Ciliaten (Protozoa, Ciliophora) des Reisfeldbodens

Dissertation

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

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg / Lahn
vorgelegt von

Mathieu Vincent Julian Schwarz

aus Bremen

Marburg / Lahn 2003

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden vom Juli 2000 bis März 2003 am Max-Planck-Institut für Terrestrische Mikrobiologie in Marburg / Lahn unter der Leitung von Prof. Dr. Peter Frenzel durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg / Lahn als Dissertation angenommen am:

Erstgutachter: Prof. Dr. P. Frenzel

Zweitgutachter: Prof. Dr. R. Thauer

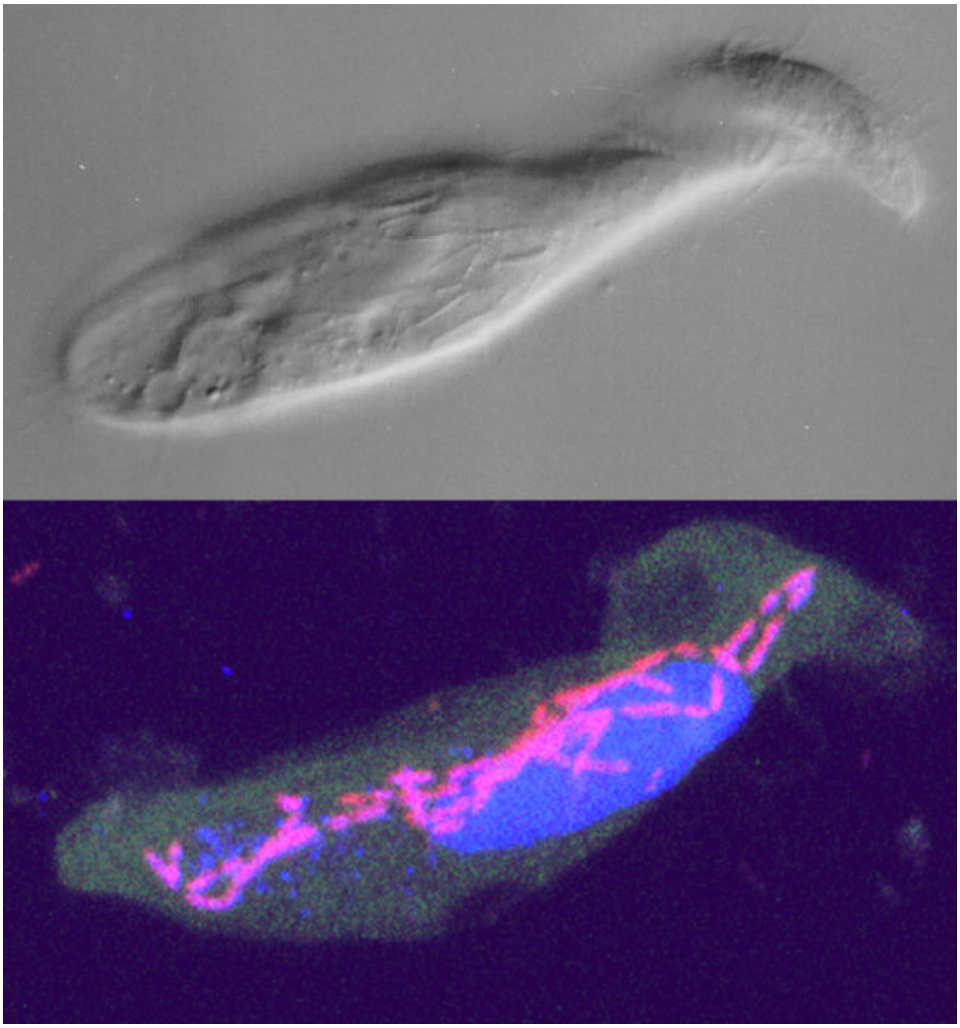
Tag der Disputation:

Ein Teil der während der Promotion erzielten Ergebnisse ist in der folgenden Publikation veröffentlicht worden (siehe Anhang A):

M.V. Julian Schwarz & Peter Frenzel (im Druck). Population dynamics and ecology of ciliates (Protozoa, Ciliophora) in an anoxic rice field soil. *Biol. Fertil. Soils*

Ciliaten (Protozoa, Ciliophora) des Reisfeldbodens

Dissertation



zur Erlangung

des Doktorgrades der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg / Lahn vorgelegt von

Mathieu Vincent Julian Schwarz

aus Bremen

Marburg / Lahn 2003

für meine Eltern und Sus

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis....IV

Tabellenverzeichnis....VI

Abkürzungen.... VII

1 Zusammenfassung....1

2 Einleitung....3

2.1 Das Ökosystem Reisfeldboden....3
2.2 Protozoen....5
2.3 Ciliaten (Protozoa; Ciliophora)....7
2.4 Zielsetzung....9

3 Material und Methoden....11

3.1 Boden....11
3.2 Chemische und physikalische Messungen....11
3.2.1 Gasmessungen....11
3.2.2 Messung organischer Säuren....11
3.2.3 Messung freier Ionen....12
3.2.4 Kolorimetrische Messung von Eisen (II)....13
3.2.5 Chemikalien....13
3.2.6 Gase....13
3.3 Versuche zur Kultivierung....14
3.3.1 Aerobe Kulturen....14
3.3.2 Anaerobe Kulturen....15
3.3.3 Kultivierte Ciliaten....16
3.3.4 Kultivierte Bakterien und Archaea....17
3.4 Bodenkerne aus einem gefluteten Reisfeld....17
3.5 Anoxische Inkubationen von Boden....18
3.6 Probennahme....19
3.6.1 Probennahme von Bodenkulturen....19
3.6.2 Elektromigrationsapparat....20
3.6.3 Analyse der Ciliatenpopulation in den anoxischen Inkubationen....22
3.6.4 Zählung der methanogenen Endosymbionten....22

3.7 Mikroskopie 23
3.7.1 Fixierungen 23
3.7.2 Färbungen mit 4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI) 24
3.7.3 Färbungen mit Fluoreszein-5-Isothiocyanat (FITC) 26
3.7.4 Färbung mit Methylgrün-Pyronin 27
3.7.5 Trockene Silbernitrat-Färbung 27
3.7.6 Protargol-Färbung 28
3.7.7 Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung (FISH) 30
4 Ergebnisse 33
4.1 Ciliatenfauna 33
4.1.1 Arteninventar des Reisfeldbodens 33
4.1.2 Populationsdynamik der Ciliaten in anoxischen Inkubationen 37
4.1.3 Biovolumina der Ciliatenpopulationen 42
4.1.4 Mikrobielle Gemeinschaft der anoxischen Inkubationen von Reisfeldboden 43
4.1.5 Interaktion der Ciliatenfauna und der mikrobiellen Gemeinschaft 46
4.1.6 Ciliatenfauna der im Feld gestochenen Bodenkerne 47
4.1.7 Ciliatenfauna der Inkubationen mit zusätzlichem Reisstroh 48
4.2 Biogeochemie 49
4.2.1 Biogeochemie der anoxischen Inkubationen 49
4.2.2 Potentieller Effekt methanogener Endosymbionten 50
4.2.3 Versuche zur Hemmung von Eukaryonten und von acetoclastischen Methanogenen 51
4.2.4 Biogeochemie anoxischer Inkubationen mit zusätzlichem Reisstroh 53
4.3 Versuche zur Kultivierung von Ciliaten 54
4.3.1 Anaerobe Kulturen 54
4.3.2 Aerobe Kulturen 54
4.4 Versuche mit FISH 54
4.4.1 Isolierung und Fixierung 54
4.4.2 Neue Sonden 55
4.4.3 Archaea in Ciliaten 55
4.4.4 Bakteria in Ciliaten 56
5 Diskussion 63
5.1 Ciliatenfauna des Reisfeldbodens 63
5.1.1 Diversität 63

5.1.2 Populationsdynamik 65
5.2 Kultivierung von Ciliaten 70
5.3 Der Elektromigrationsapparat 70
5.4 Versuche mit FISH 71
5.5 Interaktion Ciliaten – Mikrobielle Gemeinschaft 73
5.5.1 Effekte der Beweidung durch Ciliaten auf die mikrobielle Gemeinschaft 73
5.5.2 Einfluß der Ciliaten auf biogeochemische Prozeße 75
5.6 Anteil methanogener Endosymbionten an der Methanogenese 76
6 Ausblick 79
7 Literaturverzeichnis 80
8 Anhang 88

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des Reisfeldökosystems. 4

Abbildung 2.2: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Vertretern der vier wichtigsten Protozoengruppen des Bodens: 1) Gymnamoeba; 2) Thekamoeba; 3) Ciliat; 4) Flagellat; (Foissner, 1999b). 6

Abbildung 2.3: Formenreichtum und Diversität limnischer Ciliaten (Finlay, 1998). 8

Abbildung 3.1: Gasdichte Flasche mit inkubiertem Reisfeldboden (Grundaufbau). 18

Abbildung 3.2: Elektromigrationsapparat, modifiziert nach Wagener *et al.* (1986). 21

Abbildung 4.1: Cluster-Analyse (Oben: Single / Unten: Average Linkage Cluster-Analyse) der Ciliatenfauna in anoxischen Inkubationen. In beiden Analysen wurden vergleichbare Cluster (Markiert in den gleichen Farben) gefunden. 40

Abbildung 4.2: Abundanzen der Ciliaten (**a**), Diversität nach dem Shannon-Wiener-Index (**b**) und mittleres Individualvolumen der Ciliaten (**c**) in den anoxischen Inkubationen. Die logarithmische Zeitachse dient der besseren Darstellung der Dynamik der ersten Wochen. 41

Abbildung 4.3: Ciliatenvolumen in μm^3 pro gTG Boden (**b,** logarithmische Auftragung) und Anteil der Gattung *Metopus* am Gesamtvolumen [%] (**a**) in den anoxischen Inkubationen. Die logarithmische Zeitachse dient der besseren Darstellung der Dynamik der ersten Wochen. 42

Abbildung 4.4a: Mikrobielle Abundanzen nach DAPI-Färbung (logarithmische Auftragung). Die logarithmische Zeitachse dient der besseren Darstellung der Dynamik der ersten Wochen. 43

Abbildung 4.4b: Verteilung der mittleren mikrobiellen Biovolumina gemessen an je 18 Stapelbildern pro Meßtag. Untersucht wurden die Biovolumina an Tag 4 und Tag 80 nach einer FITC-Färbung. Jedes Stapelbild enthielt zwischen 34 und 345 mikrobiellen Zellen. 44

Abbildung 4.5a: *Metopus palaeformis* im differentiellen Interferenz-Kontrast nach Nomarski (**a**) und unter UV-Anregung (**b**). Der Pfeil weist auf eine Ansammlung F_{420}-Autofluoreszenz zeigenden Stäbchen. Maßstab: 10 µm 45

Abbildung 4.5b: Vorkommen aktiver Methanogener im Cytoplasma (weißer Pfeil) und den Nahrungsvakuolen (gelber Pfeil) von *Metopus inversus* unter F_{420}-Autofluoreszenz. Bildausschnitt: 100 · 100 µm. MA – Makronukleus 46

Abbildung 4.6: Zeitlicher Verlauf des gesamten Ciliatenvolumens (**a**, logarithmische Auftragung), der mikrobielle Zellzahlen und Volumina (**c**, logarithmische Auftragung) und dem Quotient beider Volumina (**b**). Die logarithmische Zeitachse dient der besseren Darstellung der Dynamik der ersten Wochen. 47

Abbildung 4.7: Entwicklung von Fe^{2+}, SO_4^{2-} und CH_4. Die logarithmische Zeitachse dient der besseren Darstellung der Dynamik der ersten Wochen. 49

Abbildung 4.8: Potentieller Beitrag methanogener Endosymbionten (Modell 1 und 2) von *Metopus* sp. zur gesamten Methanogenese. Die logarithmische Zeitachse dient der besseren Darstellung der Dynamik der ersten Wochen. Die ersten zwei Wochen werden zusätzlich in höherer Auflösung (logarithmisch) dargestellt. 51

Abbildung 4.9: Zunahme der Methankonzentration in den Hemmversuchen; CH_3F – Hemmung der acetoclastischen Methanogenese; Euk. hemm. – Hemmung von Eukaryonten mit Colchicin und Cycloheximid. 52

Abbildung 4.10: Zunahme der Kohlendioxidkonzentration in den Hemmversuchen; CH_3F – Hemmung der acetoclastischen Methanogenese; Euk. hemm. – Hemmung von Eukaryonten mit Colchicin und Cycloheximid. 52

Abbildung 4.11: Methankonzentrationen in anoxischen Inkubationen ohne und mit zusätzlichem Reisstroh. Die logarithmische Zeitachse dient der besseren Darstellung der Dynamik der ersten Wochen. 53

Abbildung 4.12: Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung von *Metopus es*; **a**: Grün – ARCMix-FLUOS, **b**: Rot – α-*Proteobacteria*-Cy3, **c**: Blau – EubMix-Cy5, **d**: DAPI, **e**: Projektion aus **a** – **c**; Bildausschnitt: 157 · 157 µm; Die Abbildung **e** zeigt die helle Autofluoreszenz der Ciliaten und die Differenz zwischen DAPI und FISH Signalen. Die Anzahl der DNS-enthaltenden Strukturen (Abb. 4.12d) ist dabei höher als die der mit FISH detektierten Signale. 57

Abbildung 4.13: Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung von *Metopus es*; **a**: Grün – ARCMix-FLUOS, **b**: Rot – EubMix-Cy3, **c**: Blau – α-*Proteobacteria*-Cy5, **d**: Projektion aus **a** – **c;** Bildausschnitt: 157 · 157 µm; Die gelben Pfeile weisen auf Archaea, die weißen auf Bakteria hin. Die Abbildung zeigt die Verteilung der verschiedenen Zellen im Ciliaten. Nicht alle Zellen sind dabei einwandfrei in Nahrungsvakuolen lokalisierbar. Weitere Details der Abbildung werden in Abb. 4.14 hervorgehoben. 58

Abbildung 4.14: Detailvergrößerung aus Abb 4.13; **a**: Grün – ARCMix-FLUOS, **b**: Rot – EubMix-Cy3, **c**: Blau – α-*Proteobacteria*-Cy5, **d**: DAPI, **e**: Projektion aus **a** – **c**; Balkenlänge (**e**): 14 µm; Die gelben Pfeile weisen auf Archaea, die weißen auf Bakteria hin. Diese Vergrößerungen aus *Metopus es* zeigen die unterschiedlicheVerteilung der hybridisierten Zellen gegenüber den DAPI-Signalen. Das FISH-Signal wird dabei nur selten vom DAPI-Signal bestätigt. 59

Abbildung 4.15: Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung von *Metopus es*: geplatzte Zelle; **a**: Grün – ARCMix-FLUOS, **b**: Rot – EubMix-Cy3, **c**: Blau – MB310-Cy5, **d**: Projektion aus **a** – **c, e**: Vergrößerung aus **d**; Bildausschnitt: **a - d**: 156 · 156 µm, **e**: 48 · 48 µm; Die gelben Pfeile weisen auf Archaea, die weißen auf Bakteria hin. Archaea wurden nur außerhalb oder innerhalb geplatzter Ciliaten hybridisiert. Die Form der Archaea legt nahe, daß sie mit denen in DAPI-Färbungen (z.B. Abb. 4.13d) sichtbaren Strukturen identisch sind. 60

Abbildung 4.16: Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung von *Metopus palaeformis*; **a**: Grün – ARCMix-FLUOS, **b**: Rot – Eub 338-Cy3, **c**: Blau – α-*Proteobacteria*-Cy5, **d**: DAPI, **e**: Projektion aus **a** – **c**; Bildausschnitt: 80 · 80 µm, **f**: Detail aus **e**, 40 · 40 µm; Ca. 5 · 1 µm große, kettenbildende α-*Proteobacteria* waren im vorderen Zellabschnitt (rechte obere Ecke) deutlich zu erkennen. Im hinteren Zellabschnitt sind Nahrungsvakuolen mit Bakteria-Signalen, sowie vereinzelte Archaea-Signale im Cytoplasma erkennbar. 61

Abbildung 4.17: **a**: Endobionten in *M. palaeformis* im differenziellen Interferenz-Kontrast nach Nomarski (130 · 30 µm). Die gelben Pfeile markieren eine gefüllte Nahrungsvakuole (**a** und **b**); **c**: *M. palaeformis*-Zellen nach DAPI-Färbung (Blau) und Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung (120 · 26 µm) mit α–*Proteobacteria*-spezifischer Oligonukleotid-Sonde (Rot). Die starke Autofluoreszenz der Ciliatenzelle ist in Grün dargestellt. Die α–*Proteobacteria* (Stäbchen) sind durch weiße Pfeile markiert. Das DAPI-Signal zeigt deutlich den große Makronukleus (MA) und eine Nahrungsvakuole (gelber Pfeil) markiert. 62

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Details zum Hochdruckflüssigkeitschromatographen. 12

Tabelle 3.2: Details zum verwendeten Ionenchromatographen. 12

Tabelle 3.3: Zur Einstellung der Stringenz des Waschpuffers nötige Zugabe von 4,5 M NaCl-Lösung bei verschiedenen Formamidkonzentrationen im Hybridisierungspuffer bzw. in 40 ml Waschpuffer. Nach Aßmus (1996). 31

Tabelle 3.4: Neu erstellte Oligonukleotid-Sonden. 32

Tabelle 4.1: Ciliatenfauna (Protozoa, Ciliophora) der Inkubationen von geflutetem Reisfeldboden. 34

Tabelle 4.2: Ciliaten (Protozoa, Ciliophora) des Reisfeldbodens: Anteile der taxonomischen Gruppen im gesamten Arteninventar und in den anoxischen Inkubationen. 37

Tabelle 4.3: Individuelle Abundanzen über die Zeit in anoxischen Inkubationen von Reisfeldboden. Die Taxa wurden entsprechend dem Zeitpunkt ihrer ersten maximalen Abundanz angeordnet. 39

Tabelle 4.4: Anzahl der methanogenen *Metopus*-Endosymbionten: Bestimmt anhand von F_{420}-Autofluoreszenz-Direktzählung und Berechnung aus Daten von Finlay und Fenchel (1995). 45

Tabelle 4.5: Anzahl methanogener Endosymbionten einiger Arten der Gattung *Metopus* sowie einer Art aus einem ähnlichen Ökosystem. 45

Tabelle 4.6: Ciliaten eines gefluteten Reisfeldes in Vercelli, Juni 2001. 48

Tabelle 4.7: Anzahl der mit FISH am CLSM bearbeiteten Ciliaten. 55

Tabelle 8.1: Zusammenstellung aller verwendeter Oligonukleotid-Sonden. 109

Abkürzungen

16S rDNS / rRNS-Gen	Gen der ribosomalen 16S Untereinheit bei Bakteria und Archaea
18S rDNS	Gen der ribosomalen 18S Untereinheit der Eukaryonten
ARCMix	Zusammenstellung zwei verschiedener archaea-spezifischer Oligonukleotid-Sonden
Bouin	Klassisches Fixiermedium für Ciliaten
CCAP	Culture Collection of Algae and Protozoa; Windermere, UK
CLSM	Konfokales Laser-Scanning Mikroskop (Confocal Laser Scanning Microscope)
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
EUBMix	Zusammenstellung drei verschiedener Bakteria-spezifischer Oligonukleotid-Sonden
FA	Formamid
FITC	Fluoreszein-5-Isothiocyanat
FISH	Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung
FLUOS	Fluoreszein (Fluoreszenz-Farbstoff)
gTG	g Trockengewicht
gFG	g Frischgewicht
w/v	Gewicht pro Volumen (weight per volume)
MPN	Most Probable Number determination (Wahrscheinlichste Keimzahl)
NFPD-Methode	Nicht geflutete Petrischalen Methode (Non-flooded Petri dish method)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PFA	Paraformaldehyd
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen (volume per volume)

1 Zusammenfassung

Reisfeldböden sind die Bodenökosysteme, die während der letzten Dekade am intensivsten studiert wurden. Dabei haben sich Reisfeldböden in den letzten Jahren als geeignetes Modellökosystem zur Untersuchung von mikrobiellen Populationen und biogeochemischen Prozessen im Boden bewährt. Der Einfluß anderer wichtiger Bodenorganismen, wie der Protozoen, wurde bisher nicht studiert. Um den Einfluß dieser Organismen auf die mikrobielle Gemeinschaft (Bakteria und Archaea) und Biogeochemie von anoxischen Reisfeldböden abschätzen zu können, wurde stellvertretend das Taxon Ciliophora Doflein, 1904 als repräsentative und häufige Gruppe der Protozoa untersucht.

In dem untersuchten italienischen Reisfeldboden wurden insgesamt 52 Taxa gefunden. Zusätzlich wurde Reisfeldboden anoxisch mit Wasser gesättigt (aber nicht geflutet), für ca. 160 Tage inkubiert. In diesen anoxischen Inkubationen wurden 23 Taxa entdeckt, wovon bisher nur 7 als obligat anaerob bekannt waren. Die anderen 16 Taxa sind als fakultativ anaerobe Taxa anzusehen. Dies zeigte, daß die Toleranz gegen anoxische Verhältnisse unter den Ciliaten des Bodens weiter verbreitet ist als bisher angenommen. Die Zellzahlen in den anoxischen Inkubationen lagen zwischen 34 und 190 Zellen gTG^{-1} Boden. Bezogen auf Zellzahlen und Biovolumenanteil dominierten in den anoxischen Inkubationen kontinuierlich Arten der obligat anaeroben Gattung *Metopus.*

Weiterhin wurde der Einfluß der Ciliatenfauna auf die mikrobielle Gemeinschaft untersucht. Dabei unterschieden sich die Verteilungen der mikrobiellen Biovolumina an zwei Meßzeitpunkten (Tag 4 und Tag 80) deutlich voneinander. An Tag 4 wurden auch größte und kleinste Zellvolumina (Volumen von 0,25 – 2,25 μm^3) gefunden. Eine solche Verteilung der Zellgrößen ist typisch für durch Protozoen beweidete Mikroorganismen. Nach 80 Tagen wurden nur mittlere Volumina gefunden (Volumen von 0,75 – 1,5 μm^3). Bestätigt wird dieses Ergebnis durch einen in den ersten 4 Tagen beobachteten negativen Quotient der mikrobiellen und der Ciliatenvolumina.

Mit Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung wurde eine bevorzugte Ingestion von Bakteria nachgewiesen. In einigen Fällen wurden jedoch auch Archaea in den Nahrungsvakuolen detektiert. Zusätzlich zu methanogenen Endosymbionten wurde in einigen Arten der Gattung *Metopus* ein weiterer den α–*Proteobacteria* zugeordneter Endobiont identifiziert. Nähere Informationen zur Physiologie des Endobionten wurden bisher nicht gefunden.

