MDH	Methanoldehydrogenase
MPN	most probable number
NÄ	Nähragar

NBTPT	N-(n-Butyl)-thiophosportriamid
NCIMB	National Collections of Industrial and Marine Bacteria
NMS	Nitratmineralsalzmedium
NMS_{-Cu}	Nitratmineralsalzmedium ohne Kupferzusatz
OD	optische Dichte
PBS	phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDB	Pee Dee Belemnite
PDB	Protein Data Bank
PHB	Poly-β-hydroxybuttersäure
pMMO	membrangebundene Methanmonooxygenase
PMS	Phenazinmethosulfat
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidon
PWP	Permanenter Welkepunkt
r	Wachstumsrate der Population
RuMP	Ribulosemonophosphat
SCP	Einzelzellprotein
SDS	Natriumdodecylsulfat
sMMO	lösliche Methanmonooxygenase
SUP	Substratverwertungsmuster
TG bzw. TS	Trockengewicht bzw. -substanz
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TCA	Tricarbonsäure
TCE	Trichlorethylen
TEMED	N'-N'-N'-N'Tetra-methyl-ethylendiamin
Tg	Teragramm (10^{12} g)
TNE	Tris-NaCl-EDTA-Puffer
TPF	Triphenylformazan
UFZ	Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH

1 Einleitung

Nach SUKOPP & WITTIG (1993) lassen sich annähernd 3 % des Gesamt-Waldbestandes in Deutschland in den Städten finden, wo dieser Vegetation wichtige ökologische Funktionen zukommen. Neben dem ästhetischen und architektonischen Wert hat die Vegetation einen günstigen Effekt auf das städtische Mikroklima, Temperaturschwankungen werden ausgeglichen, Sonneneinstrahlung durch Schattenspende gemindert und Stäube und Aerosole aus der Luft gefiltert (TAUCHNITZ 1997).

Zur Gesunderhaltung der Park- und Straßenbäume wenden die Kommunen Finanzmittel auf, die allein für das Straßenbegleitgrün 1-2 % der kommunalen Ausgaben betragen (BALDER 1998).

1.1 Vegetationsschäden

Verglichen mit ihrem natürlichen Standort sind Bäume an innerstädtischen Verkehrswegen zahlreichen adversen Effekten ausgesetzt, welche sich aus der charakteristischen Standortsituation ergeben. Die Kombination zumeist lokal begrenzter Schadfaktoren führt häufig zum Erkranken oder vorzeitigen Absterben von Bäumen (MEYER 1982, LEH 1991, 1993). Der winterliche Einsatz von Streusalz mit seinem schädigenden Einfluß auf Boden und Vegetation ist hinlänglich bekannt und galt lange Zeit als Hauptverursacher für das Erkranken von Straßenbäumen (RUGE & STACH 1968, LEH 1971, 1973, BROD 1984). Der Wasserhaushalt und Gasaustausch des Bodens sind aufgrund großflächiger Bodenversiegelung und –verdichtung erheblich beeinträchtigt, welches sich besonders negativ auf das Wurzelsystem und die Mykorrhiza auswirkt. Emissionen aus Verkehr, Hausbrand und Industrie und mechanische Beschädigungen der Bäume durch Baumaßnahmen zählen ebenfalls zu den schädigenden Faktoren, die die Prädisposition für weitere abiotische und biotische Stressoren erhöhen.

1.1.1 Baumschäden durch Gasaustritte

Von Ver- und Entsorgungssystemen, die seit mehr als 100 Jahren unter der Erde verlegt werden, gehen Umweltbelastungen aus (KRETZSCHMAR 1992).

Bereits 1893, als man im Zuge der Industrialisierung und der damit verbundenen Stadterweiterungen verstärkt Bäume in der Stadt anpflanzte, wurde in Berlin

(LÖSCHBURG 1980 cit. ex NOE 1995a) auf den Zusammenhang zwischen Baumschäden und Gasleitungsleckagen hingewiesen (HAMPEL 1893), die ersten Baumschäden traten mit Einführung der Gasbeleuchtung auf.

Eine deutliche Zunahme der Baumschäden wurde in Westeuropa in den Sechziger und Siebziger Jahren beobachtet, dieser Anstieg geht mit der Umstellung von Stadt- auf Erdgas einher; so wiesen BRAVERMAN et al. (1962) auf den Zusammenhang zwischen Erdgasleckagen und Baumschäden in New York hin. In den Niederlanden war der Tod von 50-70% der abgestorbenen Bäume auf Gasleitungsleckagen zurückzuführen (HOEKS 1972). Nach der Umstellung von Stadt- auf Erdgas 1962 stellte die Energieversorgung in Leer Gasverluste bis zu 50 % fest, in deren Folge 300 Bäume, zumeist Linden, eingingen (KÜHNE & KÖSTER 1967). Dies erstaunte zunächst, da dem Erdgas die toxischen Komponenten des Stadtgases, wie Kohlenmonoxid, Schwefelwasserstoff und Cyanide, fehlen (vgl. Tab. 1.1). HOEKS (1972) berichtet zwar von einer Konzentration von 2–3 ppm Ethylen im Erdgas, schließt jedoch einen direkten toxischen Effekt dieser Komponente aus. Aufgrund der Beaufschlagung alter Leitungsnetze mit trockenerem Erdgas, das ein Austrocknen alter Hanfdichtungen verursacht, und gleichzeitiger Erhöhung des Leitungsdruckes kommt es zu einem höheren Gasverlust aus den Leitungen. Während der Gasverlust bei Stadtgas nur 5 % betrug, steigt er bei der Beaufschlagung mit Erdgas auf das 8-10 fache an, KRÖGER (1975) berichtet von einem Entweichen von ca. 4 l/m^2 Rohrfläche pro Stunde. Eine schnelle Sanierung der Leitungssysteme hat jedoch zu einer nachlassenden Problematik geführt. Die Umstellung von Stadt- auf Erdgas in den neuen Bundesländern fand jedoch zum größten Teil in den alten Leitungsnetzen statt, großflächige Beeinträchtigungen und Baumschäden sind die Folge (BALDER 1993, LEH 1993, NOÉ et al. 1995 a, b). In Ost-Berlin treten schätzungsweise täglich über 2000 m^3 Gas aus mehr als 20000 Leckagen aus (KRÜGER & BALDER 1995, NOÉ et al. 1995b).

Tab. 1.1: Zusammensetzung von Stadt- und Erdgas

Komponente	Stadtgas	Erdgas*
	Vol.-%	*Vol.-%*
CH_4	21,8	86,97
C_2H_6	0,9	4,87
C_3H_8	k. A.	1,27
$n\text{-}C_4H_{10}$	k. A.	0,49
N_2	18,2	5,44
H_2	48,8	0
CO	4,4	0
CO_2	3,6	0,96
	mg/m³	*mg/m³*
H_2S	1,7	0
HCN	97,0	0
NH_3	108,0	0
Arbeitsdruck	80-90 mm H2O	150-180 mm H2O

*Verbundgas Nord (Verbundnetz Gas AG)

Das in erster Linie aus Methan bestehende Gas übt im Boden keine direkte toxische Wirkung aus wie das Stadtgas. Vielmehr verdrängt das austretende Erdgas die Bodenluft und damit den Bodensauerstoff. Ein weiterer Grund für das folgende Sauerstoffdefizit liegt in der mikrobiellen Oxidation der Kohlenwasserstoffe, primär des Methans. Die Untersuchungen von HOEKS (1972) legen die Verhältnisse der Gaskonzentrationen im Umkreis eines Gaslecks dar (Abb. 1.1). Mit zunehmendem Abstand zum Leck nimmt die Methankonzentration kontinuierlich ab und die Sauerstoffkonzentration gegenläufig zu. An der Grenzschicht, an der sowohl Methan als auch Sauerstoff verfügbar sind, findet unter Sauerstoffzehrung mikrobielle Methanoxidation statt. Kohlendioxid wird freigesetzt und reichert sich im Boden an, es entsteht ein größeres Sauerstoffdefizit als es eine rein mechanische Verdrängung hätte verursachen können. Der Sauerstoffgehalt in der Nähe des Lecks fällt unter die für das Pflanzenwachstum benötigten 12-14 Vol.-% (ADAMSE et al. 1972, RUGE 1977), Absterbeerscheinungen der Wurzeln sind die Folge.

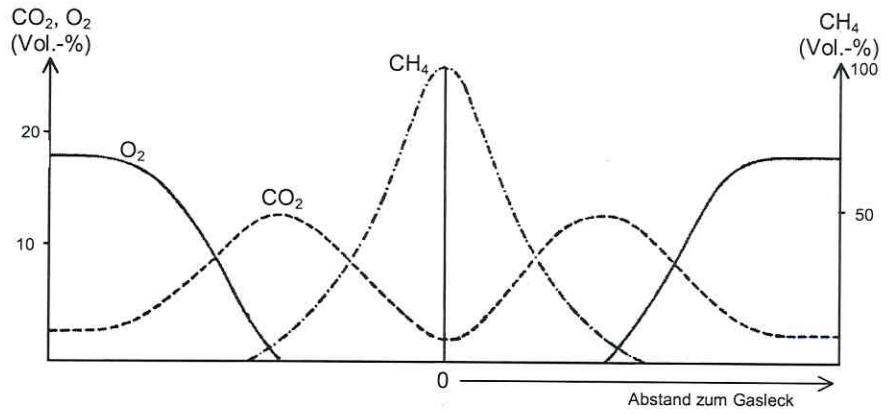


Abb. 1.1: Schema der Zusammensetzung der Bodenluft in Abhängigkeit von der Entfernung zum Gasleck (verändert nach HOEKS 1972 und MEYER 1982)

Zu den diagnostischen Merkmalen der geschädigten Straßenbäume gehören Kleinblättrigkeit, Welkerscheinungen, Vergilben und frühzeitiger Blattverlust, schüttere Kronen, Absterben von Zweigen, kein Knospen im Frühjahr, verfrühte Blüte oder Fruchtbildung und schließlich der Tod des Baumes (HOEKS 1972, KRÜGER & BALDER 1992). Die Blattinhaltsstoffe zeigen eine Zusammensetzung wie man sie aus der frühen Phase der Blattalterung vor dem Laubfall kennt (BLUME et al. 1979). Die blauverfärbten Wurzeln sind anfällig für Sekundärinfektionen von phytopathogenen Pilzen (HOEKS 1972).

Als anatomische Reaktion auf den Erdgasschaden bilden einige Bäume Adventivwurzeln aus. Dieser Anpassungsmechanismus, der hauptsächlich von überfluteten Pappeln her bekannt ist (CRAWFORD & TYLER 1969), ist jedoch für Straßenbäume zwecklos, da durch die Bodenversiegelung auch die obersten Bodenschichten kaum reicher an Sauerstoff sind. Wie DEUBER (1932) beobachtete reagieren Eichenwurzeln mit der Ausbildung von hypertrophierten Lentizellen. Die verschiedenen Baumarten zeigen unterschiedliche Sensitivitäten gegenüber einer Gasleckage, in der Literatur gehen die Meinungen hierüber jedoch auseinander. Während FOOS (1976) Pappeln, trotz ihrer Anpassungen gegenüber Sauerstoffarmut für besonders sensitiv hält, bezeichnet FINTELMANN (1877 cit ex. BALDER 1998) insbesondere *Populus balsamifera* (Balsampappel) als relativ resistent. Seiner Erfahrung nach reagieren Linden- und Ahornarten am empfindlichsten. Birken leiden stärker als Eichen und Kiefern (BLUME 1979).

Der Boden besitzt einen unangenehmen Geruch nach organischen Säuren, wie sie unter anaeroben Verhältnissen entstehen (SCHOLLENBERGER 1930, KÜHNE & KÖSTER 1967, KRÖGER 1975), er wird strukturlos und schmierig (BALDER 1998, BILHARZ & SIEGERT 1997). Das Erscheinungsbild der Böden ist vergleichbar mit den Gleyeböden oder den „Methanosolen" der Müllkippen. Hier entstammt das Methan den anaeroben Zersetzungsvorgängen im verdichteten Müllkörper, entweicht in den Boden und führt ebenfalls zu Vegetationsschäden (FUKUSHI et al.1975). Nach der Endabdeckung einer Deponie in Berlin-Wannsee waren noch in 50-75 m Entfernung Schäden in einem angrenzenden Waldgebiet festzustellen (BLUME et al. 1979).

1.2 Methan

1.2.1 Bedeutung von Methan

Methan ist mit derzeit 1,8 ppm das organische Gas mit der höchsten Konzentration in der Atmosphäre (CICERONE & OREMLAND 1988). Aus Untersuchungen der Luftzusammensetzung von Eisbohrkernen geht hervor, daß sich in den letzten 200 Jahren die Methankonzentration mehr als verdoppelt hat (CRAIG & CHOU 1982) und jährlich um ca. 0,8 % steigt (HOUGHTON et al. 1996). In den letzten 3000 Jahren war die Methankonzentration mit 0,6 bis 0,8 ppm konstant (RASMUSSEN & KHALIL 1984). Durch photochemische Oxidationsreaktionen übt Methan einen großen Einfluß auf sowohl die troposphärische als auch die stratosphärische Chemie aus. In der Troposphäre ist Methan an photochemischen Prozessen beteiligt, die die Konzentration von Hydroxylradikalen, Kohlenmonoxid und Ozon beeinflussen. Oxidierbare Spurengase wie Methan bauen Ozon ab, wenn Stickstoffmonoxid nicht oder in nur sehr geringer Konzentration vorhanden ist (1), hingegen führen höhere Stickstoffmonoxid-Konzentrationen in Gegenwart von Methan zur Ozonbildung (2).

$$CH_4 + O_3 \rightarrow\rightarrow CO + 2\,H_2O \quad \text{(NOx-Konzentration niedrig)} \quad (1)$$

$$CH_4 + 8\,O_2 \rightarrow\rightarrow CO_2 + 2\,H_2O + 4\,O_3 \quad \text{(NOx-Konzentration hoch)} \quad (2)$$

Aufgrund seiner langen Lebensdauer von 4 Jahren erreicht in die Troposphäre emittiertes Methan auch die Stratosphäre. Dort ist die Oxidation von Methan eine wichtige Quelle für Wasserdampf und folglich auch für Hydroxyl-Radikale, die ozonzerstörendes NO_x zu weniger reaktiver Salpetersäure umwandeln oder aber aus

Chlorwasserstoff ozonzerstörende Chlor- und Chloroxid-Radikale freisetzen (CRUTZEN 1991).

Weitere Verlustreaktionen stratosphärischen Methans sind die Reaktion mit Hydroxyl- und Chlor-Radikalen und energetisch angeregtem Singulettsauerstoff (3-5).

$$CH_4 + OH^{\cdot} \rightarrow CH_3^{\cdot} + H_2O \quad (3)$$

$$CH_4 + O^* \rightarrow OH^{\cdot} + CH_3^{\cdot} \quad (4)$$

$$CH_4 + Cl \rightarrow CH_3^{\cdot} + HCl \quad (5)$$

Methan gehört zu den wichtigsten Treibhausgasen der Atmosphäre, ohne deren Wärmeretention die Oberflächentemperatur der Erde um etwa 33 °C geringer wäre (MILICH 1999). Trotz der relativ niedrigen atmosphärischen Konzentration wird der Anteil von Methan am Treibhauseffekt auf 15-20 % geschätzt. Die Ursache hierfür liegt in der 32fach höheren spezifischen Absorption im Infrarot-Bereich im Vergleich zu Kohlendioxid (KHALIL & RASMUSSEN 1994). Bei einem Zeithorizont von 100 Jahren liegt der GWP-Wert („greenhouse warming potential") von Methan bei 20.

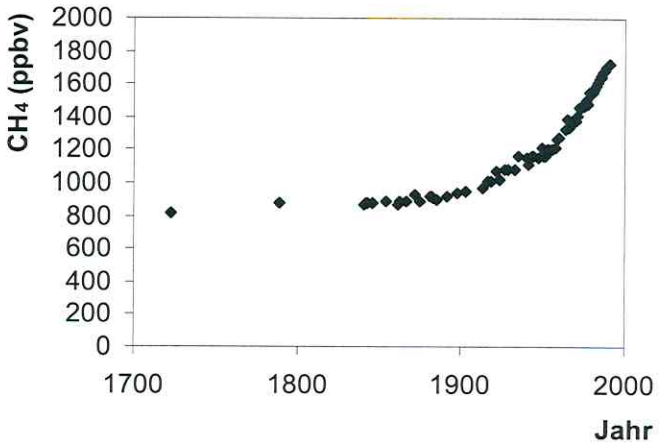


Abb. 1.2: Methankonzentrationen der letzten 300 Jahre (Werte nach KHALIL & RASMUSSEN 1994)

1.2.2 Methan – Quellen und Senken

Der Anstieg der troposphärischen Methankonzentration ist vorwiegend auf den zeitlichen Anstieg der globalen Quellstärke zurückzuführen. Methan wird bei dem mikrobiellen Abbau organischen Materials unter anaeroben Bedingungen gebildet.

Als letzter Schritt des Dekompositionsprozesses schließt sich die Methanogenese dem fermentativen Abbau und der syntrophen Acetogenese bzw. Homoacetogenese an. Die Methanogenese ist auf strikt anoxische Habitate, die ein Redoxpotential unter –200 mV aufweisen, beschränkt (NEUE & ROGER 2000), da Sauerstoff eine irreversible Diassoziation des für die Methanogenese notwendigen F_{420}-Hydrogenase-Enzymkomplexes bewirkt (SCHÖNHEIT et al. 1981). Die Fähigkeit zur Methanogenese ist auf Vertreter der Archaea beschränkt, die Wasserstoff und Kohlendioxid, Acetat oder verschieden methylierte Substanzen zu Methan reduzieren können.

Die drei größten Quellen der Methanemissionen stellen mit je um 100 Tg/a (Teragramm = 10^{12}g) natürliche Feuchtgebiete, Reisfelder und der Gastrointestinaltrakt der Wiederkäuer dar. Zusätzlich existieren noch mehrere kleinere Quellen mit zwischen 10 und 50 Tg/a, zu diesen gehören Mülldeponien, Kohlebergbau, Biomasseverbrennung, Abwasserbeseitigung, Erdgasleckagen, Seen, Ozeane und Termiten (Abb. 1.3). Der überwiegendes Anteil stammt aus biogenen, anthropogen beeinflußten Quellen (KHALIL & RASMUSSEN 1990), von denen die größten in Entwicklungsländern mit hohem Bevölkerungswachstum zu finden sind.

Extrapolationen von bekannten Methan-Fluxen deuten auf eine globale Emission von Methan aus Feuchtgebieten von 109 Tg/a hin (BARTLETT & HARRISS 1993), dies entspricht 3% der Netto-Produktion des Ökosystems, die in Form von Methan emittiert wird. Tropische Regionen besitzen mit 66 Tg/a einen Anteil von 60,5% an der Methanemission aus Feuchtgebieten, nördliche Gebiete wie Tundren 35% und Subtropen und gemäßigte Breiten 4,5% (BARTLETT & HARRISS 1993). Reisfelder, auf denen das Hauptnahrungsmittel für etwa die Hälfte der Weltbevölkerung angebaut wird (LINDAU et al. 1990) und die mit 12-20% zum globalen Methanbudget beitragen (CONRAD 1997, GILBERT 1997, MILICH 1999), stellen hinsichtlich der Bodenchemie (PONNAMPERUMA 1978) und -mikrobiologie (GILBERT 1997, HENCKEL et al. 1999, BODELIER et al. 2000a, b, LIESACK et al. 2000, ELLER & FRENZEL 2001) die am besten untersuchte Methanquelle dar.

Die Netto-Methanfreisetzung in die Atmosphäre ergibt sich aus der Methanproduktion vermindert um die Methanoxidation, die in den vom Methan passierenden oxischen Bodenschichten stattfindet. So werden bis zu 97% (SCHÜTZ et al. 1989, CONRAD & ROTHFUSS 1991, GILBERT & FRENZEL 1995) des in Reisfeldern

produzierten Methans wieder oxidiert, bevor es den Boden verläßt. Unter bestimmten Transportbedingungen kann Methan jedoch der Oxidation entkommen, 70-90% des aus Reisfeldern emittierten Methans entweicht über das Aerenchym der Reispflanze (DACEY et al. 1979, HOLZAPFEL-PSCHORN et al. 1985, 1986), 10-25% in Form von Gasblasen über das Flutwasser und ein kleiner Teil über direkte Diffusion (SCHÜTZ et al. 1989, SHANNON et al. 1996, MILICH 1999, HORZ 2000).

Die Oxidation durch Bodenmikroorganismen vermindert nicht nur die Methanfreisetzung aus dem Boden, sie stellt ebenfalls die einzige biotische Senke für atmosphärisches Methan dar (Ab.1.4). Die größte Senke ist allerdings eine abiotische, 85 % des in die Atmosphäre emittierten Methans wird durch die Reaktion mit dem Schlüsselradikal der atmosphärischen Photochemie, dem Hydroxylradikal, in der Troposphäre zerstört (MILICH 1999). Ein Anteil verbleibt in den bereits erwähnten Verlustreaktionen der Stratosphäre (vgl. S. 6 (3)-(5)). In der Mesosphäre schließlich wird alles restliche Methan durch sehr kurzwellige UV Strahlung photolytisch zerstört.

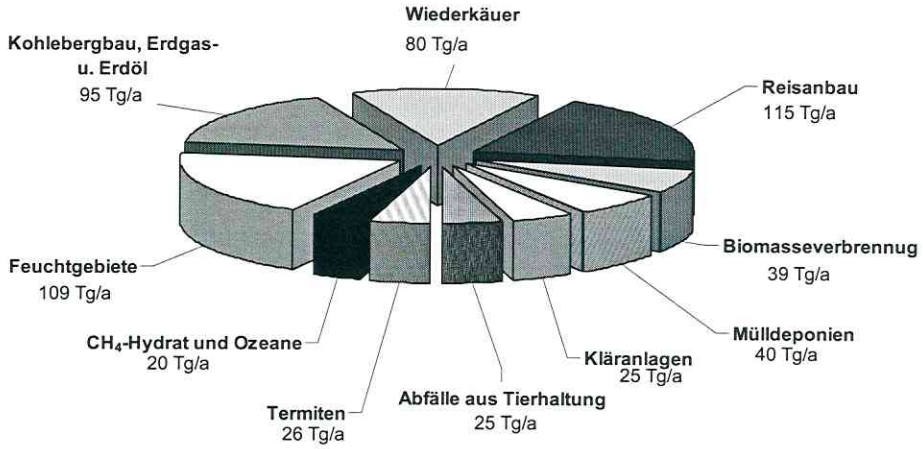


Abb. 1.3: Anteil einzelner Methanquellen an der jährlichen Gesamtmethanemission (Angaben nach Milich 1999)

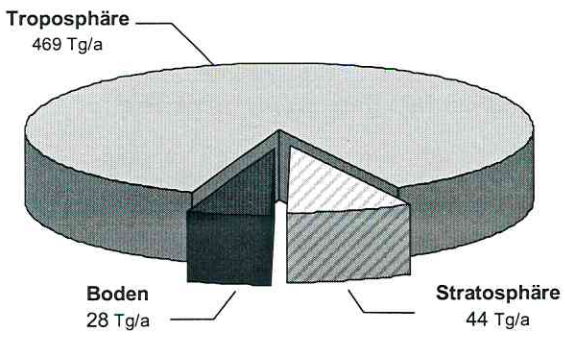


Abb. 1.4: Anteil einzelner Methansenken an der jährlichen Methanoxidation (Angaben nach Milich, 1999)

1.2.3 Methanotrophe Bakterien

Methanotrophe Bakterien sind in ihrer Fähigkeit, Methan als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle zu verwenden, einzigartig; sie stellen eine Untergruppe der physiologischen Gruppe der Methylotrophen dar, eine auf die Verwertung von C1-Verbindungen spezialisierte Gruppe der aeroben, gram-negativen Bakterien. Verbindungen mit Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen können von ihnen nicht zum Wachstum benutzt werden.

Obwohl mit *Bacillus methanicus* bereits 1906 (SÖHNGEN 1906) das erste methanoxidierende Bakterium isoliert wurde und von LEADBETTER & FOSTER (1958) und FOSTER & DAVIS (1966) weitere methanoxidierende Bakterien beschrieben wurden, legten erst WHITTENBURY et al. (1970a) mit der Isolierung von über 100 neuen methanotrophen Stämmen die Grundlage für die heutige Klassifikation dieser Bakterien. Die Schwierigkeit bei der Isolierung von Reinkulturen, das Fehlen von phänotypischen Unterscheidungsmerkmalen und Mißachtungen des *International Code of Nomenclature of Bacteria* haben jedoch Klassifikationsprobleme in der methanotrophen Systematik hervorgerufen (BOWMAN et al. 1993). Die Anwendung polyphasischer Taxonomie, DNA-DNA-Hybridisierung und 16S rDNA Sequenzierung haben in den letzten Jahren zu einer Revision der methanotrophen Systematik mit den heute gültigen Taxa (Tab. 1.2) geführt (BOWMAN et al. 1991, 1993 und 1995).

Tab. 1.2: Methanotrophe Bakterien (Nomenklatur entspricht List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature (J. P. Euzéby, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, France, http://www.bacterio.cict.fr/) bzw. Bacterial Nomenclature up-to-date (http://www.dsmz.de))

γ-Proteobacteria:

-Methylococcaceae

Methylobacter	*M. luteus* (ROMANOVSKAYA et al. 1981)* *M. marinus* (BOWMAN et al. 1993) *M. psychrophilus* (OMEL'CHENKO et al. 1996; Validation List No 73, 2000) *M. whittenburyi* (ROMANOVSKAYA et al. 1981)*
Methylocaldum	*M. gracile* (BODROSSY et al. 1997; Validation List No. 66, 1998) *M. lepidum* (BODROSSY et al. 1997; Validation List No. 66, 1998) *M. szegediense* (BODROSSY et al. 1997; Validation List No. 66, 1998)
Methylococcus	*M. capsulatus* (FOSTER AND DAVIS 1966) *M. mobilis* (HAZEU et al. 1980; Validation List No. 5, 1980) *M. thermophilus* (MALASHENKO et al. 1975)
Methylo-microbium	*M. agile* (BOWMAN et al. 1993)** *M. album* (BOWMAN et al. 1993)** *M. buryatense* (KALUZHNAYA et al. 2001) *M. pelagicum* (SIEBURTH et al. 1987)**
Methylomonas	*M. aurantiaca* (BOWMAN et al. 1990; Validation List No. 35, 1990) *M. fodinarum* (BOWMAN et al. 1990; Validation List No. 35, 1990) *M. methanica* (WHITTENBURY & KRIEG 1984) *M. scandinavica* (KALYUZHNAYA et al. 1999; Validation List No. 74, 2000)
Methylosarcina	*M. fibrata* (WISE et al. 2001), *M. quisquiliarum* (WISE et al. 2001)
Methylosphaera	*M. hansonii* (BOWMAN et al. 1997; Validation List No. 64, 1998)

Forts. Tab. 1.2:

α-Proteobacteria:

-Rhizobiaceae

Methylocystaceae	*Methylocystis*	*M. echinoides* (GAL'CHENKO et al. 1977)* *M. parvus* (ROMANOVSKAYA et al. 1978)*
	Methylosinus	*M. sporium* (ROMANOVSKAYA et al. 1978)* *M. trichosporium* (ROMANOVSKAYA et al. 1978)*
Beijerinckia Gruppe	*Methylocapsa*	*M. acidiphila* (DEDYSH et al. 2002)
	Methylocella	*M. palustris* (DEDYSH et al. 2000)
		M. tundrae (DEDYSH et al. 2004)

Typspezies sind unterstrichen; *reklassifiziert von BOWMAN et al. (1993); **reklassifiziert von BOWMAN et al. (1995)

Unterschiede in der Art der Kohlenstoff-Fixierung, der Anordnung der intracytoplasmatischen Membranen, des GC-Gehaltes und der Phylogenie (TSUJI et al. 1990) führten zu einer Einteilung in Typ I- und Typ II-Methanotrophe (Tab. 1.3) (WHITTENBURY & KRIEG 1984).

Tab. 1.3: Eigenschaften Typ I und Typ II methanotropher Bakterien

Merkmal	Typ I	Typ II
Zellmorphologie	Stäbchen oder Kokken	Gekrümmt, ellipsoid
Anordnung der intracytoplasmatischen Membranen	Bündel	Peripher (falls vorhanden)
Ruhestadien	Azotobacter ähnliche Zysten, Lipidzysten	Exosporen oder Lipidzysten
Hauptstoffwechselweg der C-Assimilation	RuMP-Weg	Serin-Weg
TCA-Zyklus	unvollständig*)	vollständig
Stickstoff-Fixierung	-/+	+
dominierende Fettsäurekettenlänge	16	18
G+C-Gehalt der DNA (mol %)	49-65	62-67
Unterklasse der Proteobakterien	γ	α

*) die Unvollständigkeit des TCA-Zyklus beruht auf dem Fehlen der 2-Oxoglutaratdehydrogenase

Methylococcus spp. besitzen Charakteristika beider Typen, dies führte zunächst zur Etablierung des Typs X, diese Einordnung wurde später von BOWMAN et al. (1993) jedoch revidiert und *Methylococcus spp.* aufgrund der phylogenetischen Verwandtschaft den Typ I Methanotrophen zugeordnet.

Eine andere Einteilung der methanoxidierenden Bakterien beruht auf der Methanaffinität, so werden die oben beschriebenen klassischen Methanotrophen als niedrig-affine Methanoxidierer bezeichnet. Sie oxidieren Methan an den anoxisch-oxischen Grenzflächen, die durch hohe Methankonzentrationen gekennzeichnet sind, hier liegt die apparente halbmaximale Substrataffinität ($K_{m(app)}$) im mikromolaren Bereich. Für die Oxidation atmosphärischen Methans sind jedoch andere bisher noch nicht isolierte Mikroorganismen verantwortlich, sie werden als hoch-affin bezeichnet, der $K_{m(app)}$ liegt hier im nanomolaren Bereich (BENDER & CONRAD 1992, 1993).

Methanotrophe Bakterien sind ubiquitär verbreitet und konnten in einer Vielzahl von Habitaten nachgewiesen werden, welches die breite ökologische Amplitude dieser Mikroorganismen widerspiegelt (HEYER et al. 1984). Durch die Kombination moderner molekularer Methoden und klassischen Isolierungen wurden in den letzten Jahren psychrophile (BOWMAN et al. 1997, MORAN & HICKEY 1997, OMELCHENKO et al. 1993, 1996, TROTSENKO & KHMELENINA 2005), thermophile (BODROSSY et al. 1997, 1999, ESHINIMAEV et al. 2004, MALASHENKO et al. 1975), acidophile (DEDYSH et al. 2002) und alkalophile (KHMELENINA et al. 1997, LIN et al. 2004) Methanotrophe entdeckt.

Methanotrophe sind an aeroben-anaeroben Grenzschichten zu finden, an denen sowohl fossiles oder rezentes Methan als auch Sauerstoff kontinuierlich verfügbar sind (REEBURGH et al. 1993), wie z. B. Reisfelder (GILBERT & FRENZEL 1995, GILBERT 1997), Torfmoore (DEDYSH et al. 1998 a, b), Tundren (VECHERSKAYA et al. 1993), Mülldeponien (MANCINELLI & MCKAY 1985, WISE et al. 1999). So sind größere Populationen im Metalimnion stratifizieter Seen anzutreffen, wo sie aus dem Hypolimnion aufsteigendes Methan oxidieren (HEYER et al. 1984). Des weiteren sind Symbiosen aus Methanotrophen mit Tiefseemuscheln der Hydrothermalquellen des Pazifischen und Altlantischen Ozeans bekannt (CHILDRESS et al. 1986, DISTEL & CAVANAUGH 1994, NERCESSIAN et al. 2005).

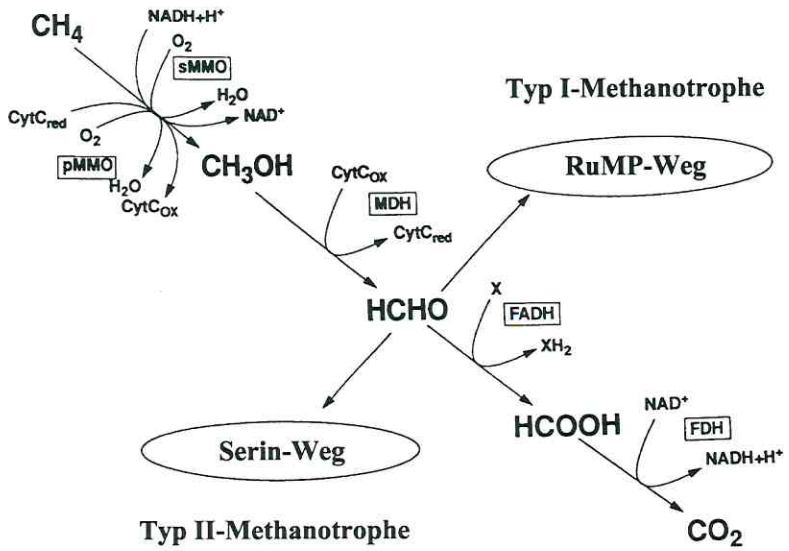


Abb. 1.5: Schema der Methanoxidation und Formaldehyd-Assimilation (CytC Cytochrom c; sMMO bzw. pMMO lösliche bzw. membrangebundene Methanmonooxygenase; MDH Methanoldehydrogenase; FADH Formaldehyddehydrogenase; FDH Formiatdehydrogenase (nach Hanson & Hanson 1996).

Die Nettoreaktion der Methanoxidation unter aeroben Bedingungen lautet:

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

Die Oxidation von Methan zu Methanol führt zum Einbau von molekularem Sauerstoff in das Molekül. Dieser primäre Schritt wird von der Methanmonooxygenase (MMO) katalysiert, von der zwei Formen identifiziert wurden: die membrangebundene oder „partikuläre" MMO (pMMO) und die cytoplasmatische bzw. „lösliche" MMO (sMMO). Trotz ihrer anscheinenden Funktionsgleichheit zeigen sMMO und pMMO keinerlei genetische oder strukturelle Homologien.

Bis auf die Gattung *Methylocella* (DEDYSH et al. 2000) verfügen alle bekannten Methanotrophen über die pMMO. Hingegen ist der Besitz der sMMO auf überwiegend Typ II Methanotrophe beschränkt, in jüngerer Zeit wurden allerdings einige Typ I methanotrophe Stämme wie *Methylomonas* (KOH et al 1993, SHEN et al. 1997, SHIGEMATSU et al. 1999) und *Methylomicrobium* (FUSE et al. 1998) mit sMMO gefunden (AUMANN et al. 2000, TAKEDA 1988).

Das im initialen Schritt durch die MMO gebildete Methanol wird über eine Methanoldehydrogenaase zu Formaldehyd umgewandelt (siehe Abb. 1.5).

Auf der Stufe des Formaldehyds verzweigen sich assimilatorischer und dissimilatorischer Stoffwechselweg. Im ersten Fall erfolgt die Synthese von Zellsubstanz aus Formaldehyd typspezifisch über den Ribulosemonophosphat- oder den Serin-Weg. Auf dem dissimilatorischen Weg wird das Formaldehyd durch eine Formaldehyddehydrogenase zu Formiat und weiter durch eine Formiatdehydrogenase zu Kohlendioxid oxidiert. Dieser NAD+ abhängige Schritt resultiert in der Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten, die einerseits zurück in die Methanoxidation, andererseits in die Atmungskette eingehen.

Das erste biotechnologische Interesse erweckten die Methanotrophen zwischen 1960 und 1980 als billiger Produzent von Einzelzellprotein (SCP) und Chemikalien wie Methanol oder Alkenepoxiden (ANTHONY 1982).

Die meisten biotechnologischen Studien sind heutzutage jedoch auf die Fähigkeit einiger methanotropher Stämme fokussiert, sMMO zu bilden. Sein breites Substratspektrum befähigt dieses Enzym dazu, eine Vielzahl von Verbindungen zu cometabolisieren (SULLIVAN et al. 1998). Die geringe Substratspezifität der sMMO wurde sehr detailliert bei *Methylosinus trichosporium* OB3b untersucht (z. B. TSIEN et al. 1989, OLDENHUIS et al. 1989). So gehören zum Repertoire der Reaktionen die Hydroxylierung von Alkanen, Epoxidation von Alkenen, Oxidation von Ether-, halogenierten Methan- und aromatischen Verbindungen (COLBY et al. 1977, HIGGINS et al. 1981, SULLIVAN 1998). Unter diesen Verbindungen befinden sich bedenkliche Umweltkontaminanten wie z. B. der halogenierte aliphatische Kohlenwasserstoff Trichlorethylen (TCE), ein bedeutender Grundwasserschadstoff. Die Biotransformation von TCE durch methanotrophe Reinkulturen wurde intensiv untersucht (FOGEL et al. 1986, LITTLE et al. 1988, OLDENHUIS & JANSSEN 1993, BECK 2000, JECHOREK et al. 2003). Die schnelle Umsetzung von TCE und die gute Verfügbarkeit von Erdgas als Wachstumssubstrat lassen Methanotrophe für Bioremediationsapplikationen attraktiv erscheinen (ALVAREZ-COHEN 1993), wie es am Beispiel des Savannah River Site-Projektes in den USA demonstriert wurde (HAZEN 1992).

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit ergibt sich aus der Fähigkeit der Methanotrophen unter Stoffwechselmangelbedingungen bestimmte Biopolymere - insbesondere die Poly-β-hydroxybuttersäure (PHB) (WENDLANDT et al. 1998, 2001, 2005)- zu bilden.

2 Zielsetzung

In den „Neuen Bundesländern" ist es seit der Umstellung von Stadt- auf Erdgas in vielen Städten zu Baumschäden durch Gasaustritte gekommen. In Leipzig sollten, angeregt durch das Grünflächenamt der Stadt und durch die Stadt Leipzig mit einem Forschungsvorhaben die Auswirkungen von Erdgasaustritten auf die Böden betroffener Bäume untersucht werden. Es galt die Bodenveränderungen hinsichtlich bodenphysikalischer, -chemischer und –biologischer Parameter zu charakterisieren und mögliche Sanierungsmethoden solcher Standorte vorzuschlagen. Eingegliedert in diese Thematik war es Ziel der vorliegenden Arbeit, bodenmikrobiologische Veränderungen zu charakterisieren, die aufgrund der Methanaustritte aus Leitungsleckagen entstehen. Die Besonderheiten, die der methanbeeinflußte Boden gegenüber anderen anoxischen Böden aufweist, sollten auf stofflicher und organismischer Ebene aufgezeigt werden.

Der Fokus wurde dabei auf die Organismen gelegt, denen das während einer Leckage in den Boden emittierte Methan als C-Quelle dient, und die somit die Bodenmikrobiozönose maßgeblich bestimmen. Da mit Ausnahme von wenigen Deponiestandorten keine neueren Untersuchungen zu Methanotrophen in stark anthropogen geprägten Substraten mit hohen Methangehalten vorliegen, ist die Untersuchung der methanotrophen Population Voraussetzung für ein grundlegendes Verständnis. Infolgedessen sollte ein Verfahrensvorschlag zur Sanierung erarbeitet werden.

Um die Erdgasauswirkungen unter vergleichbaren Bedingungen untersuchen zu können und um eine Verringerung der Heterogenität gegenüber ausgewählten Straßenstandorten zu erreichen, wurden die Untersuchungen ebenfalls in Pflanzgefäßen durchgeführt.

Es leiteten sich folgende Arbeitsschwerpunkte ab:

- Abiotische Beschreibung des Habitats erdgasbeeinflußter Straßenboden
- Charakterisierung der methanotrophen Biozönose hinsichtlich Vorkommen, Abundanz und Diversität
  a) mittels adaptierter Isolierungsstrategien und taxonomischer Einordnung quantitativ bedeutsamer Isolate
  b) mittels molekular-ökologischer Techniken
- Ableitung eines neuen Ansatzpunktes für Sanierungsmaßnahmen

3 Material und Methoden

3.1 Untersuchungsgegenstand

Die Untersuchungen erdgasbeeinflußten Bodens wurden in Straßenzügen in den Städten Leipzig und Taucha (Sachsen) und in einer Gefäßversuchsstation durchgeführt.

3.1.1 Straßenstandorte

Es wurden Standorte ausgewählt, an denen Erdgas austritt bzw. vormals austrat und die Baumscheiben mit geschädigten oder bereits abgestorbenen Bäumen besetzt sind bzw. die abgestorbenen Bäume bereits entfernt wurden. Pro Standort wurden die Tiefenstufen 0-10 cm, 10-40 cm, 40-70 cm und 17-100 cm untersucht. Einen Überblick über diese Straßenstandorte gibt Tab. 3.1.

Tab. 3.1: Einteilung der untersuchten Straßenstandorte

Straßen-zug	Standort	Kategorie*)	Zustand/Bewuchs
A	T1	hohe Methankonzentration	abgestorbener Jungbaum
B	T2	hohe Methankonzentration	vitaler Jungbaum
C	R	Referenzstandort ohne Methan	sanierte Baumscheibe mit vitaler Linde
	L1	geringe Methankonzentration	leere unsanierte Baumscheibe
	L2	kein Methan	leere unsanierte Baumscheibe
	L3	geringe Methankonzentration	leere unsanierte Baumscheibe
	L4	hohe Methankonzentration	leere unsanierte Baumscheibe
	L5	kein Methan	geschädigte Linde
D	L6	hohe Methankonzentration	abgestorbene Platane
	L7	hohe Methankonzentration	geschädigte Platane

*) Methangehalte der Bodenluft zum Zeitpunkt der Standortauswahl

3.1.2 Pflanzgefäße

Die Pflanzgefäße bestanden aus Polypropylengefäßen und hatten ein Volumen von 1 m^3. Der Aufbau der Gefäße ist Abb. 3.1 zu entnehmen. Das Pflanzsubstrat in den Gefäßen bestand aus 60 % Mutterboden, 30 % Vulkaperl und 10 % Kompost. Zum Ablauf des Sickerwassers wurden die Gefäße mit einer Drainageschicht versehen und auf einem Betonsockel mit einem Gefälle von 2 % errichtet. Zur Beaufschlagung der Gefäße mit Erdgas wurde ein geschlitztes Polyethylenrohr horizontal in die Sandschicht eingebaut. Der Erdgasanschluß erfolgte über eine 25 mbar Niederdruckleitung, über Feinstdosierventile (Swagelok) konnte ein definierter Gasfluß mit Hilfe von Durchflußmessern eingestellt werden. Zur Messung der Bodenluftzusammensetzung in verschiedenen Tiefen (10-40, 40-70, 70-100, 100-130, 130-160 cm Tiefe) der Gefäße wurden 5 geschlitzte Polyvinylchloridrohre vertikal in jedes Gefäß eingebaut. Die Gefäße waren mit je einer Winterlinde *(Tilia cordata)* bepflanzt.

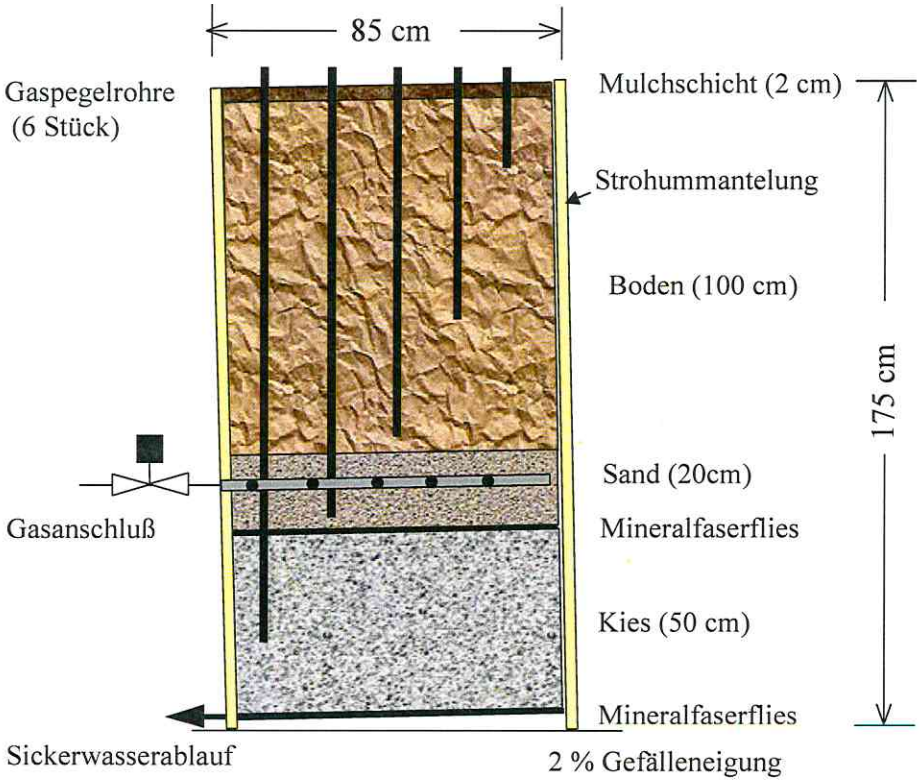


Abb. 3.1: Schematischer Aufbau eines Pflanzgefäßes

3.1.3 Probenahme und –vorbereitung

Die Bodenproben wurden an dem Standort T 1 und in den Pflanzgefäßen mit einem Pirkhauer bzw. River-Site-Bohrstock gezogen. An den Standorten L wurden die Proben den Profilwänden zuvor ausgeschachteter Gruben entnommen. Die Proben wurden homogenisiert, in Polyethylen-Beutel überführt, mit Stickstoff begast und kühl gelagert. In die Gruben wurden geschlitzte Gaspegelrohre aus Polyvinylchlorid in den Tiefen 10-40 cm, 40-70 cm und 70-100 cm zur Gasprobenahme eingebracht.
Die Bodenproben wurden sobald wie möglich nach der Probennahme untersucht. War aufgrund einer hohen Anzahl an Proben eine sofortige Analyse nicht möglich, wurde der Boden bei 4°C (Verarbeitung innerhalb von 4 Wochen) bzw. bei –18°C (bei längerer Lagerung als 4 Wochen) aufbewahrt. Vor der Verwendung eingefrorenen Bodens wurde dieser bei 4°C langsam aufgetaut. Alle bodenbezogenen Werte beziehen sich auf das Bodentrockengewicht, welches nach 24 h bei 105 °C bestimmt wurde. Phosphor und Kalium wurden an luftgetrocknetem und auf ≤ 2 mm gesiebtem, C_{org} an auf ≤ 0,1 mm gemahlenem Boden bestimmt.

3.2 Materialien

3.2.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden von verschiedenen Herstellern bezogen und hatten den Reinheitsgrad zur Analyse, molekularbiologische Reagenzien hatten entsprechenden Reinheitsgrad (DNAse frei). Oligonukleotide wurden von den Firmen Biometra (Göttingen) und MWG Biotech (Ebersberg) synthetisiert.

3.2.2 Organismen und deren Lagerung

Die in Tab. 3.2 aufgeführten Mikroorganismen dienten als Referenzorganismen. Zur Stammkonservierung wurden frisch bewachsene Agarplatten mit Medium, dem 25 % Glycerin als Frostschutzmittel zugesetzt war, abgeschwemmt, in 2 ml NUNC-Röhrchen abgefüllt und bei -85 °C eingelagert. Die Arbeitskulturen wurden auf Schrägagarröhrchen bzw. Platten kultiviert.

Tab. 3.2: Verwendete Mikroorganismen und deren Herkunft

Stamm	Herkunft	Referenz
Methylobacter luteus 53v	NCIMB 11914	ROMANOVSKAYA et al. 1978
Methylomonas methanica S1	NCIMB 11130	WHITTENBURY et al. 1970
Methylococcus capsulatus TRMC McBath	NCIMB 11132	WHITTENBURY et al. 1970
Methylosinus trichosporium OB3b	NCIMB 11131	WHITTENBURY et al. 1970
Methylosinus sporium 5	NCIMB 11126	WHITTENBURY et al. 1970
Methylocystis parvus OBBP	NCIMB 11129	WHITTENBURY et al. 1970
Methylocystis spec. GB 14	UFZ, Sektion Sanierungsforschung	

3.3 Bodenphysikalische und -chemische Methoden

3.3.1 Gasanalysen

Die Gaszusammensetzung in den Pflanzgefäßen und in den Böden der Straßenbaumstandorte wurde mit dem portablen Deponiegasmonitor "Digiflam" der Firma Neotronics gemessen.

Das Meßprinzip dieses Gerätes beruht auf Infrarot-Absorption (Methan und Kohlendioxid), Sauerstoff wird in einer elektrochemischen Zelle gemessen.

Der Meßbereich liegt für Sauerstoff bei 0 bis 21 Vol.-%, für Kohlendioxid bei 0-50 Vol.-% und für Methan von 0-100 Vol.-%. Die werksseitige Kalibrierung wurde mit folgenden Prüfgasen der Firma AGA Gas regelmäßig überprüft: 2 ± 0,06 Vol.-% Methan in synthetischer Luft und 20 ± 0,6 Vol.-% Methan, 3,01 ± 0,09 Vol.-% Kohlendioxid in Stickstoff.

3.3.2 Bodenphysikalische Untersuchungen

Die bodenphysikalischen Untersuchungen wurden an der landwirtschaftlichen Fakultät der Universität Halle, Institut für Acker- und Pflanzenbau durchgeführt.

Die Aggregatstabilität wurde mittels Naß-Siebung nach HARTGE & HORN (1989) an ausgewählten Bodenproben der Pflanzgefäße bestimmt. Mit diesem Verfahren werden unter definiertem Wassereinfluß die Veränderungen in der Aggregatgrößenverteilung bestimmt. Aus den Werten vor und nach der Naß-Siebung läßt sich die Differenz des gewogenen mittleren Durchmessers (Δ GMD) errechnen, die als Maß für die Wasserstabilität der Aggregate/Krümel Verwendung findet.

Zunehmende Werte für Δ GMD verweisen dabei auf steigende Instabilität der Aggregate.

3.3.3 Bodenchemische Methoden

3.3.3.1 Bestimmung des Gehaltes an pflanzenverfügbaren Nährstoffen

Der Gehalt des Bodens an Ammonium, Nitrat, C_{org}, Phosphat, Kalium und Mangan wurde von der Sektion Analytik, UFZ bestimmt. Die Bestimmung des Nitrats erfolgte nach NAVONE (1964) und GOLDMAN & JACOBS (1961; MEIER 1991), des Ammoniums nach DIN 38406 (1983). C_{org} wurde nach vorheriger Austreibung des Carbonats durch 10%ige HCl über die trockene Verbrennung bei 1000 °C in einem CHN-Analyser der Firma Leco gemessen. Phosphor und Kalium wurden nach CAL(Calciumacetat-Calciumlaktat)-Extraktion entprechend SCHÜLLER (1969) und VDLUFA (1997) bestimmt, Phosphor photometrisch (Philips PU 8730 und CADAS 50S, Dr. Lange) nach Reaktion mit schwefelsaurem Ammoniumheptamolybdat-Ascorbinsäurereagenz (MURPHY & RILEY 1962, WATANABE & OLSEN 1965) und Kalium mittels Atomabsorptionsspektrometer (PERKIN ELMER AAS 4100). Mobiles Mangan wurde in Anlehnung an die DIN 19730 (1997), modifiziert nach SCHLICHTING et al. (1995) an einem ICP-Atomemissionsspektrometer (SPECTROFLAME) gemessen.

3.3.3.2 Bestimmung der Isotopensignatur von Methan und Kohlendioxid

Die Isotopensignatur von Methan und Kohlendioxid ausgewählter Bodenluftproben wurde durch das Institut für Nichtklassische Chemie an der Universität Leipzig gemessen.

Die Ermittlung der $\delta^{13}C$-Werte des Methans und Kohlendioxids erfolgte mit einer Apparatur in Anlehnung an DUMKE et al. (1989). Dabei werden Kohlendioxid und Methan gaschromatographisch getrennt, Methan zu Kohlendioxid verbrannt und nach Abtrennung des Verbrennungswassers isotopenanalytisch untersucht. Das in der Probe enthaltene Kohlendioxid wurde nach der Trennung kryogenetisch gereinigt und gleichermaßen massenspektrometrisch untersucht. Die massen-spekrotmetrischen Messungen erfolgten am Isotopenverhältnismassenspektrometer Typ DELTA S. Die Ergebnisse sind als $\delta^{13}C$-Werte bezogen auf den PDB- (Pee Dee Belemnite) Standard angegeben.

3.4 Bodenbiologische Methoden

Parameter zur Kennzeichnung allgemeiner biologischer Aktivität und die Bestimmung ausgewählter Enzymaktivitäten erfolgten in der Sektion Bodenforschung, UFZ Halle. Die substratinduzierte Respiration wurde in einer Anlage nach HEINEMEYER et al. (1989) nach ANDERSON & DOMSCH (1978) gemessen. Das Dimethylsulfoxid (DMSO)-Reduktionsvermögen wurde nach ALEF & KLEINER (1989), modifiziert nach BECK (1984), die alkalische Phosphatase-Aktivität nach TABATABAI & BREMNER (1969) und die Dehydrogenase-Aktivität nach THALMANN (1968), modifiziert nach MALKOMES (1993) bestimmt.

3.5 Mikrobiologische Methoden

3.5.1 Nährmedien und Kultivierungsbedingungen

Für die Kultivierung obligat methanotropher Bakterien wurde Nitratmineralsalzmedium nach CORNISH et al. (1984) folgender Zusammensetzung verwendet (Angaben pro l):

- NMS: 850 mg $NaNO_3$; 530 mg KH_2PO_4; 860 mg Na_2HPO_4; 174 mg K_2SO_4; 37 mg $MgSO_4$ x 7 H_2O; 7 mg $CaCl_2$ x 2 H_2O; 0,574 mg $ZnSO_4$ x 7 H_2O; 0,466 mg $MnSO_4$ x 4 H_2O; 0,096 mg H_3BO_3; 0,096 mg $NaMoO_4$ x 2 H_2O; 0,096 mg $CoCl_2$ x 6 H_2O; 0,166 mg KI; 0,25 mg $CuSO_4$ x 7 H_2O; 11,2 mg $FeSO_4$ x 7 H_2O; 0,002 ml H_2SO_4 (1mM)

Folgende Varianten dieses Mediums wurden ebenfalls verwendet:

- NMS_{-Cu}-Medium: kupferfreies Medium ohne externe Zugabe von Kupfer
- LN-NMS-Medium: Medium mit wenig Nitrat-Stickstoff, 85 mg $NaNO_3$ statt 850 mg und ohne externe Kupferzugabe

Alternativ wurde ein Mineralsalzmedium mit Ammonium als Stickstoffquelle eingesetzt (Angaben pro l).

- AMS: 761 mg NH_4Cl; 530 mg KH_2PO_4; 860 mg Na_2HPO_4; 3,7 mg $CaCl_2$ x 6 H_2O; 71,2 mg $MgSO_4$ x 7 H_2O; 0,44 mg $ZnSO_4$ x 7 H_2O; 0,812 mg $MnSO_4$ x 4 H_2O; 0,785 mg $CuSO_4$ x 7 H_2O; 0,252 mg $NaMoO_4$ x 2 H_2O

Der pH-Wert wurde auf 6,8 eingestellt, feste Medien wurden mit 2 % Bacto-Agar (Difco) hergestellt. Alternativ wurden Agarplatten mit Nobelagar (Difco) oder mit Kieselgel (nach FUNK & KRULWICH 1964) verfestigt, um den Zusatz an organischen Verunreinigungen durch Agar zu minimieren. Zur Anzucht von Flüssigkulturen

wurden die Zellen einer frisch bewachsenen Agarplatte abgeschwemmt und mit 100 ml des jeweiligen Mediums in einen 1 l Erlenmeyerkolben transferiert. Spezielle Aufsätze zur sterilen Begasung ermöglichten es, ein partielles Vakuum anzulegen und 30 Vol.-% der Gasphase durch Methan zu substituieren. Die Kolben wurden schüttelnd bei 30°C inkubiert. Agarplatten wurden in Begasungstöpfen ebenfalls mit 30 Vol.-%Methan begast.

Für andere heterotrophe Bakterien bzw. zur Reinheitskontrolle methanotropher Kulturen wurde Nähragar (Merck 1.05443)

- NÄ: 5 g Pepton aus Fleisch und 3 g Fleischextrakt (pH 7,0 ± 0,2 bei 25°C)/l

bzw.

- $NMS_{oligocarbophil}$: 0,2 g/l Hefeextrakt und 1 g/l Pepton aus Casein in NMS-Medium

für die Detektion von Verunreinigungen mit oligocarbophilen Bakterien (STAROSTINA 1999) eingesetzt.

Die Zahl der koloniebildenden Einheiten (KBE) wurde auf R2A -Agar (Difco 1826-17-1) bestimmt (REASONER & GELDREICH 1985).

- R2A: 0,5 g Bacto Hefeextrakt, 0,5 g Bacto Proteose Pepton No. 3, 0,5 g Bacto Casaminosäuren, 0,5 g Bacto Dextrose, 0,5 g lösliche Stärke, 0,3 g Natrium-pyruvat, 0,3 g Dikaliumhydrogenphosphat 0,05 g Magnesiumsulfat, 15 g Bacto Agar ($\sum$ 18,2 g/l), pH 7,2 ± 0,2 bei 25 °C

Kontaminationen durch Pilze wurden mit Hilfe von Moser-Medium identifiziert.

- Pilz-Agar : Malzextrakt 5 g/l, Hefeextrakt 0,1 g/l, KH_2PO_4 0,5 g/l, $MgSO_4$ x H_2O 0,5 g/l, $FeCl_3$ 0,01 g/l

Alle verwendeten Medien und Kulturgefäße wurden 20 min bei 121°C autoklaviert.

Die Zellmorphologie der in Flüssig- und Festmedien gewachsenen Kulturen wurde mikoskopisch (Optiphot, Nikon) im Lebendpräparat (1000fache Vergrößerung, Ölimmersion, Phasenkontrast) untersucht. Die Koloniemorphologie von Agarkulturen wurde mit einem Stereomikroskop (Zeiss, Jena) festgestellt.

3.5.2 Herstellung einer Bodensuspension (nach BURLAGE 1998)

Für den Ansatz von most probable number (MPN), Anzahl koloniebildender Einheiten (KBE) und Substratverwertungsmuster (SUP) wurde eine Bodensuspension verwendet, die wie folgt hergestellt wurde: 5 g Bodenprobe (Frischgewicht) wurden in einen sterilen Minibecher (37-110 ml) eines Labormixers (Laboratory Blender, Waring) überführt, 45 ml 0,1% ige Natriumpyrophosphatlösung ($Na_2P_4O_7$ * 10 H_2O;

pH 7,0) hinzugefügt und zweimal für 30 sec. mit einer Pause von 30 sec. gemixt. Für den Ansatz der Mikro-MPN methanotropher Bakterien wurde diese Ausgangssuspension in NMS-Flüssigmedium weiter verdünnt, für die KBE und SUP wurde eine weitere Verdünnung in phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung (PBS) durchgeführt.

3.5.3 Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (KBE)

Von der in 3.5.2 hergestellten Bodensuspension wurde eine Verdünnungsreihe in PBS hergestellt und jeweils 0,1 ml auf je 3 R2A-Platten ausgestrichen. Nach einer 14tägigen Inkubation der Platten bei 25°C wurden solche ausgezählt, bei denen die Koloniezahl zwischen 20 und 120 lag.

3.5.4 Mikro-MPN methanotropher Bakterien

Zur Bestimmung der Anzahl methanotropher Bakterien in den Bodenproben wurde nach der MPN-Methode verfahren. Diese Methode beruht auf der Feststellung der An- bzw. Abwesenheit von Mikroorganismen in Aliquoten einer Verdünnungsreihe. Die Verdünnungsreihen wurden in 96 well-Mikrotiterplatten (Nunclon™ Surface, Nunc) angelegt. Diese wurden mittels einer 8-Kanal-Pipette mit 150 µl NMS-Flüssigmedium je Vertiefung beschickt. In die erste Reihe der Platten wurden 150 µl einer geeigneten Vorverdünnung der Bodensuspension (s. 3.5.2) pipettiert, mit dem Medium vermischt und 150 µl aus dieser Reihe in die nächste Reihe pipettiert, so fortfahrend ergaben sich 12 zweifache serielle Verdünnungsstufen mit 8facher Wiederholung. Die Platten wurden 4 Wochen lang in Begasungstöpfen unter einer Methan-/Luft-Atmosphäre im Verhältnis 30/70, die alle 3 Tage erneuert wurde, bei 25°C inkubiert (untere Temperaturgrenze des optimalen Wachstums methanotropher Isolate aus dem Boden (BENDER & CONRAD 1995)) . Als Kontrolle dienten Ansätze ohne Begasung. Die Platten wurden an einem Mikrotiterplatten-Photometer Victor2, 1420 Multilabel Counter (Fa. Wallac) bei 595 nm vermessen. Die Auswertung der Platten erfolgte nach ROWE et al. (1977).

3.5.5 Bestimmung der Biomassekonzentration

Die Konzentration der Biomasse während des Bakterienwachstums wurde spektrophotometrisch mit einem Spekol 11 (Fa. Carl Zeiss Jena) bei einer

Wellenlänge von 600 nm ermittelt. Aus der gemessenen optischen Dichte wurde mittels einer Eichkurve die Konzentration der Biotrockenmasse errechnet.

3.5.6 Substratverwertungsmuster mittels BIOLOG

Das BIOLOG-System ist ein kommerzielles Testsystem zur Identifizierung von Bakterien zunächst aus dem human-, tier- und pflanzenpathogenen Sektor, aber auch von Umweltisolaten. Die Differenzierung der Arten erfolgt anhand eines Substratverwertungsmusters (metabolischer Fingerabdruck), welches durch die Umsetzung von 95 verschiedenen Kohlenstoffquellen in einer 96 well-Mikrotiterplatte aufgenommen wird. Als Wachstumsindikator dient der Redoxfarbstoff Tetrazoliumviolett, dessen Konzentration nach Inkubation photometrisch vermessen wird. Die Identifizierung des Teststammes erfolgt durch einen Abgleich des Substratverwertungsmusters mit der Datenbank der MicroLog™ Software von BIOLOG. Eine weitere Anwendungsmöglichkeit des BIOLOG-Systems wurde 1991 von GARLAND & MILLS eingeführt, sie setzten das System zur Charakterisierung von Biozönosen ein, wobei die Beimpfung der Mikrotiterplatten mit Umweltproben erfolgte.

Das Substratverwertungsmuster wurde an nicht, mit 50 und mit 500 cm^3 Erdgas/min begastem Boden der Pflanzgefäße bestimmt.

Hierzu wurden GN-BIOLOG-Platten (für die Identifizierung gram-negativer Bakterien bestimmte Platten) mit der in 3.5.2 hergestellten Bodensuspension beimpft, 48 h bei 30°C inkubiert und in einem Mikrotiterplatten-Photometer (Victor2, 1420 Multilabel Counter, Fa. Wallac) bei 590 nm vermessen. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Statistica.

3.5.7 Anreicherung methanotropher Bakterien

Zur Abtrennung der Bakterien von der Bodenmatrix wurden 5 g Bodenprobe mit 20 g Glasperlen (Roth, 2 mm Durchmesser) in 45 ml LN-NMS-Medium unter sterilen Bedingungen über Nacht im Dunkeln bei 20 °C geschüttelt. Am darauffolgenden Tag wurden 500 ml Erlenmeyerkolben mit Begasungsaufsatz mit je 30 ml NMS-, LN-NMS oder AMS-Medium beschickt und mit 20 ml Bodensuspension beimpft. Die Kultur wurde schüttelnd unter Methan/Luft-Atmosphäre (30:70) im Dunkeln parallel bei 20 °C und 30 °C inkubiert. Eine Erneuerung des Gasgemisches erfolgte jeden 2.-3.

Tag. Je nach Wachstum wurde die Anreicherungskultur passagiert, indem 5 ml der Kultur in einen Schüttelkoben mit 45 ml frischem Medium überführt wurden. Die Dominanz methanotropher Zellen wurde mittels Phasenkontrastmikroskopie (Optiphot, NIKON) festgestellt und mittels PCR mit gruppenspezifischen Primern verifiziert (s. 3.6.5).

Als Inokulum für Anreicherungen methanotropher Bakterien dienten weiterhin terminalpositive Verdünnungsstufen von MPNs.

Da mittels gängiger Verfahren wie Verdünnungsreihen und Kochschem Plattengußverfahren keine Reinkulturen erhalten wurden, wurden folgende Methoden zur Aufreinigung der Stämme verwandt:

-Dichtegradientenzentrifugation nach PRIEMÉ et al. (1996)

-Trennung aufgrund von Hydrophobieunterschieden

Mittels Hexan-Behandlung sollten hydrophobe Typ II Zellen von hydrophilen Typ I Zellen getrennt werden. Hierzu wurden 2 ml Bakteriensuspension mit 0,5 ml Hexan versetzt und 2 min auf einem Vortex gemischt. Die Bakterien wurden zuvor mit 0,01 M Phosphatpuffer (pH 7,0) gewaschen und auf eine optische Dichte von 0,5 eingestellt. Nach einigen Minuten der Phasentrennung wurde die wässrige Phase, in der sich nun Begleitflora und/oder Typ I Methanotrophe befinden sollten, entfernt. Die Reextraktion der Zellen in wäßriges Medium erfolgte mittels 125 µl Isopropanol (STAROSTINA et al. 1997).

3.5.8 Isolierung methanotropher Bakterien

Die Anreicherungskulturen wurden mittels Mikroskopie und gruppenspezifischer PCR (s. Kap. 3.6.5) auf das Vorhandensein verschiedener Arten methanotropher Bakterien kontrolliert. Die nachgewiesenen Arten wurden dann gezielt aus der Anreicherung isoliert.

-Abtöten vegetativer Zellen:

Durch 15-20 minütiges Erhitzen der Kultur auf 80°C sollten Begleitflora, Typ I Methanotrophe und vegetative Zellen Typ II Methanotropher abgetötet werden, Exosporen und Cysten Typ II Methanotropher überleben diese Behandlung und können weiter kultiviert werden.

-Filtration:

Zur Abtrennung der deutlich kleineren Zellen der heterotrophen Begleitflora wurden die Anreicherungskulturen filtriert. Zu diesem Zweck wurde die Flüssigkultur in einem

Ganzglasgerät für Vakuum-Filtration (Sartorius SM 16309) durch einen Cellulose-Nitrat-Filter der Porengröße 0,8 µm filtriert und die auf dem Filter anhaftenden größeren Zellen methanotropher Bakterien resuspendiert.

-Mikromanipulation:

Aus Anreicherungskulturen oder aus der höchsten noch bewachsenen Verdünnung einer Mikrotiterplatte wurden einzelne Zellen methanotropher Bakterien mit Hilfe der Mikromanipulation isoliert. Hierbei wurde ein inverses Mikroskop (Eclipse TE 300, Firma NIKON) mit 40er Objektiv im Phasenkontrast verwendet. Die einzelne Zelle wurde mit einer manuellen Kolbenpumpe (Mikroinjektor CellTram Oil, Firma Eppendorf) und einer sterilen Glaskapillaren mit einem Innendurchmesser von 4 µm (Transfer Tips-F, ICSI) aus der Flüssigkultur in ein Reaktionsgefäß transferiert. Die Glaskapillare wurde mit einem Patch Man Mikromanipulator für die Elektrophysiologie bedient (Firma Eppendorf) (Abb.3.2).

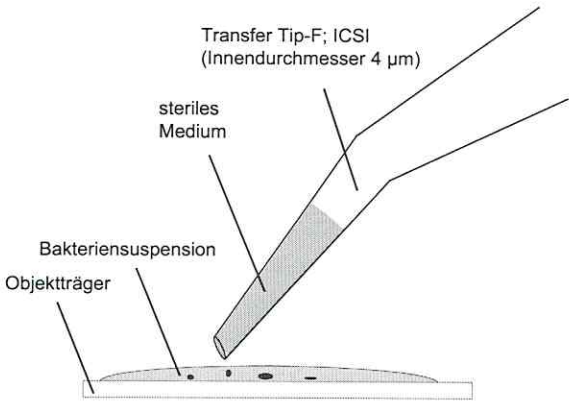


Abb. 3.2: Schemazeichnung des Aufnehmens einer einzelnen Bakterienzelle in einen Transfer-Tip

Die gewonnenen Isolate wurden mit laufenden Nummern in die Stammsammlung der Sektion Sanierungsforschung, UFZ, integriert und tragen die Bezeichnungen GB 18 bis GB 20.

3.5.9 Charakterisierung methanotropher Isolate

3.5.9.1 Bestimmung der sMMO-Aktivität

Die selektive Eigenschaft der sMMO, Naphthalen zu Naphthol zu oxidieren, ermöglicht eine einfache Aktivitätsbestimmung dieses Enzyms nach der von BOWMAN

& SAYLER (1994) beschriebenen Methode. 1 ml Flüssigkultur wird mit 1 ml gesättigter Naphthalinlösung bei der entsprechenden Wachstumstemperatur der Kultur schüttelnd inkubiert. Nach einer Stunde werden 1000 µl einer frisch zubereiteten 0,2%igen o-Dianisidinlösung zugegeben, die entstandene Diazoverbindung wurde spektrophotometrisch (CADAS 100, Fa. Dr. Lange) bei 525 nm vermessen.

3.5.9.2 Bestimmung spezifischer Enzymaktivitäten

Das Vorhandensein und die Aktivität weiterer für methanotrophe Bakterien charakteristischen Enzyme wurden am IBPM (Institute for Biology and Physiology of Microorganisms) in Pushchino, Rußland, bestimmt. Dazu wurden Bakterien in der exponentiellen Phase bei 12 000 rpm 40 min bei 5°C abzentrifugiert und zweimal mit 10 ml 50 mM Tris-Puffer gewaschen (alles auf Eis). Die in 0,5 ml Tris-Puffer resuspendierten Zellen wurden bis zur Enzymmessung bei –20°C eingefroren.

Die Aktivitäten der Methanol-Dehydrogenase (EC 1.1.99.8), Formaldehyd-Dehydrogenase (EC 1.2.1.1), Formiat-Dehydrogenase (EC 1.2.2.2), Hydroxypyruvat-Reduktase (EC 1.1.1.29), Serin-Glyoxylat-Aminotransferase (EC 2.6.1.45), Hexulosephosphat-Synthase, Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (EC 4.1.139), Citratsynthase, Isocitratdehydrogenase (EC 1.1.1.42), 2-Oxoglutarat-dehydrogenase, Malatdehydrogenase (EC 1.1.137), 6-Phosphofructokinase (EC 2.7.1.90), Glutamatsynthase (EC 2.6.1.53) und Glutaminsynthetase (EC 6.3.1.2) wurden nach STAROSTINA (2000) bestimmt.

3.5.9.3 Bestimmung des Fettsäurespektrums

Die Bestimmung des Fettsäurespektrums erfolgte nach SASSER (1990). Nach Kultivierung der Bakterien unter standardisierten Bedingungen, Extraktion der Fettsäuren und Überführung in Fettsäuremethylester wurde das Fettsäurespektrum mit dem MIS/SHERLOCK-System (V. 1.06) in der Sektion Umweltmikrobiologie des UFZ bestimmt.

3.5.9.4 Elektronenmikroskopische Untersuchung

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden am Institut für Zoologie der Universität Leipzig angefertigt.

Die Zellen methanotropher Isolate wurden sowohl in kupferhaltigem als auch in kupferfreiem NMS-Medium kultiviert und in der logarithmischen Phase geerntet.

Nach zwei Waschschritten in 25 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,0) wurden die Zellen in 3%igem Glutardialdehyd (50mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,4) über Nacht vorfixiert. Nach viermaligem Spülen der Proben (100 mM Natriumphopshatpuffer, pH 7,4, je 45 min.) erfolgte die Fixierung mittels Osmiumtetroxid (1% OsO_4 in 50 mM Natiumphosphatpuffer, pH 7,4) für 45 min. Anschließend wurden die Proben dreimal gewaschen (in 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,4, je 45 min) und in steigenden Ethanolkonzentrationen (30, 50, 70, 90 und 100%, je 45 min) entwässert. Danach erfolgte eine Blockkontrastierung (1% Phosphorwolframsäure und 0,5% Uranylacetat in 70% Etanol) und schrittweise Überführung in das Einbettungsmedium. Die mittels Ultramikrotom hergestellten Ultradünnschnitte wurden anschließend nach REYNOLDS (1963) schnittkontrastiert (1,3 g Bleinitrat, 1,76 g Natriumcitrat, 8 ml 1M NaOH auf 50 ml A. bidest.) und im Elektronenmikroskop (EM 900, Carl Zeiss, Oberkochen) betrachtet.

3.6 Molekularbiologische Methoden

3.6.1 DNA-Extraktion aus Bakterien

Die Extraktion von DNA aus Bakterien erfolgte mit dem Kit DNeasy der Firma Qiagen. Zusätzlich zum Herstellerprotokoll wurde eine 30 minütige RNAse Behandlung der Zellsuspension bei 55°C durchgeführt.

3.6.2 DNA-Extraktion aus dem Boden

Zur Extraktion von DNA aus Boden wurde dem direkten Lyseverfahren der Vorzug gegeben, in dem die Zellen in Gegenwart der Bodenmatrix lysiert und die Nukleinsäuren nachfolgend extrahiert werden. Diese Methode, die modifiziert nach MORÉ et al. (1994) durchgeführt wurde, hat den Vorteil einer höheren DNA-Ausbeute im Vergleich zu einer vorhergehenden Zellyse.

0,5 g Boden (Frischgewicht) wurde in ein 2 ml Schraubdeckelreaktionsgefäß, welches 2,5 g Zirkonium/Silizium-Kugeln (0,1 mm Durchmesser, Roth, Art. NO33.1) enthielt und 90 min bei 121°C autoklaviert war, eingewogen. 500 µl 100 mM Phosphatpuffer (pH-Wert 8,0) und 250 µl einer 100 mM NaCl /500 mM Tris-HCl (pH 8,0) /10 % SDS wurden dazu pipettiert. Die Proben wurden 5 min bei einer Schwingungszahl von ca. 1560 min^{-1} bei 10°C in einer Schwingmühle (Retsch MM

2000) geschüttelt. Zur Abtrennung der Bodenpartikel und Zirkonium-Kugeln erfolgte eine 3minütige Zentrifugation bei 12000 rpm. Der Überstand wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit einer 7,5 M Ammoniumacetat-Lösung im Verhältnis 5:2 versetzt. Zur Präzipitation des Proteins wurden die Proben für 5 min in ein Eisbad gestellt. Nach erneuter Zentrifugation (3 min, 12000 rpm) wurde der Überstand mit einem Teil eiskaltem Isopropanol versetzt und über Nacht bei –20°C inkubiert. Die DNA wurde in einer Kühlzentrifuge bei 4°C 15 min lang bei 12000 rpm abzentrifugiert. Da sich Isopropanol schwerer entfernen läßt als Ethanol, wurde das Pellet mit 70% igem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und im Vakkuum getrocknet. Die DNA wurde in 200 µl Wasser aufgenommen.

3.6.3 DNA-Aufreinigung

Die Koextraktion von Humin- und Fulvosäuren während der direkten DNA-Extraktion erforderte eine anschließende Aufreinigung der DNA-Rohextrakte, da diese Stoffe inhibitorische Effekte auf die Amplifikation mit Taq Polymerase ausüben können und somit vor einer PCR entfernt werden müssen (TEBBE & VAHJEN 1993).

Die Aufreinigung des DNA-Rohextraktes wurde nach BERTHELET et al. (1996) durchgeführt.

Die Reinigung des DNA-Extraktes erfolgte mittels Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP).

300 g PVPP wurden in 4 l 3 M HCl über Nacht suspendiert, durch mehrmaliges Waschen mit 20 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH-Wert 7,4) wurde der pH-Wert der PVPP-Suspension auf 7,0 eingestellt und bei 4°C gelagert.

Micro-Spin-Säulen (Amersham Pharmacia Biotech) wurden mit der Suspension säuregewaschenen PVPP gefüllt, in 2 ml Reaktionsgefäße gestellt und 3 min lang bei 3000 rpm zentrifugiert. Die Säulen wurden in neue Reaktionsgefäße überführt, 75 µl des DNA-Extraktes wurden jeweils auf eine Säule geladen und bei 3000 rpm für 3 min zentrifugiert. Die gereinigten DNA-Extrakte wurden bei –20 °C gelagert.

3.6.4 DNA-Reinheits- und Konzentrationsbestimmung

Die Reinheit der DNA wurde photometrisch (Spekol 1200, Analytik Jena) durch Errechnen der Verhältnisse $A_{260/280}$ bzw. $A_{260/230}$ für Proteinverunreinigungen bzw. Huminsäurekontaminationen bestimmt. Die DNA-Konzentration hingegen wurde fluorometrisch bestimmt, da die photometrische Messung stark vom pH-Wert und

Salzgehalt der zu messenden Probe abhängt (WILFINGER 1997) und ein größeres Probevolumen benötigt wird.

Die fluorometrische Konzentrationsbestimmung beruht auf dem Prinzip, der Interkalation des Farbstoffes Hoechst 33258 mit der DNA (LABARCA & PAIGEN 1980). Die Messung erfolgte an einem Spectrofluorophotometer RF-1502 der Firma Shimadzu bei einer Anregungswellenlänge von 365 nm und einer Emissionswellenlänge von 458 nm.

100 ml filtrierter TNE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0,2 M NaCl; pH-Wert 7,4) wurde mit 10 µl einer Hoechst 33258-Stammlösung (1 mg/ml; bei 4°C 6 Monate haltbar) versetzt (Farbstoffendkonzentration 0,1 µg/ml). Mit 2 ml dieser Lösung wurde der Nullabgleich am Spectrofluorometer durchgeführt. 2 µl der zu messenden DNA-Probe wurden zur Farbstoff-Pufferlösung in die Fluoreszenzküvette pipettiert und die Intensität der Fluoreszenz gemessen.

Anhand einer zuvor aufgenommenen Kalibriergeraden ließ sich der DNA-Gehalt ermitteln, als Kalibriersubstanz diente Lambda DNA-Hind III Digest Ladder (Amersham Pharmacia Biotech).

Die Amplifizierbarkeit des ungereinigten und gereinigten DNA-Extraktes wurde mit Hilfe einer PCR mit dem universellen Primerpaar f 27 und r 1492 überprüft. Falls kein Produkt in der PCR entstand, wurde die extrahierte DNA mit amplifizierbarer DNA gespikt. Somit konnte überprüft werden, ob PCR inhibierende Substanzen im Extrakt vorlagen oder die DNA-Konzentration zu gering war, die Probe wurde ggf. erneut gereinigt bzw. aufkonzentriert.

3.6.5 PCR

Seit ihrer ersten Einführung durch SAIKI et al. (1985) wurde die PCR, mit der spezifische DNA-Sequenzen in großer Anzahl aus einem DNA-Gemisch amplifiziert werden können, auch zur direkten Detektion von Mikroorganismen in u. a. terrestrischen Habitaten (BRUCE et al. 1992, PICARD et al.1992) eingesetzt.

Die in der PCR verwendeten Primer sind Tab.3.3 zu entnehmen. Die PCR-Ansätze wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl in 0,5 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt, sollten die PCR-Produkte in einer anschließenden DGGE aufgetrennt werden, wurde die PCR mit einem Volumen von 100 µl angesetzt.

Die Reaktion wurde in einem Thermocycler Mastercycler Gradient (Eppendorf) oder einem Techne (Progene) durchgeführt, wobei ein 50 µl Ansatz folgende Zusammensetzung hatte:

- 2 µl, 10 pM pro Primer (Synthese der Primer durch Fa. Biometra bzw. MWG Biotech),
- 200 µM pro Nukleotid (Pharmacia Biotech),
- 5 µl Template- DNA,
- 5 µl Taq-Puffer (10 x Puffer: 100 mM Tris-HCl, pH-Wert 9,0, 500 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$),
- 2,5 Einheiten Taq- Polymerase (Pharmacia Biotech)

Der Ansatz wurde mit bidestilliertem Wasser auf 50 µl ergänzt.

Tab. 3.3: Zur PCR verwendete phylogenetisch gruppenspezifische und funktionelle Primer (Synthese der Primer durch Fa. Biometra bzw. MWG Biotech)

Zielgen	Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	Quelle
16 S rDNA aller Eubakterien	f 27*	-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-	LANE 1991
	r 1492	-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-	
16 S rDNA der Gattung *Methylobacter*	Mb 1007r	-CACTCTACGATCTCTCACAG-	HOLMES et al. 1995
16 S rDNA der Gattung *Methylococcus*	Mc 1005r	-CCGCATCTCTGCAGGAT-	HOLMES et al. 1995
16 S rDNA der Gattung *Methylomonas*	Mm 1007r	-CACTCCGCTATCTCTAACAG-	HOLMES et al. 1995
16 S rDNA der Gattung *Methylosinus/-cystis*	Ms 1020r	-CCCTTGCGGAAGGAAGTC-	HOLMES et al. 1995
pmoA	pmof1 pmor	GGGGGAACTTCTGGGGITGGAC- -GGGGGRCIACGTCITTACCGAA-	CHENG et al. 1999
	pmof2 pmor	-TTCTAYCCDRRCAACTGGCC- -GGGGGRCIACGTCITTACCGAA-	
mmoX	882f	GGCTCCAAGTTCAAGGTCGAGC-	MCDONALD et al. 1995
	1403r	-TGGCACTCGTAGCGCTCCGGC-TCG-	
V3	Muy 2	-ATTACCGCGGCTGCTGG-	MUYZER et al. 1993
	Muy 3	-CCTACGGGAGGCAGCAG-	
	GC-Klammer	-CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGC GGGGCGGGGGCACGGGGGG-	

*) Positionsangabe entspricht der Position auf der 16S rRNA in *E. coli* nach der IUB (International Union of Biochemistry) Nomenklatur

M = C:A; pmoA mmoX = Gen, das für die α-Untereinheit des Proteins A der löslichen Methanmonooxygenase kodiert; V3 = hochvariable Region der 16S rDNA;

Bei der Amplifikation der gesamten 16S rRNA oder für Methanotrophe spezifischen Abschnitten der 16S RNA wurde die Mg-Konzentration durch Zugabe von $MgCl_2$-Lösung auf 2,5 mM erhöht.

Die Zugabe der Taq- Polymerase erfolgte grundsätzlich nach der "Hot-Start" - Technik. Hierbei wurde der PCR-Ansatz zunächst ohne die Taq-Polymerase und den Reaktionspuffer zusammenpipettiert, die Reaktionsgefäße wurden auf 95°C erhitzt und die DNA 5 min lang denaturiert, bei 80°C wurde die Taq-Polymerase im Reaktionspuffer zugegeben und die PCR gestartet. Diese Technik sollte unspezifische Amplifikationen während der PCR vermeiden.

Die Temperaturprofile der PCR sind Tab. 3.4 zu entnehmen. Der finale Elongationsschritt betrug abweichend vom Temperaturprofil 5 min.

Tab. 3.4: PCR-Temperaturprofile

		Denaturierung		**Annealing**		**Elongation**	
Primerpaar	**Zyklenzahl**	*Temperatur*	*Dauer*	*Temperatur*	*Dauer*	*Temperatur*	*Dauer*
f 27 r 12492	30	94°C	1 min	65°C	1 min	72°C	1 min
f 27 Mb1007	30	92°C	1 min	58°C	1 min	72°C	1 min
f 27 Mm 1007	30	92°C	1 min	58°C	1 min	72°C	1 min
f 27 Mc 1005	30	92°C	1 min	54°C	1 min	72°C	1 min
f 27 Ms 1020	30	92°C	1 min	54°C	1 min	72°C	1 min
Muy 2 Muy 3	20	94°C	1 min	65-1°C touch down*	1 min	72°C	1 min
		*) in jedem 2. Zyklus erfolgte eine Erniedrigung der Annealing-Temperatur um 1°C bis zu einer Temperatur von 55°C					
	10	94°C	1 min	55°C	1 min	72°C	1 min

3.6.6 Elektrophorese

Zur Überprüfung der erfolgten Amplifikation wurde ein Aliquot des PCR-Ansatzes in einem Agarosegel in 0,5xTAE-Puffer (50xTAE: 242 g TRIS-Base, 57,1 ml Eisessig, 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)) elektrophoretisch aufgetrennt. Die Agarosekonzentration entsprach der nachzuweisenden Fragmentlänge (MANIATIS et

al. 1982). Die Gele wurden 7 min mit Ethidiumbromid (4 mg/l) angefärbt, in einem 1 mM Magnesiumchloridbad zur Kontrasterhöhung 15 min lang entfärbt und im UV-Licht sichtbar gemacht. Die Dokumentation erfolgte mit ChemDoc (Bio-Rad). Als Größenstandard während der Elektrophorese wurde ein 100 bp ladder (Amersham Pharmaia Biotech) verwendet.

3.6.7 Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE)

Zur Charakterisierung der allgemeinen und methanotrophen Diversität wurde die DGGE als Fingerprint-Methode eingesetzt.

Dieses Verfahren beruht auf einer Trennung gleichlanger PCR-Fragmente verschiedener Sequenz aufgrund unterschiedlichen Schmelzverhaltens in einem denaturierenden Gradienten (FISCHER & LERMAN 1983, MUYZER et al. 1993). In ein vertikales Acrylamidgel wird ein linearer Gradient der denaturierenden Agentien Formamid und Harnstoff eingebettet, der in Kombination mit einer Temperatur von 60°C dafür sorgt, daß die Fragmente im Verlauf der Elektrophorese in Abhängigkeit von der Basenzusammensetzung aufschmelzen und so in ihrer Mobilität eingeschränkt werden (MUYZER & RAMSING 1995, MUYZER 1999). Um eine optimale Trennung der PCR-Produkte zu erzielen, besitzt ein Primer an seinem 5'-Ende eine sogenannte GC-Klammer. Hierdurch werden die PCR-Produkte mit einer 40 Basenpaar langen GC-reichen Region versehen. Diese nicht schmelzende Region („high melting domain") hält die DNA während der DGGE-Auftrennung ähnlich einer "Klammer" zusammen und bewahrt so die DNA vor einer vollständiger Dissoziation in Einzelstränge.

In der DGGE-PCR kamen Primer zum Einsatz, die die hochvariable Region V3 der 16S rDNA amplifizierten; sollte ausschließlich DNA methanotropher Bakterien amplifiziert werden, wurden eine PCR mit gruppenspezifischen Primern (s. Tab. 3.3) vorangestellt und somit eine „nested" PCR durchgeführt.

Die Elektrophorese wurde in einem Dcode Universal Mutation Detection System (Fa. Bio-Rad) in 1x TAE-Puffer (40 mM Trisacetat, 20 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, pH-Wert 7,4) bei 60°C und 150 V durchgeführt. Die optimale Dauer der Elektrophorese wurde empirisch bestimmt und betrug i. d. R. 5 Stunden. Der optimale Gradient denaturierender Agentien wurde durch Gele ermittelt, die einen Gradienten von 0-100 % aufwiesen, wobei 100 % denaturierende Agentien einer Konzentration von 40 % Formamid und 7 M Harnstoff entsprach.

8 %ige Acrylamid/Bisacrylamid-Gele wurden auf Trägerfolie (Gel-Fix for PAG, Serva 42968) in einer dafür vorgesehenen Gießapparatur gegossen. Die Zusammensetzung der Gele ist Tab. 3.5 zu entnehmen.

Tab. 3.5: Zusammensetzung der DGGE-Gele

40%iges Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	4 ml
50xTAE (s.o.)	0,2 ml
Formamid	0 ... 50 ... 100%
	0 ... 3,55 ... 7,1 ml
Harnstoff	0 ... 50 ... 100%
	0 ... 4,2 ... 8,4 g
A. dest.	*Ad* 20 ml

Die Polymerisation in den zuvor entgasten Gelansätzen wurde durch Zugabe von 20 µl TEMED (N'-N'-N'-N'Tetra-methyl-ethylendiamin) und 100 µl frische 10%ige Ammoniumpersulfatlösung gestartet.

Der denaturierende Gradient wurde durch Mischen zweier Gele mit dem minimalem und maximalem Gradienten in einem Gradientenmischer (Modell 475, Fa. Bio-Rad) hergestellt. Nach der Polymerisation wurde das Gel mit einem Sammelgel, das den Taschenbildungskamm aufnahm und folgende Zusammensetzung hatte:

40% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	2 ml
50x TAE	0,1 ml
A. dest	*ad* 10 ml
TEMED	10 µl
10%ige Ammoniumpersulfatlösung	50 µl

abgeschlossen.

In die gespülten Taschen des Sammelgels wurden jeweils 10-15 µl des zu analysierenden PCR-Produktes mit 2 µl eines Auftragspuffers aufgetragen und die Elektrophorese bei 60°C und mit 150 V gestartet.

Zur Überprüfung des Gradienten und zum Vergleich verschiedener Gele miteinander wurden PCR-Produkte mitgeführt, die DNA folgender Spezies steigenden GC-

Gehaltes enthielten: *Nocardia spec., Clostridium pasteurianum, Burkholderia gladioli, Erwinia carotovora, Streptomyces aureofaciens, Pseudomonas fluorescens*

3.6.8 Silbernitratfärbung

Die in der DGGE elektrophoretisch aufgetrennte DNA wurde mittels Silbernitratfärbung sichtbar gemacht. Dieser Färbung wurde aufgrund der niedrigen Nachweisgrenze von 0,5-2 ng DNA/Bande der Vorzug gegenüber der Ethidiumbromid-Anfärbung gegeben, ein weiterer Vorteil dieser Anfärbung liegt in der dauerhaften Dokumentation der Gele. Das Prinzip der Färbung basiert auf der Komplexierung von Silber-Ionen (Ag+) mit DNA (auch mit Proteinen), anschließend wird das Silber mit alkalischem Formaldehyd reduziert und fällt aus.

Nach der Elektrophorese wurde das Gel 5 min in 10 %igem Ethanol und 2 mal 3 min in 1 %iger Salpetersäure fixiert und mit A. dest. gespült. Die Anfärbung des Gels erfolgte durch ein 20 minütiges Bad in 0,2 %iger Silbernitratlösung. Nach gründlichem Waschen in A. dest. wurde das Gel durch mehrmaliges Baden in 4 °C kalter 3 % iger Na_2CO_3-Lösung, die 0,02 % Formaldehyd enthielt, entwickelt. Nach kurzem Spülen mit A. dest. wurde die Entwicklung durch ein 3minütiges Bad in 10 % iger Essigsäure gestoppt. Abschließend wurde das Gel für 10 min in 5 %igem Glycerin geschwenkt. Das Gel wurde an der Luft getrocknet, mit einer Folie abgedeckt und im Durchlicht gescannt (HP ScanJet). Die Auswertung der Gele erfolgte mit der Software Phoretix 1D Advanced Vers. 4.01.