Die Bildung von Methan wurde in anoxischen Inkubationen bereits nach 24 h gemessen. Einige Details der frühen Methanogenese sind zur Zeit noch unklar. Eine mögliche Erklärung für die frühe Methanogenese sind methanogene Endosymbionten, wie sie in Ciliaten der Gattung *Metopus* gefunden wurden. Anhand von eigenen Zellzahlbestimmungen und Werten aus der Literatur (Fenchel T. und Finlay B.J. 1995: Ecology and evolution in anoxic worlds. Oxford University Press) wurden zwei Modelle zur potentiellen CH_4-Produktion der methanogenen Endosymbionten berechnet. Diese Modelle erklärten 2 bzw. 59% des in den ersten zwei Wochen gebildeten CH_4. Das erste Modell (2%) berücksichtigte am detailliertesten das untersuchte Habitat und wurde demnach bevorzugt.

Eine Hemmung von Eukaryonten mit spezifischen Inhibitoren bewirkte in anoxischen Inkubationen eine deutliche Erhöhung der CH_4-Produktion. Die Summe des zusätzlich gebildeten CH_4 war weder über den vom Inhibitor eingebrachten Kohlenstoff noch über einen Abbau lysierter Ciliatenbiomasse zu erklären. Es wurde daher eine -durch Beweidung von Ciliaten induzierte- Unterdrückung der aktiven, freilebenden Methanogenen postuliert.

Anhand der in dieser Arbeit gewonnenen Daten wurde gezeigt, daß Protozoen auch in Inkubationen anoxischen Reisfeldbodens einen deutlichen, aber zeitlich begrenzten Einfluß auf die mikrobielle Gemeinschaft und die Methanogenese haben. Berücksichtigt man, daß die Ciliaten nur eine der vier häufigsten Protozoengruppen darstellen, lassen diese Ergebnisse einen noch deutlicheren Einfluß der gesamten Protozoenfauna erwarten. Um die relative Abundanz und Diversität der gesamten Protozoenfauna abschätzen zu können, soll in einem kommenden Projekt eine molekulare Charakterisierung der Gemeinschaft auf Basis der 18S rDNS erfolgen.

2 Einleitung

2.1 Das Ökosystem Reisfeldboden

Reisfeldböden gehören zu den am intensivsten studierten Bodenökosystemen. Mehrere Aspekte machen Reisfelder zu einem interessanten Modellökosystem. So besitzen Reisfeldböden eine erstaunliche Fertilität, sind eine wichtige Nahrungsquelle (Reisanbau) und eine der wichtigsten anthropogenen Quellen für das Treibhausgas Methan (CH_4).

Man unterscheidet verschiedene Methoden der Reiskultivierung. Den Trockenreisanbau, zu dem nur Wasser aus Regenfällen verwendet wird, den Naßreisanbau, der durch gesteuerte Wasserzufuhr gleichförmig geflutet bleibt, und den Tiefwasserreisanbau, in dem Reis zumeist in Wassertiefen von über 50 cm kultiviert wird. Die Flutung bewirkt eine Unterdrückung des Wachstums anderer, nicht an anoxische Bodenverhältnisse und Überflutung angepaßter Pflanzen.

Reis wird in den Tropen und Subtropen auf einer Fläche von ca. 1,46 Mio. km^2 kultiviert. Da Reis ca. 1/3 des menschlichen Kohlenhydratbedarfes deckt, wird damit gerechnet, daß sich die Anbaufläche noch vergrößern wird (FAOSTAT, 2003). Der größte Teil (ca. 50%) wird dabei als Naßreis kultiviert (www.riceweb.org). Bei dieser Methode bleiben die Felder für fast die gesamte Wachstumsperiode geflutet, wobei deren Dauer von der geographischen und klimatischen Lage sowie der Bodengüte abhängt. Einige Zeit vor der Ernte wird das Flutungswasser abgeleitet; der Boden und die Reispflanze können durchtrocknen. In dieser Arbeit wurde, stellvertretend für andere Reisfeldböden, mit Boden von den Versuchsfeldern des Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura (ISC) aus Vercelli (Italien, Norditalien) gearbeitet. Details zu den verwendeten Methoden der Bodenbearbeitung können der Arbeit von Krüger *et al*. (2001) entnommen werden.

Die Flutung des Bodens induziert eine komplexe Abfolge biogeochemischer Prozesse und der mikrobiellen Populationen (Conrad und Frenzel, 2002). Innerhalb weniger Stunden nach der Flutung wird der Boden durch aeroben Abbau von organischem Material anoxisch. Das organische Material stammt zu diesem frühen Zeitpunkt vorwiegend von eingepflügtem Reisstroh. Durch die geringere Diffusionsgeschwindigkeit in Wasser kommt es im Boden schnell zur Limitierung von Sauerstoff. Ein geflutetes Reisfeld kann in drei Bereiche unterteilt werden: einen oxischen Teil, der Atmosphäre und Flutwassersäule umfaßt, die Übergangsphase vom oxischen in den anoxischen Bereich (Übergang von Wasser und

Sediment bzw. der Rhizosphäre) sowie den undurchwurzelten Boden, der strikt anoxisch ist (siehe Abb. 2.1).

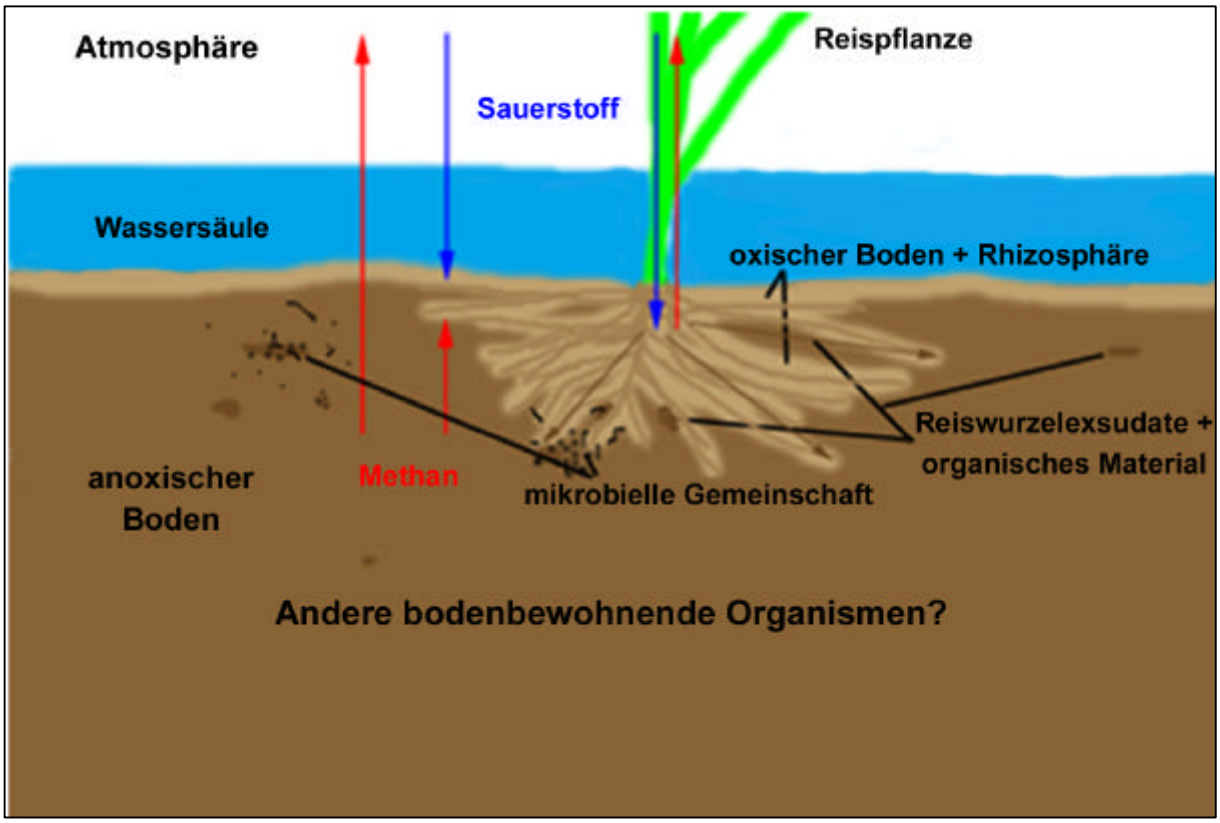


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des Reisfeldökosystems.

Direkt nach der Flutung beginnt die Phase der *sequentiellen Reduktion* (Peters und Conrad, 1996; Ponnamperuma, 1972). Dies ist eine typische Reihenfolge von aeroben und anaeroben Reduktionsprozessen verschiedener Elektronenakzeptoren ($O_2 > NO_3^- > Mn^{4+} > Fe^{3+} > SO_4^{2-}$). In Abhängigkeit von Gehalt an organischem Material etabliert sich nach einigen Tagen bis Wochen (Glissmann und Conrad, 2000) die Methanogenese als terminaler anaerober Reduktionsprozeß, welcher bis zum Ende der Kultivierungs- bzw. Flutungsphase andauert. Einige Autoren haben berechnet, daß 20% des jährlich aus anthropogenen Quellen freigesetzten CH_4 aus Reisfeldern stammt (Crutzen und Lelieveld, 2001). Alle beschriebenen Vorgänge sind eng gekoppelt an die Entwicklung und Aktivität der mikrobiellen Gemeinschaft. Der Begriff mikrobielle Gemeinschaft umfaßt in dieser Arbeit nur die Bakteria und Archaea, nicht aber Pilze oder einzellige Eukaryonten.

In Abhängigkeit von artspezifischen Substraten entwickelt sich eine Abfolge verschiedener Populationen, welche partikuläres (z.B. Reisstroh) oder gelöstes (z.B. monomere Zucker) organisches Material letztlich zu Kohlendioxid (CO_2) und Methan (CH_4) umsetzen können (Weber *et al*., 2001; Glissmann *et al*., 2001).

Die Dynamik der archaeellen Populationen in anoxischen Inkubationen wurde z.B. anhand von Änderungen in den relativen Abundanzen der 16S rRNS-Gene gezeigt (Lüders und Friedrich, 2000). Die Prozesse und die sie katalysierenden mikrobiellen Gemeinschaften sind heute sehr gut untersucht. Bei diesen Untersuchungen wurde jedoch der Aspekt der Interaktion mit höheren Bodenmikroorganismen bisher nicht berücksichtigt. So ist der Einfluß sowie die Funktion der dritthäufigsten Bodenorganismen, der Protisten oder auch einzelligen Eukaryonten, nicht bekannt. Im anoxischen Reisfeldboden kann die Bedeutung dieser Gruppe als noch höher eingestuft werden, da die zweithäufigste Gruppe der Bodenorganismen, die Pilze, im gefluteten (und anoxischen) Boden von geringer Bedeutung ist (Reichardt *et al*., 2001).

2.2 Protozoen

Als Protozoen oder Protisten werden die taxonomisch und phylogenetisch hoch diversen Gruppen der einzelligen Eukaryonten zusammengefaßt. Diese Gruppierung ist im wesentlichen historisch bedingt. Erstmals wurden Mitglieder dieser Gruppen von Antonie van Leeuwenhoek (1632 – 1723) beschrieben (Finlay und Esteban, 2001) und 1818 von G.A. Goldfuss als eigenes Taxon eingeführt. Vielfalt und taxonomische Zuordnungen dieser Gruppe basieren weitgehend auf dem *Morphospezies-Konzept* (siehe Finlay und Fenchel, 1999). Doch heute befindet sich die Taxonomie durch Verwendung geeigneter molekularer phylogenetischer Marker (z.B. 18S rRNS-Gene) in Kombination mit klassischen, auf Morphologie basierten Merkmalen in steter Revision. Einen Einblick in die Systematik liefert das Buch „Protozoology“ von Hausmann *et al.* (1996). Die globale Diversität der Protozoen ist Gegenstand intensiver und kontroverser Diskussion (z.B. Finlay und Fenchel, 1999; Foissner, 1999a).

Protozoen sind weltweit und in hoher Vielfalt in beinahe jedem Ökosystem zu finden. Hauptsächlich wird ihre Verbreitung durch den Wassergehalt des Lebensraumes limitiert (Finlay *et al*., 2000; Ekelund und Rønn, 1994). Die Ernährungsformen der Protozoen umfassen auto-, hetero-, osmo-, und phagotrophe Formen. Im Boden wird oft eine große

Diversität und Abundanz an Protozoen gefunden. Die dominantesten Gruppen (Abb. 2.2) innerhalb der Bodenprotozoen sind Gymnoamoeba, Thekamoeba, Flagellata und Ciliophora (Ekelund und Rønn, 1994; Foissner, 1998). Protozoen haben eine wichtige Funktion innerhalb der Ökosysteme. So stellen sie einen integralen Bestandteil im *microbial loop* mariner Ökosysteme (Azam *et al*., 1983) dar. Das *microbial loop*-Konzept beschreibt die Remineralisierung mikrobieller Biomasse durch Beweidung der Protozoen. Einen Überblick über das *microbial loop*-Konzept im Boden geben Coleman (1994) bzw. Clarholm (1994). Die ökologische Bedeutung wird durch neuere Ergebnisse bestätigt, die zeigen, daß Protozoen im Boden sowohl die Remineralisierungsraten (Clarholm *et al*., 2002) als auch das Wachstum von Pflanzen (Bonkowski, 2002) positiv beeinflussen.

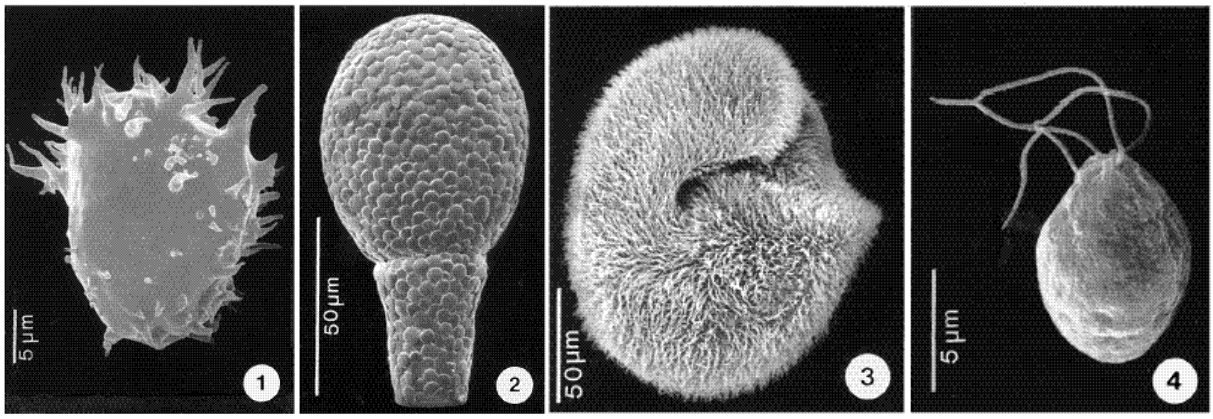


Abbildung 2.2: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Vertretern der vier wichtigsten Protozoengruppen des Bodens: 1) Gymnamoeba; 2) Thekamoeba; 3) Ciliat; 4) Flagellat; (Foissner, 1999b).

In fast allen Böden entstehen zeitweise anoxische Zonen. Die Bodenmikrofauna muß langfristig in der Lage sein, dies zu tolerieren, und es wird vermutet, daß diese Fähigkeit innerhalb der Protozoenfauna des Bodens weit verbreitet ist (Ekelund und Rønn, 1994). Über die biochemischen Grundlagen dieser Toleranzen sowie deren Ausprägung und Verbreitung innerhalb der taxonomischen Gruppen ist jedoch nur wenig bekannt.

Auf und in vielen Protozoen wurden im Laufe der letzten zwei Jahrzehnte wiederholt ekto- bzw. endosymbiontische Mikroorganismen gefunden (Görtz und Brigge, 1998). Techniken wie Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung (FISH) erlauben heute eine phylogenetische Klassifizierung dieser Zellen *in-situ* (Amann *et al*., 1991). Von der Phylogenie können häufig Rückschlüsse auf die Physiologie und die Funktion innerhalb der Wirtszelle gezogen werden. Der Begriff Symbiose bezieht sich in dieser Arbeit, sofern nicht anders vermerkt, auf die im englischen Sprachraum gebräuchliche Form. Der Begriff beschreibt das enge Zusammenleben zweier oder vieler Organismen.

2.3 Ciliaten (Protozoa; Ciliophora)

Das Taxon Ciliophora Doflein, 1904 wurde stellvertretend gewählt, um den Einfluß von Protozoen auf das anaerobe Ökosystem Reisfeldboden zu untersuchen. Diese Gruppe ist taxonomisch anhand von morphologischen Merkmalen eindeutig bis auf Artniveau identifizierbar. Dieser Punkt war wichtig, da molekulare Methoden bislang aufgrund fehlender Sequenzdaten und geringer Sequenzunterschiede nur eine eingeschränkte taxonomische Zuordnung erlauben (Bernhard *et al.*, 2001).

Unter den ersten, von A. van Leeuwenhoek beschriebenen Protozoen waren einige Ciliatenarten. Die Anzahl aller bekannten Arten inklusive parasitärer Formen wurde 1996 auf ca. 8000 (Paulin, 1996) geschätzt. Foissner (1987) listete in einem Übersichtsartikel zu den Bodenprotozoen ca. 300 Ciliatenarten auf. Seitdem wurden viele neue bodenbewohnende Arten beschrieben. Die Anzahl der heute bekannten bodenbewohnenden Ciliatenarten wird auf 800 Arten geschätzt (Foissner *et al.*, 2002). Generell zählen sie innerhalb der Protozoen zu den am besten anhand von morphologischen Merkmalen dokumentierten Gruppen. Eine Übersicht über die morphologische Vielfalt der Ciliaten gibt die Abb. 2.3 aus Finlay (1998).

Viele Ciliatenarten, insbesondere die des Bodens, sind in der Lage, auf ungünstige Umweltbedingungen mit der Bildung von Dauerstadien, sogenannter Cysten, zu reagieren. In diesen Cysten können Ciliaten längere Zeiträume überdauern und somit z.B. bei Trockenheit des Bodens überleben. Diese Fähigkeit können Ciliaten jedoch auch wieder verlieren, wie sich bei Arten des immerfeuchten Regenwaldbodens oder nach längerer Kultivierung zeigte (Foissner, 1997b). Bei den Arten des Reisfeldbodens ist jedoch davon auszugehen, daß sie durch den periodischen Wechsel von Trockenheit und Flutung hochgradig auf Cystenbildung selektiert sind.

Ciliaten wurden wiederholt als häufige Gruppe der Reisfeldfauna beschrieben (z.B. Heckman, 1979; Madoni, 1987). Dabei wurden häufig die Arten der verschiedenen Lebensräume (Wassersäule; Übergang vom Wasser zum Sediment und Rhizosphäre; anoxischer Boden; Abb. 2.1) vermischt. Von Heckman (1979) wurden 83 Arten aus einem Reisfeld in Nordost-Thailand beschrieben. Nur eine Arbeit (Foissner, 1997a) untersuchte explizit die Population terrestrischer Ciliaten. Aber auch diese Publikation (Foissner, 1997a) liefert keinerlei

Abbildung 2.3: Formenreichtum und Diversität limnischer Ciliaten (Finlay, 1998).

Informationen über die zeitliche Verteilung der Arten, deren Abundanzen sowie deren ökologischen Relevanz im Bezug auf die Biogeochemie und die mikrobiellen Populationen. Güde postulierte 1979, daß Ciliaten einen großen Einfluß auf Zusammensetzung, Morphologie und Aktivität der mikrobiellen Gemeinschaften einer Kläranlage haben. Einen direkten Einfluß der Ciliaten auf die mikrobielle Gemeinschaft durch Beweidung wurde später für aquatische Ökosysteme (Hahn und Höfle, 2001; Jürgens und Matz, 2002), aber auch für *upland* Böden nachgewiesen (Bonkowski et al., 2001; Rønn et al., 2002). Der Begriff *upland* Boden stammt aus der Bodenkunde und beschreibt häufig wasserlimitierte und oxische Böden. Für Reisfeldböden wurde diese Einflußgröße bisher noch nicht berücksichtigt und sollte mit dieser Arbeit untersucht werden.

Eine Vielzahl von Publikationen der letzten 20 Jahre beschäftigte sich mit der Symbiose von methanogenen Endosymbionten und obligat anaeroben Ciliaten. Wiederholt wurde über CH_4-Produktion von methanogenen Endosymbionten in Ciliaten berichtet (Fenchel und Finlay, 1995). Diese stammten vorwiegend aus aquatischen und marinen Habitaten (Fenchel, 1993; van Bruggen *et al*., 1983). Finlay und Fenchel (1991) isolierten einen obligat anaeroben Ciliaten (*Metopus palaeformis*) aus dem Boden einer Mülldeponie. Auch bei dieser typisch anaeroben Art des Bodens wurden aktive methanogene Endosymbionten entdeckt. Gefluteter Reisfeldboden dürfte ein ideales Habitat für obligat anaerobe Ciliaten des Bodens sein (Foissner, 1999b). Deshalb sollte zusätzlich das Vorkommen und der Anteil dieser Endosymbionten an der gesamten Bildung von CH_4 in anoxischem Reisfeldboden untersucht werden.

2.4 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, einen detaillierten Überblick über die Struktur und zeitliche Verteilung der Ciliatenpopulation in Reisfeldböden nach der Flutung zu erhalten. Dadurch soll der Einfluß dieser Gruppe stellvertretend für alle vorkommenden Protozoen abgeschätzt werden. Alle Fragestellungen beziehen sich auf anoxische Inkubationen von wassergesättigtem, unbepflanzten Reisfeldboden. Grundsätzlich beschäftigt sich diese Arbeit mit den folgenden Fragestellungen:

- Welche Ciliatenarten treten im italienischen Reisfeldboden auf?
- Wie verändert sich die Populationsstruktur der Ciliatenfauna über eine Vegetationsperiode?

- Welchen Einfluß haben Ciliaten auf die mikrobielle Gemeinschaft (Prokaryonten) des Bodens?
- Welche und wie viele Endosymbionten kommen vor?
- Welchen Anteil haben Ciliaten an der Methanogenese?
- Welche Einflußgröße stellt die Gruppe der Ciliaten stellvertretend für die Protozoengemeinschaft dar?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden über einen Zeitraum von ca. 160 Tagen die Diversität und zeitliche Verteilung der Ciliaten in anoxischen Inkubationen bestimmt. Zusätzlich wurden verschiedene Hemmversuche, z.B. mit selektiver Hemmung der Protozoenfauna, durchgeführt. Zuletzt wurde versucht, die Diversität und Anzahl von offensichtlich vorkommenden Endosymbionten durch FISH und direkte Zählungen zu bestimmen.