3.6.9 Phylogenetische Einordnung

Die Sequenzierung der 16S rDNA wurde am Einzelstrang von der Firma GATC (Konstanz) durchgeführt. Ähnliche Sequenzen wurden mit dem Programm BLAST (BLAST Version 2.2.2; ALTSCHUL et al. 1997) gesucht, dem als Datenbasis GenBank, EMBL, DDBJ und PDB zugrunde liegen. Die Sequenzen der Isolate und repräsentativer phylogenetischer Nachbarn wurden mit dem Programm ClustalW, das auf dem Needleman-Wunsch-Verfahren beruht, aligniert. Das Dendrogramm wurde mit dem Programmpaket PHYLIP Vers. 3.6 (FELSENSTEIN 1993) erstellt.

4 Ergebnisse

4.1 Standortcharakterisierung

4.1.1 Bodenluftzusammensetzung

In den Städten Leipzig und Taucha wurden zur Charakterisierung des Ausmaßes der Gasaustritte aus undichten Leitungen Bodenluftuntersuchungen durchgeführt.
In den Abb. 4.1 und 4.2 ist die Bodenluftzusammensetzung in den untersuchten Standorten zu den Zeitpunkten der Bodenprobenahmen in Tiefen zwischen 10 und 100 cm dargestellt.
Die einzelnen Straßenbaumstandorte wiesen sehr große Unterschiede hinsichtlich der Bodenluftzusammensetzung auf. Die höchste an einem Standort gemessene Methankonzentration betrug 92,6 Vol.-% in 60 cm Bodentiefe (Abb. 4.1, Standort Taucha, Straße 1 (T 1)), sogar der Oberboden dieses mit einem abgestorbenen Jungbaum besetzten Standortes wies noch 62,1 Vol.-% Methan auf. Die Sauerstoffkonzentration betrug im gesamten Bodenprofil weniger als 5 Vol.-%, der Kohlendioxidgehalt war mit 5-6 Vol.-% in allen Tiefenstufen erhöht. Die folgenden Standorte (Abb. 4.2) zeigen ein deutlicheres Profil hinsichtlich der Gaszusammensetzung vom Ober- zum Unterboden hin. Der Kohlendioxidgehalt nimmt erwartungsgemäß mit der Tiefe zu und der Sauerstoffgehalt ab. An den

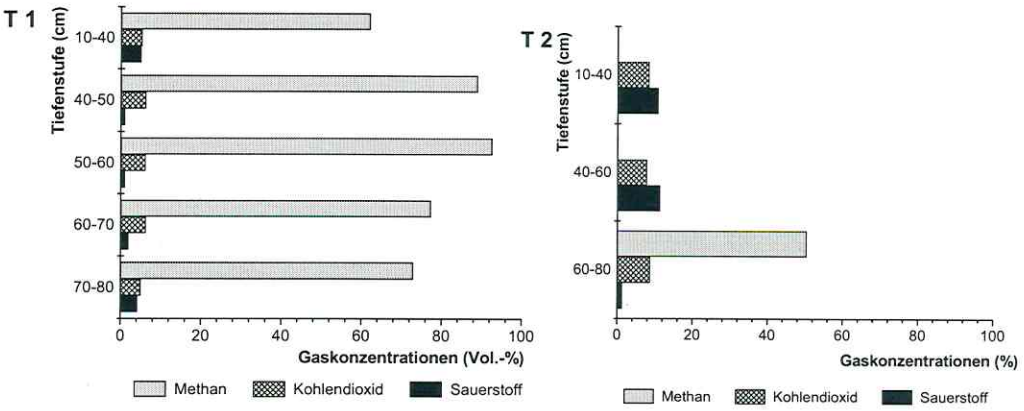


Abb. 4.1: Gaskonzentrationen im Boden der Standorte T 1 und T 2 am 15.9.1997

Standorten L 1 bis L 3 und L 5 konnte zwar zum Zeitpunkt der Probenahme kein Methan gemessen werden, hier liegen jedoch erhöhte Kohlendioxidgehalte vor, die

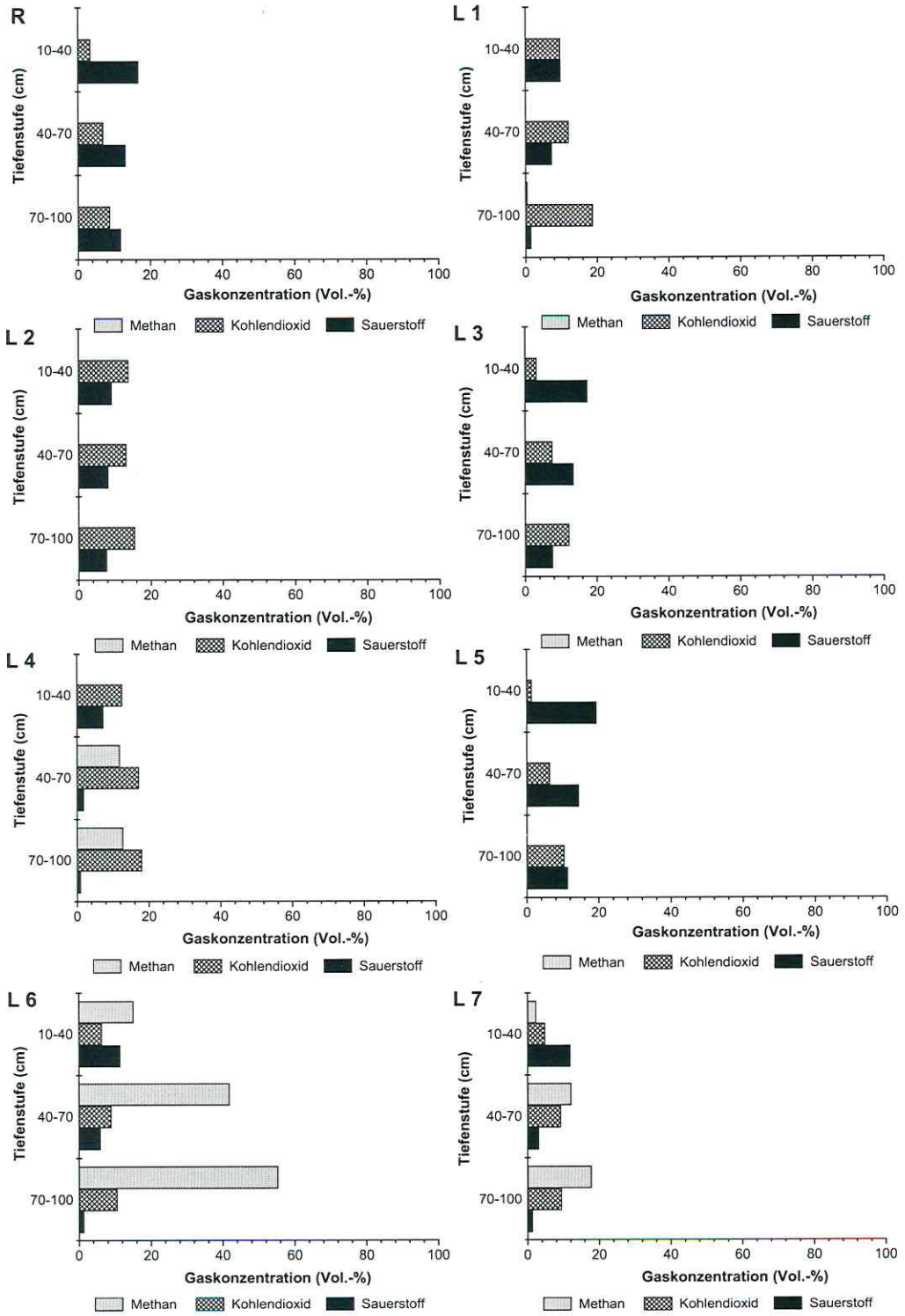


Abb. 4.2: Gaskonzentrationen im Boden des Referenzstandortes (R) und der Standorte L 1 bis L 7 (23.07.1998)

für das Wurzelwachstum von Bäumen als schädlich gelten. Ob diese CO_2-Gehalte in erster Linie auf eine frühere Methanoxidation oder die Veratmung der organischen Bodensubstanz bzw. Wurzelrespiration zurückzuführen sind, ist aus der Isotopensignatur des Gases ersichtlich (vgl. Kap. 4.5.2). Im Jahr zuvor konnte Methan jedenfalls an L 1 und L 3 nachgewiesen werden (SCHULTE 1998), wobei L 1 in räumlicher Nähe zu einem Gasleck liegt. Die in einer anderen Straße gelegenen Standorte L 6 und L 7, die mit einer abgestorbenen bzw. geschädigten Platane bewachsen sind, weisen wiederum aktuelle Methanausgasungen auf und dies obwohl die defekte Leitung in dieser Straße bereits stillgelegt wurde.

Der jahreszeitliche Gang der Bodenluftzusammensetzung der Standorte R und L 4 bis L 7 ist den Abbildungen 4.3 bis 4.7 zu entnehmen. Auf die Darstellung der Standorte L 1 bis L 3 wurde der Übersichtlichkeit halber verzichtet. Wie zu erwarten war, führt in der wärmeren Jahreszeit die mikrobielle Aktivität im Boden und die Wurzelatmung der Bäume zu einem Rückgang der Sauerstoffkonzentration und einem Anstieg des Kohlendioxidgehaltes im Boden. Dieser jahreszeitliche Gang wird beim Referenzstandort R am deutlichsten und ist auch bei dem Standort L 5 ausgeprägt.

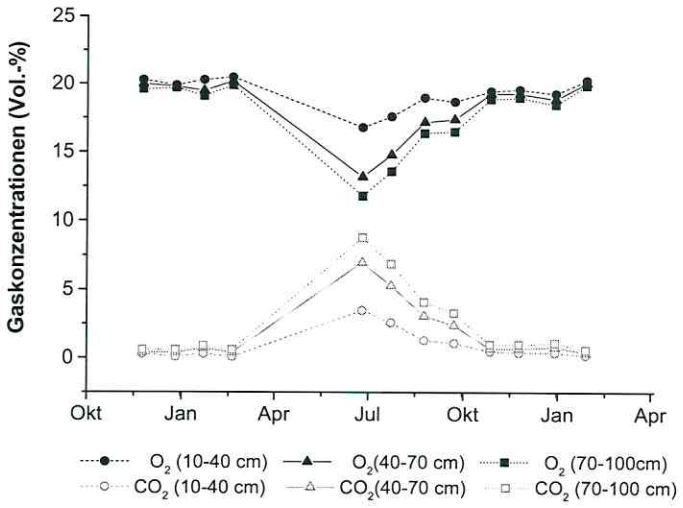


Abb. 4.3: Jahreszeitlicher Verlauf der Gaskonzentrationen an dem Referenzstandort R (Werte nach Schulte 1998)

Die erdgasbeeinflußten Standorte L 4, L 6 und L 7 hingegen zeigen abweichende jahreszeitliche Verläufe mit stark fluktuierenden Gaskonzentrationen.

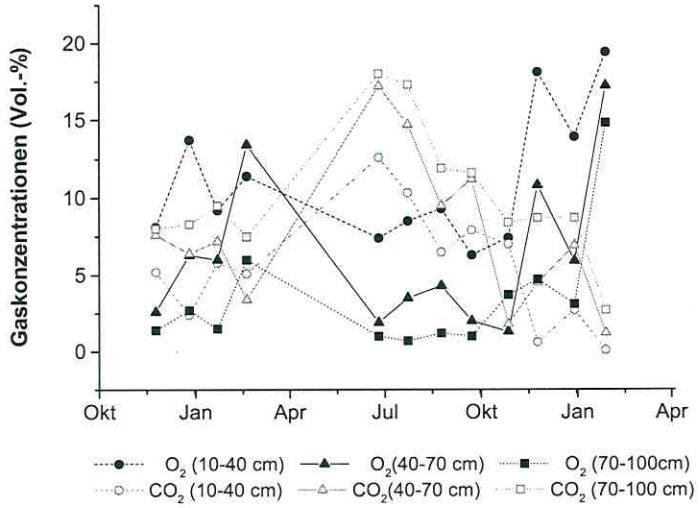


Abb. 4.4: Jahreszeitlicher Verlauf der Gaskonzentrationen an dem erdgasbeeinflußten Standort L 4 (Werte nach Schulte 1998)

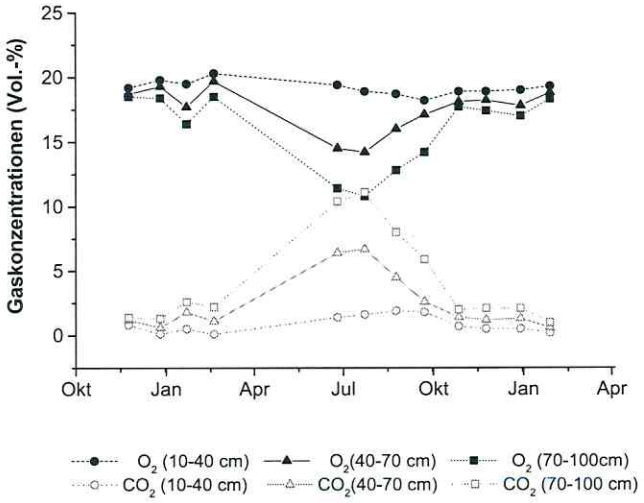


Abb. 4.5: Jahreszeitlicher Verlauf der Gaskonzentrationen an dem erdgasbeeinflußten Standort L 5 (Werte nach Schulte 1998)

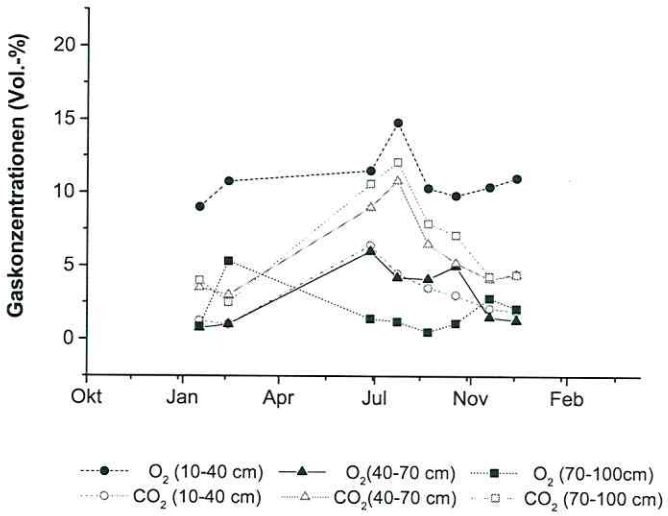


Abb. 4.6: Jahreszeitlicher Verlauf der Sauerstoff- und Kohlendioxidkonzentration an dem erdgasbeeinflußten Standort L 6 (Werte nach Schulte 1998)

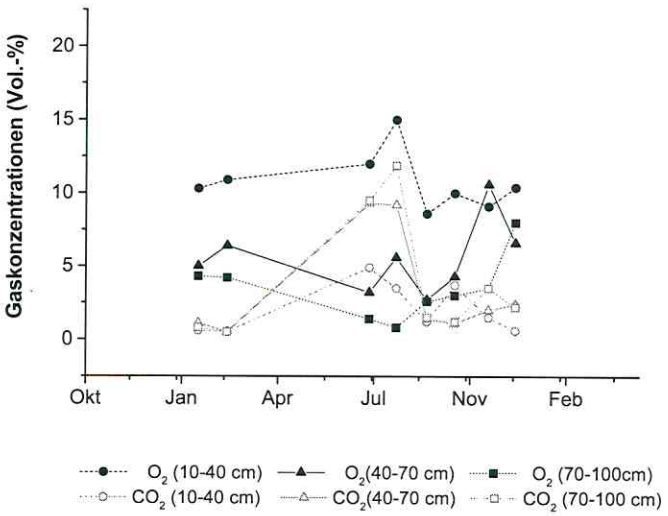


Abb. 4.7: Jahreszeitlicher Verlauf der Sauerstoff- und Kohlendioxidkonzentration an dem Standort L7 (Werte nach Schulte 1998)

4.1.2 Bodenphysikalische und -chemische Charakterisierung

An erdgasbeeinflußten Standorten war eine Reduktion von Mangan- und Stickstoffverbindungen zu beobachten (Tab. 4.1). Der Gehalt an mobilem Mangan war am Standort L 4 um das ca. 400fache gegenüber dem Referenzstandort erhöht.

Tab. 4.1: Bodenchemische Charakterisierung ausgewählter Straßenstandorte (Werte nach SCHULTE 1998)

Standort	Tiefenstufe (cm)	pH-Wert ($CaCl_2$)	Corg (%)	mobiles Mangan (µg/kg)	Nitrat (mg NO3-N/100g Boden)	Ammonium (mg NH4-N/100 g Boden)
R	0-10	7,5	0,74	72,6	0,14	0,04
	10-40	7,5	0,72	26,0	0,16	0,04
	40-70	7,5	0,79	111,4	0,07	0,03
	70-100	7,6	0,56	87,0	0,06	0,06
L1	0-10	6,4	3,76	492,1	0,04	0,16
	10-40	6,9	2,71	521,4	0,06	0,09
	40-70	7,2	0,94	1900,0	0,06	0,01
	70-100	7,5	0,56	143,4	0,19	0,01
L2	0-10	6,7	3	1551,2	0,05	0,06
	10-40	6,9	2,73	1173,9	0,07	0,05
	40-70	6,6	1,05	952,9	0,08	0,01
	70-100	7,2	1,09	222,7	0,2	0,01
L3	0-10	6,8	2,8	335,0	0,09	0,06
	10-40	6,7	1,94	115,9	0,21	0,01
	40-70	6,4	0,31	165,9	0,15	0,01
	70-100	5,8	0,17	1350,6	0,32	0,01
L4	0-10	6,7	2,01	8817,6	0,09	0,19
	10-40	7,5	0,68	1006,6	0,1	0,06
	40-70	6,8	0,77	41973,8	0,08	2,61
	70-100	7,1	0,79	32479,5	0,08	2,07
L5	0-10	6,9	1,48	91,5	0,4	0,21
	10-40	6,9	0,69	32,1	0,16	0,03
	40-70	6,9	1,16	21,6	0,18	0,02
	70-100	6,6	1,12	190,1	0,23	0,18

Eine deutliche Zunahme der Ammoniumkonzentration vom Ober- zum Unterboden hin ist ebenfalls beim stark erdgasgeprägten Standort L 4 zu verzeichnen. Unter den Sauerstoffmangel-Verhältnissen dient Nitrat als terminaler Wasserstoff-Akzeptor und wird zu Ammonium umgesetzt. Am C_{org}-Gehalt läßt sich eindeutig der sanierte Referenzstandort mit homogenem C_{org}-Gehalt von den unsanierten Baumscheiben unterscheiden, bei denen die für gewachsene Böden typische Abnahme vom Ober- zum Unterboden hin zu erkennen ist. Ein Einfluß des Erdgases läßt sich hieraus nicht ableiten. Der pH-Wert veränderte sich nicht signifikant.

4.1.3 Biologische Charakterisierung

Ausgewählte Enzymaktivitäten und die mikrobielle Biomasse wurden im Boden bestimmt, um zu ermitteln, inwiefern das Erdgas den physiologischen Gesamtzustand der Mikroflora beeinflußt. Als Maß für die bodenbiologische Aktivität wurden neben der mikrobiellen Biomasse das Endoenzym Dehydrogenase, die DMSO-Reduktion und das zellfreie Enzym alkalische Phosphatase bestimmt.

Die Ergebnisse der Standorte R, L 4, L 6 und L 7 sind den Abbildungen 4.8 bis 4.11 zu entnehmen. Die Biomassegehalte und Enzymaktivitäten der Standorte R und L 4 sind als gering einzustufen, dabei unterscheidet sich der durch hohe Methanausgasungen und geringen Sauerstoffgehalt gekennzeichnete Standort L 4 kaum von dem Referenzstandort. Generell ist mit zunehmender Bodentiefe ein Abfall der biologischen Aktivität zu verzeichnen (z. B. Abb. 4.11). Am schlechtesten korreliert die Dehydrogenase-Aktivität mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0{,}519$ ($P < 0{,}0001$) mit der mikrobiellen Biomasse (Tab. 4.2), so daß bei den Standorten L 6 und L 7 auf die Bestimmung dieses Parameters verzichtet wurde.

Tab. 4.2: Korrelationsmatrix der Parameter der bodenmikrobiologischen Aktivität

	DMSO	DHA	Alk. Phosphatase
Mikr. Biomasse	0,740	0,519	0,688
DMSO	-	0,787	0,762
DHA	-	-	0,695

Bemerkenswert sind die erhöhten Werte der mikrobiellen Biomasse und der alkalischen Phosphatase in der Tiefenstufe 70-100 cm des Standortes L 6, die mit einer hohen Methan- und niedrigen Sauerstoffkonzentration einhergehen.

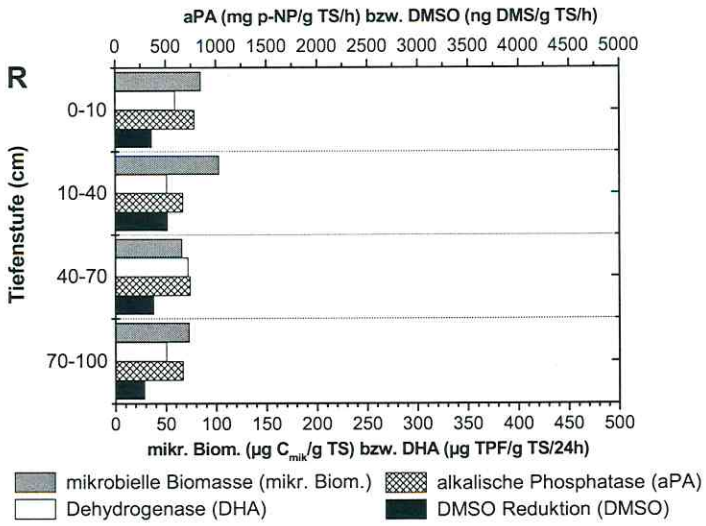


Abb. 4.8: Bodenmikrobiologische Aktivitäten am Referenzstandort (Daten nach KLIMANEK 1998)

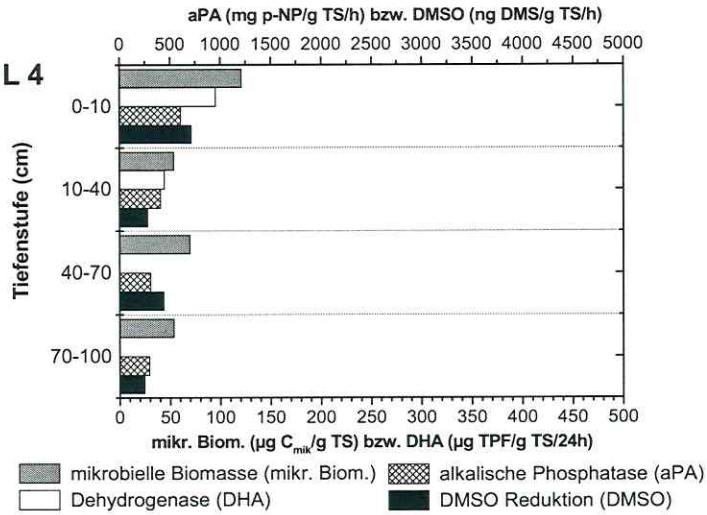


Abb. 4.9: Bodenmikrobiologische Aktivitäten am Standort L 4 (Daten nach KLIMANEK 1998)

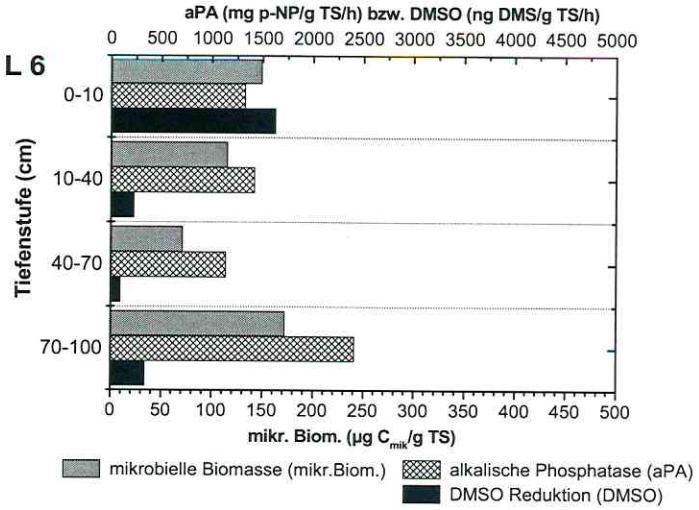


Abb. 4.10: Bodenmikrobiologische Aktivitäten am Standort L 6 (Daten nach KLIMANEK 1998)

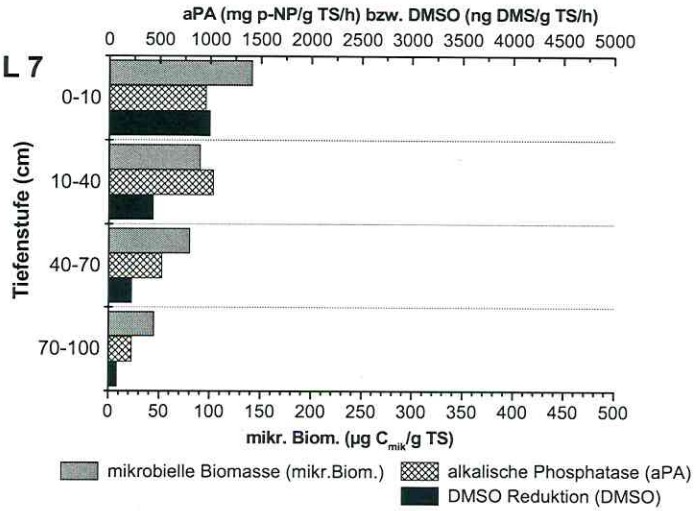


Abb. 4.11: Bodenmikrobiologische Aktivitäten am Standort L 7 (Daten nach KLIMANEK 1998)

4.2 Pflanzgefäße

Um den Einfluß von Standortvariabilitäten zu eliminieren und Untersuchungen unter standardisierten Bedingungen durchzuführen, wurden die folgenden Versuche in Pflanzgefäßen durchgeführt. Substratunterschiede, verschiedener Bewuchs der Baumscheiben und äußere Störungen (durch Befahren, Hunde etc.) ließen sich so ausschließen. Die Applikationsmengen der begasten Gefäße betrugen zwischen 10 und 500 cm^3/min Erdgas.

Die unterschiedlichen Vitalitätszustände der Bäume nach einer Behandlungsdauer von 12 Wochen sind in Abb. 4.12 zu erkennen. Die ersten Vitalitätsunterschiede zwischen dem Kontrollbaum und den Bäumen der begasten Gefäße zeigten sich bereits nach einem Monat. Zu den ersten Anzeichen gehörten Verwelken und Vergilben der Blätter; höhere Begasung bzw. längere Versuchsdauer riefen fast vollständigen Blattverlust hervor, die verbliebenen Blätter waren gelb.

ohne Erdgaseinleitung | 50 cm^3/min | 500 cm^3/min

Abb. 4.12: Winterlinden in Pflanzgefäßen verschiedener Erdgaseinleitungen nach 12wöchiger Behandlungsdauer

4.2.1 Bodenluftzusammensetzung

Die sich nach einem Zeitraum von 19 Wochen eingestellten Gaskonzentrationen sind in der Abb. 4.13 wiedergegeben. In dem nicht begasten Referenzgefäß sammelt sich das während der Respiration entstandene Kohlendioxid in der Tiefe an. Der Kohlendioxidanstieg fällt erwartungsgemäß nicht so hoch aus wie im Straßenstandort R, da es sich bei den Pflanzgefäßen weder um verdichteten noch versiegelten Boden handelt, der einen besseren Gasaustausch mit der Atmosphäre zuläßt. Dieser Gasaustausch tritt jedoch in den Hintergrund, betrachtet man die begasten Gefäße, deren Bodenluft in erster Linie von dem aufsteigenden Methan geprägt ist. Es konnte gezeigt werden, daß es bei einer hohen Erdgaseinleitung (500 cm^3/min) zu einer

weitreichenden physikalischen Verdrängungen alle übrigen Bodengase kommt und die Bodenluft in 70-100 cm Tiefe aus 92,5 Vol.-% Methan besteht. Hier entspricht eine Begasung von 500 cm^3/min den Gasverhältnissen des Standortes L 1. Nicht verdrängter Restsauerstoff von 2,2 Vol.-% reicht für methanotrophes Wachstum nicht aus, es entsteht kein Kohlendioxid. Nur in den oberen Bodenschichten ist noch hinreichend Sauerstoff vorhanden, um methanotrophe Aktivität zu ermöglichen, wie an den erhöhten Kohlendioxidwerten zu erkennen ist. Eine Begasung von 50 cm^3/min spiegelt die Gaszusammensetzung der Standorte L 4 oder L 7 wieder, die für methanotrophes Wachstum optimalen Gasverhältnise führten zu einer Anreicherung von 10 Vol.-% Kohlendioxid in der mittleren Tiefenstufe. In 40 –100 cm Tiefe wird deutlich, daß die Kombination aus Bodenluftverdrängung und methanotrophem Wachstum zu höherem Sauerstoffdefizit führt als rein physikalische Verdrängung.

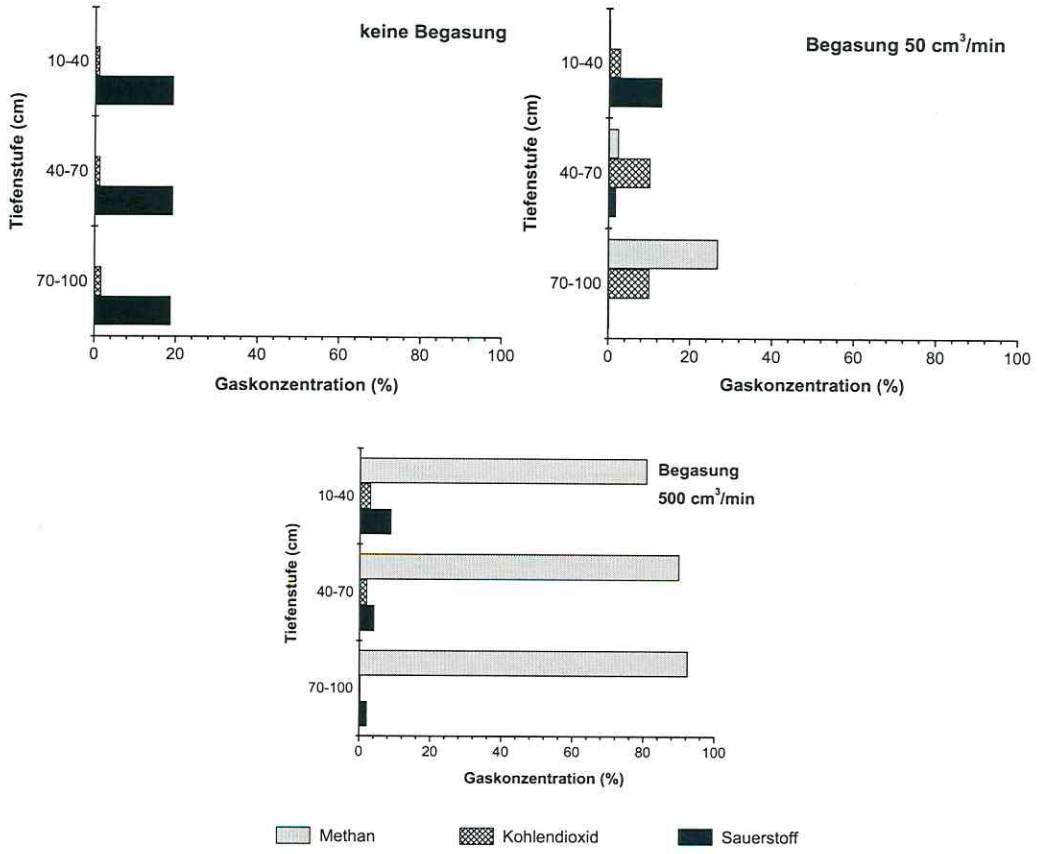


Abb. 4.13: Gaskonzentrationen im Boden der Pflanzgefäße ohne Begasung und mit einer Begasung von 50 cm^3/min bzw. 500 cm^3/min Erdgas (19 Wochen)

4.2.2 Bodenphysikalische Charakterisierung

Der Einfluß der Erdgases auf bodenphysikalische Parameter wurde exemplarisch an gestörten Bodenproben eines unbegasten Lysimeters und zweier mit 500 cm^3/min begasten Lysimeter bestimmt, hierzu wurden jeweils die unteren Tiefenstufen ausgewählt, da hier am ehesten mit bodenphysikalischen Veränderungen zu rechnen war. Außer der Aggregatstabilität, die durch Naß-Siebung ermittelt wurde, wurden zur besseren Charakterisierung der Substrate der permanente Welkepunkt und die Festsubstanzdichte gemessen.

Die Bodenproben der begasten Lysimeter wiesen einen höheren Wassergehalt und kohärente Verdichtungsgefüge auf, während die trockeneren unbegasten Proben aus Krümeln und Pseudoaggregaten bestanden.

Die Unterschiede in der Aggregatstabilität zwischen begastem und unbegastem Boden waren sehr gering, nur eines der begasten Lysimeter wies mit 2,41 mm einen signifikant (P=0,0026) niedrigeren Δ GMD Wert als die entsprechende Tiefenstufe des unbegasten Lysimeters auf, welches auf eine steigende Stabilität der Aggregate hinweist. Auch bei der Festsubstanzdichte und dem permanenten Welkepunkt traten kaum Differenzen zwischen den Behandlungsvarianten auf, der deutlich höhere permanente Welkepunkt des begasten Lysimeters deutet –trotz gleichen Ausgangssubstrats- auf ein tonreicheres Substrat hin und ist nicht auf die Behandlung zurückzuführen (Tab. 4.3).

Tab. 4.3: Aggregatstabilität (ΔGMD), permanenter Welkepunkt (PWP) und Festsubstanzdichte in einem unbegasten Lysimeter und zwei parallel über einen Zeitraum von 16 Monaten mit 500cm^3/min begasten Lysimetern.

Begasung mit Erdgas	Tiefenstufe (cm)	Δ GMD (mm)	PWP (M%)	Festsubstanzdichte (g/cm^3)
unbegast	60-80	2,48 ± 0,02	11,52 ±1,01	2,58
unbegast	80-100	2,53 ± 0,02	10,01± 0,34	2,58
500 cm^3/min	70-100	2,41 ± 0,02	14,55 ± 0,68	2,58
500 cm^3/min*)	70-100	2,44 ± 0,04	9,36 ± 0,023	2,58

*) parallel behandeltes Lysimeter

4.2.3 Bodenchemische Charakterisierung

Die Erdgasapplikation bewirkte eine nachhaltige Veränderung der bodenchemischen Verhältnisse.

Steigende Applikationsmengen gingen mit zunehmenden Ammonium- und sinkenden Nitratkonzentrationen einher (Abb. 4.14). Das Ammonium wurde entweder nicht nitrifiziert oder das vorhandene Nitrat diente fakultativen Anaerobiern als terminaler Wasserstoff-Akzeptor und wurde denitrifiziert bzw. im Zuge der assimilatorischen Nitratreduktion wieder zu Ammonium umgesetzt. Höhere Ammoniumkonzentrationen infolge der Ammonifikation des organischen Stickstoffs in der obersten Bodenschicht sind nur im Kontrollgefäß und im hoch begasten Gefäß zu erkennen. In begasten Pflanzgefäßen blieb die Nitratkonzentration mit der Bodentiefe nahezu konstant, aus den oberen in die unteren Bodenschichten ausgewaschenes Nitrat, wie im Kontrollgefäß ersichtlich, wurde reduziert. Erwartungsgemäß ist der Gehalt an organischen Kohlenstoffverbindungen in der obersten Bodenschicht am größten und nimmt mit der Tiefe ab. In den mit Erdgas beaufschlagten Pflanzgefäßen sind gegenüber dem Kontrollgefäß leicht erhöhte C_{org}-Werte festzustellen. Der pflanzenverfügbare Phosphorgehalt in den mit Erdgas beaufschlagten Böden ist gegenüber den unbegasten Böden in den unteren Bodenschichten erhöht. Tendenziell läßt sich die Erhöhung der Pflanzenverfügbarkeit von Nährstoffen durch Erdgas auch beim Kalium erkennen. Allerdings zeigt sich die deutlichste Auswirkung des Erdgases auf den Gehalt an Nährstoffen beim ammoniumnitratextrahierbaren Mangan. Insbesondere in den Unterbodenschichten kommt es zu einer Anhebung des Mangangehaltes um bis das ca. 100fache gegenüber dem Kontrollgefäß.

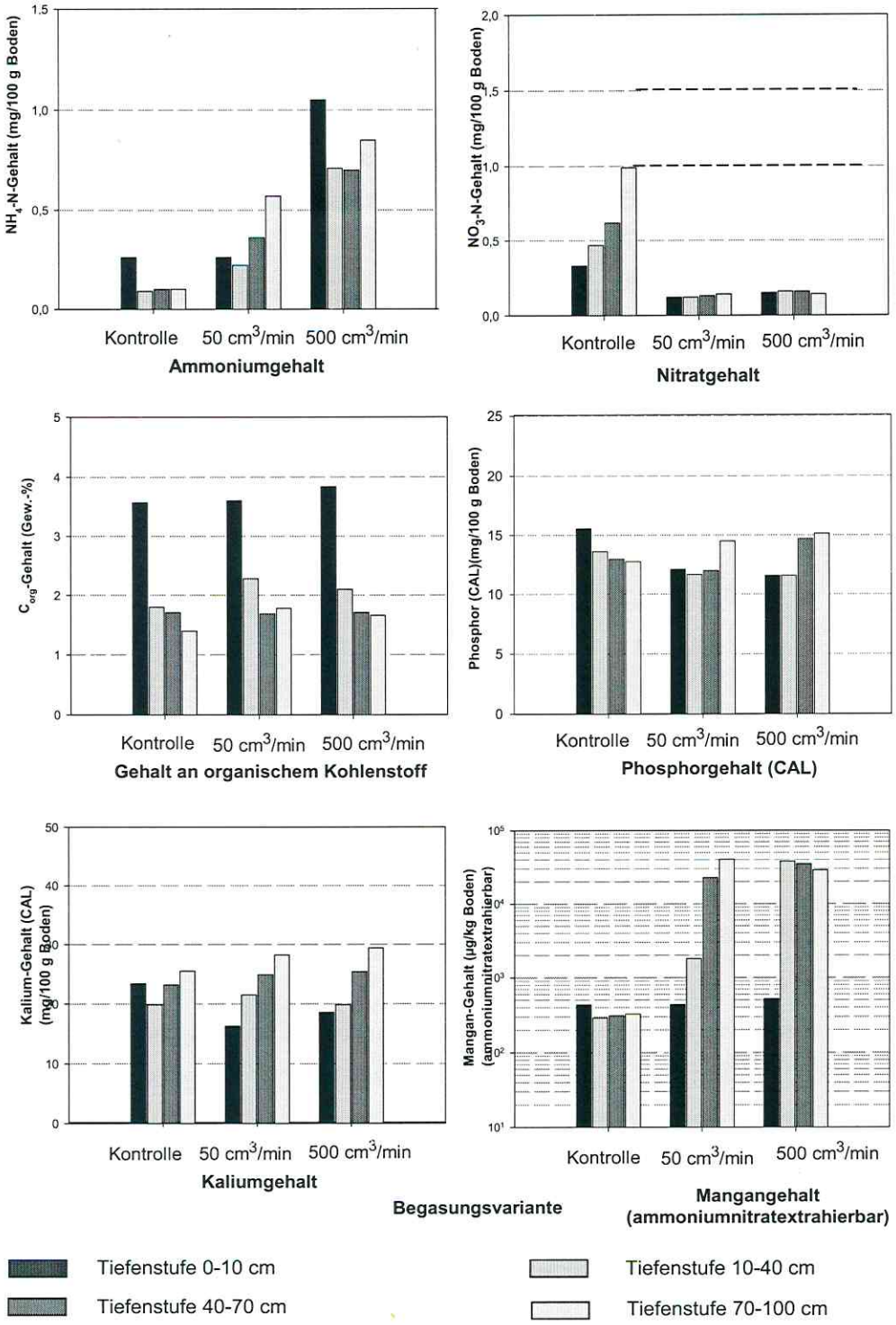


Abb. 4.14: Nährstoffgehalte im Boden der Pflanzgefäße ohne Begasung und mit einer Begasung von 50 cm^3/min bzw. 500 cm^3/min Erdgas (19 Wochen)

4.2.4 Mikrobiologische Charakterisierung

Methanotrophe und andere aerobe Heterotrophe konkurrieren um den im Boden verbliebenen Sauerstoff, eine Abschätzung der Populationsgröße beider Gruppen ist daher von Interesse. Die Bestimmung der Anzahl koloniebildender Einheiten (KBE) diente zur Ermittlung der Zellzahl aerober Heterotropher.

Die KBE (Abb. 4.15) im Boden nimmt im Vergleich zum unbegasten Lysimeter bei Erdgasbeaufschlagung zu. Durch die Methanoxidation reichern sich mikrobielle Biomasse und gegebenenfalls Metabolite im Boden an, die Grundlage für das Wachstum heterotropher Bakterien sind, so daß die Zellzahl im Boden ansteigt.

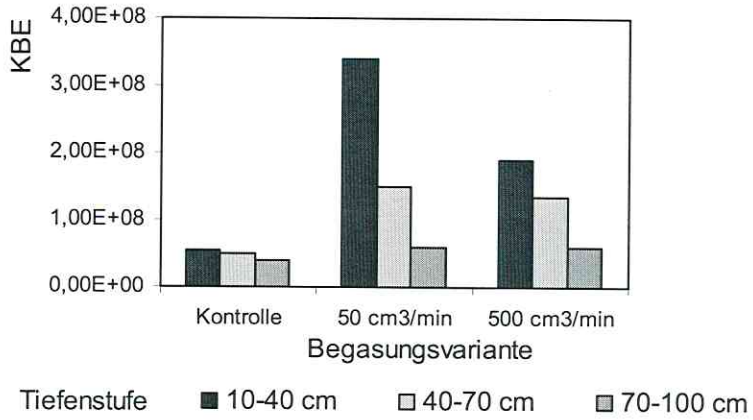


Abb. 4.15: Anzahl der koloniebildenden Einheiten im Boden der Pflanzgefäße ohne Begasung und mit einer Begasung von 50 cm^3/min bzw. 500 cm^3/min Erdgas (19 Wochen)

Die zunehmenden anaeroben Bodenverhältnisse bei höherer Begasung bewirken eine Abnahme der Zahl aerober Bakterien zugunsten der Zahl anaerober Bakterien. Die KBE zeigt eine deutliche Abhängigkeit von der Tiefenstufe bzw. von der mit der Tiefe sinkenden Sauerstoffkonzentration.

Die Bestimmung der KBE methanotropher Bakterien hat sich als unzulängliche Methode erwiesen, solange die Zahl Methanotropher die Anzahl heterotropher Bakterien unterschreitet. In niedrigen Verdünnungsstufen waren auf NMS-Medium Kolonien heterotropher Bakterien zu finden, wie sich durch die Kontrolle mit Nähr- und R2A-Agar herausstellte. Verunreinigungen des Agars waren nicht ursächlich für

dieses Wachstum, da KBE-Ansätze mit Nobelagar oder Silicagel keine Verbesserung brachten, auf diesen Verfestigungsmedien zeigten Methanotrophe eher eine verminderte Fähigkeit Kolonien zu bilden.

Das Wachstum oligocarbophiler Bakterien wird durch die Verschleppung geringer Konzentrationen organischer Substanzen mit der Verdünnung der Bodensuspension ermöglicht. Eine erfolgreiche Methode der Zellzahlbestimmung war hingegen der Mikro-MPN.

Aufgrund der ubiquitären Verbreitung methanotropher Bakterien konnten diese auch in den Kontrollgefäßen in geringer Abundanz im Mikro-MPN detektiert werden.

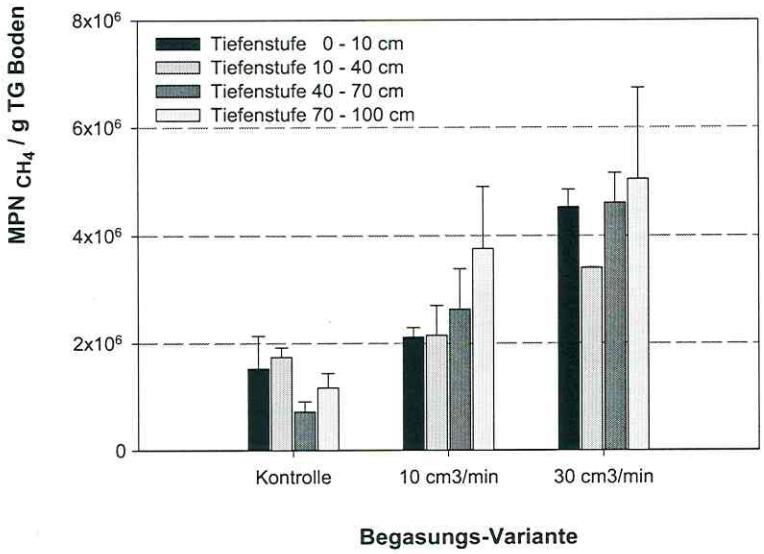


Abb. 4.16: MPN methanotropher Bakterien in unterschiedlich begasten Lysimetern (20 Wochen, Winterhalbjahr)

Bis zu einer Begasung von 50 cm^3/min steigt die Anzahl methanotropher Bakterien mit der Erdgasmenge an, erwartungsgemäß im Sommer- (Abb. 4.17) stärker als im Winterhalbjahr (Abb. 4.16). Die Abundanz steigt in den Gefäßen mittlerer Begasung mit der Tiefe, da hier noch ausreichend Sauerstoff vorhanden ist. Hingegen ist in den mit 500 cm^3/min Erdgas beaufschlagten Gefäßen aufgrund des verdrängten Bodensauerstoffes ein Rückgang der methanotrophen Population zu verzeichnen. Die Abhängigkeit der Anzahl Methanotropher vom Methangehalt des Bodens ist in Abb. 4.18 dargestellt. Bis zu einem Methangehalt von ca. 25 Vol.-% steigt die Anzahl Bakterien auf $4{,}6*10^6$ an, um danach konstant zu bleiben.

Bei höherer Begasung wird die mikrobielle Methanoxidation durch die geringe Sauerstoffverfügbarkeit limitiert, so daß die Zellzahl geringer ist als bei einer optimalen Versorgung mit Methan und Sauerstoff.

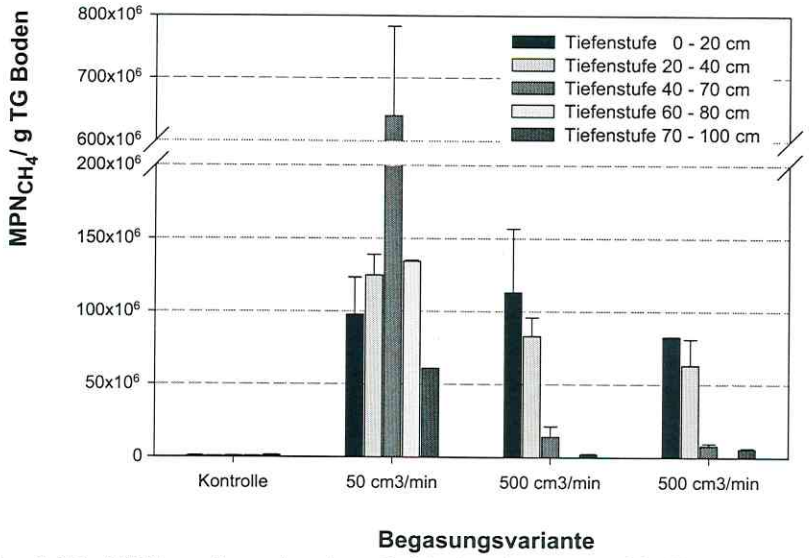


Abb. 4.17: MPN methanotropher Bakterien in unterschiedlich begasten Lysimetern nach 16 Wochen (Sommer)

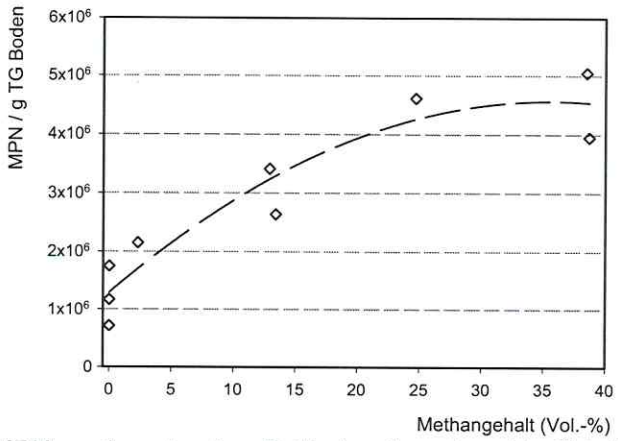


Abb. 4.18: MPN methanotropher Bakterien in unterschiedlich begasten Lysimetern (15 monatige Erdgaseinleitung)

Mit dem BIOLOG-System sollten die heterotrophen Bakterien zunächst aus den Standorten T 1 und T 2 identifiziert werden. Hierbei erwies sich BIOLOG als nicht brauchbar für die untersuchten Umweltisolate. Alle untersuchten Isolate wurden entweder eindeutig falsch oder nicht identifiziert. Dies ist zum einen Teil darin begründet, daß ökologisch bedeutsame, aber schwer zu diagnostizierende Bakterien (*Streptomyces, Nocardia, Mycobacterium*) nicht in der Datenbank von BIOLOG enthalten sind (WÜNSCHE & BABEL 1996). Andererseits weisen die Umweltisolate langsameres Wachstum auf, als die klinischen Arten, für die das BIOLOG-System entwickelt wurde, so daß die vorgegebene Inkubationszeit von 24-48 h nicht hinreichend ist. Eine weitere Identifizierung von Isolaten aus anderen Straßenstandorten wurde aus diesem Grund nicht verfolgt. Hingegen wurde das Substratverwertungsmuster der gesamten Mikrobiozönose verschieden begaster Pflanzgefäße mittels BIOLOG-Platten aufgenommen. Die Begasungsvarianten 0, 50 und 500 cm^3/min wurden nach 16 monatiger Begasungsdauer miteinander verglichen. Die Ähnlichkeiten dieser metabolischen Fingerprints sind Abb. 4.19, einem Dendrogramm nach dem Ward-Verfahren, zu entnehmen. Die Clusteranalyse trennt deutlich zwischen den Begasungsvarianten. So bilden die oberen sauerstoffreichsten Bodenschichten des Kontrollgefäßes eine eigene Gruppe, ebenso wie die unteren methanangereicherten Bodenschichten der hoch begasten Gefäße. Die Bodenluftzusammensetzung stellt erwartungsgemäß einen maßgeblichen Faktor für die Zusammensetzung der Mikrobiozönose dar. Die Bestimmung des Substratverwertungsmuster in BIOLOG-Platten hat sich, im Gegensatz zur Identifizierung einzelner Umweltisolate, als geeignete Methode erwiesen.

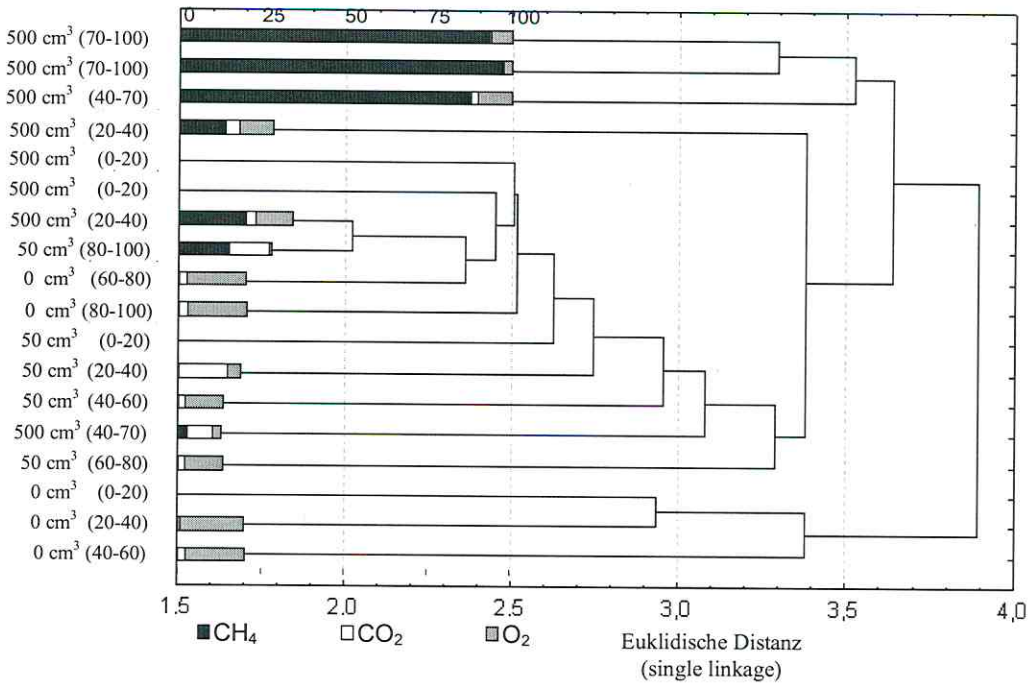


Abb. 4.19: Ähnlichkeiten der Substratverwertungsmuster nach BIOLOG der Mikrobiozönose verschieden begaster Pflanzgefäße (16 monatige Begasungsdauer) dargestellt als Dendrogramm nach dem Verfahren von WARD, die Balken geben die Bodenluftzusammensetzung der jeweils untersuchten Bodenschicht zum Probenahmezeitpunkt an (links: Begasungsmenge (cm^3/min) und Tiefenstufe (cm))

4.3 Methanotrophe Isolate aus erdgasbeeinflußten Straßenböden

Zur qualitativen Charakterisierung der methanotrophen Population wurden zwei Strategien verfolgt, eine kultivierungsabhängige und eine –unabhängige Methode. Zum einen wurden aus ausgewählten Straßenstandorten methanotrophe Bakterien angereichert und isoliert, zum anderen wurden sowohl in Straßenstandorten als auch in den Pflanzgefäßen molekularökologische Untersuchungen durchgeführt, die Gegenstand des Kapitels 4.4 sind.

4.3.1 Anreicherung und Isolierung methanotropher Bakterien

Obwohl die einzigartige Fähigkeit methanotropher Bakterien Methan als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle zu verwenden, ein sehr gutes Selektionskriterium darstellen sollte, welches das gleichzeitige Wachstum nicht-methanotropher Bakterien in Anreicherungskulturen unterbinden sollte, stellt die größte Schwierigkeit beim Umgang mit Methanotrophen die Aufreinigung zu Reinkulturen dar.

Unter Ausnutzung der unterschiedlichen Eigenschaften methanotropher Spezies, wurde das in Abb. 4.20 dargestellte Anreicherungsschema entwickelt, mit dem Ziel der Gewinnung einer maximalen Anzahl verschiedener Isolate.

Durch das differenzierte Anreicherungsverfahren sollten folgende Vorteile gegenüber herkömmlichen Methoden realisiert werden:

- effizientere Extraktion der Bakterien aus dem Boden
- spezifische Anreicherungen für beide methanotrophe Typen
- quantitative Eliminierung der heterotrophen Begleitorganismen aufgrund unterschiedlicher morphologischer und physiologischer Eigenschaften (z. B. Zellgröße, Zellhydrophobie)

Bei der Anreicherungs- und Isolierungsstrategie wurden solche Gattungen nicht berücksichtigt, die nur unter deutlich verschiedenen Habitatbedinungen anzutreffen sind, wie marine, thermophile, acidopile oder alkalophile Gattungen. Eine Anreicherung psychrophiler Methanotropher bei 10°C führte nicht zum Wachstum einer Kultur.

Um sicherzustellen, daß mit dieser Methode nicht gering abundante Physiotypen erfaßt wurden, die unter den gewählten Anreicherungsbedingungen die höchste

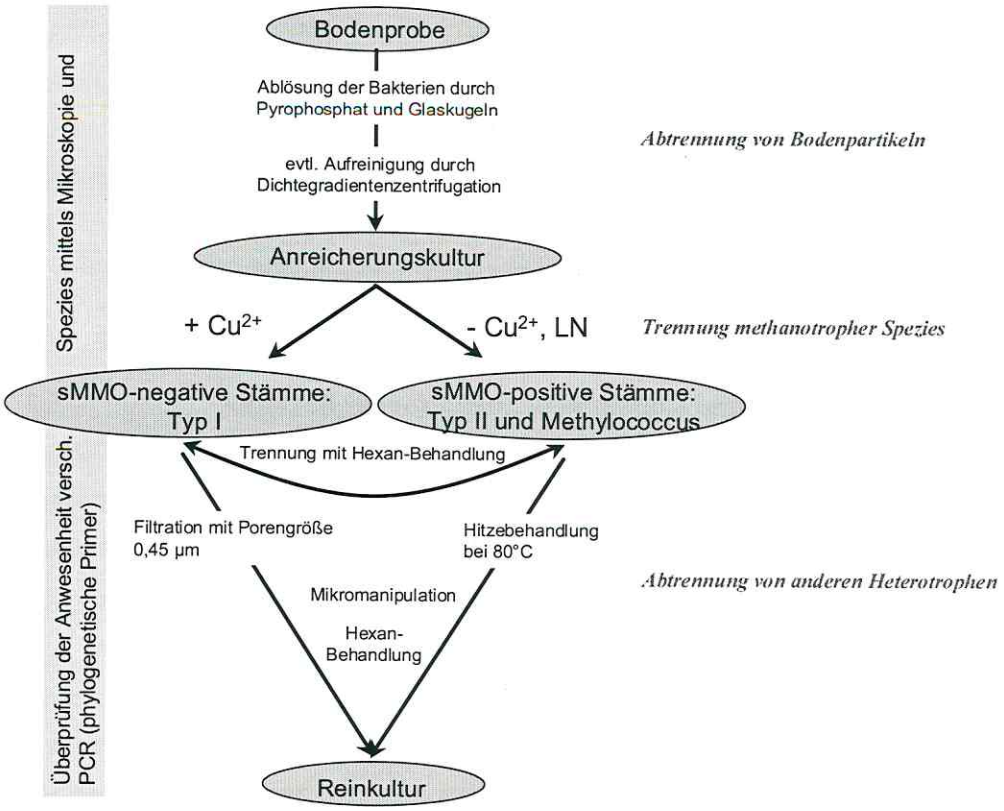


Abb. 4.20: Fließschema zur Anreicherung und Isolierung methanotropher Bakterien

Wachstumsrate aufweisen und somit langsamer wachsende Typen mit hoher Abundanz im Inokulum überwachsen, dienten ebenfalls terminalpositive Verdünnungsstufen von MPN-Untersuchungen als Inokulum für Anreicherungen. Parallel hierzu erfolgte eine mikroskopische Beurteilung dieser Verdünnungsstufen. Die Beobachtung im Phasenkontrast zeigte ein Vorherrschen von Zelltypen, die auch in den jeweiligen Anreicherungskulturen dominierten.

Die häufigsten Begleitorganismen bei methanotrophen Anreicherungskulturen stellten methanolverwertende Bakterien dar, z. B. *Hyphomicrobium*, diese sind aufgrund ihrer charakteristischen Morphologie leicht zu identifizieren und aus den Kulturen auch leicht zu entfernen. Kleine Stäbchen oliogocarbophiler Bakterien stellen eine schwieriger zu eliminierende Komponente der Anreicherungskulturen dar. Das Wachstum dieser Bakterien wird einerseits durch die Verschleppung geringer Konzentrationen organischer Substanzen mit der Verdünnung der

Bodensuspension ermöglicht, andererseits dienen Agarverunreinigungen und Exometabolite Methanotropher als Quelle organischer Verbindungen. Eine Anzucht auf Nobelagar oder Silicagel zur Vermeidung von Agarverunreinigungen brachte keinen Erfolg, auf diesen Medien war eine stark reduzierte Koloniebildungsfähigekit Methanotropher zu verzeichnen. Eine nähere Bestimmung der Begleitflora wurde nicht durchgeführt. Ein großer Anteil der heterotrophen Bakterien war durch häufiges Passagieren der Flüssigkultur und Ausplattieren nicht zu eliminieren, durch Filtration und Resuspension des Filters konnte er jedoch deutlich reduziert werden. Eine Porengröße von 0,45 µm des Filters erwies sich als geeignet, um die 0,4-1 µm breiten und 0,7-2 µm langen methanotrophen Bakterien von den deutlich kleineren Zellen der Begleitflora zu trennen. Bei Anwesenheit von Typ II Methanotrophen wurde die Anreicherungskultur für 15 bis 20 min auf 80°C erhitzt, dies resultierte im Absterben der Begleitorganismen, von Typ I methanotrophen Zellen und von vegetativen Zellen Typ II Methanotropher, wirkte sich jedoch nicht auf die Lebensfähigkeit von Exosporen und Lipidzysten der Typ II Methanotrophen aus.

Mit den Isolierungsmethoden wurden drei Stämme unterschiedlicher methanotropher Arten erhalten, die Stämme erhalten die Stammbezeichnungen GB 18, GB 19 und GB 20.

Die Reinheit der Kulturen wurde bei dem Isolat GB 18 durch Mikromanipulation, bei GB 19 in erster Linie durch Erhitzen der Kultur auf 80°C und Anzucht aus Exosporen und bei GB 20 durch Hexan-Behandlung erzielt. Anreicherungs- und Isolierungsbedingungen sowie eine erste Charakterisierung der Stämme ist Tab. 4.4 zu entnehmen. Die Reinheit der Kulturen wurde regelmäßig durch mikroskopische Kontrollen und fehlendes Wachstum auf Komplexmedien (R2A, Nähragar, $NMS_{oligocarbophil}$, Pilzagar) bestätigt.

Variierende Methangehalte hatten keine Begünstigung eines methanotrophen Typs zur Folge, mikroskopische Untersuchungen im Phasenkontrast ergaben keine Unterschiede zwischen Kulturen des gleichen Inokulums, die mit dem in situ-Methangehalt oder mit der Standardbegasung 30:70 begast wurden.

Der Erfolg des jeweiligen Anreicherungs- oder Isolierungsschrittes wurde mittels PCR und phylogenetischen Primern verfolgt.

Tab. 4.4: Anreicherungs-, Isolierungsbedingungen und Eigenschaften methanotropher Isolate

Stamm	GB 18	GB 19	GB 20
Herkunft	L 6	T 1	L 7
Tiefenstufe	10-40 cm	70-75 cm	10-40 cm
Baumbestand	abgestorbene Platane	abgestorbener Jungbaum	
CH_4 Gehalt der Bodenluft (Vol.-%)	15,2	50,4	2,4
CO_2 Gehalt der Bodenluft (Vol.-%)	6,4	8,7	4,9
O_2 Gehalt der Bodenluft (Vol.-%)	11,5	1,3	12,0
Wachstums-bedingungen	NMS-Medium; 30 °C	AMS-Medium; 30 °C	NMS-Medium; 30 °C
Isolierungsmethode	Mikromanipulation	Verdünnungsreihe	Zellhydrophobie
Gramverhalten	gram-negativ	gram-negativ	gram-negativ
Oxidase	+	+	+
Katalase	+	+	+
Zellmorphologie	Stäbchen 0,6 x 1,5-2 µm, Rosettenbildung	Vibrionen 1x 1,2 µm	Kurzstäbchen, 0,7 x 0,4 µm
sMMO -Naphthalen-oxidation	positiv	schwach positiv	positiv
-mmoX-Gen	vorhanden	vorhanden	vorhanden
Dauerstadien	n.b.	Exosporen	n. b.
Gattung, Art	*Methylosinus trichosporium*	*Methylosinus sporium*	*Methylocystis spec.*

4.3.2 Charakterisierung methanotropher Isolate

Aus den gewonnenen Reinkulturen wurden drei Isolate, die unterschiedlichen Spezies angehören, für eine nähere Charakterisierung ausgewählt.

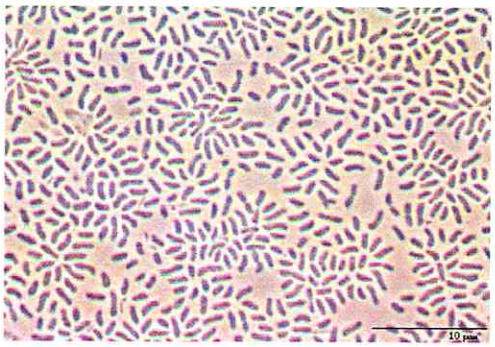
Alle Stämme waren in der Lage, auf Mineralsalzmedium ohne den Zusatz von Vitaminen oder anderen Wachstumsfaktoren und mit Methan als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle zu wachsen. Kein Stamm zeigte Wachstum auf komplexen Nährböden.

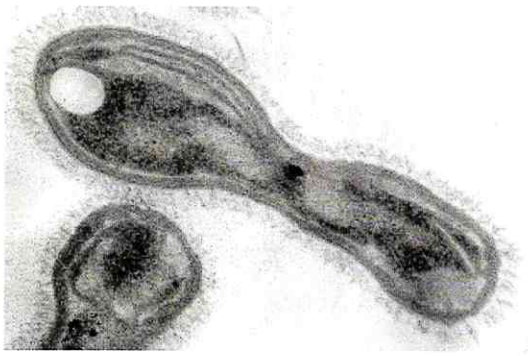
4.3.2.1 Morphologie

Die Kolonien der Isolate GB 18, GB 19 und GB 20 waren rund, glattrandig, konvex. Die Isolate GB 18 und GB 19 hatten weiß-cremefarbige, glänzende, opake Kolonien, während die Kolonien des Stammes GB 20 weiß, matt und undurchsichtig waren, auf älteren Agarplatten trat eine gelbliche Verfärbung des Agars auf. Alle Stämme waren laut Gramfärbung und Aminopeptidase-Test gram-negativ.

Die Zellmorphologie der Isolate ist im phasenkontrast-mikroskopischen Bild in den Abb.4.21 bis 4.23 dargestellt. Zellen von GB 18 waren 1,5-2 µm lange Stäbchen, von GB 19 1,2 µm lange Vibrionen und von GB 20 0,7 µm lange Kurzstäbchen. Das Isolat GB 19 war zur Exosporenbildung befähigt, bei GB 18 und GB 20 wurde keine Bildung von Dauerstadien beobachtet. Der Stamm GB 18 bildete rosettenförmige Zellverbünde.

In ihrer Ultrastruktur (Transmissions-Elektronenmikroskopie) weisen die Zellen aller Isolate zur Cytoplasmamembran peripher angeordnete intracytoplasmatische Membranen auf, sofern eine Anzucht auf kupferhaltigem Medium erfolgte. Einlagerungen von Poly-β-hydroxybuttersäure (PHB) sind deutlich in den Zellen von GB 18 und GB 20 zu erkennen. Die Zellen des Stammes GB 18 sind von einer Glycocalyx umgeben.





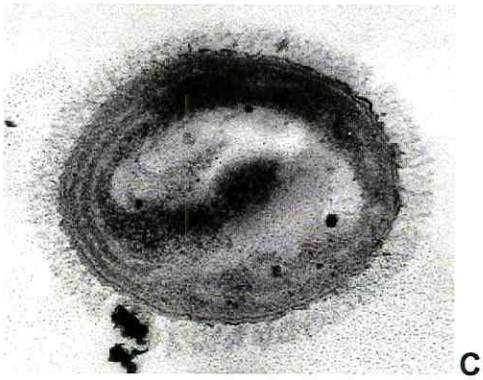


Abb. 4.21: Mikroskopische Aufnahmen des Isolates GB 18, A Phasenkontrast (1250fach), B-C elekronenmikroskopisch (B 30000, C 20000fach)

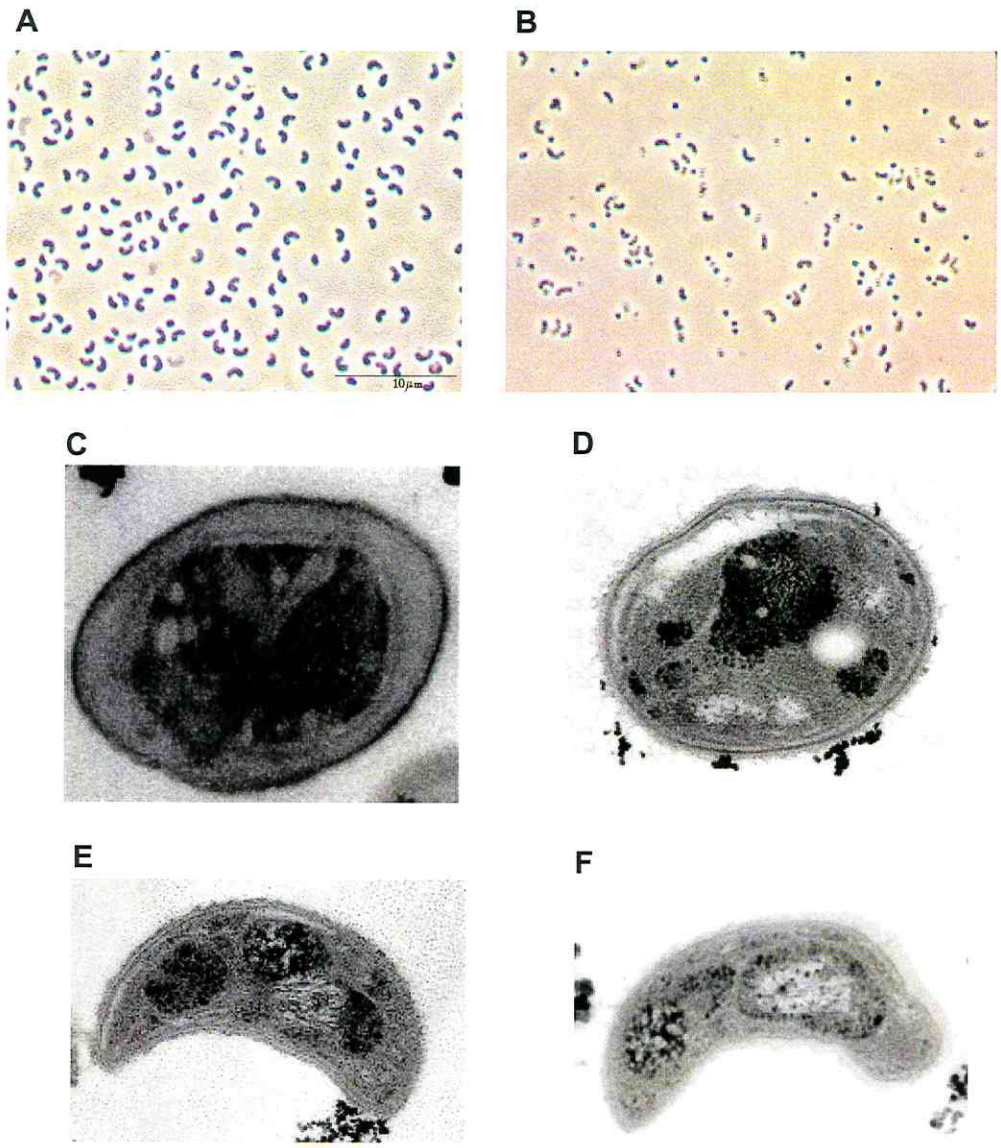


Abb. 4.22: Mikroskopische Aufnahmen des Isolates GB 19, B Exosporenbildung, A u. B Phasenkontrast (1250fach), C-F elekronenmikroskopisch (C u. D 30000, E u. F 20000fach)

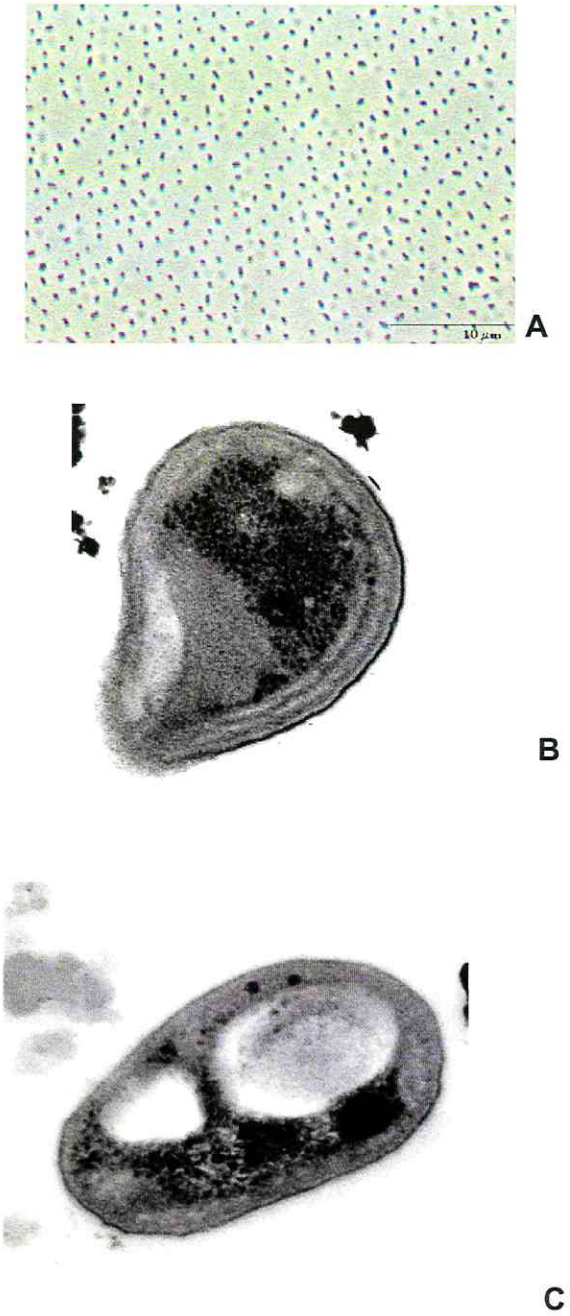


Abb. 4.23: Mikroskopische Aufnahmen des Isolates GB 20, A Phasenkontrast (1250fach), B-C elekronenmikroskopisch (30000 fach)

4.3.2.2 Physiologie

Kein Isolat zeigte Wachstum auf Polycarbon-Substraten, Methan wurde als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle genutzt.

In Schüttelkolbenversuchen wurden Wachstumsparameter aufgenommen (Tab. 4.5). Unter optimalen Kulturbedingungen besaß das Isolat GB 19 eine spezifische Wachstumsrate von μ_{max} = 0,076 h^{-1}, das Isolat GB 18 von 0,062 h^{-1} und das Isolat GB 20 von 0,066 h^{-1}.

Alle gewonnenen Isolate besaßen die lösliche Form der Methanmonooxygenase, das Vorhandensein der sMMO spezifischen Sequenzen bestätigte sich unter Verwendung des sMMO spezifischen Primers mmoX, die Bildung der sMMO ließ sich im Naphthalin-Oxidationstest nachweisen.

Der Verlauf der sMMO-Aktivität während des Wachstums ist in Abb. 4.24 am Beispiel von GB 18 dargestellt, die Aktivität der löslichen Methanmonooxygenase zeigt eine deutliche Abhängigkeit von der Wachstumsphase, sie erreicht bei allen Stämmen während der exponentiellen Phase ihr Maximum.

Tab. 4.5: Maximale Wachstumsrate und maximale sMMO-Aktivität der Isolate GB 18, GB 19 und GB 20 in NMS_{-Cu}-Medium bei 30°C

	GB 18	GB 19	GB 20
max. Wachstumsrate μ_{max} (h^{-1})	0,062	0,076	0,066
max. sMMO-Aktivität (nmol/mg*h)	346,0	90,6	105,7

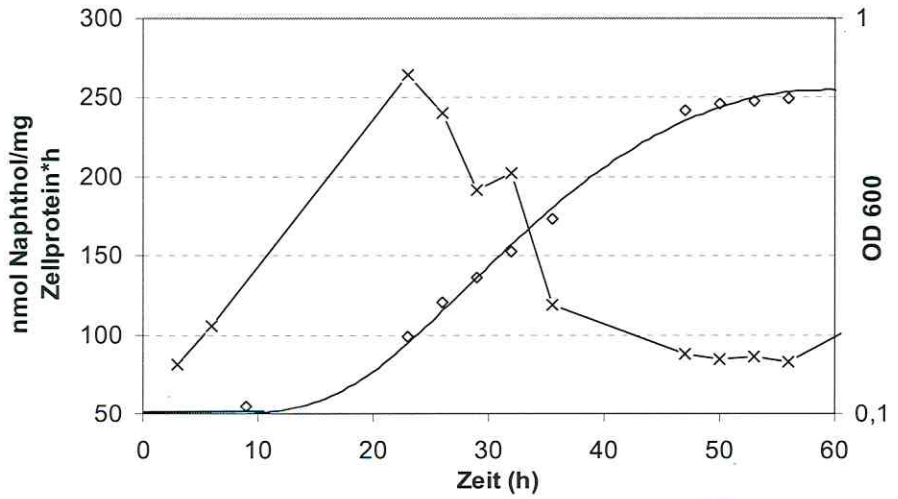


Abb. 4.24: Aktivität der löslichen Methanmonooxygenase von GB 18 in Abhängigkeit von der Wachstumsphase (kupferarmes Medium)

4.3.2.3 Biochemie

Eine metabolische Charakterisierung wurde exemplarisch an dem Isolat GB 18 und an einem Vergleichsstamm eines typischen Typ II methanotrophen Bakteriums durchgeführt. Bei dem Vergleichsstamm handelt es sich um *Methylocystis spec.* GB 14, hinterlegt bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen (DSMZ) unter der Nummer DSM 12955. An den Stämmen GB 18 und GB 20 konnte die metabolische Charakterisierung nicht durchgeführt werden, da die Stämme unter den Laborbedingungen des Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms in Pushchino (Rußland), wo die Untersuchungen durchgeführt wurden, keine typischen Wachstumsraten zeigten. Dies verdeutlicht die Empflindlichkeit dieser Bakteriengruppe gegenüber geringfügig variierenden Kulturbedingungen, wie andere Wasser- und Methanqualität bei ansonsten identischer Medienzusammensetzung.

Die Enzymprofile in Tabelle 4.6 zeigen, daß die Isolate das in der MMO-katalysierten Reaktion gebildete Methanol in einer sequentiellen Reaktion über entsprechende Dehydrogenasen zu Kohlendioxid oxidieren.

Methanol wird durch eine Methanoldehydrogenase (MDH; EC 1.1.99.8) zu Formaldehyd oxidiert. Dieses Enzym konnte durch den Zusatz des künstlichen Elektronenakzeptors Phenazinmethosulfat (PMS) nachgewiesen werden, in vivo werden die Elektronen auf Cytochrom c übertragen (ANTHONY 1986).

Eine NAD^+-abhängige Formaldehyddehydrogenase (FaDH; EC 1.2.1.1) konnte weder in Methylocystis spec. GB 14 noch in dem Isolat GB 18 nachgewiesen werden. Hingegen war eine geringe Aktivität dieses Enzyms in einer PMS gekoppelten Reaktion zu verzeichnen.

In beiden untersuchten Stämmen konnte sowohl eine NAD^+-abhängige als auch eine PMS gekoppelte Formiatdehydrogenase (FDH; EC 1.2.1.2)-Aktivität gezeigt werden.

Neben diesen Enzymen des dissimilatorischen Stoffwechsels wurden die beiden Stämme ebenfalls auf das Vorhandensein von Schlüsselenzymen der assimilatorischen Stoffwechselwege hin geprüft: Hexulosemonophosphat-Synthase (Ribulosemonophosphat-Zyklus der Formaldehyd-Fixierung), Hydroxypyruvat-Reduktase und Serin-Hydroxymethyltransferase (Serin-Weg der Formaldehyd-Fixierung) und Ribulosebisphosphat-Carboxylase (Calvin-Benson-Zyklus bzw. Ribulosebisphosphat-Zyklus). Beide Stämme wiesen Aktivitäten der Hydroxypyruvat-

Reduktase (EC 1.1.1.29) und Serin-Hydroxymethyltransferase auf, Aktivitäten der Hexulosephosphat-Synthase waren nicht zu verzeichnen. Das bedeutet, daß beide Stämme Formaldehyd über den Serin-Weg fixieren und somit den Typ II Methanotrophen zuzuordnen sind. Typ I Methanotrophe hingegen benutzen den Ribulosemonophosphat-Zyklus zur Formaldehyd-Fixierung, dessen Enzyme hier nicht nachzuweisen waren.

Sowohl *Methylocystis spec.* GB 14 als auch das Isolat GB 18 verfügen über eine $NADP^+$-abhängige Isocitratdehydrogenase, die zur Aktivierung Mg^{2+} benötigt, dieses Enzym ist typisch für Typ II Methanotrophe.

Das Vorhandensein einer, wenn auch geringen, α-Ketoglutaratdehydrogenase-Aktivität läßt bei beiden Stämmen auf einen kompletten Tricarbonsäurezyklus schließen, hingegen liegt dieser mit einer Ausnahme bei Typ I Methantrophen nur unvollständig vor (ZHAO & HANSON 1984). Die Stämme benutzen den Glutamatzyklus, für die Assimilation von Ammonium, wie an dem Vorkommen von Glutaminsynthetase und Glutamatsynthase abzulesen ist.

Tab. 4.6: Enzymaktivitäten des primären und intermediären Metabolismus in Zellextrakten methanotropher Stämme (nmol/min*mg Protein); Vergleichsstamm für Typ II Methanotrophe *Methylocystis spec.* GB 14 (DSM 12955) und Isolat GB 18

Enzym	**Stamm**	
	GB 14	***GB 18***
Methanol-Dehydrogenase (PMS)	32,0	34,6
Formaldehyd-Dehydrogenase		
NAD	0	0
PMS	1,6	3,2
Formiat-Dehydrogenase		
NAD	112,6	221,2
PMS	76,8	204,0
Hydroxypyruvat-Reduktase		
NADH	11,0	55,4
NADPH	5,4	94,2
Serin-Glyoxylat-Aminotransferase	2,8	22,2
Hexulosephosphat-Synthase	0	0
Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase	0	0
Citratsynthase	25	32
Isocitratdehydrogenase		
NAD	0	0
NADP	13,4	11,5
2-Oxoglutarat-Dehydrogenase (NAD)	6	9
Malat-Dehydrogenase		
NAD	29,3	21,8
NADP	3,5	2,8
6-Phosphofructokinase, PPi-abhängig	2,8	2,9
Glutamatsynthase (NADH)	8	12
Glutaminsynthetase, Mn^{2+}, ATP	21,8	49,6

Auch membrangebundene Fettsäuren liefern ein wesentliches Kriterium zur Einordnung methanotropher Bakterien.

Vorherrschend bei allen drei untersuchten Isolaten waren Fettsäuren mit einer Kettenlänge von 18 C-Atomen und einer Doppelbindung (C18:1), insbesondere das Vorkommen der Fettsäure 18:1ω7c, welche außer bei *Methylosinus trichosporium* (18:1ω8c) den Hauptbestandteil der Fettsäuren Typ II Methanotropher ausmacht (BOWMAN et al. 1991, GUCKERT et al. 1991, NICHOLS et al. 1985), war häufig und betrug bei GB 19 ähnlich dem von BOWMAN et al. (1991) angegebenen Wert von 78% für *Methylosinus sporium* 74,12 % aller Fettsäuren. Eine automatische Identifizierung anhand des Fettsäurespektrums konnte nicht erhalten werden, da Methanotrophe weder unter den zur Identifizierung notwendigen Standardbedingungen wachsen noch im Datenbanksystem der verwendeten Software enthalten sind (HÄRTIG 1998). Aus diesem Grund wurde ein Vergleich des Fettsäurespektrums direkt aus dem Gaschromatogramm erstellt, indem die Peaks anhand von Retentionszeiten und Fläche in einer Clusteranalyse eingesetzt wurden (Abb. 4.25). Die Isolate GB 18 und GB 20 stehen in der Zusammensetzung der Fettsäuren *Methylocystis parvus* nahe.

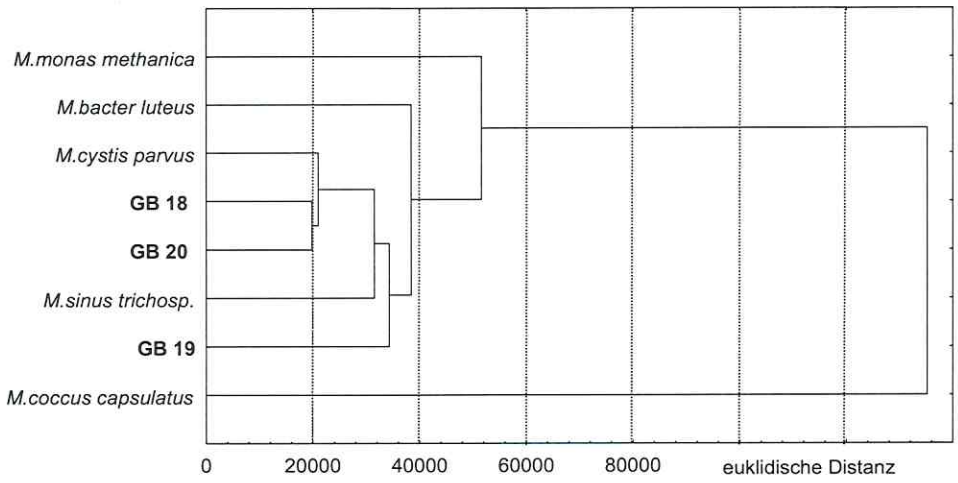


Abb. 4.25: Agglomerative Clusteranalyse (WARD-Methode) der eigenen Isolate mit Vergleichsstämmen der NCIMB (National Collections of Industrial, Food and Marine Bacteria) bezüglich des Fettsäurespektrums (M.=Methylo-).

4.3.2.4 Phylogenetische Einordnung

Mittels PCR wurde die Gruppenzugehörigkeit der Isolate zu den verschiedenen Gattungen Methanotropher bestimmt. Bei allen Isolaten konnte ein ca. 1000 bp großes Amplifikat mit dem Primerpaar f 27 und Ms 1020r im Agarosegel nachgewiesen werden, somit können alle Isolate den Typ II Methanotrophen bzw. der Gattung *Methylosinus/-cystis* zugeordnet werden. Eine Unterscheidung zwischen den beiden Gattungen *Methylosinus* und *Methylocystis* ist mittels PCR nicht möglich, da aufgrund der hohen Konformität der 16S rDNA beider Gattungen derzeit keine diskreten Primer existieren. Es konnten keine PCR-Produkte mit Primern, die für andere Gattungen spezifisch sind, erhalten werden.

Zur Zuordnung der Isolate zur Gattung *Methylosinus* oder *–cystis* wurde die 16 S rDNA sequenziert. Eine BLAST-Analyse (BLAST Version 2.2.2; Stand 14.03.2002; ALTSCHUL et al. 1997) der partiellen 16 S rDNA Sequenz der methanotrophen Isolate GB 18, GB 19 und GB 20 ergab eine 99%ige Übereinstimmung des Isolates GB 18 mit dem Stamm *Methylosinus trichosporium* OB3b (NCIMB 11131) und des Klons *Methylosinus trichosporium* pAMC 265 (COSTELLO & LIDSTROM 1999). Die partielle 16 S rDNA des methanotrophen Isolates GB 19 stimmte zu 98% mit dem Typstamm *Methylosinus sporium* (NCIMB 11126) überein und zu 99% mit den Umweltisolaten Methylosinus sp. PW 1(COSTELLO & LISTROM 1999), LW 3 (COSTELLO & LIDSTROM 1999) und LW 8 (AUMAN et al. 2000). Die höchste Sequenzidentität des Stammes GB 20 mit einer validierten methanotrophen Spezies lag bei nur 97 % (*Methylocystis parvus* NCIMB 11129). Die höchste Übereinstimmung wurde mit den Isolaten AML-A6 (99%) bzw. AML-A3 (98%) von WISE et al. (1999) gefunden, eine ebenfalls 99%ige Sequenzidentität lag zwischen GB 20 und einem unkultivierten Bakterium (MORRIS et al. 2002) bzw. einem unidentifizierten α-Proteobakterium vor (DUNFIELD et al. 1999). Als Datenbasis der BLAST-Analyse lagen GenBank (USA), EMBL (Europa), DDBJ (Japan) und PDB zugrunde.

Um die Verwandtschaft der Isolate zu bekannten Methanotrophen besser darzustellen, wurde eine phylogenetische Analyse durchgeführt (Abb. 4.26).

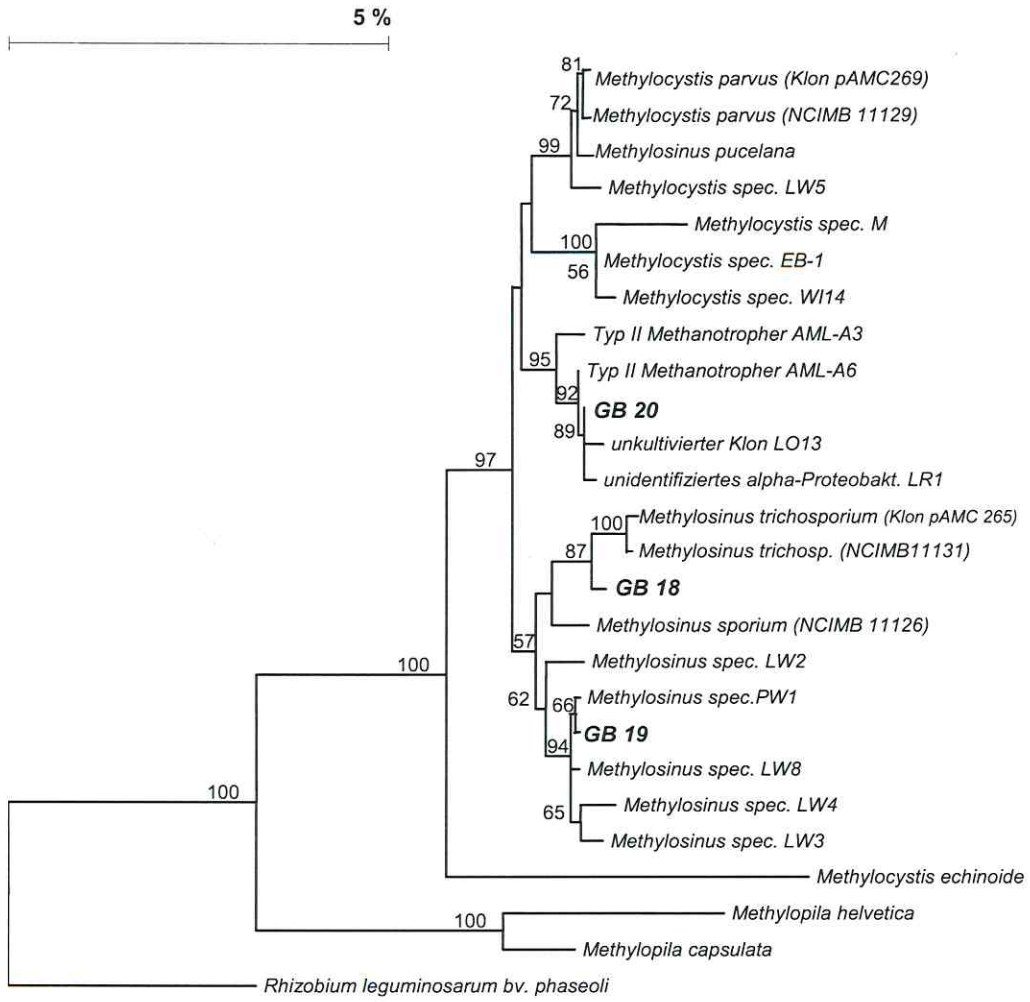


Abb.4.26: Phylogenetischer Baum, der die Verwandtschaft der Isolate GB 18, GB 19 und GB 20 zu anderen Typ II Methanotrophen aufgrund der 16 S rDNA-Sequenzen (1246 Nukleotide) zeigt. Die Zahlen an den Knoten geben die Bootstrap-Werte an (Werte unter 50 sind nicht dargestellt). *Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli* diente bei diesem Baum als „Outgroup". Der Maßstab repräsentiert 0,05 Substitutionen pro Basenposition.