3 Material und Methoden

3.1 Boden

Der verwendete Boden wurde im Frühjahr 2000 aus einem Reisfeld des Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura (ISC) in Vercelli, Norditalien, entnommen. Für die Erstellung eines Arteninventars wurde zusätzlich Reisfeldboden aus dem Jahr 1998 verwendet. Bis zur weiteren Nutzung wurde der Boden an der Luft getrocknet und bei Raumtemperatur gelagert. Vor dem Einsatz wurde der Boden mit einem Backenbrecher (Typ BB1, Fa. Retsch, Hahn) zerkleinert und auf eine Partikelgröße < 2 mm gesiebt. Der Boden hat folgende Korngrößenverteilungen: >1 mm 20%, 1 – 0,2 mm 30,5% und <0,2 mm 49,5%). Details zur landwirtschaftlichen Bearbeitung des Bodens können der Arbeit von Krüger *et al.* (2001) entnommen werden. Weitere charakteristische chemische und physikalische Merkmale des Bodens werden in Holzapfel-Pschorn *et al.* (1986) und Yao *et al.* (1999) aufgeführt.

3.2 Chemische und physikalische Messungen

3.2.1 Gasmessungen

Die Veränderungen der Methan- und Kohlendioxidkonzentrationen im Gasraum der verschieden Inkubationen wurden mit Gaschromatographen (Typ 9300 A, SRI Instruments, Torrence, USA) gemessen. Das zu analysierende Gasgemisch wurde mit gasdichten Spritzen (Pressure-Lock, VICI, Baton Rouge L.A. USA) direkt aus der Gasphase der Inkubationen entnommen. Details zur Messung und dem verwendeten Gaschromatographen wurden in der Arbeit von Bodelier *et al*. (2000) beschrieben. Die Auswertung der Chromatogramme wurde mit dem Programm Peak Simple 2000 (SRI Instruments, Torrence, USA) durchgeführt.

3.2.2 Messung organischer Säuren

Organische Säuren wurden mit Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) analysiert. Aufbau der HPLC und die Messung der Proben entsprachen den Angaben von Krumböck und Conrad (1991) sowie Nüsslein *et al*. (2001). Details zu der verwendeten HPLC-Anlage können der Tab. 3.1 entnommen werden. Zu jedem Meßzeitpunkt wurde 1 ml Porenwasser aus den Inkubationen entnommen, steril filtriert (Membranfilter, Porengröße 0,2 µm, Schleicher und Schuell GmbH, Dassel) und bis zur Messung bei –20°C eingefroren. Unmittelbar vor der Analyse wurden die Proben aufgetaut, für 15 min bei 13000xg zentrifugiert (Biofuge 13, Heraeus) und der Überstand erneut steril filtriert. Zur Eichung

wurden 50 und 500 µM Multikomponentenstandards (Lactat, Formiat, Acetat, Propionat und Butyrat) verwendet. Die Auswertung erfolgte über das Programm Peak Simple 2000 (SRI-Instruments)

Tabelle 3.1: Details zum Hochdruckflüssigkeitschromatographen.

Säule	Edelstahlsäule: 300 mm; Ø 7,8 mm; Temperatur: 60°C
Trägermaterial	ORH-801 Ion-exclusion form[1)]
Säulenofen	S4110[2)]
Pumpe	SP 1000[2)]
Fließmittel	1 mM Schwefelsäure
Flußrate	0,8 ml min^{-1}
Detektoren	RI-Detektor: Erc-7512[3)] Temperatur: 40°C; UV-Detektor: UVIS 200[4)]; Wellenlänge λ = 205 nm
Autosampler	Jasco 851-AS[5)]

[1)]Interaction, Schambeck SFD GmbH, Bad Honnef; [2)]Sykam, Gilching; [3)]ERMA CR. INC, Tokoyo; [4)]Linear Instruments, Reno USA; [5)]Jasco, Japan

3.2.3 Messung freier Ionen

Zur Messung von Sulfat, Nitrat, Nitrit und anderen anorganischen Ionen wurde ein Ionenchromatograph der Firma Sykam (Gilching) verwendet. Diese Anlage bestand aus einer Pumpe S1000, einem Säulenofen S4110 mit einer Anionentrennsäule (siehe Tab. 3.2, LCA09, Sykam), einem Leitfähigkeitsdetektor S3110 zur Bestimmung aller Ionen und einem Supressorsystem S2210/S6330. Es wurde zusätzlich ein UV/VIS-Detektor (UVIS 204, Linear, USA) angeschlossen, welcher eine wesentlich genauere Bestimmung von Nitrit und Nitrat erlaubte. Die Probenaufgabe erfolgte durch einen automatischen Probenaufgeber Jasco 851-AS (Jasco, Japan). Die Auswertung der Chromatogramme wurde mit Peak Simple 2000 (SRI-Instruments, Torrence USA) durchgeführt.

Tabelle 3.2: Details zum verwendeten Ionenchromatographen.

Säule:	Edelstahlsäule, 60 mm lang, Ø 4,6 mm,
Trägermaterial	Styrol-Divinylbenzol Kopolymer, 10 µm Korngrösse
Fließmittel	3 mM Natriumhydrogencarbonat, 6 mM Natriumcarbonat
Flußrate	2 ml min^{-1}
Ofentemperatur	65°C
Detektor	UV-Detektor Linear UVIS 204, Wellenlänge λ = 218 nm

3.2.4 Kolorimetrische Messung von Eisen (II)

Die photometrische Messung von Fe^{2+} wurde nach dem Protokoll von Ratering und Conrad (1998) durchgeführt. Zur Bestimmung des mit HCl extrahierbaren Fe^{2+} wurden 0,5 g des wassergesättigten Bodens in 4,5 ml 0,5 M HCl gegeben und für 24 h bei 25°C in einem 15 ml Falcon-Tube extrahiert. Je 10 und 100 µl des Extraktes wurden in je 1 ml Ferrozin-Reagenz pipettiert. Die Ferrozin-Reagenz bestand aus 0,1% (w/v) Ferrozin ($C_{20}H_{13}N_4NaO_6S_2$) in 200 mM Hepes ($C_8H_{18}N_2O_4S$) die mit NaOH auf pH 7 eingestellt wurde. Die Mischung wurde für 2 min im Dunkeln inkubiert, kurz zentrifugiert (13000xg) und die Extinktion von 1 ml des Überstandes bei Wellenlänge λ = 562 nm gemessen (Uvikon 930 Spektrophotometer, Kontron Instruments, Neufahrn). Die Eichung erfolgte mit einer Verdünnungsreihe aus 2 mM $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$-Lösung in 0,5 M HCl.

3.2.5 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden soweit möglich im Reinheitsgrad „zur Analyse“ bezogen. Die verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bestellt:

Chroma, Münster (bzw. Waldeck GmbH & Co KG, Münster)

Cityfluor, London, UK

Difco, Augsburg

Fluka, Buchs

Merck, Darmstadt

MWG-Biotech, Ebersberg

Roth, Karlsruhe

Sigma-Aldrich, Steinheim

3.2.6 Gase

Alle verwendeten Gase wurden von Messer-Grießheim (Frankfurt a. M.) bezogen. Einzige Ausnahme bildete Methylfluorid (CH_3F; 99%) von der Firma ABCR (Karlsruhe).

3.3 Versuche zur Kultivierung

3.3.1 Aerobe Kulturen

Aerobe Bodenkultur

Das Arteninventar des Bodens wurde über Bodenkulturen nach der sogenannten „Non-flooded Petri dish"-Methode (NFPD; Foissner, 1987) erstellt. Dazu wurden 50 bis 200 g luftgetrockneter Boden in eine Petrischale geschüttet. Diese Bodenmenge ergab in Abhängigkeit vom Durchmesser der Schale eine Schichtdicke von ca. 1 bis 3 cm. Auf den Reisfeldboden wurde destilliertes Wasser gegeben, so daß er wassergesättigt, aber nicht geflutet war. Anschließend wurde der Deckel so aufgelegt, daß ein Spalt den Luftaustausch ermöglichte. Foissner (1997b) berichtet, daß die Populationsdynamik innerhalb des ersten Monats am höchsten ist. Entsprechend der Empfehlung von Foissner (1997b) wurde dieser Zeitraum besonders intensiv studiert. Proben wurden an Tag 1 bis Tag 10 täglich genommen und untersucht. Für weitere 3 Monate wurden zweimal wöchentlich Proben untersucht.

Aerobe Kultivierung von Ciliaten nach Foissner *et al.* (1991)

Die aerobe Kultivierung von Ciliaten geschah in Petrischalen. Dazu wurden 2 – 8 Weizenkörner (diese wurden vorher bei 80°C für 5 Tage im Trockenschrank gelagert, siehe Foissner *et al.*, 1991) in eine Petrischale von 12 cm Durchmesser gegeben. Eines der Körner wurde zerdrückt, um einen raschen Zugang zur Weizenstärke zu ermöglichen. Anschließend wurde die Schale mit stillem Mineralwasser (Volvic, Frankreich) aufgefüllt und 1 bis 5 ml Bodenwasser bzw. einer alten Ciliatenkultur dazugegeben. Diese Methode führt zu reproduzierbaren Resultaten, ist aber selektiv (Foissner, 1987; 1997b).

Reisstrohmedium nach R. Hemmersbach (pers. Mitteilung)

Dieses Medium wurde speziell für eine aerobe Kultur von *Paramecium biaurelia* angesetzt. Dafür wurden 1,5 l destilliertes Wasser mit 7,5 g Reisstroh für 1 h gekocht und anschließend filtriert. Dem Extrakt wurden 7,5 ml Puffer (7,8 g Tris-hydroxylethylaminomethan [Tris], 5,6 g Na_2HPO_4, 2,1 g NaH_2PO_4, 0,7 g Ethylendiamintetraessigsäure-di-Natriumsalz Dihydrat [NaEDTA] in 100 ml destilliertes Wasser) und 1 ml Stigmasterol-Lösung -0,5 g Stigmasterol ($C_{29}H_{48}O$), 100 ml Ethanol- zugegeben. Das Medium wurde abschließend für 2 h bei 121°C autoklaviert. Bis zur Verwendung wurde es bei 4°C im Kühlschrank gelagert und vor dem Überimpfen auf Raumtemperatur gebracht.

3.3.2 Anaerobe Kulturen

Mit verschiedenen Medientypen wurde versucht, anaerobe Ciliaten zu isolieren und anzureichern.

Bodenextrakt (SES) Medium nach Biagini *et al.* (1998)

In einer Flasche wurden 1 l destilliertes Wasser und 33 g gesiebter trockener Boden für 45 min (121°C) autoklaviert. Das Extrakt wurde über Nacht im Kühlschrank gelagert, am nächsten Morgen dekantiert, filtriert und erneut für 45 min unter N_2-Atmosphäre in einem Kolben nach Widdel (Glasgerätebau Ochs GmbH, Bovenden-Lenglern) autoklaviert. Danach wurde der Kolben mit N_2 begast und alle weiteren Schritte wie von Widdel und Bak (1992) beschrieben unter anoxischen Bedingungen durchgeführt. Weiterhin wurden 20 mg l^{-1} K_2HPO_4, 20 mg l^{-1} $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 200 mg l^{-1} KNO_3 hinzugefügt und der pH-Wert auf 7,2 eingestellt. Das Medium wurde anoxisch (unter N_2- oder N_2/CO_2-Atmosphäre) in eine autoklavierte und mit 0,02 bis 0,05 gTG fein zerkleinertem und autoklaviertem Reisstroh (C-Quelle) befüllte 125 ml Serumflasche gefüllt und mit sterilen Butylstopfen sowie Alu-Krimpdeckel verschlossen. Als Variante wurden einige Flaschen mit 2 bis 6 Weizenkörnern statt Reisstroh gefüllt. Die Flaschen wurden mit unterschiedlichen Volumina anoxischen Bodenwassers angeimpft.

CMV-like Medium nach Biagini *et al.* (1998)

Dieses Medium ist die Modifizierung eines zur Kultivierung von *Trimyema compressum* entwickelten Mediums (Holler und Pfennig, 1991). Es enthielt: 0,125 g l^{-1} K_2HPO_4, 0,025 g l^{-1} NH_4Cl, 0,4 g l^{-1} NaCl, 0,2 g l^{-1} $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0,15 g l^{-1} KCl und 0,25 g l^{-1} $CaCl_2 \cdot 2H_2O$. Als Pufferlösung wurden 60 ml 1 M $NaHCO_3$ hinzugegeben und der pH mit 1 M HCl oder 1 M NaOH auf 7,2 eingestellt. Auch dieses Medium wurde anoxisch und steril (siehe oben) in 125 ml Serumflaschen mit je 0,02 g Reisstroh oder Weizenkörnern abgefüllt.

CMaC Medium nach Massana *et al.* (1994)

Mit diesem Medium haben die Autoren experimentell die Rolle von Ciliaten im anaeroben Ökosystem untersucht. Das verwendete Medium bestand aus: 6 mg l^{-1} K_2HPO_4, 3 mg l^{-1} $(NH_4)_2SO_4$, 8 mg l^{-1} KCl, 4 mg l^{-1} $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 5 mg l^{-1} $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 500 mg l^{-1} $NaHCO_3$ und 36 mg l^{-1} $Na_2S \cdot 9H_2O$. Als Indikator wurde abschließend 0,5 ml Resazurin (0,1% w/v;

$C_{12}H_6NNaO_4$) in das gesamte Medium gegeben. Der pH-Wert von 7,2 wurde mit 1 M HCl or 1 M NaOH eingestellt. Das Medium wurde unter N_2-Atmosphäre autoklaviert und wie bereits oben beschrieben unter N_2/CO_2-Atmosphäre (80/20%) abgefüllt. Als Substrat wurden pro Flasche jeweils 0,02 g steriles, getrocknetes und fein zerkleinertes Roggen- bzw. Reisstroh oder ganze Weizenkörner verwendet.

SES - Bodenextrakt mit zusätzlichen Salzen nach CCAP-F (Culture Collection of Algae and Protozoa - Freshwater, CEH Windermere, Ambleside, UK)

In 660 ml destilliertem Wasser wurden 105 gTG gesiebter Boden gegeben und in einer 1 l Flasche für 15 min autoklaviert. Nach 24 h wurde der Bodenextrakt erneut für 15 min autoklaviert. Danach mußte das Extrakt für ca. 1 Woche stehen. Dann wurde es dekantiert und filtriert. Zusätzlich wurden folgende Lösungen angesetzt: a) 1 g l^{-1} K_2HPO_4; b) 1 g l^{-1} $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$; c) 10 g l^{-1} KNO_3. Von diesen drei Lösungen (a-c) wurden zuerst je 20 ml sowie 100 ml Bodenextrakt in einen Kolben (entsprechend Widdel und Bak, 1992) gegeben, mit destilliertem Wasser auf 1 l aufgefüllt, erneut unter N_2 autoklaviert und weiter verfahren wie oben beschrieben. Zuletzt wurde der pH-Wert auf 7,2 eingestellt. Als C-Quelle wurden zerkleinertes Roggenstroh oder Weizenkörner in die verwendeten Flaschen gegeben. Das Animpfen erfolgte wie oben beschrieben.

3.3.3 Kultivierte Ciliaten

Moneuplotes crassus

M. crassus wurde freundlicherweise von Jörg Ullmann, AG Prof. Dr. Klein, (Fachbereich Biologie, Genetik, Philipps-Universität Marburg) zur Verfügung gestellt. Dieses Taxon ist ein Derivat des *Moneuplotes crassus* Typ Liv1 und stammt ursprünglich aus dem Labor von Dr. P. Luporini (Camarino, Italien). *M. crassus* wurde in Meerwassermedium kultiviert und mit der marinen einzelligen Alge *Dunaliella tertiolecta* gefüttert, welche ebenfalls aus dem Labor von Dr. Luporini stammen.

Paramecium biaurelia

P. biaurelia wurde freundlicherweise von Dr. R. Hemmersbach (Institut für Luft- und Raumfahrtmedizin, Köln) zur Verfügung gestellt. Zu Beginn wurden die Ciliaten in Reisstrohmedium, später dann in Petrischalen mit Volvic und Weizenkörnern kultiviert.

Metopus es

Stamm: CCAP 1653/2, Windermere, UK

Metopus palaeformis

Stamm: CCAP 1653/3, Windermere, UK

Die beiden Metopus-Stämme wurden bei der CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa, Windermere, UK) bestellt und in die vier verschiedenen vorbereiteten Medientypen überimpft. Als C-Quelle wurden Reis- oder Roggenstroh oder Weizenkörner verwendet.

3.3.4 Kultivierte Bakterien und Archaea

Escherichia coli wurde neben *Methanobrevibacter arboriphilus, M. crassus* und *P. biaurelia* als positiv-/negativ-Kontrolle für FISH verwendet.

***Escherichia coli* JM 109**

Ca. 24 h vor der Fixierung wurde *E. coli* in frisches LB-Medium (10 g l^{-1} Bacto–Tryptone, 5 g l^{-1} Bacto–Yeast Extract und 5 g l^{-1} NaCl; mit NaOH auf pH 7 einstellen) eingebracht und bei 35°C inkubiert. 2 h vor der Fixierung wurden die Zellen abzentrifugiert und erneut in frisches LB-Medium überführt. Eine anschließende Fixierung der Zellen erfolgte entsprechend den verwendeten Protokollen (siehe unten).

Methanobrevibacter arboriphilius

M. arboriphilius wurde freundlicherweise als Reinkultur von der AG Thauer des MPI Marburg zur Verfügung gestellt.

3.4 Bodenkerne aus einem gefluteten Reisfeld

Ende Juni 2001 wurde die Ciliatenpopulation eines italienischen Reisfeldes in Vercelli untersucht. Dazu wurden aus einem Versuchsfeld Bodenkerne mit einem Stechrohr (rostfreier Stahl, innen Ø 60 mm, 200 mm lang; Eigenbau, Werkstatt, MPI Marburg) ausgestochen. Diese Kerne enthielten die obersten 100 mm des Reisfeldbodens mit dem darüber stehenden Flutwasser. Dreimal wurden jeweils 2 Parallelen gestochen und direkt vor Ort (ISC, Vercelli, Italien) untersucht. Bodenproben von ca. 3 ml wurden mit einer abgeschnittenen Spritze alle 20 mm durch seitliche Öffnungen entnommen (Frenzel *et al.*, 1990). Die Proben wurden in ein Becherglas gegeben und mit 5 bis 10 ml steril filtriertem Leitungswasser suspendiert. Aus

dem Überstand wurden nach ca. 30 s (größere Partikel hatten sich abgesetzt) Teilproben entnommen und mikroskopisch (Axioskop, Zeiss) auf Ciliaten überprüft. Anaerobe Ciliaten überlebten dieses Verfahren für bis zu 10 min. Dieser Zeitrahmen erlaubte in den meisten Fällen eine Identifizierung der Spezies anhand morphologischer Merkmale.

3.5 Anoxische Inkubationen von Boden

Reisfeldboden wurde in drei Varianten anoxisch inkubiert. Alle Variationen versuchten den natürlichen Verhältnissen im gefluteteten Boden zu folgen. Die erste Variante bestand aus Flachkulturflaschen von ca. 260 ml Volumen (Abb. 3.1). Diese wurden autoklaviert, mit je 50 gTG Boden gefüllt, mit ausgekochten und autoklavierten Butylstopfen verschlossen und diese mit Aluminiumschraubverschlüssen gesichert. Die Flaschen wurden mit durch Filter (0,2 µm, Schleicher & Schuell) geleiteten N_2 für mindestens 20 min mit Hilfe einer eingestochenen Kanüle begast. Während der Begasung wurden die Flaschen wiederholt geschüttelt, um auch die Gasphase des Bodens auszutauschen. Zuletzt wurde den Flaschen je 30 ml steriles, anoxisches (45 min, 121°C, unter N_2-Atmosphäre autoklaviertes) destilliertes Wasser zugesetzt. In Anlehnung an die NFPD-Methode wurde darauf geachtet, den Boden mit Wasser zu sättigen, aber nicht zu fluten. Dies wurde mit dem verwendeten Volumen erreicht. Die Flaschen wurden liegend bei 20°C im Dunkeln für insgesamt 163 Tage inkubiert. Pro Meßzeitpunkt (n = 25) wurden je fünf Flaschen parallel, nach der Messung der Gasphasen, beprobt.

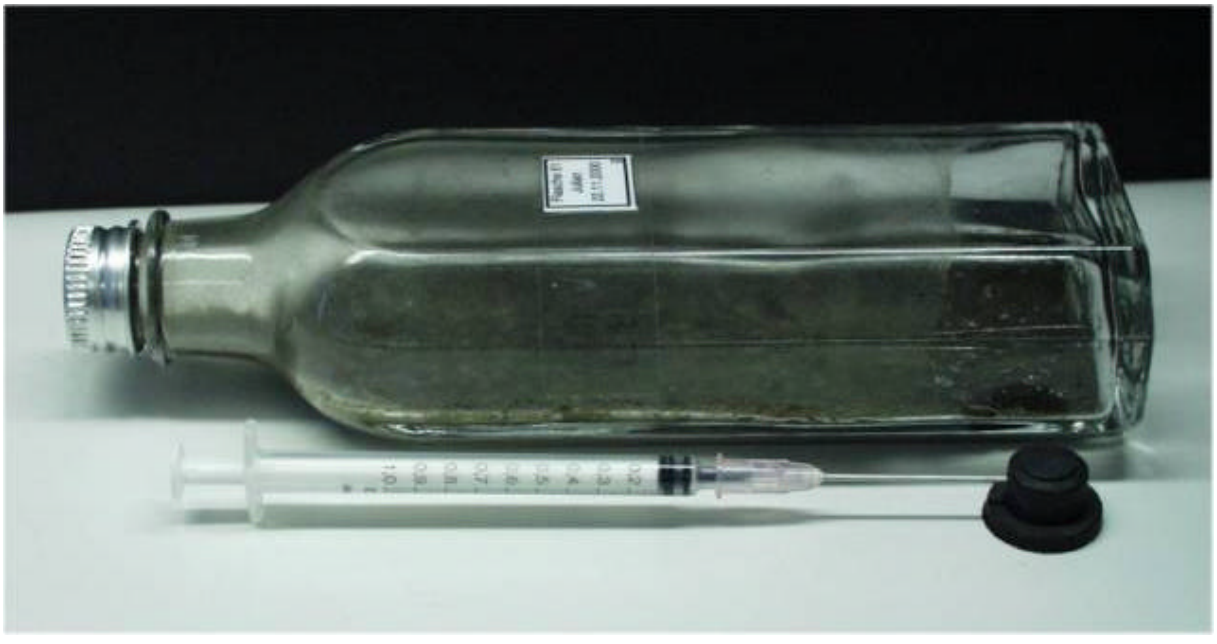


Abbildung 3.1: Gasdichte Flasche mit inkubiertem Reisfeldboden (Grundaufbau).

Als zweite Variante wurde dem Grundaufbau zusätzlich 1 gTG gehacktes Reisstroh pro 100 gTG Boden hinzugefügt. Eine Erhöhung des Anteils an partikulärem organischen Material bewirkt eine beschleunigte Reduktion von Elektronenakzeptoren (Glissmann und Conrad 2000) und eine mögliche Veränderung der Ciliatenpopulation (Verhoeven, 2001). Es wurde erwartet, daß zusätzliches Reisstroh eine Veränderung der Ciliatenpopulation und ihrer Struktur bewirken würde. Je 2 Flaschen pro Meßtag wurden zwischen Tag 32 und 75 untersucht.

In dem 3. Experiment lag der Fokus auf dem Einfluß der Ciliaten auf die CH_4-Produktion. Bei diesem Experiment wurden -im Gegensatz zu den anderen Ansätzen- anoxische Bodenaufschlämmungen untersucht. Die Variation des Inkubationsaufbaus wurde vorgenommen, da nur so die homogene Einmischung der Inhibitoren möglich war (s.u.). Für diesen Versuch wurden 125 ml Serumflaschen mit je 10 gTG Boden gefüllt und dann durch Butylstopfen und Alu-Krimpdeckel verschlossen. Die Gasphase wurde durch Begasung mit N_2 ausgetauscht. Alle Flaschen wurden mit je 10 ml sterilem, anoxischem, destillierten Wasser angeimpft. Zusätzlich wurden verschiedene Inhibitoren eingesetzt. Ohne Inhibitoren wurden 5 Flaschen als Kontrolle präpariert. Zur Hemmung der acetoclastischen Methanogenese wurde 5 Flaschen je 1% CH_3F (Methylfluorid, ABCR, Karlsruhe) zugesetzt (Frenzel und Bosse, 1996; Janssen und Frenzel, 1997). Weitere 5 Flaschen wurden mit jeweils 10 ml einer Lösung zur Hemmung von Eukaryoten angeimpft. Diese Lösung enthielt 200 mg l^{-1} Colchicin und 200 mg l^{-1} Cycloheximid. Dadurch wurde es möglich, den Einfluß der Protozoenfauna auf die CH_4-Produktion zu studieren. Außerdem wurden sechs zusätzliche Flaschen (3 mit Eukaryonten Hemmung, 3 ohne Inhibitoren als Kontrollen) präpariert. In diesen wurde am Lichtmikroskop (Axiophot II, Zeiss) die Präsens aktiver Ciliaten in je 0,5 ml Bodenwasser kontrolliert (Tag 1 bis 4 und Tag 13).

3.6 Probennahme

3.6.1 Probennahme von Bodenkulturen

Durch Schräghalten (10-35°) der Bodenkultur für ca. je 2 min sammelte sich das Bodenwasser am Rand der Petrischale. Dieses wurde mit einer Pasteur-Pipette abgezogen und auf einen Objektträger gegeben. Mit einer fein ausgezogenen Pasteur-Pipette wurden bei 10 – 40-facher Vergrößerung Ciliaten unter dem Mikrokop (Axiophot, Zeiss) aus dem Bodenwasser gepickt und in stecknadelkopfgroßen Tropfen auf neue Objektträger gegeben. Vier kleine Vaselinetropfen wurden mit einer Spritze um die Probe herum aufgegeben. Dann

wurde ein Deckglas aufgelegt und der oder die Ciliat(-en) wurden durch vorsichtiges Andrücken zwischen Deckglas und Objektträger fixiert. Weitere mikroskopische Untersuchungen berücksichtigten sowohl morphologische Merkmale wie auch andere, z.B. Bewegung (Foissner *et al*., 1991, 1999). Alle Arten wurden soweit möglich *in-vivo* und nach Färbungen (siehe unten) mit Zeichnungen, analoger und digitaler Fotografie sowie Videografie dokumentiert. Für die analoge Fotografie von Ciliaten hat sich wiederholt der hochauflösende Schwarz-Weiß-Film Kodak Technical Pan TP 135-36 (Kleffel & Aye, Frankfurt a.M.) bewährt. Der belichtete Film wurde entsprechent dem technischen Datenblatt P-255 der Firma Kodak (http://wwwde.kodak.com) mit dem Entwickler Kodak HC-110 (Kleffel & Aye, Frankfurt a. M.) in der Verdünnung D (Kodak, Technisches Datenblatt J-24) entwickelt. Für die digitale Fotografie wurde die Digitalkamera Mega Fire (INTAS, Göttingen) und für die Videografie die Kombination aus Schwarz-Weiß-Videokamera BC-2 (2/3’’-CCD, ATV Horn) und dem S-VHS Videorecorder NV-HS960 (Panasonic, Hamburg) verwendet.

Zur Bestimmung der Ciliaten wurde folgende Literatur benutzt:

Berger, 1999; Bick, 1972; Eigner, 2001 (CD-ROM); Esteban *et al*., 1995; Foissner, 1993, 1998 (und div. darin angegebene Literatur), Foissner *et al*., 1991, 1992, 1994, 1995, 1999, 2002; Jankowski, 1964; Kahl, 1926, 1927, 1930, 1931, 1932, 1935.

3.6.2 Elektromigrationsapparat

Ein Elektromigrationsapparat wurde in Anlehnung an Vorgaben von Wagener *et al*. (1986) konstruiert (Abb. 3.2) und in der Werkstatt des MPI Marburg gebaut. Zweck dieses Gerätes war es, aus Bodenwasser durch Anlegen niederer Spannungen Ciliaten zu isolieren. Dabei wird genutzt, daß Ciliaten bei artspezifischen Stromstärken beginnen, in Richtung der Anode oder Kathode zu schwimmen (Wagener *et al*., 1986; van Hoek *et al*., 1998). Dieser Apparat ermöglicht es, Ciliaten aus wässrigen Umweltproben in größerer Zellzahl zu isolieren.

Die Ciliaten wurden nach vorsichtigem Abzentrifugieren dreimal in anoxischem, sterilem Elektromigrations-Puffer (2,7 mM K_2HPO_4, 1,8 mM KH_2PO_4, 21,5 mM KCl, 20 mM NaCl, 6,1 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,5 mM L-Cystein, 0,5 mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ und 1 mM $NaHCO_3$; pH 7,5) gewaschen oder direkt im Bodenwasser in das Gerät pipettiert und durch Anlegen einer Spannung von 20 V angeregt, in Richtung Kathode zu wandern (van Hoek *et al*., 1998).

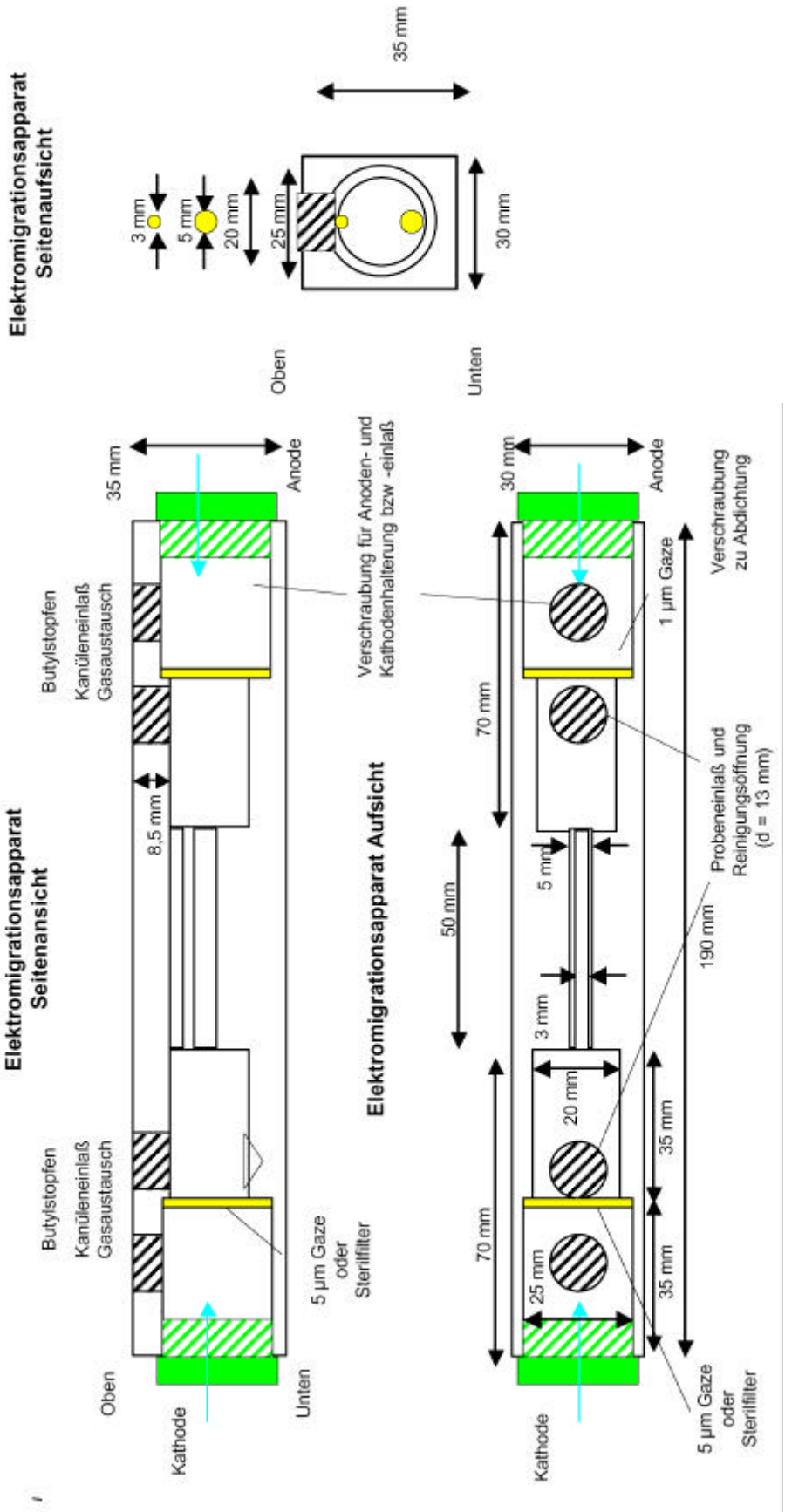


Abbildung 3.2: Elektromigrationsapparat, modifiziert nach Wagener *et al.* (1986).

3.6.3 Analyse der Ciliatenpopulation in den anoxischen Inkubationen

Die Abundanzen der einzelnen Arten wurden gemäß dem Protokoll von Finlay *et al*. (2000) bestimmt. Zu Beginn der Messung wurde in den Flaschen (Abb. 3.1) die Zusammensetzung der Gasatmosphäre analysiert.

Jede Flasche wurde für ca. 2 min leicht schräg (10 - 35°) gehalten. Dadurch sammelte sich das Porenwasser, von dem 1 ml vorsichtig durch eine Spritze und Kanüle (mit großem Innendurchmesser) abgezogen wurde. An einem Volumen von 0,5 ml wurde ein Arteninventar erstellt und die vorkommenden Taxa dokumentiert. In weiteren 0,25 µl wurden die Abundanzen gezählt (leicht modifiziertes Protokoll nach Finlay *et al*., 2000; Foissner, 1997b). Die Zählungen wurden auf normalen Objektträgern durchgeführt. Dies erlaubte, die Arten bei starken Vergrößerungen detailliert zu erfassen. In einer Zählkammer wäre dies aufgrund der optischen Eigenschaften nicht möglich.

Im Anschluß an die Zählungen wurden von jeder Inkubation 3 ml Bodenwasser abgezogen, steril filtriert und für die spätere Untersuchung mit IC und HPLC bei –20°C eingefroren. Zuletzt wurden von jeder Flasche sechsmal 1 gFG in 2 ml Plastikreaktionsgefäßen (Eppendorf, Hamburg) gegeben. Vier Plastikreaktionsgefäße wurden bei –20°C für die spätere Bestimmung von Fe^{2+} und weitere Analysen gelagert. Zwei weitere wurden mit Paraformaldehyd (siehe unten) fixiert und für spätere Zellzahlbestimmungen in ~50% (Zugabe von 1 ml) Ethanol bei –20°C gelagert. Die Inkubationen wurden täglich von Tag 1 bis 9, jeden 3 bzw. 4 Tag bis Tag 58, sowie nach 80 und 163 Tagen untersucht

Die Anzahl der Ciliaten wird in Zellen gTG $Boden^{-1}$ angegeben. Der Boden wurde in einem Gewichtsverhältnis von 5:3 mit Wasser gemischt (gesättigt) und hatte eine Dichte von 1,57 g cm^{-3}. Damit war es möglich, Zellen gTG $Boden^{-1}$ in Zellen cm^{-3} Porenwasser (1,67) oder cm^3 feuchter Boden (0,98) zu transformieren. Alle Werte werden als arithmetisches Mittel und Standardfehler angegeben.

3.6.4 Zählung der methanogenen Endosymbionten

Die Anzahl der methanogenen Endosymbionten der Ciliaten Gattung *Metopus* wurde mit zwei verschiedenen Methoden ermittelt. Die erste Methode war die direkte Zählung der Endosymbionten nach Doddema und Vogels (1978). Aktive Methanogene können leicht anhand ihrer unter UV-Licht typischen, schnell verblassenden Fluoreszenz (Wellenlänge λ =

420 nm) identifiziert werden. Diese wird auch als F_{420}-Autofluoreszenz bezeichnet und ist auf das Coenzym F_{420} zurückzuführen.

Einzelne *Metopus*-Zellen wurden unter einem Mikroskop (Axiophot mit Epifluoreszenzeinheit, Zeiss) gepickt und auf einen neuen Objektträger überführt. Auf den Bodenwassertropfen wurde ein Deckglas (24 · 24 mm^2) aufgelegt. Dann wurde auf das Deckglas leichter Druck ausgeübt, um die Zelle zum Platzen zu bringen. Von diesen geplatzten Zellen wurden unter UV-Anregung und Verwendung spezifischer Filtersätze (Zeiss 02 -G 365, FT 395, LP 420-, Zeiss) Fotos (Digital Kamera: Mega Fire, INTAS, Göttingen) gemacht, in denen sich die methanogenen Zellen als bläulich leuchtend abhoben. Die fluoreszierenden Zellen wurden nach der Einstellung von Helligkeit und Kontrast in den Fotos manuell unter Verwendung des „Crosshair Tools“ von ImageJ v.1.28 (http://rsb.info.nih.gov/ij/) gezählt.

Eine weitere Möglichkeit, die potentielle Anzahl der methanogenen Endosymbionten zu ermitteln, ergab sich aus den Daten von Fenchel und Finlay (1995). Nach diesen Autoren wurde davon ausgegangen, daß 2% der Biovolumina von *Metopus* sp. aus Volumen von Endosymbionten besteht. Auf Basis der artspezifischen Volumina der Ciliaten (siehe Tab. 4.1) konnte die Anzahl der Endosymbionten berechnet werden. Dabei wurde ein Volumen von 0,53 μm^3 pro Endosymbiontenzelle angenommen, wie es wiederholt für die Symbioten von *M. inversus* gefunden wurde.

3.7 Mikroskopie

Zur Identifikation, Zählung, Volumenbestimmung sowie physiologischer und phylogenetischer Einordnung von mikrobieller und Ciliatenpopulationen unter dem Mikroskop wurden verschiedene Fixierungen und Färbungen angewendet.

3.7.1 Fixierungen

Als Positiv- bzw. Negativkontrolle wurden bei allen Fixierungen für FISH, DAPI- und FITC-Färbungen (siehe unten) immer zusätzlich Zellen von *E. coli*, *M. arboriphilus*, *M. crassus* und / oder *P. biaurelia* separat fixiert. Nach dem Fixieren wurden die Zellen durch Zentrifugieren konzentriert und in jeweils ca. 10 µl Tropfen direkt auf SuperFrost©Plus-Objektträger oder mit Eiweißglyzerin beschichtete Objektträger gegeben. Die Proben wurden für 2-24 h bei Raumtemperatur getrocknet.

3.7.1.1 Bouin-Fixierung

Das Protokoll dieser Fixierung orientierte sich an Foissner *et al.* (1991, 1999). Die Ciliaten wurden mit Hilfe einer fein ausgezogenen Pasteur-Pipette direkt in Bouin (15 ml gesättigte Pikrinsäure, 5 ml Formalin, 1 ml Eissessig) überführt. Die Proben wurden bei einem Mischungsverhältnis von 1:1 (v/v) und bei Raumtemperatur für 30 bis 45 min fixiert. Vor dem Auftragen auf mit Eiweißglyzerin beschichtete Objekträger (z.B. Protargol- oder Silbernitrat-Färbung) wurden die fixierten Zellen durch wiederholtes Abzentrifugieren dreimal in steril filtriertem (0,2 µm) destillierten Wasser gewaschen. Für den Transfer auf SuperFrost©Plus-Objektträger war kein solcher Waschschritt nötig.

3.7.1.2 Paraformaldehyd-Fixierung (PFA)

Diese Fixierung wurde sowohl für die mikrobielle Gemeinschaft als auch für Ciliaten angewendet. Als Standard wurde eine Endkonzentration von 3% PFA in PBS-Puffer (8 g l^{-1} NaCl, 0,2 g l^{-1} KCl, 1,44 g l^{-1} Na_2HPO_4, 0,2 g l^{-1} KH_2PO_4, pH 7.2) verwendet und für 20 - 45 min bei Raumtemperatur fixiert. Die fixierten Proben wurden direkt auf die verwendeten Objektträger aufgetragen.

3.7.1.3 Ethanol-Fixierung

Die Ciliaten wurden direkt aus dem Bodenwasser gepickt, 1:1 (v/v) mit 100% Ethanol vermischt und für ca. 12 h bei 4°C fixiert. Danach wurden die Zellen durch Zentrifugation (5 min bei maximal 1500 upm) vorsichtig aufkonzentriert. Das Pallet wurde mit einer fein ausgezogenen Pasteur-Pipette direkt auf die Objektträger getropft und dort getrocknet.

3.7.2 Färbungen mit 4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI)

3.7.2.1 DAPI - Protokoll

Zur Anfärbung von DNS wurde eine Lösung mit 4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI) verwendet. Unter Anregung mit UV-Licht wurde DNS in den mit DAPI gefärbten Proben als hellblau leuchtende Struktur sichtbar.

Auf teflonbeschichtete Diagnostika-Objektträger mit 8 Feldern (Roth, Karlsruhe) wurden pro Feld 20 µl einer 1% Agaroselösung (mit niedrigem Schmelzpunkt) aufgebracht und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Nach dem Trocknen der Agarosepunkte wurden in PFA fixierte Bodenproben aufgetaut und durch Aufschütteln resuspendiert. Nach ca. 30 s

(gröberes Material konnte sich absetzen) wurden jeweils dreimal 2 µl des Überstandes entnommen und auf separate Felder der vorbereiteten Objektträger getropft. Die Proben wurden bei ca. 40°C für 2 h eintrocknen. Dann wurden die Proben durch Einbringen in Ethanol verschiedener Konzentration (50, 80, 100%) für je 5 min entwässert und an der Luft getrocknet. In 50 ml destilliertes Wasser wurden 2,4 mg DAPI gelöst und aliquotiert bei -20°C gelagert. Direkt vor der Anwendung wurde die Stammlösung im Faktor 1:500 zur Arbeitslösung verdünnt. Durch Aufbringen von je 10 µl DAPI-Arbeitslösung (pro Probenpunkt) wurde im Dunkeln für 15 – 20 min bei Raumtemperatur gefärbt. Dies fand in einer wassergesättigten Atmosphäre (z.B. in einem geschlossenen 50 ml Falcon-Tube mit wassergesätigtem Filterpapier) statt, um ein Eintrocknen zu vermeiden. Die Objektträger wurden anschließend mit eiskaltem destilliertem Wasser gespült und erneut bei ca. 40°C für 35 min im Dunkeln getrocknet. Nach dem Trocknen wurden pro Feld ca. 8 µl Anti-Fading Agens (AF1, Citifluor, London) aufgetropft und ein großes Deckglas ($24 \cdot 48$ mm^2) aufgelegt. Die Zählung gefärbter Zellen wurde bei Epifluoreszenz-Anregung unter einem Mikroskop (Leica DMR XE, Type TCS NT, Leica Microsystems AG, Heidelberg) bei 850facher Vergrößerung durchgeführt.

3.7.2.2 DAPI – Mikrobielle Abundanzen

Unter dem Mikroskop wurden die aufeinanderfolgenden Sichtfelder entlang eines Transektes gezählt. Der Transekt wurde von einer Seite der gesamten Probenfläche durch die Mitte zur anderen Seite gezogen. Die Verteilung von Zellen und Partikeln innerhalb der Probenfläche war uneinheitlich, d.h. Zellen und Partikel häuften sich entlang des äußeren Randes. Bei dieser Art der Zählung (entlang eines Transektes) besteht die Gefahr einer systematischen Unterschätzung des echten Mittels. Deshalb wurde mit der Formel 1: $\overline{X} = \frac{\sum_{i=1}^{n} Wi \cdot Xi}{\sum_{i=1}^{n} Wi}$ ein gewichtetes arithmetisches Mittel berechnet. Dabei entsprach $\overline{X}$ dem gewichteten Mittel, *Wi* dem Faktor der Gewichtung und *Xi* dem Zählwert. Das verwendete Gewicht *Wi* war proportional zum Quadrat der Radialdistanz. Diese Distanz wurde anhand der jeweiligen Anzahl von Sichtfeldern zur Mitte ermittelt. Von allen Bodenproben wurden je drei Parallelen gezählt und die gewichteten Mittelwerte der Parallelen in Zellen $\cdot$ gTG^{-1} transformiert. Dazu wurde das Volumen jeder Untermenge (2 µl), des Fixiermediums (1 ml) inklusive Porenwasser und das Trockengewicht des Bodens in 1 gFG berücksichtigt.

3.7.3 Färbungen mit Fluoreszein-5-Isothiocyanat (FITC)

3.7.3.1 FITC – Protokoll

FITC (Fluoreszein-5-Isothiocyanat) ist ein häufig angewendeter Proteinfarbstoff. Mit diesem Farbstoff wurde es möglich, zusätzlich zu einer Färbung der DNS, die proteinhaltigen Bereiche der gefärbten Zellen hervorzuheben. Die Färbung mit FITC bewirkte eine im Vergleich zur DAPI-Färbung bessere Hervorhebung des Zellvolumens.

Biovolumina der mikrobiellen Gemeinschaft wurden exemplarisch für die Meßtage 4 und 80 ermittelt. Diese zwei Tage wurden gewählt, weil an ihnen zwei stark unterschiedlich zusammengesetzte Populationen von Ciliaten gefunden wurden. Die fixierten Proben (2 µl) wurden wie bereits beschrieben auf teflonbeschichtete, mit Agarose-Feldern versehene Diagnostika-Objektträger (Roth, Karlsruhe) überführt. Nach der DAPI-Färbung wurde zusätzlich FITC verwendet. Die Präparate wurden 3 min mit der FITC-Lösung (0,5 mg FITC; 125 µl 0,5 M Na_2CO_3 und $NaHCO_2$, pH 9,6; 550 µl 0,01 M KH_2PO_4 und K_2HPO_4, pH 7,1; 550 µl 0,85% -w/v- NaCl-Lösung) gefärbt. Dann wurden sie für 10 min mit Karbonat-Bikarbonat-Puffer (0,5 M Na_2CO_3 und $NaHCO_2$, pH 9,6) und 2 min in Natrium-Pyrophosphat-Lösung (5% w/v, $Na_4P_2O_7 \cdot 10H_2O$) inkubiert. Zuletzt wurden die Objektträger mit destilliertem Wasser gespült, an der Luft getrocknet, mit Anti-Fading Agens (AF1, Cityfluor) überschichtet und mit einem Deckglas bedeckt.