4.4 Molekularbiologische Analyse erdgasbeeinflußten Bodens

Die Analyse extrahierter Boden-DNA sollte es ermöglichen, die genotypische Diversität der methanotrophen Gemeinschaft unabhängig von den gewählten Kultivierungsmethoden zu untersuchen.

4.4.1 DNA-Extraktion

Bei der Extraktion von DNA aus den untersuchten Bodenproben wurden Ausbeuten von bis zu 14,78 µg DNA/g Bodenfrischgewicht (fluorometrische Konzentrationsbestimmung) im Rohextrakt erhalten. Die Quantifizierung der DNA mittels UV Spektroskopie ergab höhere Werte, da die im Rohextrakt noch vorhandenen Huminstoffe, durch ihre Absorption im Bereich 100-400 nm (ERTEL & HEDGES 1983) interferrierten.

Der Reinheitsgrad der extrahierten Nukleinsäuren, beschrieben durch das Verhältnis $A_{260/280}$, lag bei den ungereinigten DNA-Extrakten zwischen 1,35 und 2 (Mittel 1,63 ± 0,26 (gemessen in Wasser)), welches eine nur geringe Kontamination mit Proteinen widerspiegelt. Die Aufreinigung über PVPP-Säulen bewirkte keine Verminderung an Proteinkontamination, aber verringerte deutlich die Kontamination mit Huminsäuren. So wurde das Verhältnis $A_{260/230}$ von z. B. 0,98 bei dieser Probe auf 1,36 verbessert (Abb. 4.27). Die Aufreinigung ging jedoch mit einem Verlust von 20-30 % der DNA einher. Die Eliminierung der koextrahierten Huminsäuren durch die Aufreinigung der DNA-Extrakte bewirkte, daß sich alle gereinigten Extrakte durch Taq-Polymerase amplifizieren ließen, da die für das Primerannealing notwendigen Mg^{2+}-Ionen nicht mehr durch die Huminstoffe komplexiert wurden. Die Qualität bzw. Amplifizierbarkeit der DNA wurde mit dem für die eubakterielle 16S rRNA spezifischen Primerpaar f 27 und r 1492 überprüft. Außer aus Probe L3 (40-70 cm; Pos. 7 Abb. 4.28), die aus Steinen bestand, wurden PCR-Produkte der erwarteten Größe und ähnlicher Ausbeute sowohl aus den Straßenstandorten als auch aus den Pflanzgefäßen erhalten. Typische PCR-Fehler durch unterschiedliche Gehalte an inhibierenden Substanzen dürften somit ausgeschlossen werden.

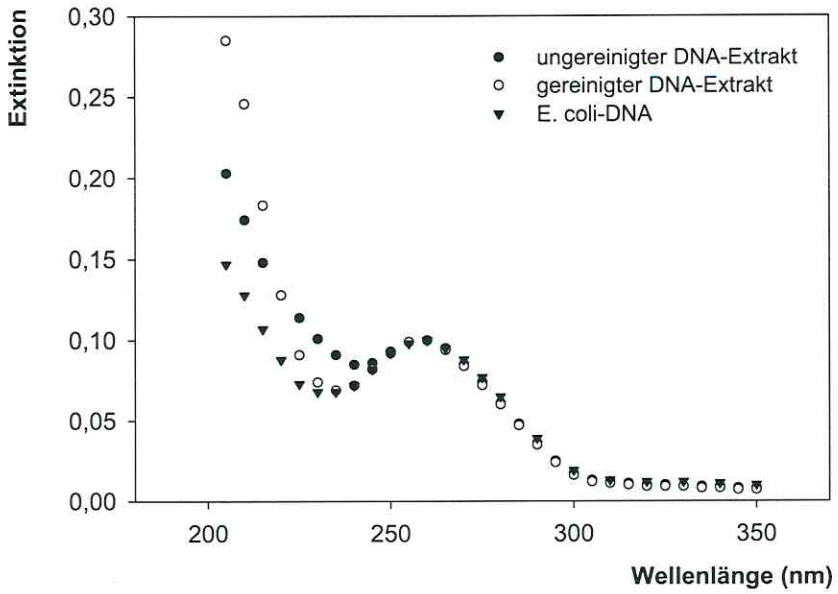


Abb. 4.27: Absorptionsspektren des ungereinigten und gereinigten DNA-Extraktes, zum Vergleich reine E. coli DNA (Sigma), die DNA-Konzentration ist auf 5 µg/ml eingestellt.

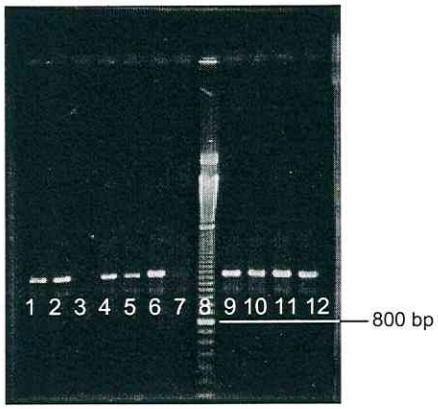


Abb. 4.28: PCR-Produkte mit dem universellen Primerpaar f 27 und r 1492 von DNA-Extrakten aus Bodenproben der Windscheidstraße. **1**: L1 (40 bis 70 cm); **2**: L1 (70 bis 100 cm); **3**: Kontrolle (ohne DNA); **4**: L2 (10 bis 40 cm); **5**: L2 (40 bis 70 cm); **6**: L2 (70 bis 100 cm); **7**: L3 (40 bis 70 cm); **8**: 100 bp ladder; **9**: L3 (70 bis 100 cm); **10**: L4 (70 bis 100 cm); **11**: L5 (10 bis 40 cm); **12**: L5 (40 bis 70 cm)

Die gruppenspezifischen Primer wurden anhand der jeweiligen Typspezies auf ihre Spezifität hin überprüft, bis auf die Primer Ms1020 und Mb1007 waren alle Primer gattungsspezifisch. Mit dem Primer Ms1020 ließen sich sowohl Sequenzen von *Methylosinus* als auch *Methylocystis* amplifizieren. Zwischen den Gattungen methanotropher α-Proteobakterien ließ sich mit den vorliegenden Primern demnach nicht differenzieren. Der Primer Mb 1007 amplifizierte keine DNA der Typspezies *Methylobacter luteus* 53v (NCIMB 11914).

4.4.2 Verteilung verschiedener Gattungen methanotropher Bakterien

In dem Straßenzug mit den Untersuchungsstandorten L1 bis L5 konnten Methanotrophe unter Anwendung der gattungsspezifischen Primer an 2 Standorten nachgewiesen werden (Tab. 4.7). Am Standort L4 wurden in beiden untersuchten Bodentiefen (40 bis 70 cm und 70 bis 100 cm) verschiedene Gattungen methanotropher Bakterien detektiert, in der oberen Bodenschicht *Methylosinus, Methylococcus und Methylomonas*. Dies steht im Einklang mit dem Vorhandensein von Methan (11,9 bzw. 13,1 Vol.-% zum Probennahmezeitpunkt) und dem Kohlenstoffisotopenverhältnis an diesem Standort. Am Standort L5 war kein Methan zu messen, jedoch wies der ^{13}C-Wert auf mikrobielle Methanoxidation hin, Methanotrophe konnten hier in der Tiefenstufe 70-100 cm molekularbiologisch nachgewiesen werden. Am Standort L1, der sich in der Nähe eines Gaslecks befand und an dem das Kohlendioxid anteilig aus Methan stammte, konnte hingegen keine Gattung methanotropher Bakterien nachgewiesen werden. Niedrige negative $\delta^{13}C$-Werte des Kohlendioxides (ca. –23 bis –29) weisen auf die Veratmung des bodenbürtigen Kohlenstoffes oder die Wurzelatmung an sich hin, während hohe negative $\delta^{13}C$-Werte (Werte über –30 bis ca. -52) auf die Veratmung des Methans hindeuten. Im Boden finden beide Prozesse gleichzeitig statt, so daß die gemessenen Werte zwischen den genannten liegen und anteilig die jeweilige Herkunft repräsentieren.

Tab. 4.7: Vorkommen unterschiedlicher Gattungen methanotropher Bakterien an ausgewählten Standorten der Windscheidstraße und entsprechende Isotopensignatur des Kohlendioxides

Standortnummer	Primer					Isotopen-signatur
	universal	Mb 1007	Mm 1007	Mc 1005	Ms 1020	$\delta^{13}C$-Wert des CO_2
L 1 (40 - 70 cm)	x	-	-	-	-	
L 1 (70 - 100 cm)	x	-	-	-	-	-30,0
L 2 (40 - 70 cm)	x	-	-	-	-	
L 2 (70 - 100 cm)	x	-	-	-	-	-28,9
L 3 (40 - 70 cm)	-	-	-	-	-	
L 3 (70 - 100 cm)	x	-	-	-	-	-28,6
L 4 (40 - 70 cm)	x	-	x	x	x	
L 4 (70 - 100 cm)	x	-	x	-	-	-32,0
L 5 (40 - 70 cm)	x	-	-	-	-	
L 5 (70 - 100 cm)	x	-	(x)	-	x	-37,3

Mb = Methylobacter; Mm = Methylomonas; Mc = Methylococcus; Ms = Methylosinus
x PCR-Produkt (x) schwaches PCR Produkt - kein PCR-Produkt

In den Pflanzgefäßen hat sich nach 19 wöchiger Erdgaseinleitung eine methanotrophe Population hoher Diversität angereichert (Tab. 4.8). Insgesamt konnten mit den phylogenetischen Primern alle vier untersuchten Gattungen bzw. Gruppen nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den kultivierenden Verfahren (Isolate und mikroskopische Beurteilung von MPNs) ist Typ I stärker vertreten: *Methylobacter* wurde bei geringen Methangehalten in den oberen Bodenschichten, *Methylomonas* bei mittleren Methankonzentrationen und *Methylococcus* in fast allen Tiefenstufen des niedrig und hoch begasten Pflanzgefäßes vorgefunden. Der

Nachweis von *Methylosinus/-cystis* gelang nur in einer Probe. Das funktionelle Primerpaar 882f und 1403r wurde zur Detektion des Gens mmoX eingesetzt, um so die Unterrepräsentation der Methylocystaceae zu verifizieren. In allen Proben, in denen sich mmoX amplifizieren ließ *Methylosinus/-cystis* jedoch nicht vorkam, ließ sich die Amplifikation von mmoX durch das Vorkommen der ebenfalls mmoX-positiven Gattung *Methylococcus* erklären.

Tab. 4.8: Vorkommen unterschiedlicher Gattungen methanotropher Bakterien in unterschiedlich begasten Pflanzgefäßen nach 19 wöchiger Erdgaseinleitung (korrespondierende Gasgehalte s. Abb. 4.13)

Begasungsvariante (Tiefenstufe)	**Primer**					
	universal	**Mb 1007**	**Mm 1007**	**Mc 1005**	**Ms 1020**	**mmoX**
50 cm^3/min (0 - 10 cm)	x	-	-	-	-	-
50 cm^3/min (10 - 40 cm)	x	x	x	(x)	-	(x)
50 cm^3/min (40 - 70 cm)	x	-	x	(x)	x	x
50 cm^3/min (70 - 100 cm)	x	-	x	(x)	-	(x)
500 cm^3/min (0 - 10 cm)	x	x	(x)	x	-	-
500 cm^3/min (10 - 40 cm)	x	-	-	(x)	-	x
500 cm^3/min (40 - 70 cm)	x	-	-	(x)	-	x
500 cm^3/min (70 - 100 cm)	x	-	x	x	-	(x)
Kontrolle (0 - 10 cm)	x	-	-	-	-	-
Kontrolle (10- 40 cm)	x	-	-	-	-	-
Kontrolle (40 - 70 cm)	x	-	-	-	-	-
Kontrolle (70 - 100 cm)	x	-	-	-	-	-

Mb = Methylobacter; Mm = Methylomonas; Mc = Methylococcus; Ms = Methylosinus
x PCR-Produkt (x) schwaches PCR Produkt - kein PCR-Produkt

Die 15monatige Begasungsdauer geht mit abnehmender Diversität einher. *Methylobacter* wurde in keiner Tiefenstufe und Begasungsvariante nachgewiesen,

Methylococcus nur noch in drei Schichten der begasten Gefäße. Im Kontrollgefäß ließ sich ebenfalls DNA mit den Primern Mm 1007 und Mc1005 amplifizieren, die unmittelbare räumliche Nähe der begasten Gefäße hat offenbar über diesen langen Zeitraum ausgereicht, um den atmosphärischen Methangehalt im Versuchsgelände soweit anzuheben, daß er methanotrophes Wachstum auch im nicht direkt begasten Boden ermöglicht.

Tab. 4.9: Vorkommen unterschiedlicher Gattungen methanotropher Bakterien in unterschiedlich begasten Pflanzgefäßen nach 15 monatiger Erdgaseinleitung

Begasungsvariante (Tiefenstufe)	**Primer**				
	universal	**Mb 1007**	**Mm 1007**	**Mc 1005**	**Ms1020**
50 cm^3/min (0 - 20 cm)	x	-	(x)	-	-
50 cm^3/min (20 - 40 cm)	x	-	x	-	x
50 cm^3/min (40 - 60 cm)	x	-	x	x	-
50 cm^3/min (60 - 80 cm)	x	-	-	-	-
50 cm^3/min (80 - 100 cm)	x	-	x	-	x
500 cm^3/min (0 - 20 cm)	x	-	x	(x)	-
500 cm^3/min (20 - 40 cm)	x	-	x	-	x
500 cm^3/min (40 - 70 cm)	x	-	x	-	-
500 cm^3/min (70 - 100 cm)	x	-	-	x	-
Kontrolle (0 - 20 cm)	x	-	x	(x)	-
Kontrolle (20 - 40 cm)	x	-	x	-	-
Kontrolle (40 - 60 cm)	x	-	-	(x)	-
Kontrolle (60 - 80 cm)	x	-	x	(x)	-
Kontrolle (80 - 100 cm)	x	-	-	-	-

Verglichen mit den kultivierenden Verfahren fallen zwei Unterschiede in der Verteilung der methanotrophen Gattungen in den Lysimetern auf: 1.) das häufige Vorkommen der Gattung *Methylomonas* (zur zweiten Probennahme sogar in einem unbegasten Lysimeter) und 2.) das geringe Auftreten der Gattung *Methylosinus* bzw. *–cystis*. Um diese Proben genauer hinsichtlich ihrer Genotypen hin zu untersuchen, wurden sie einer „nested" PCR-DGGE unterzogen, indem an eine PCR mit den gruppenspezifischen Primern für *Methylomonas* bzw. *Methylosinus* eine zweite PCR mit den DGGE-Primern angeschlossen wurde (BOON et al. 2002). Als Ergebnis erhält man gruppenspezifische DGGE-Profile. Um unspezifische Produktbildung in der PCR möglichst zu vermeiden, wurden diese PCRs mit jeweils nur 25 Zyklen durchgeführt.
Zunächst mußte das DGGE-Protokoll optimiert werden, da die Auflösung des Gels zu gering war. Bei dem optimierten Denaturierungsgradienten von 35-60% waren die Banden nicht scharf und nicht deutlich voneinander getrennt. Ein weiterer Denaturierungsgradient hätte jedoch das Auflösungsvermögen zu stark verringert. Eine deutliche Verbesserung wurde durch eine Bandenfokussierung mittels Doppelgradienten-DGGE erzielt. Bei der Doppelgradienten-DGGE wird nicht nur ein denaturierender Gradient im Gel aufgebaut, sondern weiterhin ein Acrylamidgradient (CREMONESI et al. 1997, PETRI 2000). In Laufrichtung des Gels kommt es so zu einer Verkleinerung der Porengröße, aufgeschmolzene Amplifikate werden in dem Gelbereich durch die Verengung der Poren aufkonzentriert. Die verbesserte Trennleistung ist in Abb. 4.29 am Beispiel einer Probe und des „ladders" dargestellt.

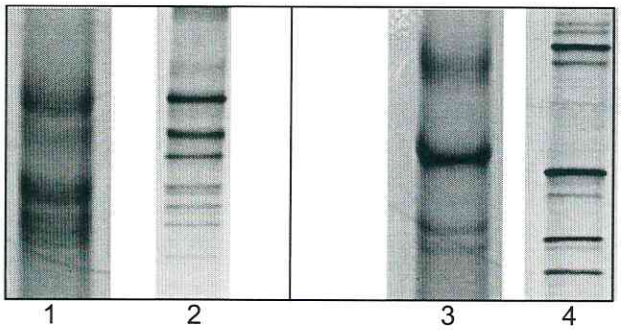


Abb.4.29: Optimierung der DGGE durch Bandenfokussierung mittels Gradienten-optimierung und Doppelgradienten-DGGE (1 Lysimeterprobe vor der Optimierung, 2 gleiche Lysimeterprobe nach der Optimierung, 3 „ladder" vor der Optimierung, 4 „ladder" nach der Optimierung)

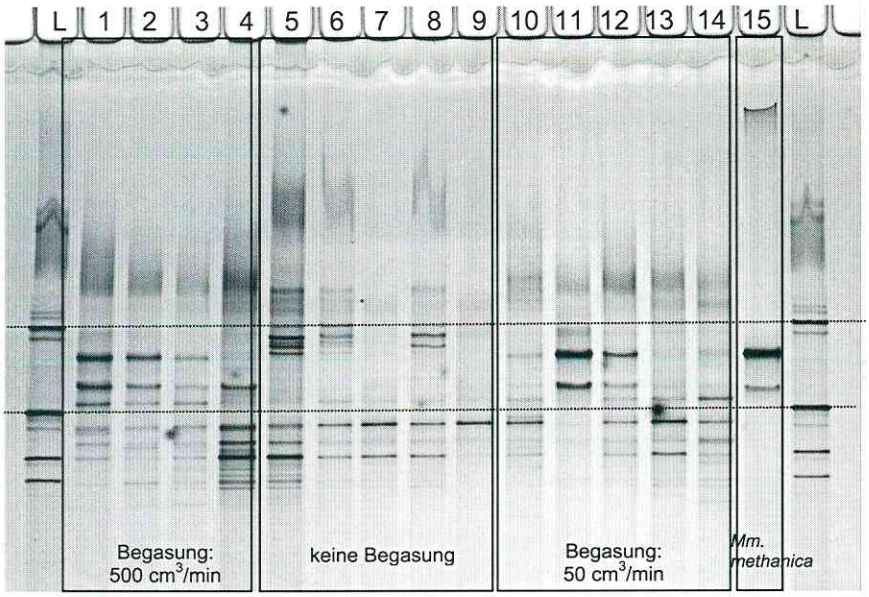


Abb. 4.30: Vorkommen der Gattung *Methylomonas* in unterschiedlich begasten Lysimetern anhand eines DGGE-Profils im Anschluß an eine „nested" PCR (denaturierender Gradient 35-60%; Acrylamidgradient 6-8%; 6 h bei 150 V), *1, 5, 6, 10* 0-20 cm; *2, 7, 11* 20-40 cm; *3* 40-70 cm; *12* 40-60 cm; *4* 70-100 cm; *8, 13* 60-80 cm; *9, 14* 80-100 cm; L „Ladder"

Der Abb. 4.30 ist das Vorkommen der Typspezies der Gattung *Methylomonas methanica* in unterschiedlich begasten Lysimetern zu entnehmen. Obwohl in dem unbegasten Lysimeter PCR-Produkte mit dem Primerpaar f 27 und r Mm1007 erhalten wurden, ist die für *Methylomonas methanica* typische Doppelbande nur in den begasten Pflanzgefäßen wiederzufinden. Die obersten Bodenschichten des hoch begasten Gefäßes und die mittleren Schichten des niedrig begasten mit jeweils mittleren Methangehalten scheinen die optimalen Bedingungen für diese Art darzustellen.

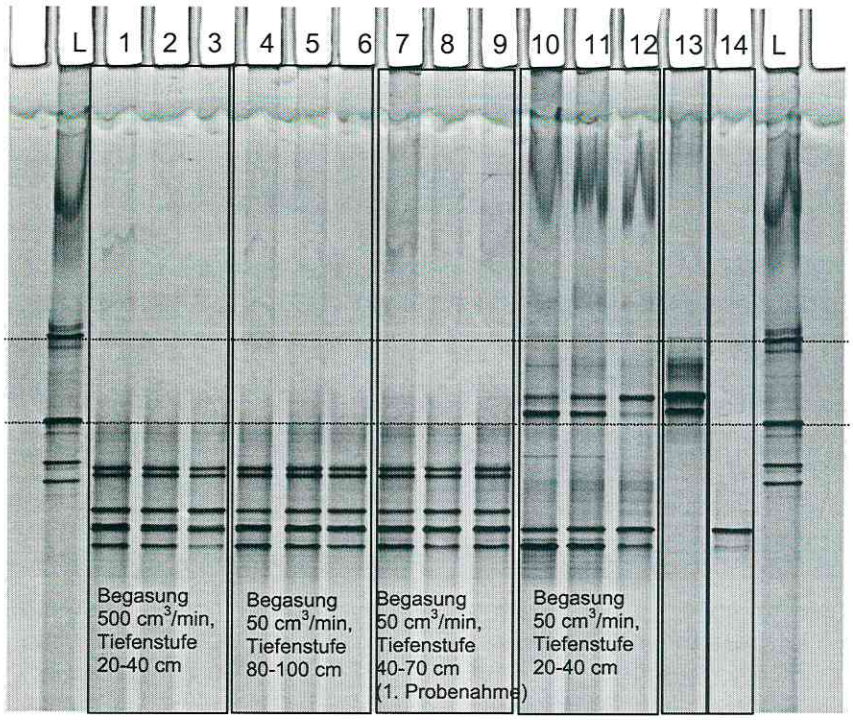


Abb. 4.31: Vorkommen der Methylocystaceae in unterschiedlich begasten Lysimetern anhand eines DGGE-Profils im Anschluß an eine „nested" PCR; *13 Methylosinus sporium*, *14 Methylocystis* parvus (denaturierender Gradient 35-60%; Acrylamidgradient 6-7%; 5 h bei 150 V, 60°C); *1, 4, 7, 10* Originalkonzentration aus der 1.PCR, *2, 5, 8, 11* 1:10 Verdünnung, *3, 6, 9, 12* 1:100 Verdünnung

Im Vergleich zur Verbreitung der Gattung *Methylomonas* reflektiert das DGGE-Profil der Methylocystaceae eine weitaus geringere Diversität (Abb. 4.31). Drei der vier Proben, in denen Methylocystaceae nachgewiesen wurden, zeigen gar das gleiche DGGE-Profil. Die Banden sind eindeutig den Arten *Methylosinus sporium*, *Methylosinus trichosporium* (nicht dargestellt) und *Methylocystis parvus* zuzuorden. *Methylosinus sporium* wurde nur bei geringem Methangehalt, d. h. in einer oberen Bodenschicht des gering begasten Pflanzgefäßes detektiert. Um Einflüsse der präferentiellen Amplifikation während der PCR beurteilen zu können, wurden die PCR-Produkte nach der 1. PCR 1:10 und 1:100 verdünnt. Es ergab sich bei allen Verdünnungsstufen einer Probe das gleiche DGGE-Profil.

4.5 Sanierungsansatz

Das vorrangigste Ziel der Sanierung eines Erdgasschadens – abgesehen von der Reparatur der Leckage - besteht in der Anhebung des Sauerstoffgehaltes der Bodenluft. In dieser Arbeit wird der Ansatz verfolgt, die durch die Methanoxidation bedingte Sauerstoffzehrung zu unterbinden und nicht erst das entstandene Sauerstoffdefizit mit Sauerstoffeintrag in den Boden zu beheben.

Die Inhibierungssubstanzen sollten möglichst spezifisch wirken, bereits den ersten Schritt der Methanoxidation, die Oxidation des Methans zum Methanol hemmen, um eine Anreicherung von Methanol oder Formaldehyd im Boden zu verhindern und nicht persistent sein.

Als Inhibierungssubstanzen kamen die Nitrifikationshemmer Nitrapyrin und Dicyandiamid (DCD) und der Ureasehemmer NBTPT (N-(n-Butyl)-thiophosphortriamid) zum Einsatz. Die Nitrifikationshemmer sind Agrarhilfsstoffe, die oftmals mit Ammoniumdüngern ausgebracht werden, um die Umsetzung des Ammoniums zu Nitrat zu verzögern. Die Hemmung der Nitrifikation ist in der Toxizität für Ammonium-oxidierende Autotrophe der Gattung *Nitrosomonas* begründet. Diese Bakterien exprimieren eine Ammonium-Monooxygenase, die CH_4 als Substratanaloges zu Ammonium oxidieren kann. Ebenso kann auch die MMO Ammonium anstelle von Methan oxidieren. Die Ähnlichkeit beider Monooxygenase-Systeme ließ eine Beeinträchtigung der Methanoxidation durch Nitrifikationshemmer vermuten. Aus diesem Grund wurde Nitrapyrin ausgewählt. NBTPT ist ebenfalls bekannt für seine inhibierende Wirkung auf die Methanoxidation im Boden.

Die Hemmungsversuche wurden im Schüttelkolbenmaßstab mit dem Isolat GB 18 durchgeführt. Als Maß für die Inhibierung galt der verminderte Zuwachs an Biomasse über die Zeit. Selbst in höheren Konzentrationen (bis 400 mg/l) verringerte DCD das Wachstum nur geringfügig, die maximale Wachstumsrate wurde auf 78,5 % der Kontrolle gesenkt (Abb. 4.32).

Ein anderes Bild ergab sich beim Einsatz von NBTPT, hier konnte eine signifikante Inhibierung des Wachstums erreicht werden (Abb. 4.33). Bei den eingesetzten Konzentrationen zeigte sich eine deutliche Abhängigkeit der maximalen Wachstumsrate von der Konzentration an NBTPT. Je höher die NBTPT-Konzentration, desto geringer die maximale Wachstumsrate. Nitrapyrin vermochte das Wachstum des Isolates GB 18 noch stärker zu hemmen als NBTPT (Abb. 4.34). Bereits 3,3 mg/l reichten, das Wachstum der Methanotrophen zu unterbinden.

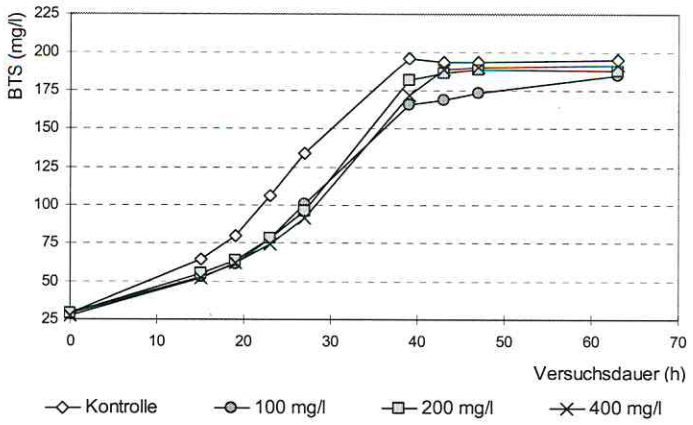


Abb. 4.32: Inhibierung des Wachstums des Stammes GB18 durch DCD

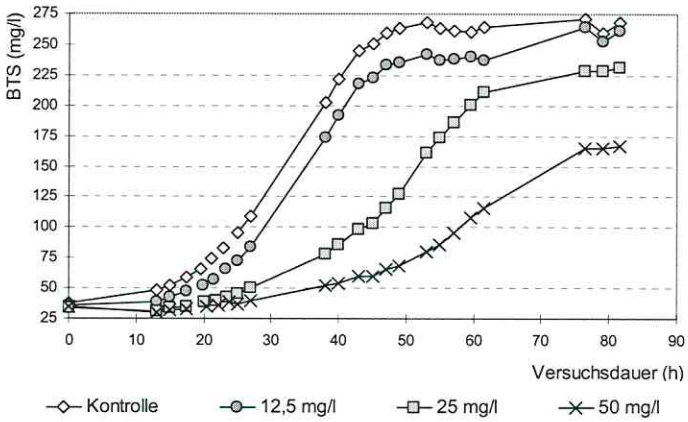


Abb. 4.33: Inhibierung des Wachstums des Stammes GB 18 durch NBTPT

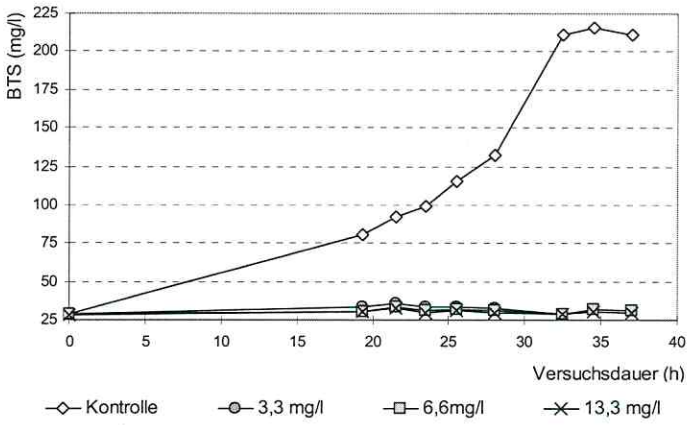


Abb. 4.34: Inhibierung des Wachstums des Stammes GB 18 durch Nitrapyrin

Die im Schüttelkolbenmaßstab durchgeführten Hemmversuche methanotropher Bakterien sollten in die Lysimeter übertragen werden. Hierzu fand eine Behandlung der mit 50 cm^3/min begasten Lysimeter an zwei Terminen in 7wöchigem Abstand mit den drei Verbindungen statt. Die Pflanzgefäße wurden mit jeweils 10 µg DCD/g, 5 µg NBTPT/g oder 5 µg Nitrapyrin/g Boden in wäßriger Lösung von oben beregnet.

In den Abb. 4.35 bis 4.37 ist der Sauerstoffgehalt in ausgewählten Lysimetern zwischen Juli und November 1999 dargestellt. Die Inhibierung der Methanoxidation konnte in drei verschiedenen Pflanzgefäßen durch einen Anstieg der Sauerstoffkonzentration gezeigt werden. Die Behandlung wirkte sich jedoch nur auf die Tiefenstufe 40 bis 70 cm aus, hier konnte zu beiden Behandlungszeitpunkten ein kurzfristig ansteigender Sauerstoffgehalt beobachtet werden. In der 70-100 cm Tiefenstufe konnte dieser Effekt nicht registriert werden. Durch die Beregnung von oben dringen die Nitrifikationshemmer möglicherweise nicht in diese Tiefe vor oder unterlagen bereits einem Abbau. In den unbehandelten Lysimetern (Abb. 4.38) ließ sich der Sauerstoffanstieg in dem Zeitraum nicht verzeichnen, so daß andere Ursachen des Sauerstoffanstiegs ausgeschlossen werden können.

Die ausbleibende Sauerstoffzehrung durch die methanotrophen Bakterien hielt etwa drei Wochen an. Die Fähigkeit zur Hemmung der Methanoxidation ging in der Reihe Nitrapyrin > NBTPT > DCD zurück. Der unterschiedliche Wirkungsgrad stimmt mit den Vorversuchen an Reinkulturen überein.

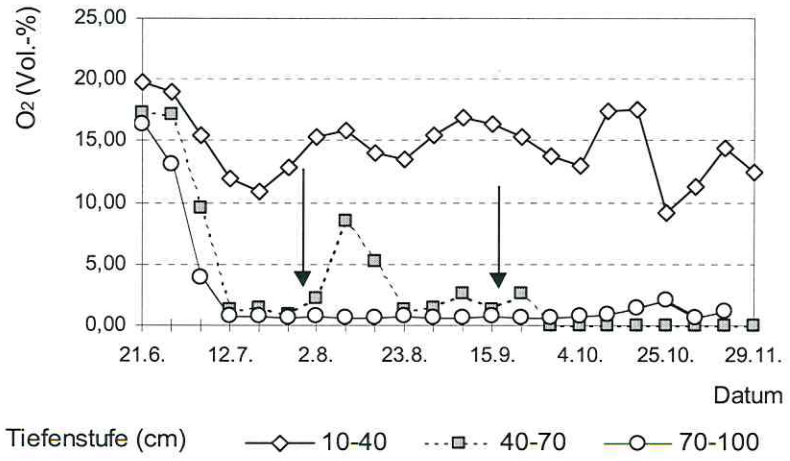


Abb. 4.35: Sauerstoffgehalt in einem mit 50 cm^3/min Erdgas begasten Pflanzgefäß während des Inhibierungsversuches der Methanoxidation (die Pfeile geben die Zeitpunkte der Applikation von 10 µg DCD/g Boden an)

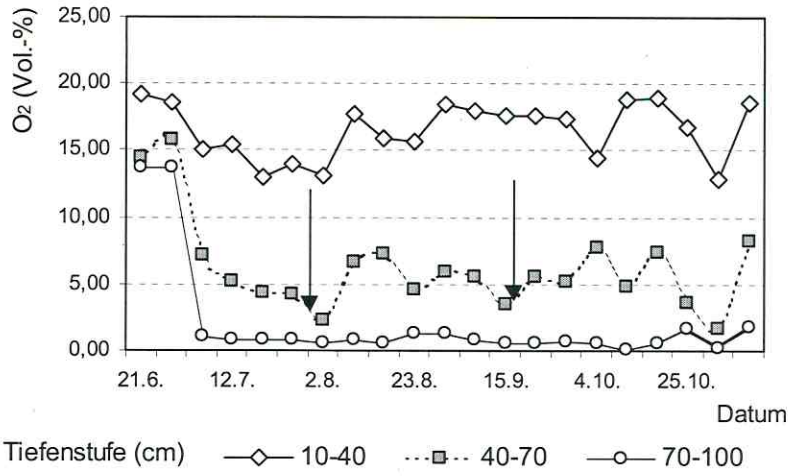


Abb. 4.36: Sauerstoffgehalt in einem mit 50 cm^3/min Erdgas begasten Pflanzgefäß während des Inhibierungsversuches der Methanoxidation (die Pfeile geben die Zeitpunkte der Applikation von 5 µg NBTPT/g Boden an)

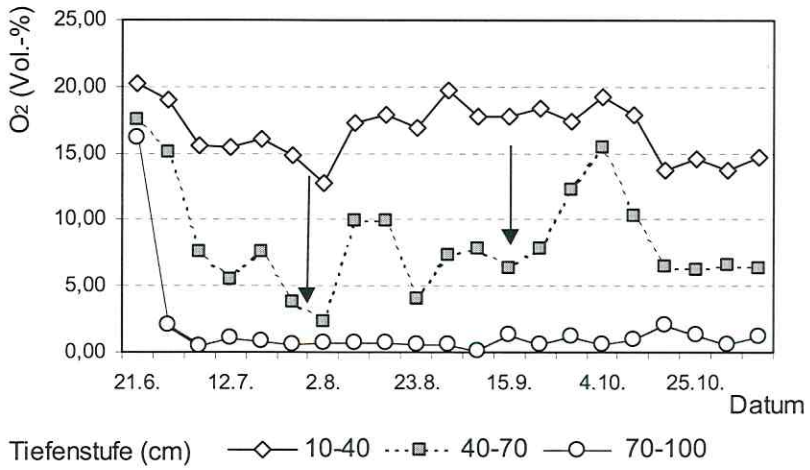
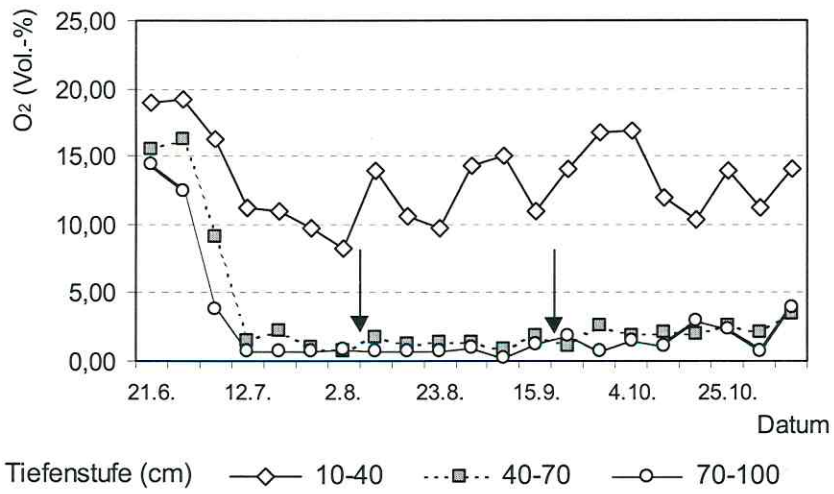


Abb. 4.37: Sauerstoffgehalt in einem mit 50 cm^3/min Erdgas begasten Pflanzgefäß während des Inhibierungsversuches der Methanoxidation (die Pfeile geben die Zeitpunkte der Applikation von 5 µg Nitrapyrin/g Boden an)



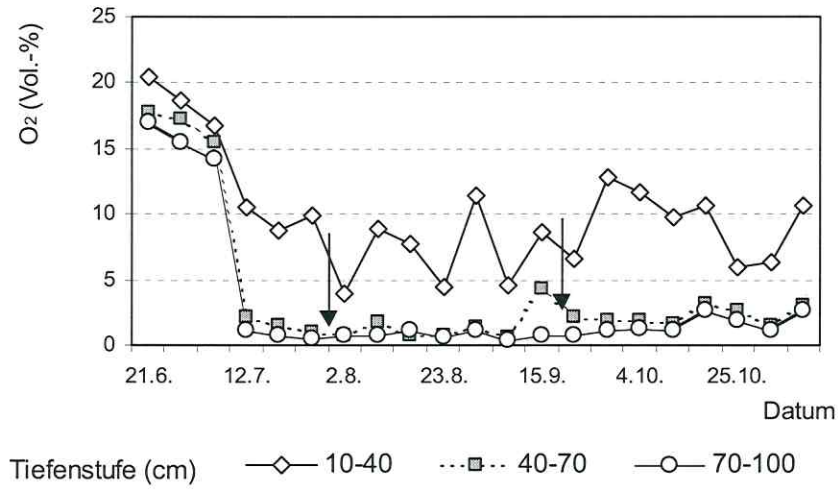


Abb. 4.38: Sauerstoffgehalt in zwei nicht mit Hemmstoffen behandelten Pflanzgefäßen während des Inhibierungsversuches der Methanoxidation (die Pfeile zeigen die Zeitpunkte der Applikation der behandelten Pflanzgefäße an), Begasung 50 cm^3/min

5 Diskussion

5.1 Einfluß des Erdgases auf bodenphysikalische, -chemische und -biologische Kenngrößen

Die wohl unmittelbarste Wirkung des Erdgases auf den Boden manifestiert sich in der nachhaltigen Veränderung der Gaszusammensetzung der Bodenluft. Das ausströmende Erdgas verdrängt einerseits den Bodensauerstoff, andererseits findet an den Grenzschichten, an denen Sauerstoff und Methan zusammentreffen, mikrobielle Methanoxidation unter Sauerstoffzehrung und Kohlendioxidfreisetzung statt (vgl. Abb. 1.1). So betrug die höchste in der Bodenluft eines Baumstandortes gemessene Methankonzentration 92,6 Vol.-%, die höchste Kohlendioxid-konzentration 18,8 Vol.-% und die niedrigste Sauerstoffkonzentration nahezu 0 Vol.-%. Adverse Effekte dieser extremen Gasverhältnisse auf die Pflanzen sind zwangsläufig, da Bäume für ein gesundes Wurzelwachstum einen Anteil von 15 Vol.-% (LANGHOFF 1971), 12-14 Vol.-% (ADAMSE et al. 1972, RUGE 1977), mindestens jedoch 10-13 Vol.-% (ASLANBOGA et al. 1979) Sauerstoff in der Bodenluft benötigen. Der Kohlendioxidgehalt sollte aufgrund seiner phytotoxischen Wirkung 3 Vol.-% (BALDER 1998) bzw. 5 Vol.-% (ASLANBOGA et al. 1979) nicht dauerhaft überschreiten.
Unter Berücksichtigung der geringen Sauerstofflöslichkeit von 8 mg O_2 /l (25°C) und eines Diffusionskoeffizienten von 2,6 x $10^{-5}cm^2s^{-1}$ (HOEKS 1972), ist der dem Baum tatsächlich zur Verfügung stehende Sauerstoff noch geringer, da er nur aus der Bodenlösung aufgenommen werden kann. Des weiteren konkurrieren die Wurzeln mit den Mikroorganismen in der Rhizosphäre um Sauerstoff, so daß der Verbrauch in der Rhizosphäre größer ist als im undurchwurzelten Boden. Über eine Schädigung der Mykorrhiza wirken sich Sauerstoffdefizite ebenfalls advers auf das Pflanzenwachstum aus. Durch die verminderte Wurzelrespiration wird der apikale Transport von Wasser und Nährstoffen behindert (LEH 1993). Hohe Kohlendioxidwerte im Straßenboden sind allerdings nicht zwingend auf die mikrobielle Methanoxidation zurückzuführen: Bei Fehlen von Methan in der Bodenluft und gleichzeitigem Vorhandensein erhöhter Kohlendioxidkonzentrationen ist zu differenzieren, ob das Kohlendioxid aus der Methanoxidation oder aber autochthon aus der Veratmung der bodenbürtigen organischen Substanz hervorgeht. So wiesen die Standorte L 2 und L 3 Isotopensignaturen des Kohlendioxides auf, die nicht auf eine Entstehung aus der mikrobiellen Methanoxidation schließen lassen (vgl. Tab.

4.7). Das idealisierte Gaskonzentrationsdiagramm von HOEKS (1972) ließ sich in den Straßenstandorten nicht wiederfinden, da Heterogenitäten des Substrates das typische Gastiefenprofil überlagerten. Inwieweit sich das Erdgas im Boden ausbreitet ist ferner von den Standortbedingungen wie Bodenversiegelung, Bodenart, meteorologischen Einflüssen etc. abhängig. So ließ sich im versiegelten Straßenboden noch Methan nachweisen, obwohl die Gasleitung bereits stillgelegt wurde (Standort L6 und L7). Des weiteren haben sandige Böden einen besseren Luftleitwert und bessere Gasaustauschkapazität als lehmige. Niederschläge verstärken den Sauerstoffmangel, da das Wasservolumen im Boden auf Kosten des Luftvolumens zunimmt (BRÖTZENBERGER & PASS 1987). Die Nachbildung eines Gaslecks in einem homogenen Substrat in Pflanzgefäßen erlaubte es, das typische Gasprofil um ein Leck zu reproduzieren. Die Größe der Gaszone war von der Erdgasmenge abhängig, in den mit 500 cm^3/min beaufschlagten Gefäßen war nur die Gaszone vorhanden, sie erstreckte sich demnach über mindestens 110 cm. Bei einer Beaufschlagung von 50 cm^3/min konnten sowohl Gaszone, Oxidationszone als auch normale Bodenluft in einem Pflanzgefäß vorgefunden werden. Sowohl die Bodenluftzusammensetzung in den Straßenstandorten als auch in den Pflanzgefäßen zeigten einen jahreszeitlichen Gang mit zunehmenden Kohlendioxid- und abnehmenden Sauerstoffwerten bei steigender Temperatur und umgekehrt. Im Winter wirkt sich ein Gasleck nicht derart gravierend negativ auf die Baumvitalität aus wie im Sommer, da die Temperaturen für die mikrobielle Aktivität und damit die Methanoxidation zu gering sind und auch die Wurzelrespiration kaum Sauerstoffzehrung hervorruft.

Im Zuge des verminderten Sauerstoffpartialdruckes treten grundlegende Milieuveränderungen auf, die Verschiebungen innerhalb des Kohlenstoff-, Stickstoff-, und Phosphor-Kreislaufes implizieren. Mit fallendem Redoxpotential tritt eine Kaskade von Redoxreaktionen ein (s. Tab. 5.1). Bei dem vorliegenden Sauerstoffmangel benutzen die Mikroorganismen alternative terminale Wasserstoffakzeptoren. Zuerst wird Nitrat von fakultativen Anaerobiern zu Ammonium reduziert, hierauf sind die erhöhten Ammonium- und erniedrigten Nitratwerte am Straßenstandort L4 und in den Pflanzgefäßen zurückzuführen. BLUME (1979) gibt ferner noch Ammoniumanreicherung infolge verhinderter Nitrifizierung an. Ebenfalls berichten SCHOLLENBERGER (1930), HARPER (1939), FUKUSHI et al. (1975) und BLUME (1979) von erhöhten Ammoniumwerten in erdgas,- bzw.

methanbeeinflußten Böden. Eine Erhöhung des Gesamtstickstoffes wie sie HARPER (1939) und FUKUSHI et al. (1975) beobachtet haben, konnnte nicht verzeichnet werden und wird auf die begrenzte Versuchsdauer zurückgeführt. Als mögliche Erklärungen für die Gesamt-Stickstoff-Anreicherung kommt zum einen die mikrobiologische N_2-Fixierung durch

Tab. 5.1: Sequenz gemessener Potentiale mikrobieller Redoxprozesse im Boden nach Wassersättigung (bei pH 7) (nach GISI 1997).