3.7.3.2 Bestimmung des Biovolumen

Mit einem Convocal Laser Scanning Mikroskop (CLSM, Leica DMR XE, Type TCS NT, Leica Microsystems AG, Heidelberg) wurden 6 Stapelbilder pro Probe bei 850-facher Vergrößerung aufgenommen (Software: TCS NT Version 1.5.451, Leica Microsystems AG, Heidelberg). Jedes Stapelbild hatte eine Fläche von 80 · 80 µm (6400 μm^2). Die Tiefe variierte zwischen 4,5 und 7,8 µm. Die Anzahl der Einzelbilder pro Stapelbild (12 – 20 Stück) war abhängig von der Dicke des Präparates. Die Stapelbilder wurden mit ImageJ v. 1.27 (http://rsb.info.nih.gov/ij/) bearbeitet. Zuerst wurde der Schwellenwert gesetzt und manuell in einigen Stapelbildern die räumliche Übereinstimmung der Signale von DAPI- und FITC-Färbung überprüft. Die räumliche Übereinstimmung beider Signaturen wurde als Kriterium für das Vorkommen von Mikroorganismen angenommen. Gemäß dieses Kriteriums konnten nahezu alle gezählten Partikel als Mikroorganismen betrachtet werden. Dann wurde die Anzahl der Bakterien mit dem Hilfsprogramm „Analyse Particles“ gezählt. Jedes Stapelbild enthielt zwischen 54 und 345 Zellen. Mit einem zweiten Hilfsprogramm („Voxel Count“)

wurde das Gesamtvolumen der Mikroorganismen, basierend auf dem FITC-Signal, berechnet. Die FITC-Färbung bildete dabei das Zellvolumen besser ab als die DAPI-Färbung, die häufig nur kleinere DNS-haltige Strukturen bzw. „Kernbereiche“ anfärbte.

3.7.4 Färbung mit Methylgrün-Pyronin

Mit einer 1% Methylgrün-Pyronin-Lösung wurden die Zellkerne und Extrusome in lebenden Ciliaten angefärbt. Die Handhabung und Herstellung orientierte sich an dem Protokoll von Foissner (1991). Diese Färbung war gut geeignet, um einen Überblick über die Lage und Struktur der angefärbten Organellen zu erhalten. Die Färbung war jedoch nicht für alle Arten verwendbar (siehe Tab. 2 in Foissner, 1991).

3.7.5 Trockene Silbernitrat-Färbung

Die trockene Silbernitrat-Färbung dient der artspezifischen Anfärbung von Ciliaten. Diese Färbung ist eine Alternative zur Protargol-Färbung (siehe unten). Beide Methoden dienen dem hervorheben von Zellstrukturen wie z.B. den Kinetiden oder den Zellkernen. Die Verwendung zweier verschiedener Methoden bot sich an, da bei unterschiedlichen taxonomischen Gruppen verschiedene Affinitäten zu den Methoden bekannt waren (Foissner, 1991). Diese Methode richtete sich nach dem Protokoll von Foissner *et al.* (1991, 1999).

3.7.5.1 Trockene Silbernitrat-Färbung

In Bouin fixierte Ciliaten wurden gewaschen und durch Zentrifugation aufkonzentriert. Auf 5 - 10 gut entfettete Objektträger wurde mit der Fingerkuppe je ein kleiner Tropfen Eiweiß (Vorbehandlung, siehe unten) im mittleren Drittel ausgestrichen und ca. 1 min getrocknet. Die Ciliaten wurden in einem kleinen Tropfen auf den Eiweißkleber aufgetropft, sofort ausgestrichen und erneut getrocknet. Mit einer Pasteur-Pipette wurden dann 6 - 10 Tropfen $AgNO_3$-Lösung (1 g $AgNO_3$, 100 ml destilliertes Wasser) aufgegeben und für 1 - 2 min inkubiert. Die Lösung wurde danach mit destilliertem Wasser abgespült und das Präparat getrocknet. Mit der beschichteten Seite wurde das Präparat für 5 - 60 s in einem Abstand von 3 - 10 cm an eine 60 Watt Glühbirne gehalten. Die Proben wurden anschließend sofort für ca. 30 - 60 s durch vorsichtiges Auftropfen der Reduktions-Lösung (20 ml Komponente A: 100 ml entionisiertes Wasser mit ca 40°C, 1 g Borsäure (H_3BO_3), 1 g Borax ($B_4Na_2O_7$), 0,5 g Hydrochinon ($C_6H_6O_2$), 10 g Natriumsulfit (Na_2SO_3) und 0,25g Metol ($(CH_2NHC_6H_4OH)_2$); 1 ml Komponente B: 100 ml destilliertes Wasser, 0,4 g Metol, 5,2 g Natriumsulfit, 1,2 g Hydrochinon, 10,4 g Natriumcarbonat (Na_2CO_3), 10,4 g Kaliumcarbonat (K_2CO_3) und 0,4 g

Kaliumbromid (KBr); 1 ml Komponente C: 10 g Natriumhydroxid (NaOH), 100 ml destilliertes Wasser) überschichtet. Danach wurde die Reduktions-Lösung abgegossen und jedes Präparat für 5 - 10 s mit 250 ml Leitungswasser gespült. Die Präparate wurden dann für 5 - 10 min in 2,5% Natriumthiosulfat-Lösung (2,5 g $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$, 100 ml destilliertes Wasser) überführt, für 2 min mit 250 ml Leitungswasser gespült und dann erneut getrocknet. Abschließend wurden sie zweimal in 100% Ethanol, dann zweimal in Xylol überführt, mit Euparal (2 - 3 Tropfen) überschichtet und durch Auflegen eines großen Deckglases (24 · 48 mm^2) eingeschlossen.

3.7.5.2 Eiweißkleber

Ungefähr 24 h vor der Silbernitrat-Färbung wurde ein Ei angeschlagen und das Eigelb vom Eiweiß getrennt. Das Eigelb wurde verworfen. Das Eiweiß wurde in eine Weithalsflasche gefüllt und diese offen stehen gelassen. Bei der Anwendung 24 h später wurde mit der Fingerspitze leicht auf die angetrocknete Eiweißoberfläche getippt und der dabei anhaftende Tropfen wie beschrieben (siehe oben) auf dem Objektträger verteilt.

3.7.6 Protargol-Färbung

Ebenfalls an dem Protokoll von Foissner *et al.* (1991, 1999) orientiert sich diese Methode. Ungefähr sechs Wochen vor der Durchführung wurde das dafür benötigte Eiweißglyzerin hergestellt (siehe unten).

Diese charakteristische Färbung wurde zum hervorheben Silberprotein-sensitiver Strukturen benutzt. Ciliaten wurden wie beschrieben aufkonzentriert, fixiert (Bouin) und gewaschen. Ein Tropfen der fixierten Ciliaten wurde zusammen mit einem Tropfen Eiweißglyzerin (siehe unten) auf einem gereinigten (fettfreien) Objektträgern vermischt und ausgestrichen. Die Tropfen waren dabei unterschiedlich groß, um variierende Schichtdicken zu erhalten. Von jeder Probe wurden 8 Objektträger angefertigt (eine Serie). Gröbere Teile wie Sand, Holz, u.a. wurden entfernt. Die Objektträger wurden für ca. 2 - 12 h bei Raumtemperatur getrocknet. Diese Beschichtung war äußerst empfindlich, weshalb Fried *et al.* (2002) die Verwendung von SuperFrost©Plus Objektträgern empfahlen. Auf diese konnten die Proben ohne vorherigen Waschschritt mit der Fixierungs-Lösung aufgetragen werden. Im weiteren Vorgehen wurden immer zwei Objektträger unterschiedlicher Serien (z.B. die ersten Objektträger von Serie 1 und 2) Rücken an Rücken ins Färbebad gestellt. Dadurch wurden beide Serien gleich behandelt und die Handhabung im Färbebad erleichtert. Die Serien

wurden in einem Färbebad für ca. 20 – 30 min in 98 - 100% Ethanol eingebracht (abhängig vom Klebevermögen des Eiweißglyzerins). Danach folgten zwei Waschschritte für einmal 5 min in 70% Ethanol und zweimal 5 min in destilliertem Wasser. Währenddessen wurden 100 ml einer 0,2% (w/v) Kaliumpermanganatlösung ($KMnO_4$), 100 ml einer 2,5% (w/v) Oxalsäurelösung ($C_2H_2O_4 \cdot 2H_2O$) und eine 0,4% Protargol-Lösung angesetzt. Letztere wurde Hergestellt, in dem 0,28 g Albumosesilber für die Mikroskopie auf 70 ml destilliertes Wasser gestreut wurden. Dieses Gemisch wurde anschließend in einem Thermoschrank auf 60°C erhitzt. Das Albumosesilber löst sich bei 60°C innerhalb von 20 min. Zusätzlich wurde ein Entwickler vorbereitet (500 ml destilliertes Wasser, 7 g Borsäure (H_3BO_3), 1,5 g Hydrochinon ($C_6H_6O_2$), 10 g Natriumsulfit (Na_2SO_3) und 75 ml Aceton (C_3H_6O)). Die Objektträger wurden gleichzeitig in die Kaliumpermanganatlösung gestellt und nach folgendem Zeitplan entnommen: 30, 60, 75, 90, 105, 120, 135 und 180 s. Danach wurden sie zweimal 5 min in destilliertes Wasser gestellt. Nach diesem Waschschritt wurden sie in die Oxalsäurelösung gestellt und daraus nach 60, 120, 150, 170, 190, 210, 230 und 300 s entnommen. Anschließend wurden die Serien erneut für dreimal 3 min in destilliertem Wasser gewässert und kamen dann für 15 min bei 60°C in die Protargol-Lösung (im Wärmeschrank). Nach Ablauf der Zeit wurde die Lösung samt der Präparate dem Wärmeschrank entnommen und für 15 – 30 min auf Raumtemperatur abgekühlt. Danach wurden die einzelnen Objekträger nacheinander in ein Entwicklerbad gestellt und unter einem Mikroskop die Färbung (das Eiweiß wurde gelblich) beobachtet. War die gewünschte Färbung erreicht, wurden die Objektträger je zweimal 2 s in destilliertes Wasser eingebracht und sofort für weitere für 5 – 10 min in Fixierlösung (500 ml destilliertes Wasser, 12,5 g Natriumthiosulfat) gestellt. Die Objektträger wurden anschließend zweimal in destilliertem Wasser gespült und für 5 min in 70% Ethanol überführt. Sofort danach wurden sie nacheinander für je zweimal 5 min in 100% Ethanol bzw. Xylol gestellt. Zuletzt wurden ca. 3-5 Tropfen Euparal auf die Objektträger gegeben und durch Auflegen eines Deckglases ($24 \cdot 40$ mm^2) versiegelt. Luftblasen wurden herausgedrückt und überschüssiges Kunstharz mit Küchenkrepp entfernt. Vor der ersten Untersuchung wurden die Präparate für 48 h bei Raumtemperatur (staubgeschützt) ausgehärtet.

3.7.6.1 Eiweißglyzerin nach Foissner et al. (1991

Eiweißglyzerin hat sich als Einbettungsmedium / Kleber für Färbungen nach der Protargol-Methode wiederholt bewährt. Die Herstellung von Einweißglyzerin ist notwendig, da kommerziell erwerbbares nicht die gewünschte Haftung erzielt (Foissner *et al*., 1991). Das Eiweiß von 9 Eiern wurde in einem sauberen Erlenmeyerkolben gesammelt und das Eigelb verworfen. In einem verschlossenen Erlenmeyerkolben wurde das Eiweiß intensiv geschüttelt, bis sich ein dicker Schaum bildete. Das restliche flüssige Eiweiß wurde in einen frischen Kolben überführt und weiter geschüttelt. Alle mit Eiweißschaum gefüllten Kolben wurden für 5 – 10 min stehengelassen, bis sich eine Flüssigkeit von glyzerinartiger Konsistenz absetzte. Diese wurde gesammelt und in Verhältnis 1:1 (v/v) mit wasserfreiem Glycerin vermischt. Zusätzlich wurden 2 - 5 kleine Thymolkristalle ($C_{10}H_{14}O$) hinzugegeben und das Eiweißglyzerin im Dunkeln bei Raumtemperatur für mindestens zwei Wochen gelagert. In dieser Zeit setzte sich ein weißlicher Belag ab. Der Überstand (das fertige Eiweißglyzerin) wurde durch vorsichtiges Dekantieren von den Kristallen und dem Bodensatz getrennt. Der restliche Bodensatz wurde verworfen. Erst nach ca. 3 Wochen zusätzlichen Alterns wurde das Eiweißglyzerin verwendet. Die Lagerfähigkeit betrugt ca. 8 - 10 Wochen.

3.7.7 Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung (FISH)

3.7.7.1 FISH-Protokoll

Das verwendete Protokoll orientiert sich an den Publikationen von Fried *et al.* (2002) und Fritsche *et al.* (1999). Eine ausführliche Liste aller aus der Literatur stammenden Sonden und der verwendeten Formamid-Konzentration (FA; in %) kann dem Anhang (Tab. 8.1) entnommen werden. Bei neu entwickelten Sonden (Tab. 3.4) wurde das von Behr *et al.* (2000) verwendete „multi-probes“-Konzept angewendet. Das heißt, es wurden Sonden verwendet, die verschiedene Zielregionen auf der 16S oder 18S rRNS-Gensequenz des selben Organismus hatten. Wiederholt wurden äquimolar gemischte Sonden für den gleichen Zielorganismus aber mit unterschiedlicher Zielregion und gleicher Fluoreszenz-Makierung (z.B. von EUB338, EUB338 II und EUB338 III als EUBMix oder Arch344 und Arch914 als ARCMix) eingesetzt. Jedem Objektträger wurde ein Tropfen von parallel fixierten Zellen von *E. coli*, *M. arboriphilus*, *M. crassus* und *P. biaurelia* als Positiv- bzw. Negativkontrolle hinzugefügt.

Für Hybridisierungen wurden die speziell beschichteten Objektträger SuperFrost© Plus der Firma Menzel verwendet. Diese Objektträger erlaubten es, auf die für einige andere Färbungen -insbesondere Protargol- nötige Eiweißglyzerin-Beschichtung zu verzichten. Die Adhäsion der fixierten Zellen war am stärksten, wenn formaldehydhaltige Fixierungen (siehe oben) benutzt wurden (PFA > Bouin > Ethanol). Die fixierten Zellen wurden direkt auf die Objektträger aufgetragen und eingetrocknet. Anschließend wurden die Objektträger für dreimal 10 min in Leitungswasser gewaschen und in einer Ethanolreihe (30, 50, 80 und 100% Ethanol) für je 5 min entwässert. In diesem Zustand wurden die Objektträger teilweise für einige Tage im Dunkeln (kühl und trocken) gelagert.

Vor einer Hybridisierung wurde die Prähybridisierungslösung (2,4 g l^{-1} Tris-hydroxyl-ethylaminomethan [Tris], 2,0 g l^{-1} Natriumdodecylsulfat [SDS], 2,0 g l^{-1} Ethylendinitrilotetraessigsäure [EDTA], pH 7,4) und eine 4,5 M Natriumchlorid-Lösung vorbereitet. Jeweils 40 ml Aliquots der Lösung wurden zur Aufbewahrung in 50 ml Falcon-Tubes gefüllt und bei –20°C eingefroren. Vor jeder Hybridisierung wurde der Hybridisierungpuffer (800 µl Prähybridisierungslösung, 200 µl NaCl-Lösung, steril filtriert) vorbereitet. Das Einstellen der Formamidkonzentration erfolgte über die Werte der Tabelle 3.4. Entsprechend der Tabelle wurden auch die NaCl-Konzentration im Waschpuffer eingestellt.

Tabelle 3.3: Zur Einstellung der Stringenz des Waschpuffers nötige Zugabe von 4,5 M NaCl-Lösung bei verschiedenen Formamidkonzentrationen im Hybridisierungspuffer bzw. in 40 ml Waschpuffer. Nach Aßmus (1996)

Formamid [%] im Hybridisierungspuffer	NaCl [ml] im Waschpuffer	Formamid [%] im Hybridisierungspuffer	NaCl [ml] im Waschpuffer
0%	10,0	20%	2,0
5%	7,0	25%	1,4
10%	4,5	30%	0,9
15%	3,0	35%	0,5

Auf 100 µl Hybridisierungspuffer wurden jeweils 10 µl Probe zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte in einem liegenden Falcon-Tube für 2 h bei 46°C im Hybridisierungsofen (Hybaid Shake n Stack, Thermo Hybaid, Heidelberg). Durch ein kleines Stück befeuchtetes Filterpapier wurde das Austrocknen des Präparates verhindert. Um eine gleichmäßige Verteilung der Hybridisierungs-Lösung zu gewährleisten empfahlen Fried *et al.* (2002), ein Deckglas aufzulegen. Dies hatte jedoch den Nachteil, daß beim Abnehmen des Deckglases, Zellen abgetrennt oder zerstört wurden (eigene Beobachtung). Im Anschluß an die Hybridisierung wurden die Objektträger kurz mit warmen (48°C) Waschpuffer gespült und in

ein Falcon-Tube mit dem entsprechend vorbereiteten Waschpuffer gestellt (48°C, 15 - 20 min). Dann wurden die Objektträger für zweimal 10 s in eiskaltem destillierten Wasser gespült und bei Raumtemperatur getrocknet. Danach wurde eine DAPI-Färbung durchgeführt. Zuletzt wurden je 5 – 10 µl Anti-Fading Agens (AF1, Cityfluor, London) sowie 6 kleine Vaselinetropfen (als Deckglasfüße) aufgegeben und ein großes Deckglas (24 · 40 mm^2) aufgelegt.

Die Hybridisierungen wurden mit einem CLSM mit Argon-Krypton-Laser und UV-Laser (Leica DMR XE, Type TCS NT, Leica Microsystems AG, Heidelberg) bei 850- bis 1250-facher Vergößerung ausgewertet und in Stapelbildern dokumentiert. Als Bildbearbeitung-Software wurden TCS NT (Version 1.5.451, Leica Microsystems AG, Heidelberg), ImageJ v 1.27 und Adobe Photoshop 6 (Adobe, USA) verwendet.

Tabelle 3.4: Neu erstellte Oligonukleotid-Sonden.

Name	Sequenz (5' – 3')	Zielorganismus	*E. coli* Position[1)]	Farbstoff
Cil 768	GUUAGGGGAUCAAAGACG	Ciliophora	768 – 785	FLUOS
Mpal 194	CGAAUCGCGGAUUUUUCUGC	*Metopus palaeformis*	194 – 213	Cy3
Mpal 637	ACGGACCAUAUCCAUCCUUC	*Metopus palaeformis*	637 – 656	Cy3
Mpal 1263	ACCGAAAGGUUCGCGGUAAU	*Metopus palaeformis*	1263 - 1282	Cy3

[1)]Zielbereich im *E. coli* Genom (nach Brosius *et al*., 1978); Die Position im *E. coli*-Genom bezieht sich auf die in ARB (Stand: 12. Juni 2002) genannte. [2)]Optimale Konzentration von Formamid im Hybridisierungspuffer [%].

3.7.7.2 Oligonukleotid-Sonden

Für die Hybridisierungen wurden mit am 5'-Ende fluoreszierenden Farbstoffen gekoppelte Oligonukleotid-Sonden verwendet (Tab. 3.4; Tab. 8.1). Die Mehrzahl aller verwendeten Sonden wurde der Literatur oder der Webseite ProbeBase (http://www.microbial-ecology.net/probebase/, letzter Zugriff am 25. Juni 2003), entnommen. Alle Oligonukleotidsequenzen wurden anhand der aktuellen ARB-Datenbankversion (12. Juni 2002) überprüft. Die Sonden wurden mit den Fluoreszenz-Farbstoffen FLUOS, Cy3 oder Cy5 gekoppelt. Alle Oligonukleotide wurden von MWG-Biotech (Ebersberg) synthetisiert.

4 Ergebnisse

4.1 Ciliatenfauna

4.1.1 Arteninventar des Reisfeldbodens

Mit der NFPD-Methode wurde ein Arteninventar der Ciliatenfauna des italienischen Reisfeldbodens erstellt. Über einen Zeitraum von 3 Monaten wurde in den ersten 10 Tagen täglich und dann zweimal in der Woche die Zusammensetzung der Arten erfaßt und detailliert dokumentiert. Die regelmäßige Untersuchung des Porenwassers der anoxischen Inkubationen zeigte die Ciliaten als dominierende Protozoengruppe. Andere Protozoen wurden nur selten gefunden. Flagellaten und Gymnamoebae waren nur selten zu finden, während von Thekamoebae nur leere Schalen entdeckt wurden.

Die gefundenen Taxa der Ciliaten wurden in Tab. 4.1 aufgelistet. Insgesamt waren 52 Taxa im italienischen Reisfeldboden vertreten. Mit Taxon (Tab. 4.1) wurden die nicht näher identifizierten Arten bezeichnet, die in die entsprechenden höheren taxonomischen Gruppen eingeordnet werden konnten. Die Numerierung dieser Taxa erfolgte in der Reihenfolge ihres Auftretens in den Bodenkulturen oder den anoxischen Inkubationen. Um eine Überprüfung der beschriebenen Taxa zu ermöglichen, wurden von einigen schwierig bestimmbaren Taxa Protargol-Färbungen als Dauerpräparate angefertigt.

Aerobe Taxa dominierten die Artenliste (Tab. 4.1). Nur sieben Arten wurden anhand von Daten aus der Literatur (Foissner, 1998; Jankowski, 1964) als Anaerobier klassifiziert. In dieser Gruppe dominierte die Gattung *Metopus* mit sechs Arten und *Cirranta mobilis.* In den anoxischen Inkubationen des Reisfeldbodens wurden 23 Taxa gefunden, wobei darin die sieben genannten Anaerobier enthalten waren. Die anderen 16 bisher als Aerobier klassifizierten Taxa wurden als fakultative Anaerobier den obligat Anaeroben gegenübergestellt. Begründet wurde dies mit ihrem Vorkommen unter anoxischen Bedingungen über Zeiträume von 2 Tagen bis mehreren Wochen.

Die genaue taxonomische Zusammensetzung der Ciliatenfauna wurde in der Tab 4.2 aufgelistet. Die höchste Diversität erreichte die Gruppe Gymnostomatida (Tab. 4.2). Von allen vorkommenden Taxa entfielen 17 (33%) bzw. 10 (anoxische Inkubationen, 43%) in diese Gruppe.