Redoxprozeß		E (V)	Sequenz
aerobe Atmung	$O_2 + 4\,H^+ + 4\,e^- \rightarrow 2\,H_2O$ O_2 nicht mehr nachweisbar	0,82	0
Denitrifikation	$NO_3^- + 2\,H^+ + 2\,e^- \rightarrow NO_2^- + H_2O$ NO_3^- nicht mehr nachweisbar	0,54	I
Manganreduktion	$MnO_2 + 4H^+ + 2\,e^- \rightarrow Mn^{2+} + 2\,H_2O$ Mn^{2+} nachweisbar	0,4	II
Eisenreduktion	$FeOOH + 3H^+ + 2\,e^- \rightarrow Fe^{2+} + 2\,H_2O$ Fe^{2+} nachweisbar	0,17	III
Sulfatreduktion	$SO_4^{2-} + 8\,H^+ + 4\,e^- \rightarrow S^{2-} + 4\,H_2O$ SO_4^{2-} nicht mehr nachweisbar	-0,16	IV
Wasserstoff- und Methanbildung	Wasserstoff- und Methanbildung	-0,41	V

Methanotrophe (DAVIS et al. 1964) oder Clostridien (HARPER 1939) in Frage; zum anderen werden Kationen wie Ammonium in den negativ geladenen tonmineralischen Zwischenschichten besser adsorbiert als Anionen (Nitrat). Pflanzen können zwar Stickstoff sowohl als Ammonium als auch als Nitrat aufnehmen, dennoch wirken sich hohe Ammoniumkonzentrationen negativ auf die Wurzelausbildung aus (FOY et al. 1978).

Die gravierendsten Veränderungen sind bei dem Redoxpaar Mn^{4+}/Mn^{2+} zu verzeichnen. Sowohl in den Straßenstandorten als auch in den begasten Pflanzgefäßen finden sich Konzentrationen an mobilem Mangan (vgl. Tab. 4.1 und Abb. 4.14), die die Werte unbegasten Bodens um das ca. 400 bzw. 100fache übersteigen und damit in einem phytotoxischen Bereich liegen; je nach Pflanzenart wirken sich zwischen 150 und 5000 mg Mangan/kg Trockensubstanz in der Pflanze toxisch aus (BERGMANN 1993). So halten auch FUKUSHI et al. (1975) den

Manganüberschuß für einen der schädigenden Faktoren. Nach RUGE (1977) treten ab einer Konzentration von 0,5% zweiwertigem Mangan am Gesamtmangan im Boden Schäden an den Wurzeln der Bäume auf, starke Schäden sind ab 5% zu verzeichnen.

Von hohen Konzentrationen austauschbaren Mangans berichten auch SCHOLLENBERGER (1930), HARPER (1939), ADAMS & ELLIS (1960),), FUKUSHI et al. (1975), KRÖGER (1975) und BLUME et al. (1979). KRÖGER (1975) wies nach, daß die Manganreduktion auf einer biologischen Reaktion beruht, da sie durch ein Bakterizid gehemmt werden konnte. Unter Stadtgaseinfluß hingegen wird das Mangan chemisch durch Schwefelwasserstoff reduziert; unter CO_2-Atmophäre konnte KRÖGER (1975) keine Reduktion nachweisen. Ebenso werden auch Eisen-III-oxide zu Eisen-II-verbindungen reduziert (KÜHNE & KÖSTER 1967, FUKUSHI et al. 1975, BLUME et al. 1979). ADAMS & ELLIS (1960) sehen im gestörten Fe^{2+}-Mn^{2+}-Verhältnis einen der wesentlichsten Faktoren für den schädlichen Einfluß auf das Pflanzenwachstum (soll 1,5:1 bzw. 2,5:1 sein).

Die Reduktion von Sulfat zu Sulfid führt zur charakteristischen schwarzen Färbung des Bodens durch Eisensulfide (LEH 1989, KRETZSCHMAR 1992). Durch die Analyse der Isotopensignatur des Methans stellten BREUSTE et al. (1998) sogar fest, daß an einem erdgasbeeinflußten Boden das Redoxpotential so weit gesunken sein mußte, daß Methanogenese eintrat.

Die Ergebnisse über pH-Wert-Veränderungen divergieren. Während weder in Straßenstandorten noch in den Pflanzgefäßen bedeutende pH-Wertänderung gemessen werden konnte, berichtet SCHOLLENBERGER (1930) von einem Anstieg, HARPER (1939) von einem Abfallen. Die Methanoxidation setzt Wasserstoffionen frei, während ein höherer Ammoniumgehalt zu einer verminderen H+-Ionenkonzentration führt (SCHOLLENBERGER 1930). In den Straßenboden verbrachte Bauschuttreste könnten mögliche Säureschübe neutralisieren. Eine pH-Wertänderung könnte auch mitverantwortlich für die bessere Pflanzenverfügbarkeit zuvor fest sorbierter Kationen/Nährstoffe wie Kalium und Phosphat sein, wie sie tendenziell in den Pflanzgefäßen zu verzeichnen war und BÜHLER (1992) bestätigt.

Von einer Austrocknung des Bodens durch Erdgas berichtet BRAY (1958), diese findet jedoch nur in den 10 cm um das Gasleck herum statt (HOEKS 1972). Durch die mikrobielle Methanoxidation entsteht vielmehr Wasser, welches wie festzustellen war, zu einer höheren Bodenfeuchte führt. BALKS & WEHRMANN-EBSTORF (1944) und

ADAMS & ELLIS (1960) verzeichneten einen leichten Anstieg der Wasserhaltekapazität, welches sich positiv auf den Boden auswirkt; die höhere Porenfüllung mit Wasser schränkt jedoch das Luftvolumen und die Luftleitfähigkeit ein (BLUME 1979).

Bei den Straßenstandorten zeichnete sich aufgrund der genannten Substratinhomogenitäten kein Zusammenhang zwischen der Bodenstruktur und dem Erdgaseinfluß ab, die anthropogene Überprägung sorgte für allgemein schlechte bodenphysikalische Eigenschaften dieser Standorte. In ausgewählten Pflanzgefäßen wurde die Aggregatstabilität als Maß für bodenphysikalische Veränderungen bestimmt. In begasten Pflanzgefäßen ließ sich eine leichte Tendenz zu steigender Aggregatstabilität in Abhängigkeit von der Begasung aufzeigen. ADAMS & ELLIS (1960) verzeichneten einen Anstieg des Gesamtporenvolumens und einen Abfall der Lagerungsdichte, im Gegensatz zu FUKUSHI et al. (1975), der ein geringfügig kleineres Porenvolumen feststellte.

In den begasten Pflanzgefäßen ist ein leicht erhöhter Gehalt an organischem Kohlenstoff festzustellen. Während der Methanoxidation werden 50% des Methans unter Kohlendioxidfreisetzung dissimiliert, die übrigen assimilierten 50% führen zu einer Zunahme der mikrobiellen Zellmasse (WENDLANDT 1979, ANTHONY 1986). Freigesetzte Metabolite und abgestorbene methanotrophe Biomasse, liefern neue C-Quellen für andere heterotrophe Bakterien. Der gestiegene Gehalt an leicht verfügbaren Kohlenstoffquellen äußert sich in einem erhöhten DOC-Wert, wie BREUSTE et al. (1998) an Straßenstandorten und in Pflanzgefäßen registrierten. Die These, daß während der Methanoxidation entstehende Metabolite wie Methanol, Formaldehyd und Ameisensäure, die ebenfalls den DOC erhöht haben könnten, für toxische Wirkungen auf die Wurzeln verantwortlich sind, kann nicht bestätigt werden. In Vorversuchen konnten in S4-Eluaten (DIN 38414-S4) des Bodens weder phytotoxische Wirkungen (getestet an *Lemna minor*) noch Metabolite mittels Ionenchromatographie nachgewiesen werden. Die hohe bis sehr hohe Mobilität dieser Metabolite im Boden legt dies nah. Methanol wird im Boden kaum oder nicht gebunden (koc <1). Die geschätzte abiotische und biologische Halbwertszeit beträgt ca. 2 Tage. Allgemein ist die Sorption von niederen Alkoholen, Aldehyden und Carbonsäuren im Boden sehr gering (BLUME 1992). Methanol bewirkt eine 2-3fache Zunahme der Wasserleitfähigkeit der Böden (ANDERSON et al. 1985). Der Abbau von

Formaldehyd im Boden erfolgt nach BERKOWITZ et al. (1981) innerhalb von 1 bis 4 Wochen.

Die Anzahl methanotropher und anderer aerober heterotropher Bakterien nimmt mit steigender Erdgasapplikation solange zu, bis eine Sauerstofflimitierung einsetzt. In Pflanzgefäßen nahm die Anzahl Methanotropher proportional zum Methangehalt bis zu 35 Vol.-% Methan zu. Bei MANCINELLI et al. (1981) und MANCINELLI & MCKAY (1985), die ebenfalls eine signifikante Korrelation zwischen dem Methangehalt und der Anzahl Methan- bzw. Methanoloxidierern feststellte, blieb die Zellzahl ab 50 Vol.-% Methan in der Bodenluft einer Mülldeponie konstant. ADAMSE et al. (1972) stellten aufgrund des im Erdgas enthaltenen Ethans und Propans auch eine Zunahme an Ethan- und Propanoxidierern fest, wobei die Zellzahlen dieser Gruppen schneller zunahmen als die Methanoxidierer, da sie nicht obligat auf diese Substrate angewiesen sind. Typ II Methanotrophe hingegen bilden bei Abwesenheit von Methan Dauerstadien in Form von Cysten und Exosporen aus, die nach einer lag-Phase bei Methananwesenheit auskeimen, so wurden auch in den Kontrollgefäßen zwischen $0{,}33*10^6$ und $1{,}9*10^6$ Zellen /g TG Boden gefunden.

Neben dem Anstieg der Zellzahlen der Kohlenwasserstoffoxidierer finden weitere Verschiebungen in der Zusammensetzung der Bodenmikrobiozönose statt, mit fallendem Sauerstoffgehalt werden zunehmend aerobe Arten durch fakultativ anaerobe ersetzt. HARPER (1939) fand in erdgasgeschädigtem Boden Arten wie *Clostridium sporogenes, C. bifermentans, C. butyricus.* Die unterschiedliche Zusammensetzung der Mikrobiozönose verschieden begaster Pflanzgefäße spiegelt das aufgenommene Substratverwertungsmuster wider.

Da der wesentlichste Unterschied zwischen einem Boden mit einem reinen Sauerstoffdefizit und einem methanbeeinflußten Boden (Methanosol) in der Bereitstellung einer Kohlenstoffquelle für spezialisierte Mikroorganismen in Form von Kohlenstoff in seiner reduziertesten Form liegt, ist das Vorkommen der Methanotrophen Gegenstand der Diskussion des folgenden Kapitels.

5.2 Methanotrophe Isolate aus erdgasbeeinflußten Straßenböden

5.2.1 Erdgasbeeinflußter Straßenboden als Habitat für Methanotrophe

Nachdem WHITTENBURY et al. (1970) mit der Isolierung von ungefähr 100 Isolaten den Grundstein für die Klassifikation methanotropher Bakterien gelegt hat, wurden in jüngerer Zeit Methanotrophe, die teilweise neuen Gattungen angehören, aus einer Reihe von verschiedenen terrestrischen Habitaten isoliert, so z. B. aus Tundren (OMELCHENKO et al. 1993), Torfmooren (DEDYSH et al. 2000) und Reisfeldern (GILBERT 1997, DIANOU & ADACHI 1999). Bei der Charakterisierung der methanotrophen Population von Böden standen bisher hauptsächlich natürliche Feuchtgebiete und agrarisch genutzte Böden (Reisfelder) im Vordergrund. Mit Ausnahme von wenigen Deponiestandorten (MANCINELLI & MCKAY 1985 nur koloniebildende Einheiten, MANDERNACK et al. 2000 nur PLFA, WISE et al.1999) und Mauerwerk (KUSSMAUL et al. 1998) liegen bislang keine Kenntnisse über die Besiedlung (Verteilung und Diversität) stark anthropogen geprägter Böden bzw. Substrate mit Methanotrophen vor. Hingegen wurde die Kinetik der Methanoxidation an solchen Standorten hinreichend untersucht (WHALEN et al. 1990, JONES & NEDWELL 1993, KIGHTLEY et al. 1995, LIPTAY et al. 1998). Erdgasbeeinflußte Straßenböden stellen ein heterogenes, stark anthropogen überprägtes Habitat dar, welches eine breite physiologische Amplitude der Organismen gegenüber den vorherrschenden Faktoren bedingt. Der hohe Grad an Bodenversiegelung und –verdichtung bedingt einen verringerten Gasaustausch mit der Atmosphäre, die vorliegenden Substrate reichen von gewachsenen Böden über geschüttete mit Bodenhilfsstoffen versetzte Böden bis hin zu Bauschutt. Einhergehend mit den unterschiedlichen Substraten fluktuieren auch der Gehalt an Nährstoffen, pH-Wert etc. So weisen mit Bauschutt versetzte Standorte alkalische pH-Werte auf, während ein in der gleichen Straße wie R und L1 bis L5 gelegener hier nicht näher untersuchter Standort einen pH-Wert von 4,4 aufwies (SCHULTE 1998). Des weiteren ist in Straßenböden von einer Belastung mit organischen Schadstoffen, Schwermetallen und Tausalz durch Straßenverkehr und Hausbrand auszugehen. Bei der Entstehung eines Lecks kann der Methangehalt im Boden kurzfristig stark ansteigen, bei Beseitigung der Leckage nimmt der Gehalt wieder ab. Da die Verfügbarkeit von Methan und Sauerstoff die bestimmenden Faktoren für die Verbreitung Methanotropher sind, liegt hierin der bedeutendste Unterschied zu quasi

natürlichen Habitaten mit konstant niedrigen Methangehalten wie Moor, Sumpf, oder Tundra.

5.2.2 Anpassungen der Isolate an das Habitat

Die aus erdgasbelasteten Straßenböden isolierten methanotrophen Bakterien weisen sich durch ihre Zellmorphologie mit Rosettenbildung bei GB 18 und Exosporenbildung bei GB 19, die periphere Anordnung der intracytoplasmatischen Membranen, die Fixierung von Formaldehyd über den Serinweg (nachgewiesen bei GB 18), die Dominanz von C18:1 Fettsäuren eindeutig als Typ II Methanotrophe aus, welches durch den molekularbiologischen Nachweis mit phylogenetischen Primern verifiziert wurde.

Hohe Fluktuationen der gasförmigen Substrate und fehlende Ausweichmöglichkeiten auf andere Substrate machen Überdauerungsmechanismen wie die bei GB 18 beobachteten Exosporen besonders für Methanotrophe notwendig. Exosporen werden am unbegeißelten Ende der Zelle abgeschnürt, kommen nur bei *Methylosinus trichosporium* vor und haben viele Eigenschaften mit den Endosporen der *Bacillus*-Arten gemeinsam, das Fehlen der Dipicolinsäure unterscheidet diese jedoch (WHITTENBURY et al. 1970b). Die Exosporen sind hitze- und trocknungsresistent, sie überleben mindestens 18 Monate im trockenen Zustand und ohne Methan und sind somit sehr gut an das Überdauern in trockenen und nährstoffarmen Habitaten adaptiert. Vegetative Zellen vertragen Substratmangel generell besser in Abwesenheit von Sauerstoff, so überlebte *Methylosinus trichosporium* OB3b in einer Studie von ROSLEV & KING (1994, 1995) bis zu 6 Wochen unter anoxischen Bedingungen und ohne Methan und fing wenige Stunden nach der Zugabe von Methan und Sauerstoff an, Methan zu oxidieren. Oxische Bedingungen hingegen rufen Biomasseverlust, morphologische Veränderungen und Verringerung der Überlebensfähigkeit hervor. Ein anaerober endogener Metabolismus sichert die Erhaltung der Lebensfähigkeit. Eine Anpassung an ungünstige Umweltbedingungen ist ebenfalls die Fähigkeit, PHB als Reservestoff zu bilden (ASENJO & SUK 1986, WANG & BAKKEN 1998) wie sie bei GB 18 und GB 20 beobachtet wurde.

Die bei GB 18 vorgefundene Glycocalyx könnte ebenfalls einen Schutz vor adversen Umweltbedingungen wie Austrocknung etc. darstellen (FASSEL & EDMISTON 1999),

andererseits könnte die Hüllschicht aus Glycoproteinen und Polysacchariden für die typische Rosettenbildung bei GB 18 notwendig sein.

Die im Elektronenmikroskop sichtbaren intracytoplasmatischen Membranen verlaufen in allen drei Organismen parallel zur Cytoplasmamembran. Die Ausbildung derart extensiver Lipidstrukturen ist ebenfalls von phototrophen (Purpurbakterien), nitrifizierenden und n-Alkan-verwertenden Bakterien bekannt. Da bei Wachstum auf kupferarmen Medien keine ICM ausgebildet werden, handelt es sich bei den Membranstrukturen nicht um eine Anpassung an die Verwertung eines gasförmigen Substrates wie von ANTHONY (1982) zuerst angenommen, sondern vielmehr um eine Assoziation der pMMO mit den Lipidstrukturen.

Die Stämme GB 18 und GB 19 weisen die höchste 16S rDNA-Genidentität mit *Methylosinus trichosporium* (99%), respektive *Methylosinus sporium* (98%) auf, die Artenzuordnung ist somit eindeutig, da Stämme von *Methylosinus trichosporium* eine 16S rDNA-Gensequenzidentität von >97% und Stämme von *Methylosinus sporium* von >96% aufweisen.

Die 16S rDNA-Sequenz von GB 20 stimmt zu 97% mit Methylocystis *parvus* (NCIMB 11129) überein.

Die hohen bootstrap-Werte, die GB 20 von validierten Methanotrophen Spezies trennen, könnten vermuten lassen, daß GB 20 und die keiner Spezies zugeordneten, von WISE et al. (1999) isolierten Stämme AML-A3, AML-A6, das unidentifiziertes α-Proteobacterium LR 1 (DUNFIELD et al. 1999) und der unkultivierte Klon LO13 (MORRIS et al. 2002) (vgl. Abb. 4.27), die zusammen ein Cluster bilden, einer von *Methylocystis parvus* und *echinoides* verschiedenen Art angehören. In seiner revidierten Taxonomie räumen BOWMAN et al. (1993) die Existenz von mehr als zwei *Methylocystis*-Arten ein. GALCHENKO et al. (1977) beschreiben mehr *Methylocystis*-Arten, die jedoch bisher nicht validiert wurden.

BOWMAN (1993) fand *Methylosinus* und *–cystis*-Arten in mit TCE kontaminiertem Grundwasser, eine Dominanz dieser beiden Gattungen konnte ebenfalls im überfluteten Reisfeldboden beobachtet werden (GILBERT 1997). Auch mit nicht-kultivierenden Verfahren wurden Typ II Methanotrophe in terrestrischen Habitaten nachgewiesen, z. B. mit einer Phospholipidanalyse borealen Torfbodens (SUNDH et al. 1995) oder mit 16S rRNA-Hybridisierung in Boden aus Alaska (BRUSSEAU et al. 1994). In aquatischen Habitaten dominiert Typ II in oligotrophen, Typ I in eutrophen Seen (Metalimnion) (BOWMAN 1993). Bisher ging man davon aus, daß der Besitz von

sMMO und Nitrogenase unter Cu- und N-limitierenden Bedingungen Typ II Methanotrophen Selektionsvorteile gegenüber Typ I verschaffte. Diese Annahme mußte in den letzten Jahren jedoch teilweise revidiert werden. Bei den Typ I Methanotrophen wie *Methylomonas* und *Methylomicrobium* konnte geringe sMMO-Aktivität nachgewiesen werden (KOH et al. 1993, SHIGEMATSU et al. 1999). AUMAN et al. (2001) konnten das nifH-Gen, welches für das Eisenprotein der Nitrogenase codiert, von 4 Stämmen Typ I Methanotropher amplifizieren, allerdings konnte nur bei einem Stamm eine deutliche Acetylen-Reduktion gemessen werden.

5.2.3 Anreicherungs- und Isolierungsstrategien

Trotz etablierter molekularökologischer Techniken bleiben die Kultivierungsmethoden für bestimmte, insbesondere autökologische, Fragestellungen unerläßlich. Zum einen beruht die Zuordnung von in der Umwelt gefundenen Gensequenzen auf einem Datenbanksystem, welches aus Isolaten aufgestellt wurde, zum anderen verlangt die biochemische und physiologische Charakterisierung Reinkulturen autochthoner Mikroorganismen des Systems. Besonders Untersuchungen zur Diversität von Methanotrophen sind allein mit molekularbiologischen Methoden problematisch, da diese in mindestens zwei monophyletischen Clustern innerhalb der α- und γ-Proteobacteria gruppieren. Die Methanotrophen können daher per se nicht mit einem einzigen 16S rDNA-Nachweissystem erfaßt werden (HORZ 2000). Ferner kann man mit den vorliegenden molekularbiologischen Methoden nicht zwischen den Typ II Methanotrophen Gattungen *Methylosinus* und *–cystis* differenzieren, da kein spezifischer Primer oder spezifische RNA-Sonde für diese Gattungen, sondern nur generell für Typ II, vorliegt (GULLEDGE et al. 2001).

Die beiden Gattungen unterscheiden sich zwar durch einige phänotypische Merkmale, wie Zellform und Dauerstadien, sind sich aber in ihren physiologischen, metabolischen und chemotaxonomischen Merkmalen sehr ähnlich (BOWMAN et al. 1993). 5- (BULYGINA et al. 1990) und 16S rRNA-Sequenzanalysen (BRATINA et al. 1992) zeigten, daß diese Gruppe ein distinktes und enges Cluster innerhalb der α-Proteobacteria bilden, welches von den anderen Serinweg-Methylotrophen getrennt ist. Mit Hilfe von Antikörpern und Immunofluoreszenzanalyse gelang VECHERSKAYA et al. (1993) eine getrennte in-situ-Detektion von verschiedenen *Methylosinus* und *Methylocystis* Arten.

Neben den bekannten Problemen der Kultivierung, wie unvollständige Extraktion der Bakterien aus dem Boden (LINDAHL & BAKKEN 1995) und einer Kultivierbarkeit zwischen 0,25% (Böden) und 15% (Klärschlamm) aller Bakterien (u. a. GIOVANNONI et al. 1990, WARD et al. 1990, AMANN 1995), sind die Methanotrophen eine schwer zu isolierende Bakteriengruppe. Obwohl das Bereitstellen von Methan als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle ein gutes Selektionskriterium zur Gewinnung methanotropher Reinkulturen sein sollte, stellt deren Isolierung eines der problematischsten Gebiete bei der Untersuchung dieser Bakteriengruppe dar (MANCINELLI et al. 1981, DIANOU & ADACHI 1999, Bowman 2000, RADAJEWSKI 2000, SVENNING et al. 2003).

So gelang es DEDYSH et al. erst 1998, die seit 1991 existierende acidophile methanotrophe Anreicherungskultur aus einem Torfmoor in Reinkultur zu isolieren, nachdem herkömmliche Anreicherungstechniken erfolglos waren (DEDYSH et al. 1998a, 2000). HOLMES et al. (1996) berichten von Schwierigkeiten, Methanotrophe aus marinen Umweltproben zu isolieren. Ein Verfahren ohne vorherige Anreicherung wurde kürzlich von SVENNING et al. (2003) beschrieben, es beinhaltet die direkte Isolierung Methanotropher auf Polycarbonatmembranen und die Verwendung unsteriler Bodensuspension als Puffer zur Eliminierung methanotropher Metabolite .

Zur besseren Simulierung der in situ Bedingungen wurden verschiedene Medien zur Anreicherung verwendet, die sich sowohl im Stickstoffgehalt und –quelle als auch in der Kupferkonzentration unterschieden, der Methangehalt während der Kultivierung wurde dem in situ-Gehalt angepaßt. Wider erwarten wirkten sich die Anreicherungsbedingungen nicht auf den angereicherten Organismus aus. Bei niedrigem Methangehalt und ausreichend Stickstoff- und Kupfer-Versorgung wie ihn das NMS-Medium bereitstellt, hätten sich Typ I Methanotrophe angereichert, sofern sie in der Bodenprobe in kultivierbarer Form vorhanden gewesen wären. Typ I Methanotrophe überwachsen Typ II Methanotrophe (GRAHAM et al. 1993) unter diesen Bedingungen, u. a. da der Ribulosemonophosphat-Weg der Formaldehyd-Fixierung mit 65-80% effizienter Umwandlung effektiver ist als der Serin-Weg mit 40-60% (ANTHONY 1982). Umgekehrte Anreicherungbedingungen mit Sauerstoff, Stickstoff und Kupfer als limitierende Faktoren werden zur gezielten Anreicherung von sMMO-positiven Typ II Methanotrophen verwendet, um diese für die Biodegradation einzusetzen (STAROSTINA 2000). AUMAN et al. (2000) fand ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen den Begasungsvarianten während der

Anreicherung und der isolierten Gattung, *Methylosinus*-Stämme ließen sich sowohl bei einem CH4/Luft-Verhältnis von 5:95 wie auch von 80:20 (vol/vol) finden.

Zur Anreicherung wurden definierte Medien ohne organische Zusätze benutzt, da heterotrophe Bakterien Methanotrophe in mit komplexen Nährstoffen supplementierten Medien schnell überwachsen. Diesen Isolierungen entgehen eventuell Populationen von Methanotrophen, die Vitamine oder andere Wachstumsfaktoren benötigen, so sind z. B. dem Medium für *Methylocella palustris* Vitamine zugesetzt (DEDYSH et al. 1998b). Das Wachstum von einigen Typ I Methanotrophen wird auch von Zuckern, z. B. Glucose stimuliert (Zhao & Hanson 1984).

Die bessere Simulation der in situ-Bedingungen bezieht sich nur auf die abiotische Umwelt, Wechselwirkungen mit anderen (Mikro-)Organismen können jedoch für eine Lebensfähigkeit unabdingbar sein. HOLMES et al. (1996) konstatierten bei ihrer marinen Anreicherungskultur komplexe Wachstumsbedingungen, die nur durch die enge Assoziation (Syntrophismus) mit einem unidentifizierten heterotrophen Bakterium, nicht aber durch die Zugabe von Hefeextrakt oder Vitaminen erfüllt werden konnten. Die Zellen überleben in Mischkulturen besser als in Reinkulturen (HEYER 1984). Ein Grund dafür ist die Eliminierung toxischer Stoffwechselprodukte, so scheiden während des Wachstums auf Methan einige Methanotrophe Methanol und organische Abfallprodukte aus, die durch die in einem Konsortium enthaltenen Heterotrophen weiter verstoffwechselt werden (u. a. PATT et al. 1974). Solche Konsortien sind u. a. von biotechnologischem Interesse, da sie ein besseres Wachstum der methanotrophen Komponente gewährleisten und über einen langen Zeitraum auch unter unsterilen Bedinungen stabil sind (HELM 2002).

Zu den Hauptkomponenten der Begleitflora gehören einerseits Methanol verwertende Mikroorganismen, wie z. B. *Hyphomicrobium,* das in einigen Anreicherungen beobachtet wurde. Andererseits wird durch die Verschleppung geringer Konzentrationen organischer Substanzen mit der Verdünnung der Bodensuspension ein Wachstum oligocarbophiler Bakterien ermöglicht. Laut ESCOFFIER et al. (1997) erlaubt schon das NMS-Medium Wachstum von Nicht-Methanotrophen, Aktinomyceten und Pilzen.

Die Problematik Reinkulturen zu erzielen bzw. zu erhalten und Verunreinigungen zu Identifizieren, veranschaulicht eine Arbeit von ELLER (2000). Sie hat sowohl in der institutseigenen als auch in offiziellen Stammsammlungen „sehr kleine Stäbchen" als

hartnäckige Verunreinigung vorgefunden. So befinden sich teilweise ungenügend aufgereinigte Stämme in Stammsammlungen, bei denen die Verunreinigungen nicht erst nachträglich eingeschleppt wurden (ELLER 2000). Reinheitskontrollen nicht nur auf reichem Nähragar, sondern R2A und $NMS_{oligocarbophil}$-Agar und mikroskopische Beurteilungen sollten dieses Problem vermeiden. Eine erfolgreiche Eliminierung der Begleitflora wurde durch auf den jeweiligen methanotrophen Organismus abgestimmte Methoden erzielt. Für Exosporenbildner wie *Methylosinus sporium* GB 19 ist die Anzucht aus Exosporen Methode der Wahl, da bei der Hitzebehandlung alle vegetativen Zellen abgetötet werden. Die Größenunterschiede zwischen Methanotrophen und Begleitflora ergaben gute Ansätze zur Trennung beider Gruppen. So wurde- wenn auch keine Reinkultur gewonnen werden konnte- der Anteil Methanotropher in der Kultur durch Filtration deutlich erhöht. Die Zellen von GB 20 waren zu klein für eine Abtrennung mittels Filtration , sie ließen sich am besten durch die Unterschiede in der Zellhydrophobie trennen. *Methylocystis*-Stämme zeichnen sich durch eine hohe Hydrophobie der Zelloberfläche aus, dies ermöglicht eine Separation von den hydrophilen Typ I Methanotrophen (STAROSTINA et al. 1997). In der vorliegenden Arbeit konnten jedoch auch die Heterotrophen erfolgreich abgetrennt werden. Die hohe Hydrophobie steht im Zusammenhang mit der Kohlenwasserstoff-Verwertung dieser Bakterien sowohl mit dem Substrat Methan als auch mit der cometabolischen Umsetzung einer Reihe von hydrophoben Verbindungen (KENNEDY et al. 1975).

Eine weitere Methode Typ II gegenüber Typ I anzureichern ist die Anwendung lytischer Pseudomonaden, Typ I (Peptidoglykanschicht 20-30Å) reagiert wesentlich empfindlicher, während Typ II (70-150Å) resistent gegenüber den lytischen Enzymen ist (STAROSTINA et al. 1992).

Die größte Gewißheit, daß eine Kultur von einer einzelnen Zelle abstammt, erhält man mit der Methode der Mikromanipulation. Sie erlaubt die Separation einer einzelnen bakteriellen Zelle mit einer dünnen Kapillare unter mikroskopischer Kontrolle und ist damit Durchflußzytometrie und Coulter-Counter überlegen, bei denen auch Zellaggregate isoliert werden (FRÖHLICH & KÖNIG 2000).

GB 18 wurde mittels Mikromanipulation gewonnen, aufgrund seiner Zellform war dieser Stamm für diese Methode prädestiniert. Der sog. "Vereinsamungseffekt" (HENGSTMANN 1997) oder auch „quorum-sensing effect" (HOLDEN et al. 1999) gereicht dieser Methode jedoch zum Nachteil. Aus noch nicht vollständig geklärten Gründen

wachsen einzelne Zellen oftmals nicht an, ein Transferieren in geringes Volumen frischen Kulturüberstandes hat jedoch einen stimulierenden Effekt. Kommunikation zwischen den Zellen über Signalmoleküle wie langkettige Fettsäureester oder N-Acetylhomoserin-Lactone scheinen hierbei eine Rolle zu spielen (HOLDEN et al. 1999). Eine Weiterentwicklung der Mikromanipulation stellt die „optische Pinzette" dar. ASHKIN et al. (1987, ASHKIN & DZIEDZIC 1987) gelang es, einzelne Bakterien- bzw. Hefezellen in einem stark fokussierten Laserstrahl eines Lasermikroskopes festzuhalten, wobei sich die Zellen noch teilten. HUBER et al. (1995) entwickleten hieraus ein gezieltes Einzellzell-Kultivierungssystem zur Isolierung Hyperthermophiler.

Im Gegensatz zum klassischen Ausplattieren auf Agarplatten bietet die Mikromanipulation die Möglichkeit, die einzelne Zelle in Flüssigmedium zu überführen, welche für Bakterien mit geringer Koloniebildungsfähigkeit, wie oftmals von Methanotrophen berichtet wird (LEES et al. 1991, BOWMAN et al. 1993, 1997, BODROSSY et al. 1999), von Vorteil ist. Eine geringe Fähigkeit auf festen Medien zu wachsen, wurde besonders auf Gelrite, Silicagel und Nobelagar verzeichnet, die aufgrund ihrer geringen Verunreinigung mit organischen Substanzen Anwendung fanden.

5.3 Molekularbiologische Charakterisierung der methanotrophen Lebensgemeinschaft in Pflanzgefäßen

Angesichts der in Kapitel 5.2 diskutierten Schwierigkeiten bei der Isolierung methanotropher Bakterien, sollte die methanotrophe Population erdgasbeeinflußten Bodens vergleichend mit nicht-kultivierenden Verfahren untersucht werden.

Zwei aus Umweltproben extrahierbare Biomarker bieten sich zur Analyse der methanotrophen Population an. Die den methanotrophen charakteristischen Fettsäuren C16:1ω7 bzw. C16:1ω7 und C18:1ω7 bzw. C18:1ω8 (NICHOLS et al. 1985, 1987, GUCKERT et al. 1991) wurden zur quantitativen Beurteilung des Verhältnisses Typ I/Typ II von MANDERNACK et al. (2000) und SUNDH et al. (1995, 2000) herangezogen. Die größte Bedeutung zur Beschreibung der Biodiversität mikrobieller Gemeinschaften haben jedoch Nukleinsäuren, insbesondere die 16S rDNA, gewonnen. Um jedoch nicht nur phylogenetische Beziehungen aufzeigen zu können, sondern auch die funktionelle Diversität zu beschreiben, wurden Primer

entwickelt, die folgende Strukturgene methanotropher Schlüsselenzyme amplifizieren:

-mmoX.....codiert für die α-Untereinheit der sMMO.....McDonald et al. 1995

-pmoA.....codiert für die α-Untereinheit der pMMO.....Holmes et al. 1995, Cheng et al. 1999

-mxaF.....codiert für die α-Untereinheit der Methanol-Deydrogenase.....McDonald & Murrell 1997.

Die Analyse erfolgt mittels PCR (z. B. Costello & Lidstrom 1999), real-time PCR (Kolb et al. 2003, Seghers et al. 2005), PCR-DGGE (Bodelier et al. 2005, Henckel et al. 1999, 2001, Horz et al. 2001), PCR-T-RFLP (Horz et al. 2001, 2005, Pester et al. 2004) oder/und anschließender Sequenzierung (z. B. Bodrossy et al. 1997) .

Mit Hilfe dieses Instrumentariums wurden in Habitaten wie z. B. Seesedimenten (Costello & Lidstrom 1999, Aumann et al. 2000), Waldböden (Henckel et al. 2000, Jensen et al. 2000), Reisfeldern (Henckel et al. 1999, 2001, Horz et al. 2001) und Torfmooren (McDonald et al. 1996, McDonald & Murrell 1997) methanotrophe Populationen charakterisiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Gesamt-DNA aus dem Boden mittels direkter Lyse, d. h. in Gegenwart der Matrix extrahiert; diesem Verfahren wurde gegenüber der indirekten Lyse mit vorausgehender Zellextraktion der Vorzug gegeben, da es effizienter ist und auch stärker an Bodenpartikel anhaftende Mikroorganismen erfaßt. Dies trifft auf Methanoxidierer zu, sofern sie niedrigen Methankonzentrationen ausgesetzt sind, die ihr Wachstum limitieren (Priemé et al. 1996).

Die Lysebedingungen stellen einen kritischen Schritt in der direkten DNA-Extraktion dar. Auf der einen Seite müssen die Bedingungen scharf genug sein um eine maximale Ausbeute zu erzielen, auf der anderen Seite sollten die Scherkräfte, die auf die DNA einwirken, minimiert werden (Erb & Wagner-Döbler 1993, Miller et al. 1999). Die Detektionsgrenze der nachfolgenden PCR hängt stark vom Fragmentierungsgrad der DNA ab.

Es wurden bis zu 14,78 µg DNA/g Bodenfrischgewicht gewonnen, dieser Wert liegt in der in der Literatur angegebenen Größenordnung für Böden (z. B. 11,7-23,7 µg DNA/g Boden Tebbe & Vahjen 1993; 12±4 µg DNA/ g Boden Tsai & Olsen 1991; 4,6-33 µg DNA/g Boden Berthelet et al. 1996). Die bei der direkten Extraktion erfolgende Coextraktion von Huminstoffen machte eine Aufreinigung des DNA-Extraktes notwendig, da bereits weniger als 0,1 µg Huminsäure/ml im PCR-Ansatz

die Taq-Polymerase inhibieren können (TSAI & OLSEN 1992); dies kann mit der hohen Kapazität von Fulvosäuren, Ca^{2+} und Mg^{2+}-Ionen zu komplexieren, erklärt werden.
Mit Hilfe phylogenetischer Primer sollte die Verteilung der verschiedenen Gattungen Methanotropher in unterschiedlichen Tiefen erdgasbeeinflußten Bodens bestimmt werden. Anhand dieser Methode wurde eine höhere methanotrophe Diversität im Vergleich zu kultivierenden Verfahren festgestellt. Aus dem Standort L4 wurde nur *Methylosinus sporium* isoliert, während *Methylomonas, Methylococcus* und *Methylosinus /-cystis* mit entsprechenden Primern nachgewiesen werden konnten.
Der molekularbiologische Nachweis methanotropher Bakterien läßt sich als Indikator nicht nur für aktuelle Methanausgasungen, sondern auch für vormalige verwenden. Am Standort L 5 war kein Methan mehr in der Bodenluft zu messen, die Gattung *Methylosinus /-cystis* war jedoch noch nachzuweisen. Hierbei ist zu beachten, daß mit der direkten DNA-Extraktion auch Dauerstadien Typ II Methanotropher erfaßt wurden. Ein noch sensitiverer Indikator stellt die Isotopensignatur dar, an dem Standort L 1 wies der $\delta^{13}C$-Wert des CO_2 auf Methanoxidation hin, obwohl weder Methanotrophe noch Methan mehr nachzuweisen waren.
Die über ein Jahr andauernde Erdgasapplikation hat den atmosphärischen Methangehalt im Versuchsgelände soweit angehoben, daß sich methanotrophes Wachstum offenbar auch in den Kontrollgefäßen etablieren konnte. Das nicht oxidierte Methan der hoch begasten Gefäße entwich nach oben ins Gelände.
Laut HENCKEL et al. (2001) reichen bereits 1000 ppmv Methan für eine Ausbreitung von Typ I aus. Bei über 7000 ppm fanden BENDER & CONRAD (1995) eine Zunahme der Zellzahl Methanotropher. Diese niedrigen Methankonzentrationen wurden mit dem Deponiegasmonitor nicht erfaßt (Meßgenauigkeit ±0,5 Vol.-% zwischen 0 und 5 Vol.-%). Die unbepflanzten Gefäße wurden von Methylomonaden besiedelt, wie sich in der PCR herausstellte. Die DGGE belegte jedoch, daß diese nicht von der Typspezies *Methylomonas methanica* gestellt werden. Die Verbreitung von *Methylomonas methanica* beschränkt sich hingegen auf die mittleren Methangehalte der oberen bzw. mittleren Tiefenstufen des hoch bzw. niedrig begasten Pflanzgefäßes. Die positiven Befunde im unbehandelten Pflanzcontainer könnten außer auf das Vorkommen von *M. fodinarum* und *M. aurantiaca* ebenfalls auf primer mismatches zurückzuführen sein. Die Sequenzierung ausgewählter DGGE-Banden hätte hier näheren Aufschluß gegeben, das Ausschneiden und Reamplifizieren der

Banden lieferte jedoch erneut das ursprüngliche Bandenmuster, so daß eine Sequenzierung nicht verfolgt wurde.

Auch in den Pflanzgefäßen besteht eine Diskrepanz zwischen der Gattungszusammensetzung, die mit kultivierenden Verfahren bestimmt wurde und der, die mit molekularbiologischen Methoden ermittelt wurde. Typ I scheint stärker vertreten, als es laut Kultivierung den Anschein hat. Eine Favorisierung des Wachstums von Typ II Methanotrophen der Methylosinus/-cystis-Gruppe durch Kultivierungsmethoden stellten BUSSMANN et al. (2004) sogar bei Verwendung eines adaptierten Mediums fest.

Die gleichmäßig konstante Begasung von 50 cm^3/min ohne Nährstofflimitationen dürften tatsächlich Typ I Methanotrophe begünstigt haben. Typ I dominiert dort, wo schnelles Wachstum methanoxidierender Bakterien ermöglicht wird, während Typ II dort abundanter ist, wo die Wachstumsraten periodisch durch Nährstoffmangel begrenzt sind (HANSON & HANSON 1996). In Torfmoorböden detektierten VECHERSKAYA et al. (1993) mit Immunfluoreszenzanalyse 61,6% Typ I, aber nur 38,4 % Typ II, wobei *Methylobacter* dominierte, gefolgt von *Methylomonas* und *Methylocystis*.

Nach einem Jahr zeigte sich in den Pflanzgefäßen eine abnehmende Diversität mit einer Dominanz der Gattung *Methylomonas*. Von einer höheren Dynamik von Typ I z. B. bei wechselnden CH_4/O_2 Verhältnissen oder Drainage im Reisfeld berichteten auch HENCKEL et al. (2000).

Bei Typ I Methanotrophen geht, den r-Strategen vergleichbar, die schnelle Vermehrung bei günstigen Umweltbedingungen auf Kosten der Überlebenschancen bei adversen Lebensbedingungen. Während Typ II langsamer wächst und, wie K-Strategen, bessere Überlebensmechanismen, z. B. Dauerstadien, N_2-Fixierung bei mikroaerophilen N-limitierten Bedingungen besitzt (VECHERSKAYA et al. 1993). Der Nachweis von Typ II bei abgestelltem Gasleck bestätigt diese Annahme.

Die Anpassung der beiden Typen an unterschiedliche Umweltbedingungen veranschaulichen AMARAL et al. (1995) und AMARAL & KNOWLES (1995) in ihren Sauerstoff-Methan-Gradientenversuchen. Sie fanden eine Etablierung von Banden mikrobiellen Wachstums bei bestimmten Methan/Sauerstoffmischungsverhältnissen. Wie sich mit Hilfe von FISH-Sonden herausstellte, bestand die Bande bei einem O_2/CH_4-Mischungsverhältnis zwischen 1,57 und 1,97 aus Typ I Methanotrophen, während sich die Bande bei hohen Methankonzentrationen und nur Spuren von

Sauerstoff (<0,5%) aus Typ II Methanotrophen zusammensetzte. Insofern verwundert das Vorkommen von Typ I bei der hohen Begasungsmenge von 500 cm^3/min. Der Konkurrenzvorteil von Typ II bei hohen Methangehalten (GRAHAM et al. 1993), läßt sich zum Teil durch den unterschiedlichen Sauerstoffbedarf der sMMO und pMMO erklären, der K_m-Wert des Enzyms beträgt 17 µm respektive 0,1 µm. Dieser Unterschied legt nahe, daß sMMO exprimierende Organismen, wie Typ II und X, unter geringer Sauerstoffspannung erfolgreicher um Methan konkurrieren können. Widersprüchlich war insbesondere das Vorkommen der Methylocystaceae.

Speziell bei hohen Methangehalten liegt eine mangelnde Detektion der Gruppe *Methylosinus/cystis* mit der PCR vor, sowohl in Anreicherungskulturen als auch in der mikroskopischen Bewertung von MPNs wurde diese Gruppe verstärkt gefunden. Durch die im Zuge der Begasung erfolgten bodenchemischen Veränderungen ist eine höhere Konzentration von PCR-Inhibitoren in diesen DNA-Extrakten im Vergleich zu unbegastem Boden denkbar. So wurde zwar die Gesamt-DNA-Konzentration gemessen, diese kann sich jedoch von der Menge amplifizierbarer Nukleinsäuren unterscheiden. Eine Unterrepräsentation mit gattungsspezifischen Primern stellten auch COSTELLO & LIDSTROM (1999) mit den Primern Mm 1007r und Ms 1020r fest. Sie isolierten ebenso wie PACHECO-OLIVER et al. (2002) Reinkulturen von *Methylocystaceae*, konnten diese aber nicht in situ nachweisen. Sie führten die Probleme auf die geringe Sequenzdatenbasis zurück, auf der diese Primer entwickelt wurden. Erfolgreich waren sie hingegen mit Mb 1007r und Mc 1005r. Ein breiteres Spektrum an *Methylosinus/-cystis*-Sequenzen amplifiziert der Primer Typ2b, da er aber ebenso Sequenzen von z. B. *Methylobacterium* amplifiziert (PACHECO-OLIVER et al. 2002), wurde er in der vorliegenden Arbeit nicht verwendet. Bei Isolaten funktionieren beide *Methylosinus/-cystis*-Primer, dies bestätigt die Vermutung, daß die fehlende Amplifikation bei Benutzung des Ms1020 Primers auf ungenügend Ziel-DNA zurückzuführen ist. So gelang der Nachweis von *Methylosinus/-cystis* mit dem Ms 1020r Primer in der Probe mit der höchsten extrahierten DNA-Konzentration (127 ng im PCR-Ansatz).

Einen weiteren alternativen Primer entwickelten BRUSSEAU et al. (1994), MB9α amplifiziert die partielle 16S rDNA methylotropher α-Proteobacteria und erfaßt somit auch nicht methanoxidierende Serinweg-Methylotrophe.

Die verwendeten gattungsspezifischen Primer wurden anhand der jeweiligen Typspezies überprüft. Das Primerpaar f27 r Mb 1007 amplifizierte keine 16S rDNA

des Stammes *Methylobacter luteus* 53v (NCIMB 11914). Die generelle Funktion des Primerpaares wurde mit einer Anreicherungskultur getestet, es wurde ein PCR-Produkt der erwarteten Größe erhalten wurde. HOLMES et al. (1995) verwendeten den Primer Mb1007r mit dem Kontrollorganismus *Methylobacter albus* BG8, diese Art wurde von BOWMAN et al. (1995) jedoch reklassifiziert und gehört der Gattung *Methylomicrobium* an. Diese Gattung unterscheidet sich durch das Fehlen von Cysten, ein anderes Fettsäuremuster und 5S rDNA-Analyse deutlich von der Gattung *Methylobacter*, so daß der verwendete Primer spezifisch für die Gattung *Methylomicrobium* und nicht *Methylobacter* ist.

Neben diesen Problemen wie Primerunspezifitäten und Reklassifikationen der Kontrollorganismen birgt der Amplifikationsprozeß von 16S rDNA-Gemischen, wie sie komplexe Umweltproben darstellen, während der PCR einige Fehler (SUZUKI & GIOVANNONI 1996), z. B. präferentielle Amplifikation, die Bildung chimärer DNA und Heteroduplex-Moleküle (OLSEN et al. 1986, PACE et al. 1986, WANG & WANG 1996, V. WINTZINGERODE et al. 1997).

Einige Gene können präferentiell amplifiziert werden, so daß die Häufigkeit einer Sequenz in einer 16S rDNA-Bibliothek nicht die relative Abundanz in der mikrobiellen Gemeinschaft reflektiert (REYSENBACH et al. 1992). Chimäre oder rekombinante Moleküle werden bei einer PCR-Amplifikation eines DNA-Gemisches verschiedener Arten mit ähnlicher Sequenz generiert. Nicht vollständig vervielfältigte, komplementäre Sequenzen zweier verschiedener Species hybridisieren miteinander und bilden einen Doppelstrang, der sich aus den Sequenzen zweier verschiedener Arten zusammensetzt (KOPCZYNSKI et al. 1994, LIESACK et al. 1991, QIU et al. 2001).

Die Unstimmigkeiten mit den Primern Ms1020 und Mm1007 ergaben Anlaß zur genaueren Analyse der Diversitätsstruktur und Verteilung dieser beiden Gattungen in den Pflanzgefäßen. Mit Hilfe der DGGE sollte eine schnelle Einschätzung der Verteilung amplifizierbarer Sequenztypen vorgenommen werden (FERRIS et al. 1996). Die DGGE beruht auf der Auftrennung von DNA-Fragmenten gleicher Länge aber unterschiedlicher Sequenz aufgrund des unterschiedlichen Schmelzverhaltens während der Denaturierung des Doppelstranges. Die Trennung des DNA-Doppelstranges erfolgt bei ansteigendem Denaturierungsgradienten zunächst partiell in sogenannten "Schmelzdomänen". Dieses partielle Aufschmelzen führt zu einer starken Retardierung des gesamten DNA-Fragmentes während der elektrophoretischen Auftrennung in einem Polyacrylamidgel (ESCHWEILER 1999).

Die DGGE wird seit 1979 in der medizinischen Anwendung zur Detektion von Punktmutationen verwendet (FISCHER & LERMAN 1979, 1983), 1989 verbesserte SHEFFIELD die Auflösung der DGGE durch Einführung eines GC-clamps.
MUYZER et al. (1993) etablierte die DGGE für die Anwendung in der molekularen Ökologie zur Untersuchung mikrobieller Populationsstrukturen. Theoretisch können PCR-Fragmente mit bis zu einem Basenunterschied in der DGE differenziert werden (MUYZER et al. 1993, HEUER et al. 1997, MUYZER & SMALLA 1998), dies ermöglicht einen Diversitätsvergleich auf Sequenzebene einer großen Anzahl an Umweltproben ohne eine aufwendige Sequenzierung.
Als methodische Schwierigkeit stellt sich das zu geringe Auflösungsvermögen des DGGE-Gels dar, welches mit Anlegen eines Doppelgradienten aus denaturierendem und Acrylamidgradient gelöst werden konnte. Die Auflösung des Gels kann ferner durch ssDNA, Proteine und unvollständig vervielfältigte DNA oder GC-Klammer beeinträchtigt werden (MUYZER et al. 1993, ESCHWEILER 1999).
VALLAEYS et al. (1997) vermochten die PCR-Podukte methanotropher Bakterien trotz Sequenzunterschieden nicht in der DGGE voneinander zu trennen.
Die Analyse der methanotrophen Population mit Hilfe der DGGE erlaubte eine Differenzierung von *Methylosinus* und *Methylocystis*.
Das Auftreten von Doppelbanden bei Reinkulturen wird auch von FÜHR et al. (1996) und SMALLA et al. (1998) beschrieben und auf Mikroheterogenitäten zurückgeführt. So können im Genom eines Stammes mehrere Kopien der 16S rDNA vorhanden sein (KISS et al. 1977, GREEN et al. 1985, SMITH et al. 1987, ITAYA & TANAKA 1991), deren DNA Sequenz sich in einigen Positionen unterscheidet (STOLYAR et al. 1999 und GILBERT et al. 2000 fanden ebenfalls mehrere Operone der pMMO. Die Sequenzidentität liegt bei E. coli zwischen 98,8 und 100 % (MAIDAK et al. 1997, 1999). Mehrere Banden von Reinkulturen bei der DGGE-Analyse wurden von GARCIA-PICHEL et al. (1996), KOWALCHUK et al. (1997) und ROSADO et al. (1998) und ESCHWEILER 1999 gefunden. Umgekehrt kann es zu weniger Banden als Stämmen kommen, da die PCR Produkte naher verwandter Arten aufgrund von Sequenzähnlichkeiten identische elektrophoretische Eigenschaften aufweisen können.

5.4 Sanierung erdgasbeeinflußter Straßenböden

Zweifellos ist die Erneuerung aller alten bzw. defekten Gasleitungen, nicht zuletzt als präventive Maßnahme, die Sanierungsmethode der Wahl. Die in Kap. 4.1 und 4.2 dargestellten in erster Linie bodenchemischen Veränderungen legen die Notwendigkeit einer umgehenden Sanierung eines Erdgasschadens dar. Die Abdichtung des aufgespürten Lecks gilt als erste und wichtigste Maßnahme (NOÉ et al. 1995a). Angaben einer britischen Studie belegen jedoch, daß es bei der derzeitigen Erneuerungsrate alter Rohrleitungen in Großbritannien allein 50 Jahre dauern würde, um die vor 1969 verlegten Leitungen auszutauschen, Lecks in neueren Leitungen nicht mit eingenommen (WALLIS 1995). Nach Angaben des zuständigen Berliner Versorgungsunternehmens wurden im Jahr 1993 an dem 6700 km langen Leitungsnetz 15000 Leckagen in Ost- und 7100 in West-Berlin (d. h. 3,3 Lecks/km) gemeldet. Praxisübliche Sanierungsmaßnahmen wie Bodenaustausch, Einbau von Entlüftungen sind in Berlin daher kaum anwendbar (NOÉ et al. 1995a). Eine Abdichtung allein reicht jedoch nicht aus, um die ursprünglichen Bodenverhältnisse wiederherzustellen. Obwohl in einem Modellversuch von HOEKS (1972) der Methangehalt nach Abdichtung des Lecks innerhalb von sechs Tagen vollständig absank, trat erst nach mehr als 78 Tagen die normale Sauerstoffkonzentration in der Bodengasphase ein. In der Bodenlösung dürfte nach frühestens drei Monaten die Sauerstoffkonzentration ihren Normalwert erreicht haben (KRÖGER 1975). Die Standorte L 6 und L 7 belegen, daß selbst bei stillgelegten defekten Leitungen noch Methan im Boden vorhanden ist. Aufgrund der schlechten bodenphysikalischen Eigenschaften vieler Stadtböden und der verringerten Diffusionsfläche kommt es auch nach der Leitungsreparatur nur zu einem unzureichenden Austausch der Bodengase mit der Atmosphäre.

Gängige Sanierungsmaßnahmen sollen Sauerstoff in den Boden einbringen, um das vorhandene Defizit zu beheben. Eine Belüftung mit der Kompressormethode, bei der einmalig eine künstliche Belüftung mit Drücken von 5 bar durchgeführt wird, können den Bodensauerstoffwert jedoch nur kurzfristig von 1-3 Vol.-% auf 14-17 Vol.-% anheben (S.I.A.B. 1970, HOEKS 1972, KRÖGER 1975, MEYER 1982).

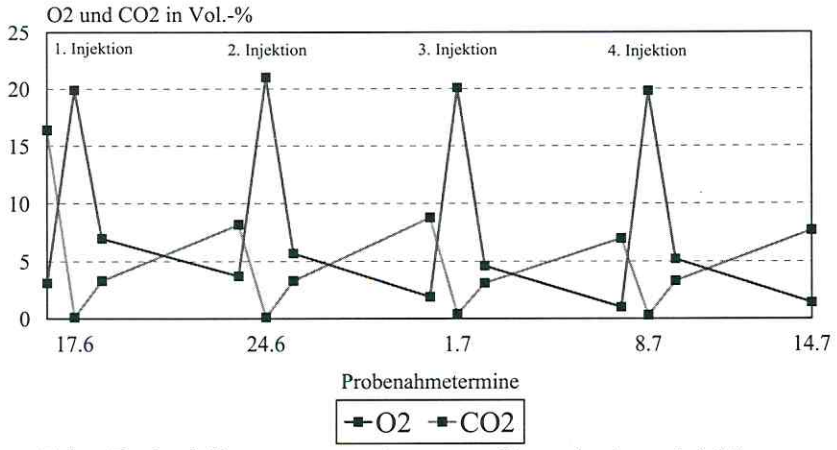


Abb. 5.1: Bodenluftzusammensetzung während des Injektionsversuches am Standort L 4 (BREUSTE et al. 2000)

Ein im Rahmen dieses Projektes am Standort L 4 durchgeführter Injektionsversuch ist in Abb. 5.1 dargestellt. Mit einem Kompressor (Arbeitsdruck 4,9 bar, Leistung 5000 l/min) wurde 4 mal in wöchentlichem Abstand jeweils 20 min Luft in eine Tiefe von 80-100 cm eingeblasen. Bereits einen Tag nach der Injektion fiel die zuvor auf ca. 20 Vol.-% gestiegene Sauerstoffkonzentration in der Bodenluft wieder ab. Mit Hilfe der Kompressormethode kann weder die Sauerstoffversorgung der Wurzeln gesichert noch eine Reoxidation der zuvor reduzierten Systeme erzielt werden. Durch das Eindringen der Druckluft finden unkontrollierte Bodenluftverfrachtungen statt, die verfrachtete Luft strömt nach Beendigung der Injektion wieder in die belasteten Bereiche zurück (BALDER 1998). MEYER (1982) schlägt jedoch eine Belüftung mittels Kompressor während der Leitungsreparatur vor, mit dem Ziel restliches Methan und Kohlendioxid in die offene Arbeitsgrube abzuleiten, aus der die Gase entweichen können. Auf die Bildung explosiver Gasgemische ist jedoch zu achten. HOEKS (S.I.A.B. 1970, HOEKS 1972) schlägt Belüftungsrohre vor, um das Redoxpotential im Boden zu verbessern. Kunststoffrohre, deren Wandungen in der Längsrichtung unterbrochen sind, werden in einem Kiesbett in den Boden eingebracht. Als präventive Maßnahme können diese Rohre zwischen der Gasleitung und der Baumreihe als Sperre eingebracht bzw. zur Dauerbelüftung kreisförmig um den Baumstamm herum angeordnet werden. Mit einem Rohr entweichen 10-40 l Gas pro Stunde aus dem Boden, mit 6 Rohren wurde innerhalb von 14 Tagen der Sauerstoffgehalt in der Gaszone um 5% angehoben (HOEKS 1972). Ein anderer Sauerstofflieferant als Luft wurde von KRÖGER (1975) in den Boden eingebracht.

Das Anbieten von Nitrat als alternativem terminalem Wasserstoff-Akzeptor inhibiert die Mangan-Reduktion und fördert die Mangan-Reoxidation. Die hohen Nitratgehalte im Boden und Nitritbildung lassen diese Maßnahme jedoch als fragwürdig erscheinen. Eine zu bevorzugende Alternative des Sauerstoffeintrages in den Boden besteht in der Applikation von „oxygen release compound" (ORC®). Bei Anwendung dieser aus Magnesiumperoxid bestehenden Verbindung wird über einen längeren Zeitraum Sauerstoff freigesetzt. Diese Maßnahme hat sich bei Degradationsvorhaben zum Abbau von BTEX und MTBE im Rahmen von „accelerated natural attenuation"-Konzepten bewährt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Konzept verfolgt, nicht den Sauerstoffeintrag in den Boden zu erhöhen, sondern die Sauerstoffzehrung durch Methanotrophe zu unterbinden. Dieser Schritt wäre als Sofortmaßnahme vor der Leitungsreparatur anwendbar, es würde nur zur Verdrängung des Sauerstoffs durch das Methan kommen, welches sich leichter aus dem Boden entfernen ließe als das bei der Methanoxidation entstehende Kohlendioxid.

Aufgrund vorliegender umfassender Daten zu Wirkung, Verbleib und Toxizität wurden Agrarhilfsstoffe ausgewählt, speziell Nitrifikationshemmer, die auch für die inhibierende Wirkung auf die Methanaufnahme durch den Boden bekannt sind (BEDARD & KNOWLES 1989, BRONSON & MOSIER 1994). Nitrifikationsinhibitoren werden mit dem Ziel eingesetzt, die Stickstoff-Effizienz für Kulturpflanzen zu steigern, Nitratauswaschungsverluste und N_2O-Freisetzung zu minimieren und Nitratgehalte in Obst und Gemüse zu senken (SCHINNER & SONNLEITNER 1997). Bei der Inhibierung wird die Nitritation vermutlich durch Chelatisierung des Kupfer der Ammoniummonooxygenase unterbunden (HOOPER et al. 1997).

Ein gezielter Freilandeinsatz zur Hemmung Methanotropher durch diese Stoffgruppe fand bisher noch nicht statt. Die Nebenwirkungen der Inhibitoren auf die Methanoxidation wurden bisher nur unter atmosphärischen Methankonzentrationen untersucht, da deren Einsatz zu einer erhöhten Freisetzung des Treibhausgases in die Atmosphäre führt (WEISKE 2001).

Die effektiven Dosen der verwendeten Inhibierungssubstanzen lagen im in der Literatur angegebenen Bereich.

Nur die erstmalige Anwendung von 10 µg DCD/g Boden hemmten die Methanoxidation in der mittleren Tiefenstufe des Pflanzgefäßes. Auch BRONSON &

MOSIER (1994) verzeichneten nur eine geringe (bis 14%) Hemmung der Methanoxidation bei einer Konzentration von 5 und 25 µg/g Boden.

Die geringe Wirksamkeit von DCD ist die Folge einer schnellen Degradation im Boden, besonders nach wiederholten Anwendungen. Bereits nach einer zweiten Applikation wurde die Halbwertszeit von DCD von 2-3 Wochen auf etwa eine Woche herabgesetzt (RAJBANSHI et al. 1992, RAJBANSHI 1993). Über Guanylharnstoff, Guanidin und Harnstoff wird DCD letztlich zu Kohlendioxid, Ammoniak und Wasser mikrobiell hydrolysiert. (WEISKE 2001). Das Harnstoffderivat DCD ist der in Deutschland maßgeblich eingesetzte Nitrifikationsinhibitor.

Die effektive Dosis lag bei dem Nitrifikationshemmer Nitrapyrin bereits bei 5 µg/g Boden, bei dieser Konzentration konnten ebenfalls BRONSON & MOSIER (1994) die Methanoxidation 6 Tage nach der Applikation abhängig von der Bodenart um 66-89% hemmen. Auch SYAMSUL ARIF et al. (1996) konnten mit 100 ppm Nitrapyrin die Methanoxidation komplett inhibieren. TOPP & KNOWLES (1982, 1984) untersuchten die Wirkung von Nitrapyrin an Reinkulturen von *Methylosinus trichosporium* OB3b, 2 bzw. 10 µg/ml inhibierten die Methanoxidation respektive das Wachstum des untersuchten Stammes. Nitrapyrin übt einen direkten Effekt auf die Methanmonooxygenase aus, da weder die Oxidation von Methanol, Formaldehyd noch Formiat beeinflußt wurde. Die MMO ist in der Lage, Ammonium als Substratanalogon zu Methan zu oxidieren, dies gilt umgekehrt auch für die Ammonium-Monooxygenase (BÉDARD & KNOWLES 1989). Die Ähnlichkeit beider Monooxygenase-Systeme erklärt aber nur teilweise die Beeinträchtigung der Methanoxidation durch Nitrifikationshemmer. Der Wirkmechanismus scheint bei beiden Enzymen ein anderer zu sein, während die Trichloromethylgruppe des Nitrapyrins für die Toxizität gegenüber chemoautotrophen Ammoniumoxidierern verantwortlich ist, wird die Methanoxidation auch durch 6-Chloro-2-picolin gehemmt, eine Verbindung, bei der die Trichlorogruppe des Nitrapyrins durch eine Methylgruppe substituiert wurde (TOPP & KNOWLES 1984).

In den Laborversuchen von BRONSON & MOSIER (1994) zeigte NBTPT in einer Konzentration von 25 µg/g Boden eine starke Hemmwirkung auf die Methanaufnahme durch den Boden. Im feinsandigen Lehm betrug diese Hemung 83% und im sandigen Tonlehm 60%. Hinsichtlich des involvierten Mechanismus besteht Forschungsbedarf (SCHINNER & SONNLEITNER 1997). Die Ammoniumoxidation wurde hingegen in beiden Böden nur schwach gehemmt (13-17%). Die Anwendung

von NBTPT würde demnach mit einer Reoxidation zuvor reduzierter Verbindungen wie Ammonium vereinbar sein.

Die Testung von NBTPT an Reinkulturen stand bis dato noch aus.

Als langfristige Maßnahme wird empfohlen, den erdgasbeeinflußten Boden per se reoxidieren zu lassen und neues, lockeres Substrat in die Baumscheiben einzubringen. Während der Regeneration leerer Baumscheiben sollte eine Zwischenbegrünung mit Meliorationspflanzen zur Verhinderung der Oberflächenverschlämmung durch Niederschläge erfolgen.

In Pflanzgefäßen, in denen die Erdgasapplikation abgestellt wurde, fand eine Reoxidation innerhalb von 2 Monaten statt. Im Straßenboden ist die Regenerationszeit größtenteils von der Wasserhaltekapazität und Nährstoffverfügbarkeit des Substrats und der Bodenverdichtung abhängig. Während HOEKS (1972) bereits nach 60-80 Tagen nach Abstellen des Gaslecks eine normale O_2-Konsumrate feststellte, geben BILHARZ & SIEGERT (1997) eine Regenerationszeit des Bodens von bis zu 10 Jahren an.

6 Zusammenfassung

Seit der Umstellung von Stadt- auf Erdgas in den „Neuen Bundesländern" ist es an vielen Standorten zu Baumschäden durch Gasaustritte aus undichten Erdgasleitungen gekommen. Das durch einen niedrigeren Feuchtigkeitsgehalt und höheren Leitungsdruck gekennzeichnete Erdgas entweicht aus ausgetrockneten und undicht gewordenen Hanfdichtungen.

Erdgasbeeinflußter Straßenboden bedarf nicht nur einer dringenden Sanierung aufgrund der verminderten Gesundheit und gar Standfestigkeit der Straßenbäume, er stellt ferner eines der wenigen Habitate mit extrem hohen Methangehalten und –gradienten dar, und bietet somit ein interessantes Untersuchungsobjekt für die Verbreitung von Methanotrophen.

Die Untersuchungen fanden sowohl an Straßenstandorten als auch in einer mit Winterlinden (*Tilia cordata*) besetzten Pflanzengefäßanlage statt.

Die unmittelbare Wirkung des Erdgases im Bodenreich schlägt sich in der Veränderung der Bodenluft nieder. Die Kombination von Verdrängung der Bodenluft und mikrobieller Methanoxidation führt zu einem Sauerstoffdefizit und Kohlendioxidanreicherung im Boden. An den untersuchten Standorten lagen Bodengasverhältnisse mit bis zu 92,6 Vol.-% Methan und 18,8 Vol.-% Kohlendioxid vor. Der typische jahreszeitliche Gang der Bodenluftzusammensetzung mit hohen Kohlendioxidwerten im Sommer und niedrigen im Winter war an erdgasbeeinflußten Standorten gestört.

In Pflanzgefäßen konnte ein Einfluß des Erdgases auf bodenchemische, nicht aber auf bodenphysikalische Eigenschaften, gemessen als Aggregatstabilität, nachgewiesen werden. Zu den wichtigsten Sekundärprozessen gehören im Boden ablaufende Redoxreaktionen. In dem reduzierenden Milieu des erdgasbeeinflußten Bodens kommt es dem Redoxpotential entsprechend nacheinander zur Reduktion von Nitrat, Mangan(IV)-Verbindungen, Eisen(III)-Verbindungen und Sulfat; an einem Straßenstandort wurde sogar authochthone Methanogenese beobachtet. Sehr hohe Ammonium- (bis 7 mg NH_4-N/100 g Boden) und mobile Mangankonzentrationen (bis zu 200 mg Mn^{2+}/kg Boden) waren die Hauptcharakteristika erdgasbeeinflußten Bodens in Pflanzgefäßen. Nach 12wöchiger Behandlungsdauer mit 500 cm^3/min Erdgas zeigte die angepflanzte Winterlinde fast vollständigen Laubfall.

Der gravierendste Unterschied zu anderen anoxischen Böden besteht in der Bereitstellung von Methan als Kohlenstoffquelle speziell für Methanotrophe. Es

zeigte sich ein Anstieg der methanotrophen Population auf 4,6 x10^6 Zellen bis zu einem Gehalt von 25 Vol.-% Methan. Geringe Erdgasapplikationen von 50 cm^3/min führten ebenfalls zu einem Anstieg der Anzahl aerober heterotropher Bakterien, denen Metabolite Methanotropher als Kohlenstoffquelle dienten.

Das Vorkommen der Methanotrophen bei bestimmten Methangehalten wurde vergleichend mit Kultivierungs- und kultivierungsunabhängigen Methoden beschrieben. Durch die enge Assoziation oligocarbophiler und methanolverwertender Bakterien mit Methanotrophen waren gängige Isolierungsmethoden ungeeignet. Zur Gewinnung von Reinkulturen wurde deshalb eine Batterie von Aufreinigungsmethoden angewendet, die die Abtrennung der Begleitflora von den schwer in Reinkultur zu bringenden Methanotrophen gewährleistete. Erfolgreiche Isolierungen wurden mit Mikromanipulation, Nutzung unterschiedlicher Zellhydrophobien und mit Verdünnungsreihen erhalten. Mit diesem Ansatz konnten drei verschiedene Isolate gewonnen werden. Die Enzymausstattung mit hoher sMMO-Aktivität, Hydroxypyruvat-Reduktase und Serin-Hydroxymethyltransferase, zur Cytoplasmamembran peripher angeordnete intracytoplasmatische Membranen und das Vorherrrschen einer Fettsäurekettenlänge von 18 C-Atomen bestätigen die Zugehörigkeit der Isolate zu Typ II Methanotrophen. Mittels 16S rDNA-Sequenzierung konnten die Stämme als *Methylosinus trichosporium*, *Methylosinus sporium* und *Methylocystis sp.* klassifiziert werden.

Auf der Basis gattungsspezifischer Primer wurde die methanotrophe Lebensgemeinschaft kultivierungsunabhängig durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und denaturierende Gradientengelelektrophorese analysiert. Diese Untersuchung wurde an direkt extrahierter und aufgereinigter Gesamt-Boden-DNA durchgeführt. Die Verteilung verschiedener Arten Methanotropher bei unterschiedlichen Methangehalten wurde beschrieben. Während mit der Isolierung nur Typ II Methanotrophe gewonnen wurden, konnten mit nicht-kultivierenden Verfahren nach 19wöchiger Begasungsdauer vier Arten *(Methylomonas, Methylobacter, Methylococcus, Methylosinus/-cystis*) Methanotropher detektiert werden. *Methylobacter* kam bei niedrigen, *Methylomonas* bei mittleren und *Methylocooccus* unabhängig von der Methankonzentration vor. Die Population Typ I Methanotropher zeigte über die 15monatige Versuchsdauer eine höhere Dynamik im Vergleich zu Typ II Methanotrophen mit einer Dominanz der Gattung *Methylomonas*. Der PCR-Nachweis methanotropher 16S rDNA war empfindlicher in der Detektion

von Gasleckagen als das Vorhandensein von Methan, jedoch unempfindlicher als ein Nachweis über die Isotopensignatur (Herkunft des Kohlendioxides).

Die Regeneration des Bodens beinhaltet nicht nur die Verbesserung der Bodenluft, die eine Sauerstoffkonzentration von über 12 Vol.% aufweisen sollte, sondern auch eine Oxidation aller Verbindungen, die zuvor reduziert wurden (zweiwertiges Mangan, Ammonium). Vordringlichste Aufgabe ist es demnach, Sauerstoff in den Boden einzubringen. Luftinjektionen in den Boden haben jedoch nur eine kurzfristige Wirkung gezeigt und sind nicht dazu geeignet, Sauerstoff langfristig für die Oxidationsprozesse zur Verfügung zu stellen. In dieser Arbeit wurden neue Sanierungsansätze verfolgt, mit dem Ziel, die Sauerstoffzehrung zu minimieren. Mit nitrifikationshemmenden Agrarhilfsstoffen konnte eine Inhibierung der methanotrophen Bakterien sowohl in Reinkultur als auch in Pflanzgefäßen erzielt werden. Die bisher nur als unerwünschte Nebenwirkung bekannte Hemmung der Oxidation atmosphärischen Methans, wurde hier gezielt genutzt, um die Oxidation des ausgetretenen Leckagemethans zu inhibieren. Bei einer vergleichenden Untersuchung von Dicyandiamid, Nitrapyrin und N-(n-Butyl)-thiophosphortriamid erwies sich Nitrapyrin am geeignetsten, da bereits 3,3 mg/l das Wachstum einer methanotrophen Kultur vollständig unterbunden. Durch Beregnung eines Pflanzgefäßes mit 5 µg Nitrapyrin/g Boden ließ sich der Sauerstoffgehalt bis in eine Tiefe von 70 cm anheben. Bei einem neu entstandenen Gasschaden könnte mit dieser Methode die durch Methanotrophe bedingte Sauerstoffzehrung bis zur Behebung der Leitungsleckage gemindert werden.

7 Literatur

Adams R. S.; Ellis R. (1960): Some physical and chemical changes in the soil brought about by saturation with natural gas. Proceedings of the Soil Science Society of America 24: 41-44.

Adamse, A. D.; Hoeks, J.; Bont, J. A. M. d.; Kessel, J. F. v. (1972): Microbial activities in soil near natural gas leaks. Arch. Mikrobiol. 83 : 32-51.

Alef, K.; Kleiner, D. (1989): Rapid and sensitive determination of microbial activity in soils and in soil aggregates by dimethylsulfoxide reduction. Biol. Fertil. Soils 8: 349-355.

Altschul, S. F.; Thomas, L. M.; Schäffer, A. A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D. J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research 25 : 3389-3402.

Alvarez-Cohen, L. (1993): Application of methanotrophic bacteria for the bioremediation of chlorinated organics. S. 337-350. *In:* Murrell, J. C.; Kelley, H. P.: Microbial growth on C1 compounds. Andover, United Kingdom.

Amann, R. I. (1995): In situ identification of microorganisms by whole cell hybridization with rRNA targeted nucleic acid probes. S. 3.3.6: 1-15. *In:* Molecular Microb. Ecol. Manual. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.

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

Amaral, J. A.; Archambault, C.; Richards, S. R.; Knowles, R. (1995): Denitrification associated with groups I and II methanotrophs in a gradient enrichment system. FEMS Microbiology Letters 18 : 289-298.

Anderson, J.P.E.; Domsch, K.H. (1978): A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. Soil Biol. Biochem. 10: 215-221.

Anderson, D.; Brown, K.; Thomas, J. (1985): Conductivity of compacted clay soils to water and organic liquids. Waste Manag. Res. 3: 339-349.

Anthony, C. (1982): The biochemistry of methylotrophs. Academic Press, London.

Anthony, C. (1986): Bacterial oxidation of methane and methanol. Adv. Microb. Physiol. 27 : 113-210.

Asenjo, J. A.; Suk, J. S. (1986): Kinetics and models for the bioconversion of methane into an intracellular polymer, poly-β-hydroxypyruvate (PHB). Biotechnol. Bioeng. Symp. 15: 225-234.

Ashkin, A.; Dziedzic, J. M. (1987): Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria. Nature 235 : 1517-1520.

Ashkin, A.; Dziedzic, J. M.; Yamane, T. (1987): Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams. Nature 330 : 769-771.

Aslanboga, I.; Höster, R.; Meyer, F.H. (1979): Umweltschäden an Straßenbäumen in Hannover. Das Gartenamt, 28: 364- 376.

Auman, A. J.; Stolyar, S.; Costello, A. M.; Lidstrom, M. E. (2000): Molecular characterization of methanotrophic isolates from freshwater lake sediment. Appl. Environ. Microbiol. 66 (12): 5259-5266.

Auman, A. J.; Speake, C. C.; Lidstrom, M. E. (2001): nifH sequences and nitrogen fixation in type I and type II methanotrophs. Appl. and Environ. Microbiol. 67 (9): 4009-4016.

Balder, H. (1993): Vitalität des öffentlichen Grüns - ein Ost-West-Vergleich und Folgerungen für die Zukunft. Nachrichtenbl. Dt. Pflanzenschutzd. 45 (10): 208-213.

Balder, H. (1998): Die Wurzeln der Stadtbäume: Ein Handbuch zum vorbeugenden und nachsorgenden Wurzelschutz. Parey, Berlin.

Balks, R.; Wehrmann-Ebstorf, C. (1944): Schädigungen der Kulturpflanzen durch Grubengas? Forschungsdienst 17: 133-138.

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

Beck, T. (1984): Mikrobiologische und biochemische Charakterisierung landwirtschaftlich genutzter Böden. II. Mitteilung: Beziehungen zum Humusgehalt. Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde 147: 467-475.

Beck, M. (2000): Cometabolische Degradation von Trichlorethen in Wässern mittels methanotropher Bakterien. Dissertation, Universität Leipzig.

Bédard, C.; Knowles, R. (1989): Physiology, biochemistry, and specific inhibitors of CH_4, NH_4^+, and CO oxidation by methanotrophs and nitrifiers. Microbiol. Rev. 53 (1): 68-84.

Bender, M.; Conrad, R. (1992): Kinetics of CH_4 oxidation in oxic soils exposed to ambient air or high CH_4 mixing ratios. FEMS Microbiol. Ecol. 101 : 261-270.

Bender, M.; Conrad, R. (1993): Kinetics of methane oxidation in oxic soils. Chemosphere 26 (1-4): 687-696.

Bender, M.; Conrad, R. (1995): Effect of CH_4 concentrations and soil conditions on the induction of CH_4 oxidation activity. Soil Biol. Biochem. 27 : 1517-1527.

Bergmann, W. (1993): Ernährungsstörungen bei Kulturpflanzen. Entstehung, visuelle und analytische Diagnose. G. Fischer, Jena.

Berkowitz, J.; Harris, J.; Little, B. (1981): Identification of hazardous waste for land treatment research. EPA-600/9-81-002b.

Berthelet, M.; Whyte, L. G.; Greer, C. W. (1996): Rapid, direct extraction of DNA from soils for PCR analysis using polyvinylpolypyrrolidone spin columns. FEMS Microbiol. Letters 138 (1): 17-22.

Bilharz, J.; Siegert, B. (1997): Baumtod durch Erdgas. Landschaftsarchitektur 4 : 29-31.

Blume, H. P. (1992): Handbuch des Bodenschutzes – Bodenökologie und –belastung Vorbeugende und abwehrende Schutzmaßnahmen. 2. Aufl. ecomed.

Blume, H. P.; Bornkamm, R.; Sukopp H. (1979): Vegetationsschäden und Bodenveränderungen in der Umgebung einer Mülldeponie. Zeitschrift für Kulturtechnik und Flurbereinigung 20 : 65-79.

Bodelier, P. L. E.; Hahn, A. P.; Arth, I. R.; Frenzel, P. (2000a): Effects of ammonium-based fertilisation on microbial processes involved in methane emission from soils planted with rice. Biogeochemistry 51 : 225-257.

Bodelier, P. L. E.; Roslev, P.; Henckel, T.; Frenzel, P. (2000b): Stimulation by ammonium-based fertilizers of methane oxidation in soil around rice roots. Nature 403 : 421-422.

Bodelier, P. L. E.; Meima-Franke, M.; Zwart, G.; Laanbroek, H. J. (2005): New DGGE strategies for the analysis of methanotrophic microbial communities using different combinations of existing 16S rRNA-based primers. FEMS Microbiol. Ecol. 52: 163-174.

Bodrossy, L.; Holmes, E. M.; Holmes, A. J.; Kovacs, K. L.; Murrell J. Colin (1997): Analysis of 16S rRNA and methane monooxygenase gene sequences reveals a novel group of thermotolerant and thermophilic methanotrophs, *Methylocaldum* gen. nov. Arch. Microbiol. 168 : 493-503.

Bodrossy, L.; Kovacs, K. L.; McDonald, I. R.; Murrell, J. C. (1999): A novel thermophilic methane-oxidising y-Proteobacterium. FEMS Microbiol. Letters 170: 335-341.

Boon, N.; de Windt, W.; Verstraete, W.; Top, E. M. (2002): Evaluation of nested PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) with group-specific 16S rRNA primers for the analysis of bacterial communities from different wastewater treatment plants. FEMS Microbiol. Ecol. 39: 101-112.

Bowman, J. P.; Sly, L. L.; Cox, J. M.; Hayward, A. C. (1990): *Methylomonas fodinarum* sp. nov. and *Methylomonas aurantiaca* sp. nov.: two closely related type I obligate methanotrophs. Syst. Appl. Microbiol. 13: 279-287.

Bowman, J. P.; Sly, L. I.; Hayward, A. C. (1991): Contribution of genome characteristics to assessment of taxonomy of obligate methanotrophs. Int. J. Syst. Bacteriol. 41 (2): 301-305.

Bowman, J. P.; Sly, L. I.; Nichols, P. D.; Hayward, A. C. (1993): Revised taxonomy of the methanotrophs: description of *Methylobacter* gen. nov., emendation of Methylococcus, validation of Methylosinus and Methylocystis species, and a proposal that the family Methylococcaceae includes only the group I methanotrophs. Int. J. Syst. Bacteriol. 43 (4): 735-753.

Bowman, J. P.; Sayler, G. S. (1994): Optimization and maintenance of soluble methane monooxygenase activity in *Methylosinus trichosporium* OB 3b. Biodegradat. 5: 1-11.

Bowman, J. P.; Sly, L. I.; Stackebrandt, E. (1995): The phylogenetic position of the family Methylococcaceae. Int. J. Syst. Bacteriol. 45 (1): 182-185.

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

Bowman, J. (2000): The methanotrophs – The families Methylococcaceae and Methylocystaceae. Kap. 249 der Online-Ausgabe The prokaryotes. http://rizzo.springer-ny.com, 30.03.2000.

Bratina, B. J.; Brusseau, G. A.; Hanson, R. S. (1992): Use of 16S rRNA analysis to investigate phylogeny of methylotrophic bacteria. Int. Syst. Bacteriol. 42: 645-648.

Braverman, M. M.; Ettinger, I.; Jacobs, M. B. (1962): Determining the cause of death of vegetation by analysis of soil gases. Gas Age 129 : 23-26.

Bray, D. F. (1958): Gas injury to shade trees. Scientific Tree Topics 2: 19-22.

Breuste, J.; Schulte, G.; Rudolph, M.; Klimanek, E.-M.; Meißner, B.; Nitzsche, H.-M.; Keplin, B.; Gast, C. (2000): Untersuchung der Auswirkungen von Erdgasaustritten auf Boden für Großggrün und Entwicklung von Sanierungsmethoden. UFZ Leipzig-Halle GmbH Projektabschlußbericht.

Brod, H.-G. (1984): Auswirkungen der Auftausalze auf physikalische, chemische und biologische Bodenparameter. Z. Kulturt. Flurber. 25: 236-242.

Bronson, K. F.; Mosier, A. R. (1994): Suppression of methane oxidation in aerobic soil by nitrogen fertilizers, nitrification inhibitors, and urease inhibitors. Biol. Fertil. Soils 17: 263-268.

Brötzenberger, H.; Pass, F. (1987): Untersuchungen zur Ausbreitung von Erdgas im Boden. gwf-Gas-Erdgas 128 (2): 69-75.

Bruce, K. D.; Hiorns, W. D.; Hobman, J. L.; Osborn, A. M.; Strike, P.; Ritchie, D. A. (1992): Amplification of DNA from native populations of soil bacteria by using the polymerase chain reaction. Appl. Environ. Microbiol. 58 (10): 3413-3416.

Brusseau, G. A.; Bulygina, E. S.; Hanson, R. S. (1994): Phylogenetic analysis and development of probes for differentiating methylotrophic bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 60 (2): 626-636.

Bühler, I. (1992): Einfluß von Erdgas auf die mikrobielle Aktivität und Pflanzennährstoffe in Böden. Dissertation, Universität Hohenheim.

Bulygina, E. S.; Gal'chenko, V. F.; Govarakhina, N. I.; Netrusov, A. I.; Nikitin, D. I.; Trotsenko, Y. A.; Chumakov, K. M. (1990): Taxonomic studies on methylotrophic bacteria by 5S ribosomal RNA sequencing. J. Gen. Microbiol. 136: 441-446.

Burlage, R. S.(Hrsg.) (1998): Techniques in microbial ecology. Oxford, New York.

Bussmann, I.; Pester, M.; Brune, A.; Schink, B. (2004): Preferential cultivation of type II methanotrophic bacteria from littoral sediments (Lake Constance). FEMS Microbiol. Ecol. 47: 179-189.

Cheng, Y. S.; Halsey, J. L.; Fode, K. A.; Remsen, C. C.; Collins, M. L. P. (1999): Detection of methanotrophs in groundwater by PCR. Appl. Environ. Microbiol. 65 (2): 648-651.

Childress, J. J.; Fisher, C. R.; Brooks, J. M.; Kennicut, M. C.; Bidigare, R.; Anderson, A. E. (1986): A methanotrophic marine molluscan (Bivalvia: Mytilidae) symbiosis: mussels fueled by gas. Science 233: 1306-1308.

Cicerone, R. J.; Oremland, R. S. (1988): Biogeochemical aspects of atmospheric methane. Global Biogeochemical Cycles 2 (4): 299-327.

Colby, J.; Stirling, D. I.; Dalton, H. (1977): The soluble methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* Bath: its ability to oxygenate n-alkanes, ethers and alicyclic, aromatic and heterocyclic compounds. Biochem. J. 165 : 395-402.

Conrad, R. (1997): Production and consumption of methane in the terrestrial biosphere, S. 27-44. *In*: Helas, G.; Slanina, J.; Steinbrecher, R. (Hrsg.) SBP Academic Publ., Amsterdam.

Conrad, R.; Rothfuss, F. (1991): Methane oxidation in the soil surface layer of a flooded rice field and the effect of ammonium. Biol. Feril. Soils 12: 28-32.

Cornish, A.; Nicholls, K. M.; Scott, D. (1984): In vivo ^{13}CNMR investigations of methanol oxidation by the obligate methanotroph *Methylosinus trichosporium* OB3b. J. Gen.Microbiol. 130: 2565-2575.

Costello, A. M.; Lidstrom, M. (1999): Molecular characterization of functional and phylogenetic genes from natural populations of methanotrophs in lake sediments. Appl. Environ. Microbiol. 65 (11): 5066-5074.

Craig, H.; Chou, C. C. (1982): Methane: The record in polar ice cores. Geophys. Res. Letters 9: 1221-1224.

Crawford, R. M. M.; Tyler, P. D. (1969): Organic acid metabolism in relation to flooding tolerance in roots. J. Ecol. 57: 237-246.

Cremonesi, L.; Firpo, S.; Ferrari, M.; Righetti, P.G.; Gelfi, C. (1997):Double-gradient DGGE for optimized detection of DNA point mutations. Biotechniques 22: 326-330.

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

Dacey, J. W.; Drake, B: G.; Klug, M. J. (1979): Stimulation of methane emission by carbon dioxide enrichment of marsh vegetation. Nature 370 (6484): 47-49.

Davis, J. B.; Coty, V. F.; Stanley, J. P. (1964): Atmospheric nitrogen fixation by methane-oxidizing bacteria. J. Bacteriol. 88: 468-472.

Dedysh, S. N.; Panikov, N. S.; Tiedje, J. M. (1998a): Acidophilic methanotrophic communities from Sphagnum peat bogs. Appl. Environ. Microbiol. 64 (3): 922-929.

Dedysh, S. N.; Panikov, N. S.; Liesack, W.; Großkopf, R.; Zhou, J.; Tiedje, J. M. (1998b): Isolation of acidophilic methane-oxidizing bacteria from northern peat wetlands. Science 282 (9): 281-284.

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

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

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

Deuber, C. G. (1932): Effects of illuminating gas on young oak trees. American Journal of Botany 19: 845.

Dianou, D.; Adachi, K. (1999): Characterization of methanotrophic bacteria isolated from a subtropical paddy field. FEMS Microbiol. Letters 173: 163-173.

DIN Deutsches Institut für Normung e.V. (Hrsg.) (1997): DIN 19730 - Bodenbeschaffenheit, Ammoniumnitratextraktion zur Bestimmung mobiler Spurenelemente in Mineralböden, Berlin.

DIN Deutsches Institut für Normung e. V. (Hrsg.) (1983): DIN 38406 - Kationen (Gruppe E) Bestimmung des Ammonium-Stickstoffs (E5), Berlin.

DIN Deutsches Institut für Normung e. V. (Hrsg.) (1984): DIN 38414 Teil 4 – Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung; Schlamm und Sedimente (Gruppe S), Bestimmung der Eluierbarkeit mit Wasser (S4).

Distel, D. I.; Cavanaugh, C. M. (1994): Independent phylogenetic origins of methanotrophic and chemoautotrophic bacterial endosymbioses in marine bivalves. J. Bacteriol. 176 (7): 1932-1938.

Dumke, I., Faber, E. und Poggenburg, J. (1989): Determination of stable carbon and hydrogen isotopes of light hydrocarbons. Anal. Chem., 61: 2149-2164.

Dunfield, P. F.; Liesack, W.; Henckel, T.; Knowles, R.; Conrad, R. (1999): High-affinity methane oxidation by a soil enrichment culture containing a type II methanotroph. Appl. Environ. Microbiol. 65: 1009-1014.

Eller, G. (2000): Aktivität, Populationsdynamik und Diversität Methan-oxidierender Bakterien im Reisfeld. Dissertation, Universität Marburg.

Eller, G.; Frenzel, P. (2001): Changes in activity and community structure of methane-oxidizing bacteria over the growth period of rice. Appl. Environ. Microbiol. 67 (6): 2395-2403.

Erb, R. W.; Wagner-Döbler, I. (1993): Detection of polychlorinated biphenyl degradation genes in polluted sediments by direct DNA extraction and polymerase chain reaction. Appl. Environ. Microbiol. 59 (12): 4065-4073.

Ertel, J. R.; Hedges, J. I. (1983): Bulk chemical and spectroscopic properties of marine and terrestrial humic acids, melanoidins and catechol-based polymers. In: Christman, R. F.; Gjessing, E. T. (Hrsg.): Aquatic and terrestrial humic materials. Ann Arbor Science, Ann Arbor, MA, 143-162.

Eschweiler, B. (1999): Charakterisierung der mikrobiellen Besiedlung von Grundwässern unterschiedlicher Beschaffenheit mittels molekularbiologischer Methoden (PCR, DGGE). Dissertation, Universität Bremen.

Escoffier, S.; LeMer, J.; Roger, P. A. (1997): Enumeration of methanotrophic bacteria in ricefield soils by plating and MPN techniques: A critical approach. European Journal of Soil Biology 33 (1): 41-51.

Eshinimaev, B. T.; Medvedkova K. A.; Khmelenina, V.N.; Suzina, N.E.; Osipov, G.A.; Lysenko, A. M.; Trotsenko, Y. A. (2004): New thermophilic methanotrophs of the genus Methylocaldum. Mikrobiologiia. 73(4): 530-9.

Fassel, T. A.; Edmiston, C. E. (1999): Review: Ruthenium red and the bacterial glycocalyx. Biotechnic & Histochemistry 74 (4): 194-212.

Felsenstein, J. (1993): PHYLIP (Phylogeny Inference Package) Version 3.5c. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.

Ferris, M. J.; Muyzer, G.; Ward, D. M. (1996): Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. Appl. Environ. Microbiol. 62 (2): 340-346.

Fintelmann, L. (1877): Über Baumpflanzungen in den Städten, deren Bedeutung, Gedeihen, Pflege und Schutz. J. U. Kern's Verlag, Breslau.

Fischer, S. G.; Lerman, L. S. (1979): Length-independent separation of DNA restriction fragments in two dimensional gel electrophoresis.Cell 16: 191-200.