Tabelle 4.1: Ciliatenfauna (Protozoa, Ciliophora) der Inkubationen von geflutetem Reisfeldboden.

Taxon	Vorkommen in anoxischen Inkubationen	obligat anaerob[1)]	methanogene Endosymbionten[2)]	Berechnung der Biovolumina[3)]	Typische Größe [µm][4)]	bevozugte Nahrung[5)]	taxonomische Gruppe[6)]
Actinorhabdos trichocystiferus Foissner, 1984	+	–	–	A	56 · 23	c	GY
Arcuospathidium vermiforme Foissner, 1984	+	–	–	A & B	140 · 18	c	GY
Blepharisma hyalinum Perty, 1852	–	–	–	C	82 · 26	b, h*	HE
Blepharisma sp	–	–	–	C	72 · 21	b*	HE
Bothrostoma cf. *undulans* Stokes, 1887	–	–	–	A	72 · 21 · 23	b, f	HE
Bryometopus sphagini (Pernard, 1922) Kahl, 1932	–	–	–	A	64 · 40 · 20	b,c,d,g*	CO
Bryophyllum tegularum Kahl, 1931	–	–	–	A	148 · 28 · 20	c,r*	GY
Chaena torrenticola Foissner, 1984	–	–	–	A	80 · 21	c	GY
Chilodonella uncinanta (Ehrenberg, 1838) Strand, 1928	–	–	–	A	40 · 21 · 20	b*	CY
Cirranta mobilis (Pernard, 1922) Jankowski, 1964	+	+	–	B & C	44 · 35 · 20	b	HE
Colpoda inflata (Stokes, 1884) Kahl, 1931	–	–	–	C	50 · 40†	b,f*	CO
Colpoda magna (Gruber, 1879) Lynn, 1978	–	–	–	A	140 · 60 · 60	b*	CO
Colpoda minima (Alekperov, 1985) Foissner, 1993	–	–	–	C	125 · 80†	b*	CO
Colpoda steinii Maupas, 1883	+	–	–	A	22 · 17 · 15	b,e,g,h*	CO
Colpodidium caudatum Wilbert, 1982	–	–	–	A & C	69 · 31	b*	NA
Cyclidium glaucoma Müller, 1773	–	–	–	C	32 · 17	b,g*	HM
Cyrtolophosis mucicola Stokes, 1885	–	–	–	C	28 · 15	b*	CO
Frontonia cf. *acuminata* Ehrenberg, 1833	–	–	–	B	45 · 12 · 8	b*	HM
Gonostomum affine (Stein, 1859) Sterki, 1878	–	–	–	A	96 · 27 · 16	b,f,s*	HY
Halteria grandinella (Müller, 1773) Dujardin, 1841	–	–	–	B	65 · 45	b,f,g*	OL

Tabelle 4.1: Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung **Tabelle 4.1**

Taxon	Vorkommen in anoxischen Inkubationen	obligat anaerob[1)]	methanogene Endosymbionten[2)]	Berechnung der Biovolumina[3)]	Typische Größe [µm][4)]	bevozugte Nahrung[5)]	taxonomische Gruppe[6)]
Hemisincirra inquieta Hemberger, 1985	+	–	–	A & B	126 · 12	b*	HY
Histroculus muscorum Kahl, 1932	+	–	–	A	98 · 42 · 23	b,f	HY
Holostichides chardezi Foissner, 1987	–	–	–	A	84 · 23	e,h,s*	HY
Leptopharynx costatus Mermod, 1914	–	–	–	A	25 · 15 · 10	b,f*	NA
Metopus es (Müller, 1776) Lauterborn, 1916	+	+	+	C	140 · 52	b,e,f,s*	HE
Metopus hasei Sondheim, 1929	+	+	+	B	58 · 20	b*	HE
Metopus inversus (Jankowski, 1964) Agatha und Foissner, 1999	+	+	+	B	115 · 63	b*	HE
Metopus minor Kahl, 1927	+	+	+	C	25 · 12	b*	HE
Metopus palaeformis Kahl, 1927	+	+	+	B	105 · 30	b*	HE
Metopus setosus Kahl, 1927	+	+	+	A	63 · 31	b*	HE
Oxytricha setigera Stokes, 1891	–	–	–	A	45 · 20 · 15	b,f*	HY
Oxytrichidae Taxon 1	+	–	–	A	70 · 20 · 18	b,f*	HY
Oxytrichidae Taxon 2	+	–	–	A	73 · 24 · 15	b,f	HY
Oxytrichidae Taxon 3	–	–	–	A	104 · 26 · 13	b,f	HY
Oxytrichidae Taxon 4	–	–	–	–	n.b.	b,f	HY
Oxytrichidae Taxon 5	–	–	–	–	n.b.	b,f	HY
Oxytrichidae Taxon 6	–	–	–	–	n.b.	b,f	HY
Phialina binucleata Berger, Foissner und Adam, 1984	–	–	–	B	62 · 13‡	c*	GY
Plagiocampa pentadactyla Foissner, Agatha und Berger 2002	+	–	–	C	32 · 16	b*	PR
Pleuroplitoides smithii Foissner 1996	–	–	–	B	86 · 26	c*	GY
Prorodon sp.	–	–	–	B	80 · 40	c	PR

Tabelle 4.1: Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung **Tabelle 4.1**

Taxon	Vorkommen in anoxischen Inkubationen	obligat anaerob[1)]	methanogene Endosymbionten[2)]	Berechnung der Biovolumina[3)]	Typische Größe [µm][4)]	bevozugte Nahrung[5)]	taxonomische Gruppe[6)]
Protospathidium serpens (Kahl, 1930)	+	–	–	C	55 · 11	c*	GY
Protospathidium sp.	+	–	–	C	150 · 24	c	GY
Spathiidae Taxon 1	+	–	–	C	33 · 9	c	GY
Spathiidae Taxon 2	-	–	–	–	n.b.	c	GY
Spathiidae Taxon 3	+	–	–	B	40 · 8	c	GY
Spathiidae Taxon 4	+	–	–	–	n.b.	c	GY
Spathiidae Taxon 5	+	–	–	–	n.b.	c	GY
Spathidium cf. *crassum* Kahl, 1926	+	–	–	A	37 · 9	c	GY
Spathidium longicaudatum (Wilbert und Buitkamp, 1974) Buitkamp, 1977	–	–	–	A	150 · 30	c,n*	GY
Spathidium cf. *modestum* Kahl, 1930	+	–	–	A & B	85 · 18	c	GY
Spathidium cf. *vermiculis* Kahl, 1926	–	–	–	A	45 · 15 · 8	c	GY

[1)]Nach Foissner, 1998
[2)]Verifiziert durch eigene Beobachtungen
[3)]Biovolumen wurde berechnet als **A**: ein Quader, **B**: ein Zylinder mit halbkreisförmigen Ende oder **C**: ein Raumellipsoid;
[4)]Länge · Breite · Höhe (drei Zahlen) oder Länge · Durchmesser (zwei Zahlen) aus eigenen Messungen; andernfalls †: Foissner, 1998; ‡: Berger *et al*., 1984; n.b.: nicht bestimmt;
[5)]Bevorzugte Nahrung: **b** - Bakterien; **c** - Ciliaten; **e** - Cyanobakterien; **f** - Farblose Flagellaten; **g** - Grünalgen inklusive Grüner Flagellaten; **h** - Hyphen and Sporen von Pilzen und Hefen; **n** – Nacktamöben (Gymnamoebae); **r** - Rotatorien, Nematoden; **s** - Bodenpartikel. Aus eigenen Beobachtungen; sonst: *Foissner, 1998;
[6)]Einteilung nach Foissner, 1998: **CO** - Colpodida, **CY** - Cyrtophorida, **GY** - Gymnostomatida, **HE** - Heterotrichia, **HM** - Hymenostomatida, **HY** - Hypotrichida, **NA** - Nassulidae, **OL** - Oligotricha, **PR** – Prostomatida;

Heterotriche Ciliaten waren die dritt- bzw. zweithäufigste (anoxische Inkubationen) Gruppe im Reisfeldboden. Die Gruppe Heterotrichida enthält die obligat anaeroben Arten der Gattung *Metopus* und *Cirranta*. Die Gruppe Colpodida zählt zu den bekanntesten Ciliaten des Ökosystems Boden. Der Anteil dieser Gruppe ist unter anoxischen Umweltbedingungen mit 4,3% (bzw. einer Art) niedrig.

Bakteriovore Taxa wurden als dominierende Ernährungsgilde der Ciliatenfauna angetroffen (Tab. 4.1). Eine größere Anzahl an Ciliaten, vorwiegend der Gruppe Gymnostomatida, wurde den carnivoren Taxa zugeordnet.

Tabelle 4.2: Ciliaten (Protozoa, Ciliophora) des Reisfeldbodens: Anteile der taxonomischen Gruppen im gesamten Arteninventar und in den anoxischen Inkubationen

	gesamter Boden		anoxische Inkubationen	
taxonomische Gruppe[1)]	Anzahl der Arten	%	Anzahl der Arten	%
CO	7	13,5	1	4,3
CY	1	1,9	-	-
GY	17	32,7	10	43,5
HE	10	19,2	7	30,4
HM	2	3,8	-	-
HY	11	21,1	4	17,4
NA	1	1,9	-	-
OL	1	1,9	-	-
PR	2	3,8	1	4,3
SUM	52	100	23	100

[1)]Einteilung nach Foissner, 1998: **CO** - Colpodida, **CY** - Cyrtophorida, **GY** - Gymnostomatida, **HE** - Heterotrichia, **HM** - Hymenostomatida, **HY** - Hypotrichida, **NA** - Nassulidae, **OL** - Oligotricha, **PR** – Prostomatida

4.1.2 Populationsdynamik der Ciliaten in anoxischen Inkubationen

4.1.2.1 Populationsdynamik und Ciliatengruppen

Die Entwicklung der Ciliatenpopulation wurde über einen Zeitraum von 163 Tagen in anoxischen Inkubationen untersucht. In Tab 4.3 wird die Populationsentwicklung dargestellt. Die höchste Diversität und die größten Zellzahlen (ca. 190 Zellen gTG^{-1} Boden) wurden innerhalb der ersten 30 Tage gefunden. Nach dieser 1. Phase folgte ein Einbruch der Populationstruktur zwischen Tag 33 und 44. Von diesem Einbruch erholte sich die Population in einer 2. Phase (ab Tag 48) wieder und erreichte wieder nahezu die Abundanzen der ersten Phase.

In Tab. 4.3 sind die Zellzahlen in jeder Zeile quantitativ dargestellt. Dabei entspricht der dunklere Farbton der höheren und der hellere der niedrigeren Zellzahl. Die Taxa sind gemäß dem zeitlichen Autreten ihres ersten Abundanzmaxiums angeordnet. Die Zellenbreite der Zeitachse entspricht innerhalb der ersten neun Tage je einen Tag. Ab Tag neun bis zu Tag 58 entsprach die Zellbreite je drei bzw. vier Tagen. Die Messung endete nach 163 Tagen. Die Namen wurden zur Verdeutlichung der Ergebnisse der Cluster-Analyse (Abb. 4.1) entsprechend ihrer Cluster-Zugehörigkeit farblich hervorgehoben. Durch sie ist ein besserer Vergleich der Tab. 4.3 und der Abbildung möglich. Durch Cluster-Analyse (Single und Average Linkage; SPSS, SPSS Inc. USA) wurden die vorkommenden Taxa in 4 Cluster unterteilt, die ähnliche Ansprüche an das Ökosystem stellen (Abb. 4.1). Davon wurden 3 Cluster innerhalb der ersten 30 Tage (Phase 1) gefunden. Der größte Cluster (Rot) umfaßt die höchste Diversität in der 1. Phase. Der zweite Cluster (Schwarz) besteht aus einer carnivoren und einer bakteriovoren Art. Diese traten nur in der frühen Inkubationsphase (Tag 2 bzw. 3) auf. Der dritte Cluster (Grün) enthält drei obligat anaerobe Arten der Gattung *Metopus* und ein Spathidiidae-Taxon. Diese *Metopus*-Arten hatten ihr Abundanzmaximum innerhalb der Phase 1, wurden aber auch bei späteren Untersuchungen regelmäßig gefunden. In der ersten Phase dominierten demnach 5 der 6 obligat anaeroben *Metopus*-Arten die Ciliatenfauna. Die häufigsten Arten überhaupt waren *M. minor*, *M. hasei*, *Plagiocampa pentadactyla* und *M. palaeformis*. Während innerhalb der ersten 19 Tage *Metopus palaeformis* und *M. inversus* dominierten, verschob sich das Dominanzverhältnis nach der Ciliatostasis zugunsten von *M. hasei* und *M. minor*.

Der 4. Cluster (Blau) bestand aus drei obligat anaeroben Arten (*Cirranta mobilis, M. hasei, M. minor*) und den zwei fakultativ anaeroben Arten *Spathidium* cf. *crassum* (Orange) und *Plagiocampa pentadactyla*. Diese vierte Gruppe dominierte die Ciliatenfauna für ca. 120 Tage in der 2. Phase nach dem Populationseinbruch. *M. minor* wurde trotz der Entfernung zu den anderen vier Taxa mit in dieses letzte Cluster übernommen, da sein erstes Maximum mit dem der anderen vier zusammenfällt (Tab. 4.3). *Spathidium* cf. *crassum* wurde ebenfalls in dem 4. Cluster eingeordnet. Diese Diskrepanz zur Cluster-Analyse ergab sich aufgrund des späten Abundanzmaximums (Tag 54) der Art in der 2. Phase. Die Verteilung der Individuenzahlen weißt hingegen auf eine Zuordnung zum 4. Cluster hin.

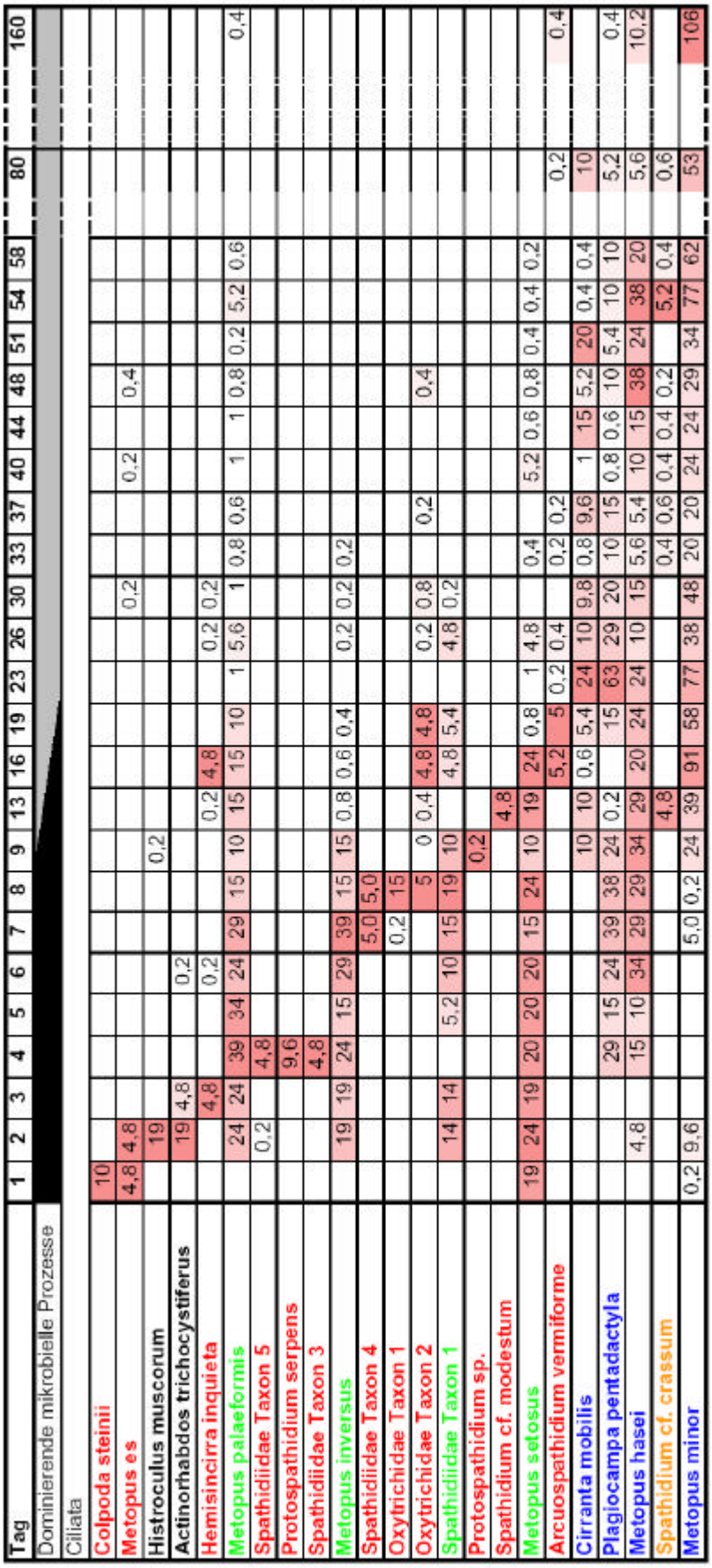


Tabelle 4.3: Individuelle Abundanzen über die Zeit in anoxischen Inkubationen von Reisfeldboden. Die Taxa wurden entsprechend dem Zeitpunkt ihrer ersten maximalen Abundanz angeordnet.

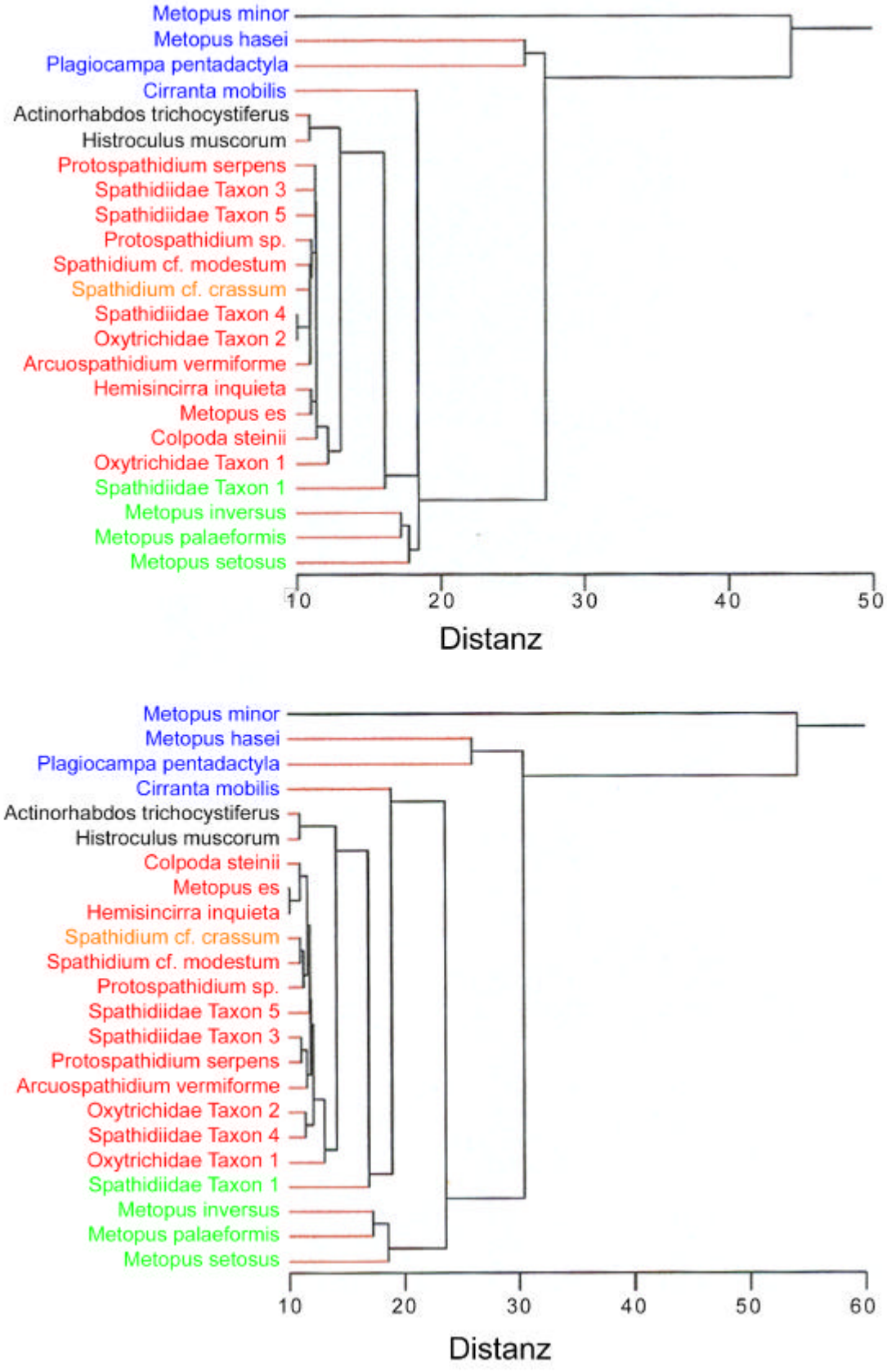


Abbildung 4.1: Cluster-Analyse (Oben: Single / Unten: Average Linkage Cluster-Analyse) der Ciliatenfauna in anoxischen Inkubationen. In beiden Analysen wurden vergleichbare Cluster (Markiert in den gleichen Farben) gefunden.

Um Tag 54 (Phase 2) stieg die Gesamtzellzahl, blieben aber unterhalb des Niveaus der Phase 1 (Abb. 4.2 oben). Die Artenzusammensetzung veränderte sich zugunsten des 4. Clusters (Abb 4.1, Tab. 4.3).

4.1.2.2 Abundanzen, Diversität und individuelle Biovolumina

Der Verlauf der gesamten Zellzahlen wird in Abb. 4.2 gezeigt. Dabei sind neben den Zellzahlen die Diversität nach dem Shannon-Wiener-Index (Formel 2: $H' = \sum_{i=1}^{s} p_i \log p_i$) und die individuellen mittleren Zellvolumina dargestellt. Anhand der aktiven Ciliaten bzw. der vorkommenden Taxa wurde der Shannon-Wiener-Index (Formel 2) berechnet.