Fischer, S. G.; Lerman, L. S. (1983): DNA fragments differing by single substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 1579-1583.

Fogel, M. M.; Taddeo, A. R.; Fogel, S. (1986): Biodegradation of chlorinated ethenes by a methane-utilizing mixed culture. Appl. Environ. Microbiol. 51: 720-724.

Foos, K. (1976): Erdgas im Wurzelraum schädigt Pappeln aktiv. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie 79: 199-208.

Foster, J. W.; Davis, R. H. (1966): A methane-dependent coccus, with notes on classification of obligate, methane-utilizing bacteria. J. Bacteriol. 91: 1924-1931.

Foy, C. D.; Chaney, R. L.; Whie, M. C. (1978): The physiology of metal toxicity in plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 29: 511-566.

Fröhlich, J.; König, H. (2000): New techniques for isolation of single prokaryotic cells. FEMS Microbiology Reviews 24: 567-572.

Führ, A. (1996): Untersuchungen zu der Biodiversität natürlicher Bakterien-populationen im Boden mit der denaturierenden Gradientengelelektrophorese (DGGE) von 16S rDNA-Sequenzen. Dissertation, Kaiserslautern.

Fukushi, S.; Shirai, K.; Minami, K. (1975): Einfluß vom in der Mülldeponie gebildeten Gas auf den Boden. Soil Sci. Plant Nutr. 21: 293-300.

Funk, H. B.; Krulwich, T. A. (1964): Preparation of clear silica gel that can be streaked. J. Bacteriol. 88: 1200-1201.

Fuse, H.; Onta, M.; Takimura, O.; Murakami, K.; Inoue, H.; Yamaoka, Y.; Oclarit, J. M.; Omori, T. (1998): Oxidation of trichloroethylene and dimethyl sulfide by a marine *Methylomicrobium* strain containing soluble methane monooxygenase. Bioscience Biotechnology and Biochemistry 62: 1925-1931.

Gal'chenko, V. F.; Shishkina, V. N.; Suzina, N. E.; Trotsenko, Y. A. (1977): Isolation and properties of new strains of obligate methanotrophs. Mikrobiologiya 46: 723-728.

Garcia-Pichel, F.; Prufert-Bebout, L.; Muyzer, G. (1996): Phenotypic analysis show *Microcoleus chthonoplastes* to be a cosmopolitan cyanobacterium. Appl. Environ. Microbiol. 62: 3248-3291.

Garland, J. L.; Mills, A. L. (1991): Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. Appl. Environ. Microbiol. 57: 2351-2359.

Gilbert, B. (1997): Methanotrophe Bakterien in der Reisrhizosphäre. Dissertation, Universität Marburg.

Gilbert, B.; Frenzel, P. (1995): Methanotrophic bacteria in the rhizosphere of rice microcosms and their effect on porewater methane concentration and methane emission. Biol. Fertil. Soils 20: 93-100.

Gilbert, B.; McDonald, I. R.; Finch, R.; Stafford, G. P.; Nielsen, A. K.; Murrell, J. C. (2000): Molecular analysis of the pmo (particulate methane monooxygenase) operons from two type II methanotrophs. Appl. Environ. Microbiol. 66 (3): 966-975.

Giovannoni, S. J.; Britschgi, T. B.; Moyer, C. L.; Field, K. G. (1990): Genetic diversity in Sargasso sea bacterioplankton. Nature 345 (3): 60-62.

Gisi, U. (1997): Bodenökologie. Thieme, Stuttgart.

Goldman, E.; Jacobs, R. (1961): Determining of nitrates by ultraviolet absorption. Amer. Water Works Assoc. 53: 187-191.

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

Green, C. J.; Stewart, G. C.; Hollis, M. A.; Vold, B. S.; Bott, K: F. (1985): Nucleotide sequence of *Bacillus subtilis* ribosomal RNA operon, rrn B. Gene: 37: 261-266.

Guckert, J. B.; Ringelberg, D. B.; White, D. C.; Hanson, R. S.; Bratina, B. J. (1991): Membrane fatty acids as phenotypic markers in the polyphasic taxonomy of methylotrops within the proteobacteria. J. Gen. Microbiol. 137: 2631-2641.

Gulledge, J.; Ahmad, A.; Steudler, P. A.; Pomerantz, W. J.; Cavanaugh, C. M. (2001): Family- and genus-level 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes for ecological studies of methanotrophic bacteria. Appl. Environm. Microbiol. 67 (10): 4727-4733.

Hampel, C. (1893): Stadtbäume. Anleitung zum Pflanzen und Pflegen der Bäume in Städten, Vororten und auf Landstraßen. P. Parey Verlag, Berlin.

Hanson, R. S.; Hanson, T. E. (1996): Methanotrophic bacteria. Microbiol. Rev. 60 (2): 439-471.

Harper , H. J. (1939): The effect of natural gas on the growth of microorganisms and the accumulation of nitrogen and organic matter in the soil. Soil Sci. 48: 461-466.

Hartge, K. H.; Horn, R. (1989): Die physikalische Untersuchung von Böden. Enke Verlag, Stuttgart, S. 106-113.

Härtig, C. (1998): persönliche Mitteilung. UFZ Leipzig-Halle GmbH, Sektion Umweltmikrobiologie.

Hazen, T. (1992): Test plan for in situ bioremediation demonstration of the Savannah River Integrated Demonstration. Westinghouse Savannah River Co., Aiken, S. C.

Hazeu, W.; Batenburg van der Vegte, W. H.; de Bryn, J. C. (1980): Some characteristics of *Methylococcus mobilis* sp. nov. Arch. Microbiol. 124: 211-220.

Heinemeyer, O., Insam, H. K., Kaiser, E.-A. und Walenszik, G. (1989): Soil microbial biomass and respiration measurements: an automated technique based on infrared gasanalysis. Plant and Soil 116 (1): 191-195.

Helm, J. (2002): Methanotrophe Bakterien als Produzenten von Poly-(β-hydroxybuttersäure) (PHB) – Charakterisierung des Prozesses, des Polymers und einer stabilen Mischkultur. Dissertation, Technische Universität Dresden.

Henckel, T.; Friedrich, M.; Conrad, R. (1999): Molecular analyses of the methane-oxidizing microbial community in rice field soil by targeting the genes of the 16S rRNA, particulate methane monooxygenase, and methanol dehydrogenase. Appl. Environ. Microbiol. 65 (5): 1980-1990.

Henckel, T.; Jäckel, U.; Schnell, S.; Conrad, R. (2000): Molecular analyses of novel methanotrophic communities in forest soil that oxidize atmospheric methane. Appl. Environ. Microbiol. 66 (5): 1801-1808.

Henckel, T.; Jäckel, U.; Conrad, R. (2001): Vertical distribution of the methanotrophic community after drainage of rice field soil. FEMS Microbiology Ecology 34 : 279-291.

Hengstmann, U. (1997): Charakterisierung mikrobieller Lebensgemeinschaften in überflutetem Reisfeldboden. Dissertation, Universität Marburg.

Heuer, H.; Krsek, M.; Baker, P.; Smalla, K.; Wellington, E. M. H. (1997): Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. Appl. Environ. Microbiol. 63 (8): 3233-3241.

Heyer, J.; Malashenko, Y.; Berger, U.; Budkova, E. (1984): Verbreitung methanotropher Bakterien. Z. Allg. Mikrobiol. 24: 725-744.

Higgins, I. J.; Best, D. J.; Hammond, R. C.; Scott, D. (1981): Methane-oxidizing microorganisms. Microbiol. Rev. 45: 556-583.

Hoeks, J. (1972): Effect of leaking natural gas on soil and vegetation in urban areas. Dissertation, Wageningen.

Holden, M. T. G.; Chhabra, S. R.; de Nys, R.; Stead, P.; Bainton, N. J.; Hill, P. J.; Manefield, M.; Kumar, N.; Labatte, M.; England, D.; Rice, S.; Givskov, M.; Salmond, G.P. C.; Stewart, G. S. A. B.; Bycroft, B. W.; Kjelleberg, S. A.; Williams, P. (1999): Quorum-sensing cross talk: isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from Pseudomonas aeruginosa and other gram-negative bacteria. Mol. Microbiol. 33: 1254-1266.

Holmes, A. J.; Owens, N. J. P.; Murrell, C. (1995): Detection of novel marine methanotrophs using phylogenetic and functional gene probes after methane enrichment. Microbiology 141: 1947-1955.

Holmes, A. J.; Owens, N. J. P.; Murrell, J. C. (1996): Molecular analysis of enrichment cultures of marine methane oxidising bacteria. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 203: 27-38.

Holzapfel-Pschorn, A.; Conrad, R.; Seiler, W. (1985): Production, oxidation and emission of methane in rice paddies. FEMS Microbiol. Ecol. 3: 343-351.

Holzapfel-Pschorn, A.; Conrad, R.; Seiler, W. (1986): Effects of vegetation on the emission of methane from submerged paddy soil. Plant and Soil 92: 223-233.

Hooper, A. B.; Vanelli, T.; Bergmann, D. J.; Arciero, D. M. (1997): Enzymology of the oxidation of ammonia to nitrite by bacteria. Antonie van Leeuwenhoek 71: 59-67.

Horz, H. P. (2000): Entwicklung und Anwendung molekularer Techniken zur Charakterisierung von nitrifizierenden und methanotrophen Populationen in natürlichen Ökosystemen. Dissertation, Universität Marburg.

Horz, H. P.; Yimga, M. T.; Liesack, W. (2001): Detection of methanotroph diversity on roots of submerged rice plants by molecular retrieval of pmoA, mmoX, mxaF, and 16S rRNA and ribosomal DNA, including pmoA-based terminal restriction fragment length polymorphism profiling. Appl. Environ. Microbiol. 67 (9): 4177-4185.

Horz, H. P.; Rich, V.; Avrahami, S.; Bohannan, B. J. M. (2005): Methane-oxidizing bacteria in a california upland grassland soil: diversity and response to simulated global change. Appl. Environ. Microbiol. 71: 2642-2652.

Houghton, J. T.; F. L. G. Meir; B. A. Callander; N. Harris; A. Kattenberg; K. Maskell. (1996): The Science of Climate Change. Cambridge.

Huber, R.; Burggraf, S.; Mayer, T.; Barns, S.M.; Rossnagel, P.; Stetter, K. O. (1995): Isolation of a hyperthermophilic archaeum predicted by in situ RNA analysis. Nature 376: 57-58

Itaya, M.; Tanaka, T. (1991): Complete physical map of the *Bacillus subtilis* 168 chromosome constructed by a gene-directed mutagenesis method. J. Mol. Biol. 220: 631-648.

Jechorek, M.; Wendlandt, K. D.; Beck, M. (2003): Cometabolic degradation of chlorinated aromatic compounds. J. Biotechnol. 102: 93-98.

Jensen, S.; Holmes, A. J.; Murrell, J. C. (2000): Detection of methane oxidizing bacteria in forest soil by monooxygenase PCR amplification. Microb. Ecol. 39: 282-289.

Jones, H. A.; Nedwell, D. B. (1993): Methane emission and methane oxidation in land-fill cover soil. FEMS Microbiol. Ecol. 102: 185-195.

Kalyuzhnaya, M. G.; Khmelenina, V. N.; Kotelnikova, S.; Holmquist, L.; Pedersen, K.; Trotsenko, Y. A. (1999): *Methylomonas scandinavica* spec. nov., a new methanotrophic psychrotrophic bacterium isolated from deep igneous rock ground water of Sweden. Syst. Appl. Microbiol. 22 (4): 565-572.

Kalyuzhnaya, M. G.; ; Khmelenina, V.; Eshinimaev, B.; Suzina, N.; Nikitin, D.; Solonin, A.; Lin, J. L.; McDonald, I. R.; Murrell, J. C.; Trotsenko, Y. (2001): Taxonomic characterization of new alkaliphilic and alkalitolerant methanotrophs from soda lakes of the Southeastern Transbaikal region and description of *Methylomicrobium buryatense* sp. nov. Syst. Appl. Microbiol. 24: 166-176.

Kennedy, R.S.; Finnerty, W. R.; Sudarsanan, K.; Young, R. A. (1975): Microbial assimilation of hydrocarbons. Arch. Microbiol. 102: 75-83.

Khalil, M. A. K.; Rasmussen, R. A. (1990): Atmospheric methane: Recent global trends. Environ. Sci. Technol. 24: 549-553.

Khalil, M. A. K.; Rasmussen, R. A. (1994): Global emissions of methane during the last several centuries. Chemosphere 29 (5): 833-842.

Khmelenina, V. N.; Kalyuzhnaya, M. G.; Starostina, N. G.; Suzina, N. E.; Trotsenko, Y. A. (1997): Isolation and characterization of halotolerant alkaliphilic methanotrophic bacteria from Tuva soda lakes. Current Microbiology 35: 257-261.

Kightley, D.; Nedwell, D. B.; Cooper, M. (1995): Capacity for methane oxidation in landfill cover soils measured in laboratory-scale soil microcosms. Appl. Environ. Microbiol. 61 (2): 592-601.

Kiss, A.; Sain, B.; Venetianer, P. (1977): The number of rRNA genes *in Escherichia coli* . FEMS Lett. 79: 77-79.

Klimanek, E. M. (1998): persönliche Mitteilung. UFZ Leipzig-Halle GmbH, Sektion Bodenforschung.

Koh, S. C.; Bowman, J. P.; Sayler, G. S. (1993): Soluble methane monooxygenase production and trichloroethylene degradation by a type I methanotroph *Methylomonas methanica* 68-1. Appl. Environ. Microbiol. 59 (4): 960-967.

Kolb, S.; Knief, C.; Stubner, S.; Conrad, R. (2003): Quantitative detection of methanotrophs in soil by novel pmoA-targeted real-time PCR assays. Appl. Environ. Microbiol. 69 (5): 2423-2429.

Kopczynski, E. D.; Bateson, M. M.; Ward, D. M. (1994): Recognition of chimeric small-subunit ribosomal DNAs composed of genes from uncultivated microorganisms. Appl. Environ. Microbiol. 60 (2): 746-748.

Kowalchuk, G. A.; Stephen, J. R.; De Boer, W.; Prosser, J. I.; Embley, T. M.; Woldendorp, J. W. (1997): Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the β subdivision of the class Proteobacteria in costal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. Appl. Environ. Microbiol. 63: 1489-1497.

Kretzschmar, R. (1992): Gase und Wärme. *In*: Blume, H. P.: Handbuch des Bodenschutzes – Bodenökologie und –belastung: Vorbeugende und abwehrende Schutzmaßnahmen. 2. Aufl., ecomed.

Kröger, K. H. (1975): Beeinflussung der biologischen Aktivität im Boden durch Erd- und Stadtgas. Zbl. Bakt. Abt. II 130: 251-284.

Krüger, G.; Balder, H. (1992): Gasschäden an Straßenbäumen. BDGL-Schriftreihe 10: 125.

Kühne, H.; Köster, P. (1967): Erdgasschäden an Straßenbäumen. Nachrichtenbl. Dt. Pflanzenschutzd. 19: 121-122.

Kussmaul, M.; Wilimzig, M.; Bock, E. (1998): Methanotrophs and methanogens in masonry. Appl. Environ. Microbiol. 64 (11): 4530-4532.

Labarca, C.; Paigen, K.(1980): A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. Analytical Biochemistry 102: 344-352.

Lane, D. J. (1991): 16S/23S rRNA Sequencing. pp. 115-147. *In* Stackebrandt, E.; Goodfellow, M. (Hrsg.): Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics.

Langhoff, K. (1971): Bekämpfung von Baumschäden durch Erdgas in Den Haag, Amsterdam und Lübeck. Garten und Landschaft 81: 20-21.

Leadbetter, E. R.; Foster, J. W. (1958): Studies on some methane-utilizing bacteria. Arch. Mikrobiol. 30: 91-118.

Lees, V., Owens, N. J. P.; Murrell, J. C. (1991): Nitrogen metabolism in marine methanotrophs. Arch. Microbiol. 157: 60-65.

Leh, H.-O. (1971): Schäden an Straßenäumen durch Auftausalze. Gesunde Pflanzen 23: 217-220.

Leh, H.-O. (1973): Untersuchungen über die Auswirkungen der Anwendung von Natriumchlorid als Auftaumittel auf die Straßenbäume in Berlin. Nachrichtenbl. Dt. Pflanzenschutzd. 25: 163-170.

Leh, H.-O. (1989): Innerstädtische Streßfaktoren und ihre Auswirkungen auf Straßenbäume. Kali-Briefe (Büntehof) 19 (10): 719-742.

Leh, H.-O. (1991): Innerstädtische Streßfaktoren und ihre Auswirkungen auf Straßenbäume. *In*: Brod, H. G. (Hrsg.): Straßenbaumschäden. Ursachen und Wirkungen. S. 5-21, Landsberg am Lech.

Leh, H. O. (1993): Zur Diagnose von Schäden an Straßenbäumen durch abiotische Belastungsfaktoren. Nachrichtenbl. Dt. Pflanzenschutzd. 45 (10): 201-207.

Liesack, W.; Weyland, H.; Stackebrandt, E. (1991): Potential risks of gene amplification by PCR as determined by 16S rDNA analysis of a mixed culture of strict barophilic bacteria. Microb.Ecol. 21: 191-198.

Liesack, W.; Schnell, S.; Revsbech, N. P. (2000): Microbiology of flodded rice paddies. FEMS Microbiology Reviews 24: 625-645.

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

Lindahl, V.; Bakken, L. R. (1995): Evaluation of methods for extraction of bacteria from soil. FEMS Microbiology Ecology 16: 135-142.

Lindau, C. W.; DeLaune, R. D.; Patrick, W. H.; Bollich, P. K. (1990): Fertilizer effects on dinitrogen, nitrous oxide, and methane emissions from lowland rice. Soil Sci. Soc. Am. J. 54: 1789-1794.

Liptay, K.; Chanton, J.; Czepiel, P.; Mosher, B. (1998): Use of stable isotopes to determine methane oxidation in landfill cover soils. Journal of Geophysical Research 103 (D7): 8243-8250.

Little, C. K.; Palumbo, A. V.; Herbes, S. E.; Lidstrom, M. E.; Tyndall, R. L.; Gilmer, J. (1988): Trichloroethylene biodegradation by a methane-oxidizing bacterium. Appl. Environ. Microbiol. 45: 951-956.

Löschburg, W. (1980): Unter den Linden. Buchverlag der Morgen, Berlin.

Maidak, B. L.; Olsen, G. J.; Larsen, N.; Overbeek, R.; McCaughey, M. J.; Woese, C. R. (1997): The RDP (Ribosomal Database Project). Nucleic Acids Res. 25: 109-111.

Maidak, B. L.; Cole, J. R.; Parker, C. T.; Garrity, G. M.; Larsen, N.; Li, B.; Lilburn, T. G.; McCaughey, M. J.; Olsen, G. J.; Overbeek, R.; Pramanik, S.; Tiedje, J. M..; Woese, C. R. (1997): A new version of the RDP (Ribosomal Database Project). Nucleic Acids Res. 27: 171-173.

Malashenko, Y. R.; Romanovskaya, V. A.; Bogachenko, V. N.; Shved, A. D. (1975): Thermophilic and thermotolerant methane-assimilating bacteria. Mikrobiologiya 44 : 855-862.

Malkomes, H. P. (1993): Eine modifizierte Methode zur Erfassung der Dehydrogenaseaktivität (TTC-Reduktion) im Boden nach Herbizidanwendung. Nachrichtenbl. Dt. Pflanzenschutzd. 45: 180-185.

Mancinelli R.; McKay C. P. (1985): Methane-oxidizing bacteria in sanitary landfills. *In*: Antonopoulos A., (Hrsg.): First Symposium on Biotechnological Advances in Processing Municipal Wastes for Fuel and Chemicals, S. 437-450.

Mancinelli, R. ; Shulls, W. A.; McKay, C. P. (1981): Methanol-oxidizing bacteria used as an index of soil methane content. Appl. Environ. Microbiol. 42 (1): 70-73.

Mandernack, K. W.; Kinney, C. A.; Coleman, D.; Huang, Y. S.; Freeman, K. H.; Bogner, J. (2000): The biogeochemical controls of N2O production and emission in landfill cover soils: the role of methanotrophs in the nitrogen cycle. Environmental Microbiology 2 (3): 298-309.

Maniatis, T.; Fritsch, E. F.; Sambrook, J. (1982): Molecular cloning - A laboratory manual. CSH Cold Spring Harbor Laboratory.

McDonald, I. R.; Murrell, J. C. (1997): The particulate methane monooxygenase gene pmoA and its use as a functional gene probe for methanotrophs. FEMS Microbiol. Letters 156 (2): 205-210.

McDonald, I. R.; Kenna, E. M.; Murrell, J. C. (1995): Detection of methanotrophic bacteria in environmental samples with the PCR. Appl. Environ. Microbiol. 61 (1): 116-121.

McDonald, I. R.; Hall, G. H.; Pickup, R. W.; Murrell, J. C. (1996): Methane oxidation potential and preliminary analysis of methanotrophs in blanket bog peat using molecular ecology techniques. FEMS Microbiol. Ecol. 21: 197-211.

Meier, M. (1991): Nitratbestimmung in Bodenproben (Nmin-Methode). Labor-Praxis, 42: 244-247.

Meyer, F. H. (1982): Bäume in der Stadt. 2. Aufl., Ulmer, Stuttgart.

Milich, L. (1999): The role of methane in global warming: where might mitigation strategies be focused? Global Environmental Change 9: 179-201.

Miller, D. N.; Bryant, J. E.; Madsen, E. L.; Ghiorse, W. C. (1999): Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. Appl. Environ. Microbiol. 65 (11): 4715-4724.

Moran, B. N.; Hickey, W. J. (1997): Trichloroethylene biodegradation by mesophilic and psychrophilic ammonia oxidizers and methanotrophs in groundwater microcosms. Appl. Environ. Microbiol. 63 (10): 3866-3871.

Moré, M. I.; Herrick, J. B.; Silva, M. C.; Ghiorse, W.; Madsen, E. L. (1994): Quantitative cell lysis of indigenous microorganisms and rapid extraction of microbial DNA from sediment. Appl. Environ. Microbiol. 60 (5): 1572-1580.

Morris, S. A.; Radajewski, S.; Willison, T. W. (2002): Identification of the functionally active methanotroph population in a peat soil microcosm by stable-isotope probing. Appl. Environ. Microbiol. 68 (3): 1446-1453.

Murrell, J. C.; Radajewski, S. (2000): Cultivation-independent techniques for studying methanotroph ecology. Res. Microbiol. 151: 807-814.

Murphy, J.; Riley, J. P. (1962): A modified single method for the determination of phosphate in natural waters. Anal. Chim. Acta 27: 31-36.

Muyzer, G.; Smalla, K. (1998): Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. Antonie van Leeuwenhoek 73: 127-141.

Muyzer, G.; de Wall, E. C.; Uitterlinden, A. G. (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 (3): 695-700.

Muyzer, G.; Ramsing, N. B. (1995): Molecular methods to study the organization of microbial communities. Wat. Sci. Tech. 32 (8): 1-9.

Muyzer, G. (1999): DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. Current Opinion in Microbiology 2: 317-322.

Navone, R. (1964): Proposed method for nitrate in potable water. J. Am. Waterworks An. 29: 669-678.

Nercessian, O.; Bienvenu, N.; Moreira, D.; Prieur, D.; Jeanthon, C. (2005): Diversity of functional genes of methanogens, methanotrophs and sulfate reducers in deep-sea hydrothermal environments. Environ Microbiol. 7: 118-32.

Neue, H. U.; Roger, P. A. (2000): Rice agriculture: Factors controlling emissions, S. 134-169. *In*: Khalil, M. A. K. (Hrsg.): Atmospheric methane – Its role in the global environment. Springer, Berlin.

Nichols, P. D.; Smith, G. A.; Antworth, C. P.; Hanson, R. S.; White, D. C. (1985): Phospholipid and lipopolysaccharide normal and hydroxyfatty acids as potential signatures for methane-oxidizing bacteria. FEMS Microbiol. Ecol. 31: 327-335.

Nichols, P. D.; Henson, J. M.; Antworth, C. P.; Parsons, J.; Wilson, J. T.; White, D. C. (1987): Detection of a microbial consortium, including type II methanotrophs, by use of phospholipid fatty acids in an aerobic halogenated hydrocarbon-degrading soil column enriched with natural gas. Environ. Toxicol. Chem. 6: 89-97.

Noe, H.; Balder, H.; Krüger, G. (1995a): Gasschäden an Bäumen - Ursachen, Folgen und Sanierung. Stadt und Grün 12: 862-866.

Noe, H.; Krüger, G.; Balder, H. (1995b): Langzeitbelastungen durch Gas an Straßenbäumen in Berlin. In: 1. Leipziger Symposium "Stadtökologie in Sachsen" 153-155.

Oldenhuis, R.; Janssen, D. B. (1993): Degradation of trichloroethylene by methanotrophic bacteria. S. 121-133. *In:* Murrell, J. C.; Kelley, D. P.: Microbial growth on C1 compounds, Andover, United Kingdom.

Oldenhuis, R.; Vink, R. L. J. M.; Janssen, D. B.; Witholt, B. (1989): Degradation of chlorinated aliphatic hydrocarbons by *Methylosinus trichosporim* OB3b expressing soluble methane monooxygenase. Appl. Environ. Microbiol. 55: 2819-2826.

Olsen, G. J.; Lane, D. J.; Giovannoni, S. J.; Pace, N. R. (1986): Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. Ann. Rev. Microbiol. 40: 337-365.

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

Omel'chenko, M. V.; Vasil'eva, L. V.; Zavarzin, G. A.; Savel'eva, N. D.; Lysenko, A. M.; Mityushina, L. L.; Khmelenina, V. N.; Trotsenko, Y. A. (1996): A novel psychrophilic methanotroph of the genus *Methylobacter*. Mikrobiologiya 65: 384-389.

Pace, N. R.; Stahl, D. A.; Lane, D. J.; Olsen, G. (1986): The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. Adv. Microb. Ecol. 9: 1-55.

Pacheco-Oliver, M.; McDonald, I. R.; Groleau, D.; Murrell, J. C.; Miguez, C. B. (2002): Detection of methanotrophs with highly divergent pmoA genes from Arctic soils. FEMS Microbiol. Letters 209: 313-319.

Patt, T. E.; Cole, G. C.; Bland, J.; Hanson, R. S. (1974): Isolation and characterization of bacteria that grow on methane and organic compounds as sole sources of carbon and energy. Journal of Bacteriology 120 (2): 955-964.

Pester, M.; Friedrich, M. W.; Schink, B.; Brune, A. (2004): *pmoA*-based analysis of methanotrophs in a littoral lake sediment reveals a diverse and stable community in a dynamic environment. Appl. Environ. Microbiol. 70 (5): 3138-3142.

Petri, R. (2000): Diversität nitratreduzierender Bakteriengemeinschaften in den Sedimenten der Ostsee. Dissertation, Universität Kiel.

Picard, C.; Ponsonnet, C.; Paget, E.; Nesme, X.; Simonet, P. (1992): Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain reaction. Appl. Environ. Microbiol. 58 (9): 2717-2722.

Ponnamperuma, F. N. (1972): The chemistry of submerged soils. Adv. Agron. 24: 29-96.

Priemé, A.; Sitaula, J. I. B.; Klemedtsson, A. K.; Bakken, L. R. (1996): Extraction of methane-oxidizing bacteria from soil particles. FEMS Microbiol. Ecol. 2: 59-68.

Qiu, X. Y.; Wu, L. Y.; Huang, H. S.; McDonel, P. E.; Palumbo, A. V.; Tiedje, J. M.; Zhou, J. Z. (2001): Evaluation of PCR-generated chimeras: Mutations, and heteroduplexes with 16S rRNA gene-based cloning. Appl. Environ. Microbiol. 67: 880-887.

Radajewski, S.; Ineson, P.; Parekh, N. L.; Murrell, J. C. (2000): Stable isotope probing as a tool in microbial ecology. Nature 403: 646-649.

Rajbanshi, S. S.; Benckiser, G.; Ottow, J. C. G. (1992): Effects of concentration, incubation temperature and repeated applications on degradation kinetics of dicyandiamide (DCD) in soils. Biol. Fertil. Soils 13: 61-64.

Rajbanshi, S. S. (1993): Einfluß unterschiedlicher ökologischer Bedingungen auf die Mineralisationskinetik und Persistenz des Nitrifikationshemmstoffes Dicyandiamid in Böden. Dissertation, Gießen.

Rasmussen, R. A.; Khalil, M. A. K. (1984): Atmospheric methane in the recent and ancient atmospheres: Concentrations, trends, and interhemispheric gradient. J. Geophys. Res. 89 (11): 599-605.

Reasoner, D. J.; Geldreich, E. E. (1985): A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. Appl. Environ. Microbiol. 49 (1): 1-7.

Reeburgh, W. S.; Whalen, S. C.; Alperin, M. J. (1993): The role of methylotrophy in the global methane budget. *In:* Murrell, J. C.; Kelley, D. P. (Hrsg): Microbial growth on C1 compounds, Andover, United Kingdom, S. 1-14.

Reynolds, E. S. (1963): The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. J. Cell. Biol. 17: 208-213.

Reysenbach, A. L.; Giver, L. J.; Wickham, G. S.; Pace, N. R. (1992): Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. Appl. Environ. Microbiol. 58 (10): 3417-3418.

Romanovskaya, V. A.; Malashenko, Y. R.; Bogachenko, V. N. (1978): Corrected diagnoses of the genera and species of methane-utilizing bacteria. Microbiology (Moscow) 47: 96-103.

Romanovskaya, V. A.; Malashenko, Y. R.; Grishchenko, N. I. (1981): Diagnosis of methane-oxidizing bacteria by numerical methods based on cell fatty acid composition. Mikrobiologiya 49: 762-764.

Rosado, A. S.; Duarte, G. F.; Seldin, L.; van Elsas, J. D. (1998): Genetic diversity of *nifH* gene sequences in Paenibacillus azotofixans strains and soil samples analysed by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments. Appl.Environ. Microbiol. 64: 2770-2779.

Roslev, P.; King, G. M. (1994): Survival and recovery of methanotrophic bacteria starved under oxic and anoxic conditions. Appl. Environ. Microbiol. 60 (7): 2602-2608.

Roslev, P.; King, G. M. (1995): Aerobic and anaerobic starvation metabolism in methanotrophic bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 61 (4): 1563-1570.

Rowe, R.; Todd, R.; Waide, J. (1977): Microtechnique for most-probable-number analysis. Appl. Environ. Microbiol. 33 (3): 675-680.

Ruge, U.; Stach, W. (1968): Über die Schädigung von Straßenbäumen durch Auftausalze. Angew. Botanik 42: 69-77.

Ruge, U. (1977): Erdgasschäden bei Straßenbäumen. Neue Landschaft 22: 276-278.

Saiki, R. K.; Scharf, S.; Faloona, F.; Mullis, K. B.; Horn, G. T.; Erlich, H. A.; Arnheim, N. (1985): Enzymatic amplification of ß-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230: 1350-1354.

Sasser, M. (1990): MIDI technical note 101 & 102. MIDI, Newark, Del.

Schinner, F.; Sonnleitner, R. (1997): Bodenökologie: Mikrobiologie und Bodenenzymatik, III. Pflanzenschutzmittel, Agrarhilfsstoffe und organische Umweltchemikalien. Springer-Verlag, Heidelberg.

Schlichting, E., Blume, H.-P. und Stahr, K. (1995): Bodenkundliches Praktikum (Pareys Studientexte, 81), 2. Aufl., Berlin, Oxford.

Schollenberger, C. J. (1930): Effect of leaking natural gas upon the soil. Soil Science 29: 261-266.

Schönheit, P.; Keweloh, H.; Thauer, R. K. (1981): Factor F_{420} degradation in *Methanobacterium thermoautotrophicum* during exposure to oxygen. FEMS Microbiol. Lett. 12: 347-349.

Schüller, H. (1969): Die CAL-Methode, eine neue Methode zur Bestimmung des pflanzenverfügbaren Phosphates im Boden. Zeitschrift für Pflanzenernährung, Düngung und Bodenkunde 123: 48-63.

Schulte, G. (1998): persönliche Mitteilung. UFZ Leipzig-Halle GmbH, Sektion Analytik.

Schütz, H.; Seiler, W.; Conrad, R. (1989): Processes involved in formation and emission of methane in rice paddies. Biogeochemistry 7: 33-53.

Seghers, D.; Siciliano, S. D.; Top, E.M.; Verstraete, W. (2005): Combined effect of fertilizer and herbicide applications on the abundance, community structure and performance of the soil methanotrophic community. Soil Biol. Biochem. 37: 187-193.

Shannon, R. D.; White, J. R.; Lawson, J. E.; Jilmour, B. S. (1996): Methane efflux from emergent vegetation in peatlands. J. Ecol. 84: 239-246.

Sheffield, V. C.; Cox, D. R.; Lerman, L. S.; Myers, R. M. (1989): Attachment of a 40-base-pair G+C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 232-236.

Shen, R.; Yu, C.; Ma, Q.; Li, S. (1997): Direct evidence for a soluble methane monooxygenase fromType I methanotrophic bacteria: purification and properties of a soluble methane monooxygenase from *Methylomonas* sp. GYJ3. Arch. Biochem. Biophysics 345: 223-229.

Shigematsu, T.; Hanada, S.; Eguchi, M.; Kamagata, Y.; Kanagawa, T.; Kurane, R. (1999): Soluble methane monooxygenase gene clusters from trichloroethylene-degrading *Methylomonas* sp. strains and detection of methanotrophs during in situ bioremediation. Appl. Environ. Microbiol. 65 (12): 5198-5206.

Shishkina, V. N.; Trotsenko, Y. A. (1982): Multiple metabolic lesions in obligate methanotrophic bacteria. FEMS Microbiol. Lett. 13: 237-242.

Sieburth, J. M.; Johnson, P. W.; Eberhardt, M. A.; Sieracki, M. E.; Lidstrom, M. E.; Laux, D. (1987): The first methane-oxidizing bacterium from the upper mixing layer of the deep ocean: *Methylomonas pelagica* sp. nov. Curr. Microbiol. 14: 285-293.

Smalla, K.; Wachtendorf, U.; Heuer, H.; Liu, W. T.; Forney, L. (1998): Analysis of BIOLOG GN substrate utilization patterns by microbial communities. Appl. Environ. Microbiol. 64 (4): 1220-1225.

Smith, C.L.; Econome, J. G.; Schutt, A.; Klco, S.; Cantor, C. R. (1987): A physical map of the *Escherichia coli* K 12 genome. Science 236: 1448-1453.

Söhngen, N. L. (1906): Ueber Bakterien, welche Methan als Kohlenstoffnahrung und Energiequelle gebrauchen. Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten, II. Abteilung 15 (17/18): 513-517.

Starostina, N. G.; Suzina, N. E.; Pashkova, N. I.; Fikhte, B. A. (1992): Spectrum of bacteriolytic activity of a new strain of *Pseudomonas* sp. (LM 7). Applied Biochemistry and Microbiology (Moscow) 27 (4): 415-420.

Starostina, N. G.; Koshchaev, A. G.; Ratner, E. N.; Tsiomenko, A. B. (1997): Assessment of cell-surface hydrophobicity in methanotrophic bacteria by their adherence to hydrocarbons. Microbiology (Moscow) 66 (2): 151-156.

Starostina, N. G. (1999): persönliche Mitteilung. IBPM Institute for Biology and Physioloy of Microorganisms, Pushchino.

Starostina, N. G. (2000): Report on the project „consortium of psychropilic methanotrophic bacteria for biodegradation", No.: 0311553/BMBF.

Stolyar, S.; Costello, A. M.; Peeples, T. L.; Lidstrom, M. E. (1999): Role of multiple gene copies in particulate methane monooxygenase activity in the methane-oxidizing bacterium *Methylococcus capsulatus* Bath. Microbiology 145: 1235-1244.

S.I.A.B. (Studiecommissie invloed aardgas op beplantingen) (1970): Bestrijding en vorkoming van aardgasschade aan stedelijke beplantingen. SIAB-report4, The Hague.

Sukopp, H.; Wittig, R. (Hrsg.) (1993): Stadtökologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

Sullivan, J. P. ; Dickinson, D. P.; Chase, H. A. (1998): Methanotrophs, *Methylosinus trichosporium* OB3b, sMMO, and their application to bioremediation. Critical Reviews in Microbiology 24 (4): 335-373.

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

Suzuki, M. T.; Giovannoni, S. J. (1996): Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. Appl. Environ. Microbiol. 62: 625-630.

Svenning, M. M.; Wartiainen, I.; Hestnes, A: G.; Binnerup, S. J. (2003): Isolation of methane oxidising bacteria from soil by use of a soil substrate membrane system. FEMS Microbiol. Ecol. 44: 347-354.

Syamsul Arif, M. A.; Houwen, F.; Verstraete, W. (1996): Agricultural factors affecting methane oxidation in arable soil. Biol. Fertil. Soils 21: 95-102.

Tabatabai, M. A.; Bremner, J. M. (1969): Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. Soil Biol. Biochem. 1: 301-307.

Takeda, K. (1988): Characteristics of anitrogen-fixing methanotroph, *Methylocystis* T-1. Antonie van Leeuwenhoek 54: 521-534.

Tauchnitz, H. (1997): Warum Bäume an Straßen gepflanzt werden. Stadt und Grün 7: 469-477.

Tebbe, C.; Vahjen, W. (1993): Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. Appl. Environ. Microbiol. 59 (8): 2657-2665.

Thalmann, A. (1968): Zur Methodik der Bestimmung der Dehydrogenaseaktivität im Boden mittels Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC). Landwirtschaftliche Forschung 21: 249-258.

Topp, E.; Knowles, R. (1982): Nitrapyrin inhibits the obligate methylotrophs *Methylosinus trichosporium* and *Methylococcus capsulatus*. FEMS Microbiol. Lett. 14: 47-49.

Topp, E.; Knowles, R. (1984): Effects of nitrapyrin [2-chloro-6-(trichloromethyl)pyridine] on the obligate methylotroph *Methylosinus trichosporium* OB3b. Appl. Environ. Microbiol. 47: 248-262.

Trotsenko, Y. A.; Khmelenina, V. N. (2005): Aerobic methanotrophic bacteria of cold ecosystems. FEMS Microbiol. Ecol. 53: 15-26.

Tsai, Y. L.; Olsen, B. H. (1991): Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. Appl. Environ. Microbiol. 57 (4): 1071-1074.

Tsai, Y. L.; Olsen, B. H. (1992): Detection of low numbers of bacterial cells in soils and sediments by polymerase chain reaction. Appl. Environ. Microbiol. 58 (2): 754-757.

Tsien, H. C.; Brusseau, G. A.; Wackett, L. P.; Hanson, R. S. (1989): Biodegradation of trichloroethylene by *Methylosinus trichosporium* OB3b. Appl. Environ. Microbiol. 58: 3155-3161.

Tsuji, K.; Tsien, H. C.; Hanson, R. S.; de Palma, S. R.; Scholtz, R.; LaRoche, S. (1990): 16S ribosomal RNA sequence analysis for determination of phylogenetic relationships among methylotrophs. J. Gen. Microbiol. 136: 1-10.

Vallaeys, T.; Topp, E.; Muyzer, G.; Macheret, V.; Laguerre, G.; Rigaud, A.; Soulas, G. (1997): Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16 S rDNA sequence variation in rhizobia and methanotrophs. FEMS Microbiol. Ecol. 24: 279-285.

VDLUFA Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (1997): Methodenbuch Band I. Die Untersuchung von Böden.- 1. (1991) und 2. (1997) 4. Aufl., Darmstadt.

Vecherskaya, M. S.; Galchenko, V. F.; Sokolova, E. N.; Samarkin, V. A. (1993): Activity and species composition of aerobic methanotrophic communities in tundra soils. Current Microbiology 27: 181-184.

Wallis, M. (1995): Methane emissions in the UK: Report of Watt Comittee on energy. Energy Policy 23: 244-245.

Wang, J. G.; Bakken, L. R. (1998): Screening of soil bacteria for poly-beta-hydroxybutyric acid production and its role in the survival of starvation. Microb. Ecol. 35: 94-101.

Wang, G. C. Y.; Wang, Y. (1996): The frequency of chimeric molecules as a consequence of PCR co-amplification of 16S rRNA genes from different bacterial species. Microbiology 142: 1107-1114.

Ward, D. M.; Weller, R.; Bateson, M. M. (1990): 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. Nature 345: 63-65.

Watanabe, F.S.; Olsen, S.R. (1965): Test of an ascorbic acid method for determining phosphorus in water and Nabicarbonate extracts from soil. Soil Science Society of America, Proceedings 29: 677-678.

Weiske, A. (2001): Einfluß der Nitrifikationsinhibitoren 3,4-Dimethylpyrazolphosphat (DMPP) und 4-Chlor-3-Methylpyrazol (CIMP) im Vergleich zu Dicyandiamid (DCD) auf die N_2O- und CO_2-Emissionen sowie auf die Methanoxidation vom Boden in einem 3jährigen Feldversuch. Dissertation, Universität Gießen.

Wendlandt, K.-D. (1979): Grundlagenuntersuchung zur mikrobiellen Eiweißsynthese aus Methan/Erdgas. Dissertation, Akademie der Wissenschaften der DDR.

Wendlandt, K.-D.; Jechorek, M.; Helm, J.; Stottmeister, U. (1998): Production of PHB with a high molecular mass from methane. Polym. Degrad. Stabil. 59: 191-194.

Wendlandt, K.-D.; Jechorek, M.; Helm, J.; Stottmeister, U. (2001): Production of poly-3-hydroxybutyrate with a high molecular mass from methane. J. Biotechnol. 86: 127-133.

Wendlandt, K.-D.; Geyer, W.; Mirschel, G.; Al-Haj Hemidi, F. (2005): Possibilities for controlling a PHB accumulation process using various analytical methods. J. Biotechnol. 117: 119-129.

Whalen, S. C.; Reeburgh, W. S.; Sandbeck, K. A. (1990): Rapid methane oxidation in a landfill cover soil. Appl. Environ. Microbiol. 56 (11): 3405-3411.

Whittenbury, R.; Krieg, N. R. (1984): Family IV. Methylococcaceae. S. 256-261. *In* Krieg, N. R.; Holt, J. G. (Hrsg.): Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.

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

Whittenbury, R.; Davies, S. L.; Davey, J. F. (1970b): Exospores and cysts by methane-utilizing bacteria. J. Gen. Microbiol. 61: 219-226.

Wilfinger, W. W. (1997): Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. BioTechniques 22 (3): 474-481.

Wintzingerode, F. von; Göbel, U. B.; Stackebrandt, E. (1997): Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. FEMS Microbiol. Rev. 21: 213-229.

Wise, M. G.; McArthur, J. V.; Shimkets, L. J. (1999): Methanotroph diversity in landfill soil: Isolation of novel type I and type II methanotrophs whose presence was suggested by culture-independent 16S ribosomal DNA analysis. Appl. Environ. Microbiol. 65: 4887-4897.

Wise, M. G.; Mcarthur, J. V.; Shimkets, L. J. (2001): *Methylosarcina fibrata* gen. nov., sp. nov. and *Methylosarcina quisquiliarum* sp. nov., novel type I methanotrophs. Int. J. Syst. Evolut. Microbiol. 51: 611-621.

Wünsche, L.; Babel, W. 81996): The suitability of the Biolog automated microbial identification system for assessing the taxonomical composition of terrestrial bacterial communities. Microbiol. Res. 151: 133-143.

Zhao, S. J.; Hanson, R. S. (1984): Variants of the obligate methanotroph isolate 761M capable of growth on glucose in the absence of methane. Appl. Environ. Microbiol. 48 (4): 807-812.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. U. Stottmeister möchte ich für die Arbeitsmöglichkeiten am UFZ, Leipzig, die Überlassung des Themas und das entgegengebrachte Vertrauen in den Fortgang der Arbeit danken.

Frau Prof. Dr. I. Röske danke ich für die freundliche Bereitschaft zu Begutachtung der Arbeit und die wissenschaftliche Einbindung an die Technische Universität Dresden.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. K.-D. Wendlandt für die sehr gute fachliche Betreuung, konstruktiven Anregungen und Hinweise zur Anfertigung der Arbeit und die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Herrn Dr. G. Schulte danke ich für die intensive Einbindung in das Projekt, die gute Zusammenarbeit und Überlassung zahlreicher bodenbezogener Daten.

Frau Dr. habil. E.-M. Klimanek möchte ich für die spontane Bereitschaft zur Übernahme des Gutachtens und die Überlassung der Bodenenzymaktivitätsdaten danken.

Frau Dr. Starostina sei gedankt für die herzliche Aufnahme in ihrem Labor am IBPM in Pushchino und die Hinweise zur Isolierung Methanotropher.

Bei Herrn Dr. Nitzsche, Institut für Nichtklassische Chemie an der Universität Leipzig, möchte ich mich für die Bestimmung der Isotopensignatur bedanken.

Für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen danke ich Herrn Dr. Hoheisel, Institut für Zoologie, Universität Leipzig.

Allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der AG „Methanotrophe Bakterien", insbesondere Frau Gerlind Rogge und Frau Elvira Knaak, möchte ich für die freundliche Arbeitsatmosphäre danken. Vielen Dank an die ehemaligen Mitdoktoranden der SAN, insbesondere Dr. Jana Schwarz-Linek, Dr. Matthias Beck und Dr. Uwe Kappelmeyer, für die schöne Zeit in Leipzig.

Helmholtz-Zentrum
für Umweltforschung GmbH – UFZ
Permoserstraße 15, 04318 Leipzig
Internet: www.ufz.de