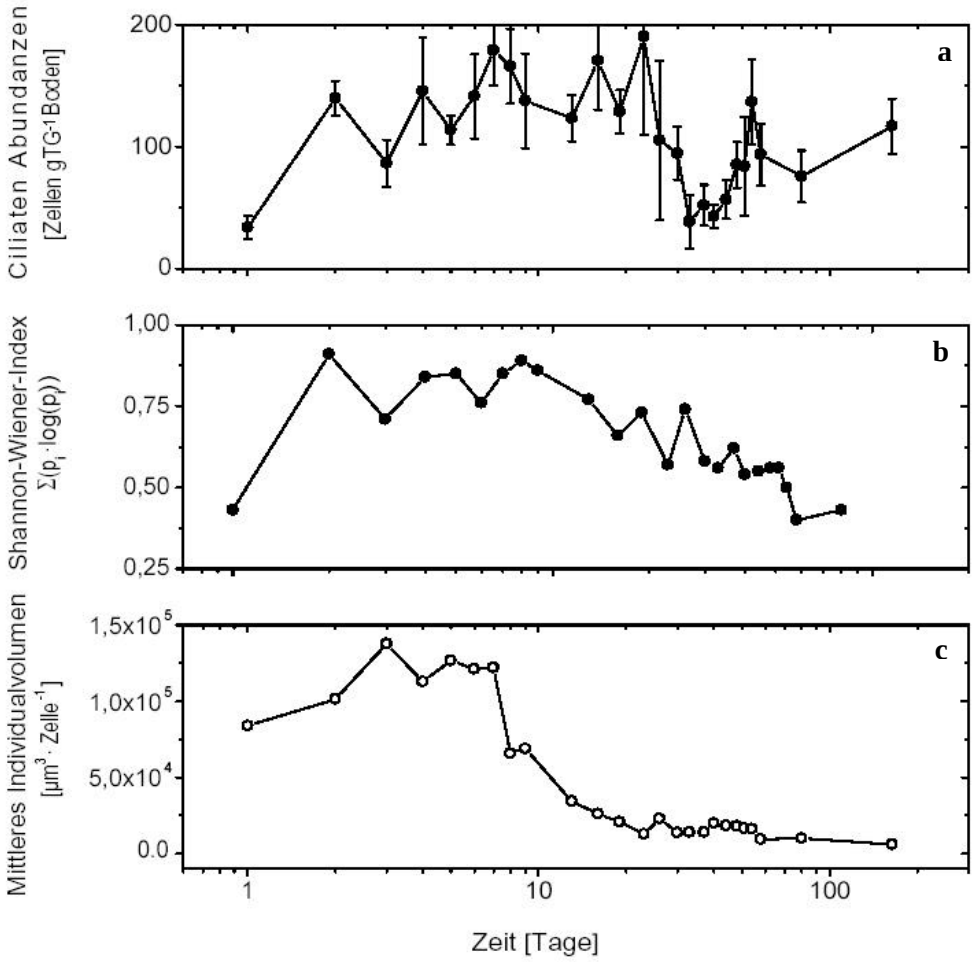


Abbildung 4.2: Abundanzen der Ciliaten (**a**), Diversität nach dem Shannon-Wiener-Index (**b**) und mittleres Individualvolumen der Ciliaten (**c**) in den anoxischen Inkubationen. Die logarithmische Zeitachse dient der besseren Darstellung der Dynamik der ersten Wochen.

Die Diversität der Ciliaten H', berechnet mit dem Shannon-Wiener-Index (Abb. 4.2b), nimmt ab Tag 8 langsam ab. Dieser Rückgang resultierte aus den abnehmenden Artenzahlen in den

Inkubationen. Die Zellzahlen der Ciliaten (Abb. 4.2a) blieben jedoch bis Tag 23 relativ konstant und begannen erst danach zu sinken. Das mittlere Individualvolumen (Abb. 4.2b) der Ciliaten begann bereits ab Tag 7 zu sinken und zeigt damit einen Artenwechsel hin zu weniger und kleineren Arten an.

4.1.3 Biovolumina der Ciliatenpopulationen

Anhand von Zellgrößen und Zellzahlen (Tab. 4.1 und Tab. 4.3) wurden die Biovolumina der Ciliaten für die einzelnen Meßtage berechnet (Abb. 4.3). Die Abb. 4.2 zeigt hingegen den Verlauf des mittleren individuellen Zellvolumens. Über den Zeitraum der Inkubation wurde eine Verschiebung von großen (Phase 1) zu kleinen Arten (Phase 2) beobachtet. So dominierten zu Beginn der ersten 30 Tage Taxa mit großen Volumina. Gegen Ende des Untersuchungszeitraumes dominierten kleinere Arten. Eine Berechnung der Volumenanteile einzelner Gattungen bzw. Gruppen resultierte in einer Dominanz der Gattung *Metopus*. Im Mittel waren 80% der gesamten Biovolumina der Gattung *Metopus* zuzuordnen. Nach der Phase 1 sank der Anteil (parallel zur abnehmenden Individuenzahl und der veränderten Zusammensetzung der Taxa) auf 70%.

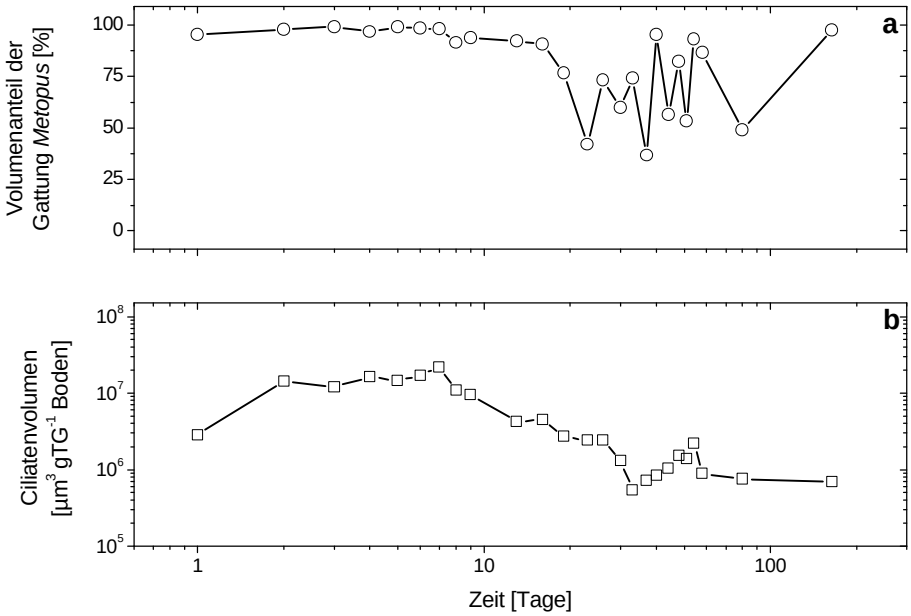


Abbildung 4.3: Ciliatenvolumen in µm³ pro gTG Boden (**b,** logarithmische Auftragung) und Anteil der Gattung *Metopus* am Gesamtvolumen [%] (**a**) in den anoxischen Inkubationen. Die logarithmische Zeitachse dient der besseren Darstellung der Dynamik der ersten Wochen.

4.1.4 Mikrobielle Gemeinschaft der anoxischen Inkubationen von Reisfeldboden

4.1.4.1 Zellzahlen nach DAPI-Färbung und Biovolumenveränderung der Mikroorganismen

Mikrobielle Zellzahlen

Nach DAPI-Färbung von PFA-fixierten Zellen wurde die Anzahl der mikrobiellen Zellen in den anoxischen Inkubationen gezählt. Die Zählung erfolgte an je drei Replikaten pro Bodenprobe. Die mikrobiellen Zellzahlen blieben innerhalb einer Größenordnung relativ stabil (Abb. 4.4a). Aus der Abbildung wird jedoch deutlich, daß die mikrobiellen Zellzahlen zweimal zurückgingen, sich dann aber wieder erholten. Diese minimalen Zellzahlen wurden nach 4 und 33 Tagen gefunden. Durchschnittlich wurden $4{,}2 \cdot 10^7$ Zellen gTG^{-1} Boden gezählt.

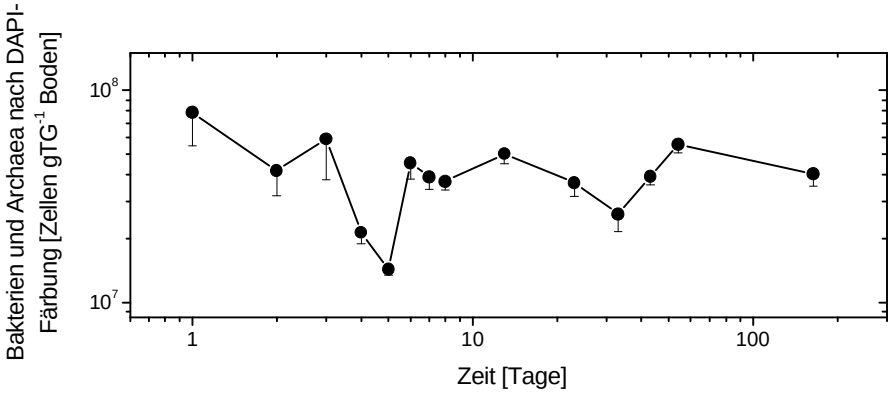


Abbildung 4.4a: Mikrobielle Abundanzen nach DAPI-Färbung (logarithmische Auftragung). Die logarithmische Zeitachse dient der besseren Darstellung der Dynamik der ersten Wochen.

Mikrobielle Volumina

Durch eine zusätzliche Bestimmung der mikrobiellen Zellvolumen wurde versucht, einen Einfluß der Protozoen auf die mikrobielle Gemeinschaft nachzuweisen. Die Bestimmung der Volumina beruhte auf je sechs Auswertungen von drei Bodenproben des Tages 4 und drei des Tages 80. Die mittleren Zellvolumen jedes Stapelbildes, wurden sieben verschiedene Klassen (von 0,25 μm^3 bis 2,25 μm^3) zugeordnet. Die Ergebnisse in Abb. 4.4b dargestellt. Am Tag 4 wurden Zellen fast aller Klassen, also auch kleinste und größte Zellen, gefunden. An Tag 80 wurden hingegen nur Zellen in den mittleren (0,75 bis 1,5 μm^3) Klassen gefunden.

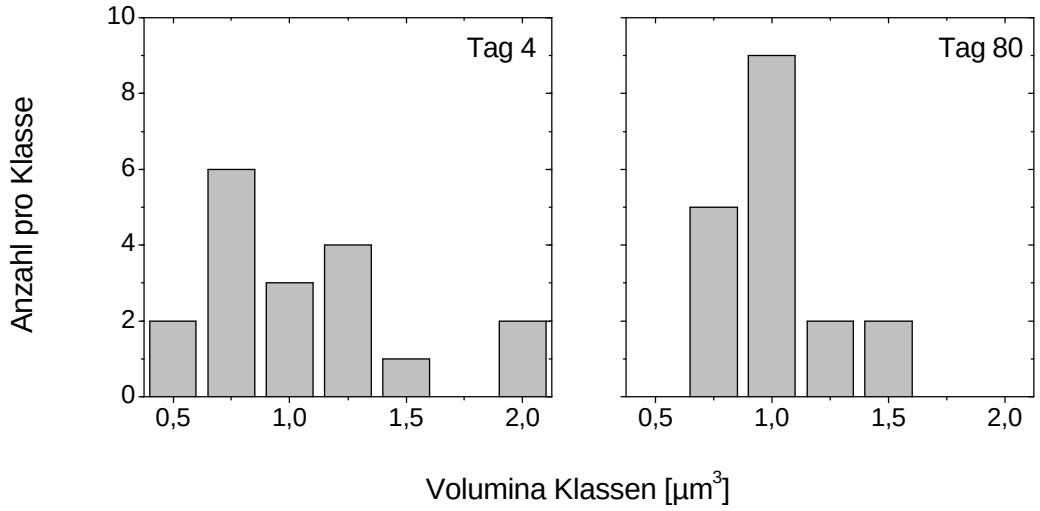


Abbildung 4.4b: Verteilung der mittleren mikrobiellen Biovolumina gemessen an je 18 Stapelbildern pro Meßtag. Untersucht wurden die Biovolumina an Tag 4 und Tag 80 nach einer FITC-Färbung. Jedes Stapelbild enthielt zwischen 34 und 345 mikrobiellen Zellen.

4.1.4.2 Methanogene Endosymbionten

Anhand ihrer charakteristischen F_{420}-Autofluoreszenz (Abb. 4.5) wurden aktive methanogene Endosymbionten nachgewiesen. Methanogene Archaea wurden in Ciliaten nur in der Gattung *Metopus* gefunden. In Tab. 4.4 wurden die Endosymbiontenzahlen jeder Art aufgeführt. Zusätzlich wurden die potentiellen Endosymbiontenzahlen aus Anteilen am Ciliatenvolumen (2% pro *Metopus* sp. Zelle, 0,53 µm^3 pro Endosymbiont) berechnet und den Werten der direkten Zählungen gegenübergestellt (Tab. 4.4; rechte Spalte). Um einen Vergleich zu Ergebnissen aus anderen Habitaten zu ermöglichen, wurden zusätzlivh Zellzahlen von methanogenen Endosymbionten aus der Literatur in Tab. 4.5 zusammengefaßt.

Tabelle 4.4: Anzahl der methanogenen *Metopus*-Endosymbionten: Bestimmt anhand von F_{420}-Autofluoreszenz-Direktzählung und Berechnung aus Daten von Finlay und Fenchel (1995).

Art	Endosymbionten pro Ciliat AV	SE	Anzahl gezählter Ciliaten[1)]	Größe[2)] Länge · Durchmesser [µm]	Endosymbionten pro Ciliat Anzahl aus *Metopus* Volumenfraktion[3)]
M. es	637	19	4	140 · 52	12284
M. hasei	64	8	22	58 · 26	885
M. inversus	141	14	11	115 · 63	15940
M. minor	19	3	4	25 · 12	139
M. palaeformis	251	29	30	105· 30	3995
M. setosus	239	75	6	63 · 31	2246

[1)]aus anoxischem Bodenwasser gepickte Zellen; [2)]Größenangaben der Ciliaten aus Tab. 4.1; [3)]Potentielle Anzahl (Volumenanteil 2%, 0,53 µm^3 pro Endosymbionten Zelle)

Tabelle 4.5: Anzahl methanogener Endosymbionten einiger Arten der Gattung *Metopus* sowie einer Art aus einem ähnlichen Ökosystem.

Art	Anzahl Endosymbionten[1)]	Literatur Quelle
Metopus palaeformis	492	Finlay und Fenchel (1991)
Metopus setosus	490	Wagener *et al.* (1990)
Metopus contortus	4500	van Bruggen *et al*. (1986)
Metopus striatus[2)]	2000	van Bruggen *et al*. (1983)
Trimyema sp.	300	Finlay *et al*. (1993)

[1)]pro Ciliatenzelle; [2)] Synonym mit *M. inversus;* Esteban *et al*., 1995

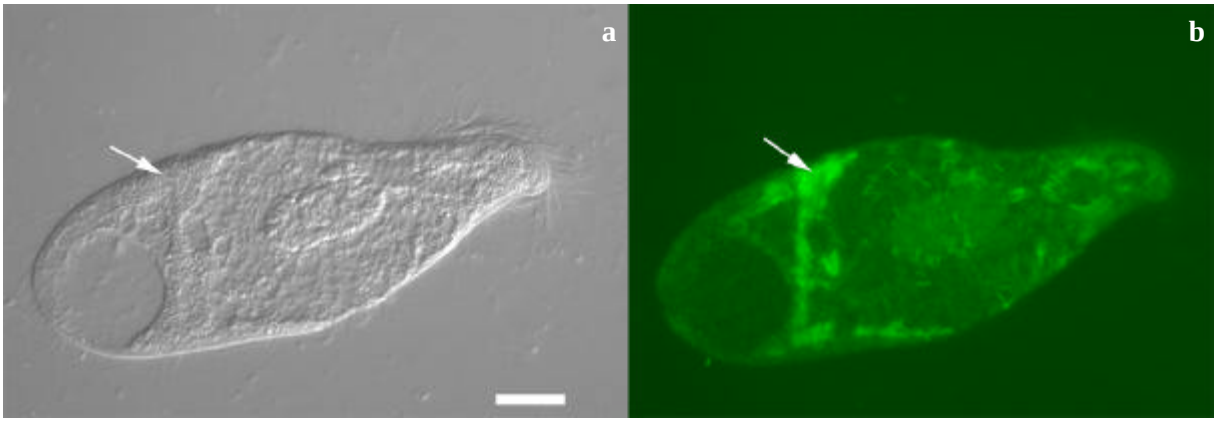


Abbildung 4.5a: *Metopus palaeformis* im differentiellen Interferenz-Kontrast nach Nomarski (**a**) und unter UV-Anregung (**b**). Der Pfeil weist auf eine Ansammlung F_{420}-Autofluoreszenz zeigenden Stäbchen. Maßstab: 10 µm

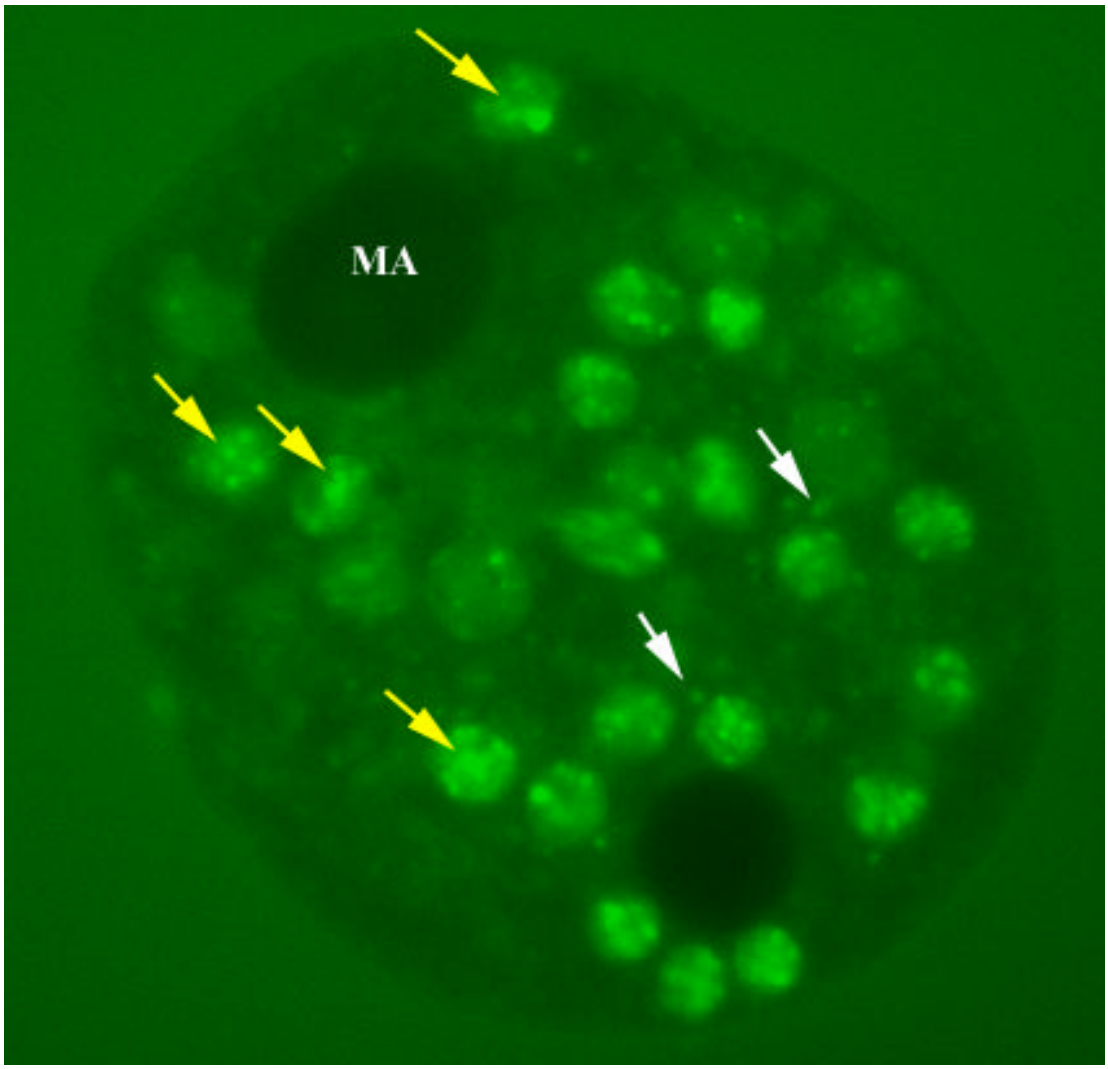


Abbildung 4.5b: Vorkommen aktiver Methanogener im Cytoplasma (weißer Pfeil) und den Nahrungsvakuolen (gelber Pfeil) von *Metopus inversus* unter F_{420}-Autofluoreszenz. Bildausschnitt: 100 · 100 µm. MA – Makronukleus

4.1.5 Interaktion der Ciliatenfauna und der mikrobiellen Gemeinschaft

Auf Basis der Ciliatenabundanzen, deren Nahrungspräferenzen und Biovolumina wurde versucht, den möglichen Einfluß auf die Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft zu bestimmen. So wurden die mikrobiellen Zellzahlen und Biovolumina gemessen. Die Abb. 4.6b stellt den Quotienten der Volumina in der Ciliaten- und der mikrobiellen Gemeinschaft dar. Die relativen mikrobiellen Zellzahlen (Abb. 4.6c) wurden für diese Darstellung gleich 1 μm^3 pro Zelle gesetzt. Die mittlere Abbildung zeigt den Quotienten beider Volumina. Innerhalb der ersten Woche war der Verlauf des Quotienten negativ, danach jedoch positiv. Anhand der Zellzahlen der Ciliaten (Abb. 4.2) wurde gezeigt, daß die Ciliatenpopulation bis zum Tag 4 anwuchs, danach aber bis zum Tag 30 relativ konstant blieb. Mit Eintritt in diese stationäre Wachstumsphase wurde der potentielle Einfluß der Ciliaten auf die mikrobielle

Gemeinschaft geringer. Dies ließ sich von den erneut ansteigenden mikrobiellen Zellzahlen ableiten.

Ein Vergleich der Biovolumina beider untersuchter Populationen (Abb. 4.6) zeigte einen anfänglich negativen Verlauf, der, wie bereits erwähnt, auf Beweidung der mikrobiellen Gemeinschaft durch Ciliaten schließen läßt. Betrachtet man die Zellzahlen und Verteilung der Volumina innerhalb der Phase 1 (Tab. 4.1 und Tab. 4.3), so wird deutlich, daß hier große bakteriovore Ciliaten vorherrschen.

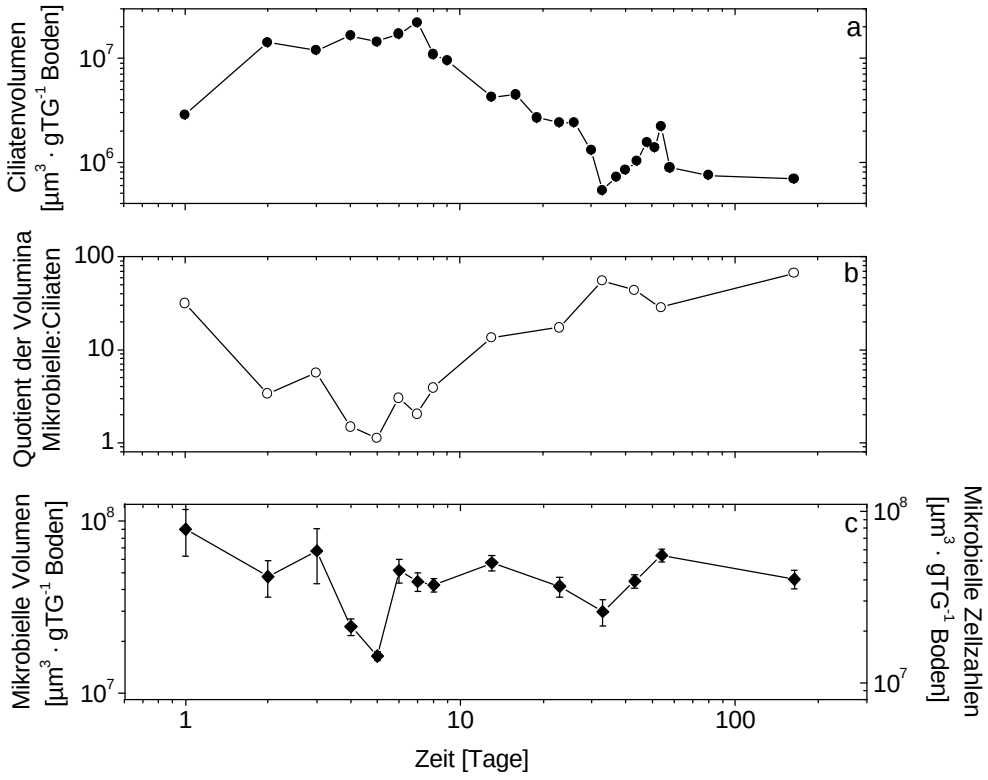


Abbildung 4.6: Zeitlicher Verlauf des gesamten Ciliatenvolumens (**a**, logarithmische Auftragung), der mikrobielle Zellzahlen und Volumina (**c**, logarithmische Auftragung) und dem Quotient beider Volumina (**b**). Die logarithmische Zeitachse dient der besseren Darstellung der Dynamik der ersten Wochen.

4.1.6 Ciliatenfauna der im Feld gestochenen Bodenkerne

Die Untersuchung der im Feld beprobten Bodenkerne kann aufgrund der geringen Anzahl der Stichproben nur als Momentaufnahme ca. sechs Wochen nach der Flutung betrachtet werden. Die Ergebnisse zeigten eine im Vergleich zu den Inkubationen abweichende

Zusammensetzung der Ciliatenfauna. So wurden wenige aktive Ciliaten im Feld gefunden. Alle identifizierten Taxa sind in Tab. 4.6 aufgeführt.

Insgesamt 5 von 7 der im Boden gefundenen Taxa stimmten mit den in den Inkubationen und Bodenkulturen vorkommenden Taxa überein. Im gleichen Zeitraum nach der Flutung wurden in den anoxischen Inkubationen im Labor 8 Taxa (Tag 40 bzw. 44) gezählt. Weiterhin wurden zwei von fünf Taxa des Flutwassers in den Inkubationen gefunden.

Tabelle 4.6: Ciliaten eines gefluteten Reisfeldes in Vercelli, Juni 2001.

	Ciliaten	obligat anaerob[1)]	Vorkommend in Inkubationen[2)]
Flutwasser	*Acineria uncinata*	-	-
	Cinetochilum magaritaceum	-	-
	Cyclidium cf. *glaucoma*	-	+
	Halteria grandinella	-	+
	Uronema sp.	-	-
Boden	*Acineria uncinata*	-	-
	Aspidisca cicada	-	-
	Bryophyllum sp.	-	+
	Cyclidium glaucoma	-	+
	Metopus hasei	+	+
	Oxytricha Taxon 2	-	+
	Plagiocampa pentadactyla	-	+

[1)]nach Foissner, 1998; [2)]Tab. 4.1

4.1.7 Ciliatenfauna der Inkubationen mit zusätzlichem Reisstroh

Für diesen Versuch wurde dem Reisfeldboden zusätzlich 1 g Reisstroh auf 100 g Boden zugesetzt. Auf diesem Weg wurde überprüft, ob eine Veränderung des Anteils an partikulärem organischen Material im Boden Auswirkungen auf die Ciliatenfauna hat. Alle Messungen wurden an je zwei Parallelen durchgeführt. An 13 Meßtagen wurde die Zusammensetzung der Gasphase gemessen (siehe Abschnitt: 4.2.4). An 9 Tagen (ab Tag 32) wurden ein Arteninventar und die Zellzahlen der Ciliatenfauna ermittelt. Die Beimengung von Reisstroh in anoxischen Inkubationen führte zu einer Verschiebung innerhalb der Protozoenfauna. Dominierten in den anoxischen Inkubationen ohne zusätzlich beigemengtes Reisstroh die Ciliaten als Gruppe mit den höchsten Abundanzen, verschob sich dies zugunsten der Flagellaten (87 gTG^{-1} Boden) in denen mit zusätzlichem Reisstroh (Ciliaten, 81 gTG^{-1} Boden). Nur an zwei Tagen wurden mehr Ciliaten als Flagellaten gefunden (Tag 65: 180; Tag 75: 253).

Es wurden 6 Arten identifiziert, welche alle auch in den anderen Inkubationen von Reisfeldboden (Tab. 4.1) gefunden wurden. Eine Erhöhung des Gehaltes an Reisstroh hat also auch Auswirkungen auf die Diversität der Ciliatenfauna. Diese Beobachtung kann aber auch aus der niedrigeren Anzahl an Probennahmen resultieren.

Auch in diesem Versuch dominierten Arten der Gattung *Metopus* (*M. hasei*, *M. minor*, *M. palaeformis*) die Gruppe der Ciliaten. Zusätzlich wurden *P. pentadactyla*, *Arcuospathidium vermiforme* und *Spathidium* cf. *crassum* gefunden. Damit gleicht das Artenspektrum dem der anoxischen Inkubationen (im Grundaufbau) während der 2. Phase.

4.2 Biogeochemie

4.2.1 Biogeochemie der anoxischen Inkubationen

Die Entwicklung einiger biogeochemischer Parameter in den anoxischen Inkubationen (Grundaufbau, Abb. 3.1) wurde für 163 Tage untersucht. Diese Inkubationen wurden im weiteren, sofern nicht anders vermerkt, als Standard gegenüber den anderen Varianten verwendet. Ziel der Untersuchung war es, die Auswirkungen einiger biogeochemischer Prozesse auf die CH_4-Produktion zu studieren. Dafür wurde die Entwicklung von freien Anionen (Bromid, Chlorid, Nitrat, Nitrit, Phosphat und Sulfat) und kurzkettigen Fettsäuren (Acetat, Butyrat, Formiat, Lactat und Propionat) im Porenwasser verfolgt.

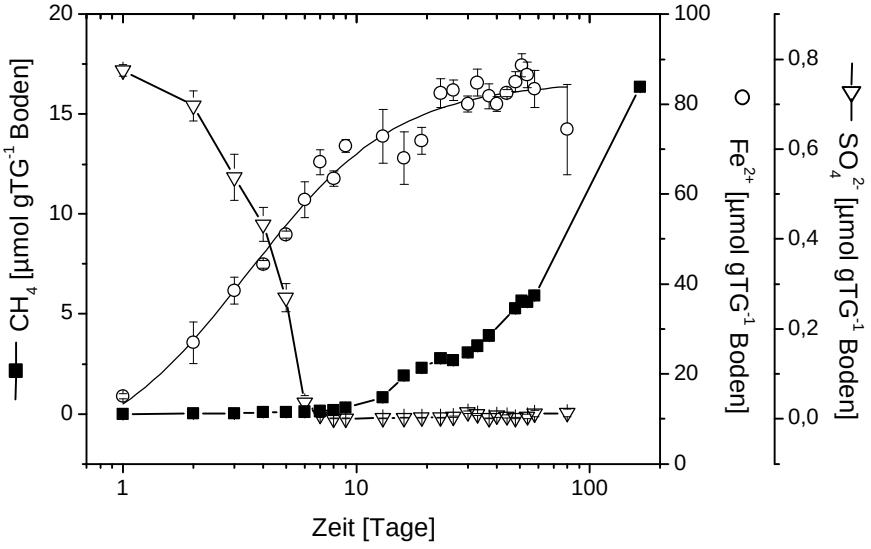


Abbildung 4.7: Entwicklung von Fe^{2+}, SO_4^{2-} und CH_4. Die logarithmische Zeitachse dient der besseren Darstellung der Dynamik der ersten Wochen.

Die zeitliche Entwicklung der drei wichtigsten terminalen Prozesse wurde in Abb. 4.7 dargestellt. In den ersten 19 Tagen wurden vorwiegend SO_4^{2-} und Fe^{3+} reduziert. Nachdem diese Elektronakzeptoren komplett reduziert waren, wurde die Methanogenese der wichtigste terminale anaerobe Reduktionsprozeß. Die Fe^{2+}-Werte werden als Datenpunkte dargestellt. Um den Verlauf der Fe^{2+}-Werte zu verdeutlichen, wurde eine nichtlineare Kurve angepaßt und eingefügt. Diese wurde anhand der Formel 3: $y = \frac{A_1 - A_2}{1 + (x/x_0)^P} + A_2$ (wobei: A_1= 0; A_2 = 85; x_0 = 3,44; p = 1,36) in Origin 6.1 (Microcal Software, Inc, USA) berechnet. Die Standardfehler der Methanwerte sind zumeist kleiner als der Symboldurchmesser.

Bei den Fettsäuren akkumulierte einzig Acetat innerhalb der ersten 24 h bis auf 187 µM. Anschließend fiel die Acetatkonzentration innerhalb von 48 h unter das Detektionslimit von 10 µM (Acetat) und war auch später nicht mehr nachweisbar. Die Konzentrationen der anderen gemessenen Fettsäuren fiel bereits innerhalb von 24 h unter das Detektionslimit von 10 µM (Butyrat, Lactat und Propionat) bzw. 50 µM (Formiat).

4.2.2 Potentieller Effekt methanogener Endosymbionten

Anhand der Zellzahlen methanogener Endosymbionten wurde versucht den potentiellen Beitrag dieser an der gesamten Methanogenese zu bestimmen. Dafür wurden die gesamten Zellzahlen der methanogenen Endosymbionten aus Tab. 4.4 für jeden Meßtag berechnet. Modell 1 basierte auf den direkten Zählungen methanogener Endosymbionten, Modell 2 hingegen auf den kalkulierten Zellzahlen.

Auf Basis dieser Zellzahlen wurden die in Abb. 4.8 dargestellten kumulativen Werte anhand einer maximalen CH_4-Produktionrate von 0,97 fmol CH_4 · Zelle · h^{-1} (Fenchel und Finlay, 1992) errechnet.

Der potentielle Anteil von CH_4 aus der Produktion methanogener Endosymbionten lag in den ersten zwei Wochen bei ca. 2% für Modell 1 (direkt Zählungen), und bei ca. 59% für Model 2 (potentielle Anzahl). Danach überwog die CH_4-Produktion außerhalb der Zellen. Ein potentieller Effekt der Endosymbionten auf die gesamte Methanbildung wurde mit den verwendeten Modellen somit nur für diesen frühen Zeitraum gezeigt.

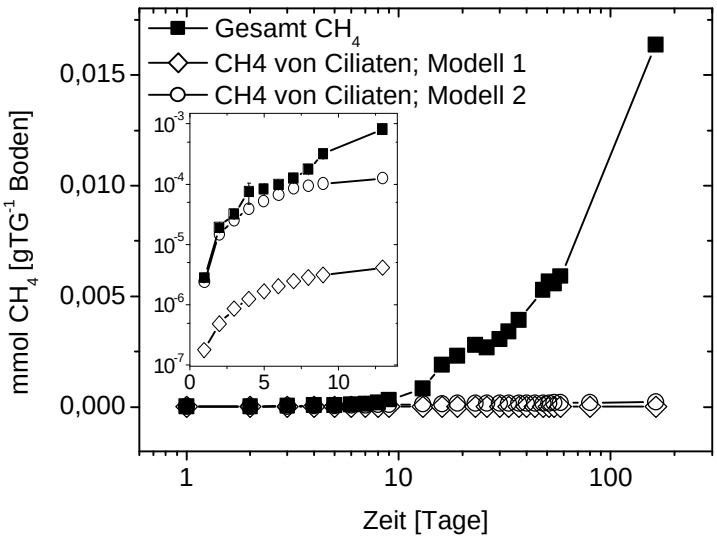


Abbildung 4.8: Potentieller Beitrag methanogener Endosymbionten (Modell 1 und 2) von *Metopus* sp. zur gesamten Methanogenese. Die logarithmische Zeitachse dient der besseren Darstellung der Dynamik der ersten Wochen. Die ersten zwei Wochen werden zusätzlich in höherer Auflösung (logarithmisch) dargestellt.

4.2.3 Versuche zur Hemmung von Eukaryonten und von acetoclastischen Methanogenen

In diesem Experiment wurde versucht, den Anteil der methanogenen Endosymbionten sowie der acetoclastischen Methanogenen an der CH_4-Produktion zu bestimmen.

Dafür wurde in separaten Ansätzen Bodenaufschlämmungen anoxisch inkubiert. In einem Drittel der verwendeten Flaschen wurden die Eukaryonten und in einem weiteren Drittel die hydrogenotrophe Methanogenese gehemmt. Als Kontrolle wurden Bodenaufschlämmungen ohne Inhibitoren verwendet. In allen Flaschen wurde die Zusammensetzung der Gasphase (CH_4 und CO_2) gemessen. Die Inkubationen wurden über einen Zeitraum von 14 Tagen durchgeführt und täglich beprobt.

In weiteren Flaschen wurde vor dem Beginn der Gasmessungen je 0,5 ml Bodenwasser unter einem Mikroskop auf aktive Protozoen hin untersucht. In den Ansätzen zur selektiven Hemmung von Eukaryonten wurden in den ersten zwei Tagen sehr selten aktive Zellen gefunden. Nach drei Tagen bis zum Versuchsende wurden keine weiteren aktiven Zellen entdeckt. In den Kontrollen hingegen wurden hingegen täglich aktive Ciliaten sowie einige Flagellaten gefunden.

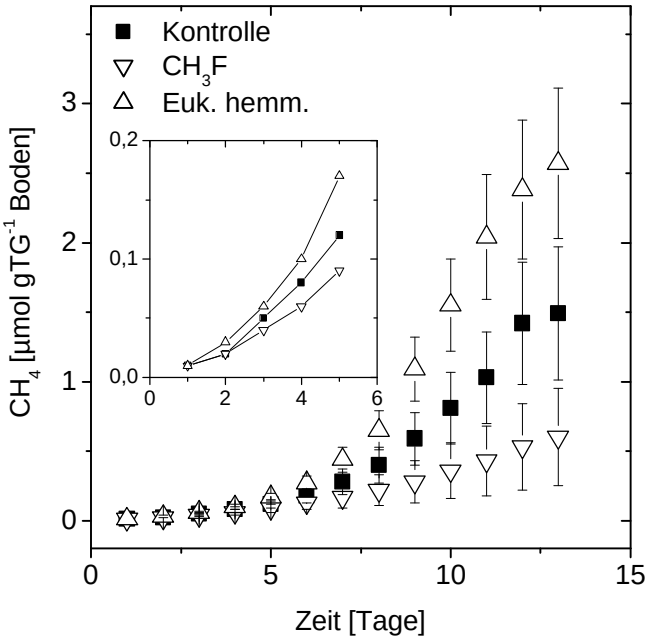


Abbildung 4.9: Zunahme der Methankonzentration in den Hemmversuchen; CH_3F – Hemmung der acetoclastischen Methanogenese; Euk. hemm. – Hemmung von Eukaryonten mit Colchicin und Cycloheximid.

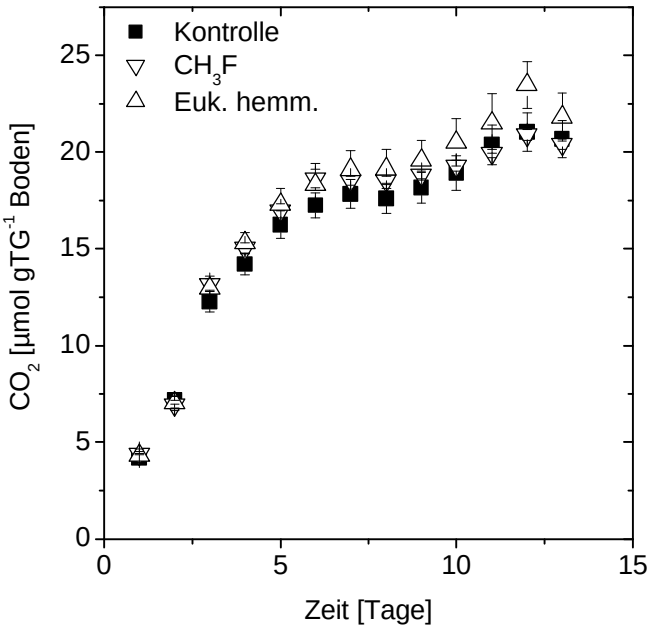


Abbildung 4.10: Zunahme der Kohlendioxidkonzentration in den Hemmversuchen; CH_3F – Hemmung der acetoclastischen Methanogenese; Euk. hemm. – Hemmung von Eukaryonten mit Colchicin und Cycloheximid.

In den Versuchen zur Hemmung von Eukaryonten wurde nach 14 Tagen eine Verdoppelung der CH_4-Produktion gegenüber den Kontrollen festgestellt. Im Vergleich zu den Kontrollen bewirkte die Hemmung der acetoclatischen Methanogenese eine Halbierung der CH_4-Produktion (Abb. 4.9). Die CO_2-Produktion veränderte sich nicht durch die Hemmung. Alle Ansätze zeigten einen raschen Anstieg innerhalb der ersten fünf Tage, dem sich eine stationäre Phase anschloß (Abb. 4.10).

4.2.4 Biogeochemie anoxischer Inkubationen mit zusätzlichem Reisstroh

In diesen Inkubationen wurden die Auswirkungen höherer Anteile organischen Materials (Reisstroh) auf die CH_4-Produktion untersucht. In jeweils zwei Parallelen wurde zwischen Tag 5 und Tag 76 die kumulative Anreicherung von CH_4 in der Gasphase gemessen. Als Kontrolle wurden die gemessenen CH_4-Werte der anoxische Inkubationen ohne zusätzliches Reisstroh verwendet.

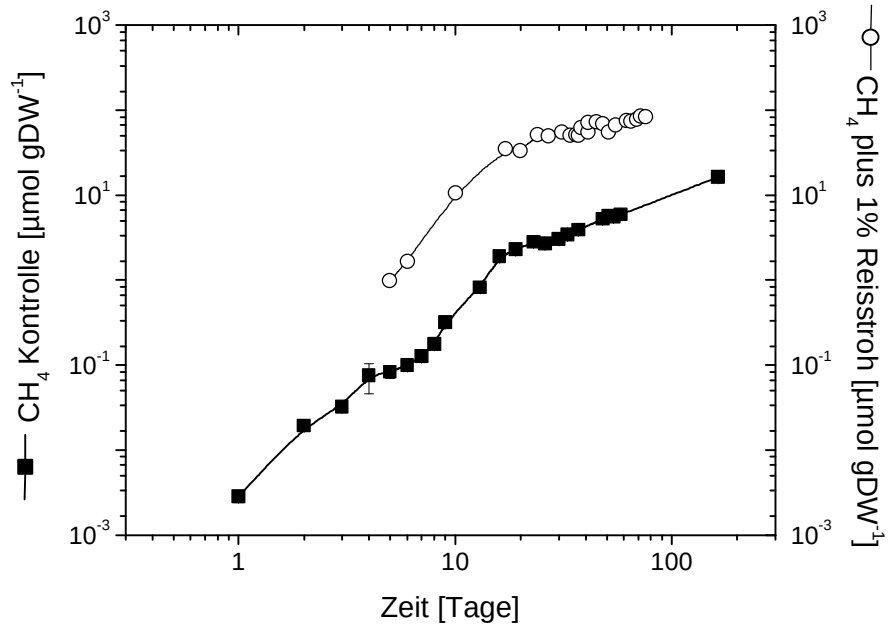


Abbildung 4.11: Methankonzentrationen in anoxischen Inkubationen ohne und mit zusätzlichem Reisstroh. Die logarithmische Zeitachse dient der besseren Darstellung der Dynamik der ersten Wochen.

Bereits bei der ersten Messung nach fünf Tagen wurde eine imVergleich zu den Kontrollen erhöhte CH_4-Konzentration gemessen (Abb. 4.11). Die Werte lagen innerhalb des Zeitraumes der weiteren Messung konstant über den Werten der Kontrollen.

4.3 Versuche zur Kultivierung von Ciliaten

Um Wachstums-, Produktions- und Beweidungsraten von Ciliaten anhand von Reinkulturen überprüfen zu können, wurde wiederholt versucht, Ciliaten zu kultivieren. Dazu wurden verschiedene anaeobe und aerobe Kultivierungstechniken verwendet.

4.3.1 Anaerobe Kulturen

Anaerobe Ciliaten konnten mit keinem in der Literatur angegebenen Medium aus Reisfeldboden angereichert werden. Auch *Metopus*–Kulturen (*Metopus es*, Stamm: CCAP 1653/2 und *Metopus palaeformis*, Stamm: CCAP 1653/3; CCAP, Windermere, UK) aus einer Stammsammlung konnten nicht länger kultiviert werden. So überlebte *M. es* nur zweimaliges Überimpfen. Die bereits sehr schwache Kultur von *M. palaeformis* konnte nicht wieder vermehrt werden. Nach diesen Fehlschlägen wurden Ciliaten für weitere Untersuchungen mit einer fein ausgezogenen Pasteur-Pipette unter dem Mikroskop gepickt.

4.3.2 Aerobe Kulturen

Mit der aeroben Kultivierungsmethode wurden verschiedene Ciliatenarten angereichert. Dies erleichterte die Artbestimmung in kritischen Fällen, da mehr Zellmaterial zur Verfügung stand. Wiederholt wurden auch Gymnostomatida in Kultur gebracht. Einige wenige Gymnostomatidazellen wurden erfolgreich mit der Protargol-Methode angefärbt. Dabei gelang die Anfertigung einiger Dauerpräparate, z.B. von *Protospathidium serpens*. Die für Versuche mit FISH als Positvkontrolle verwendeten *P. biaurelia* und *M. crassus* wurden ohne Probleme dauerhaft in Kultur gehalten.

4.4 Versuche mit FISH

4.4.1 Isolierung und Fixierung

Eine gute und etablierte Alternative zum Studium der mikrobiellen Gemeinschaft an und in Ciliaten stellt FISH dar. Durch Anwendung von FISH wurde versucht, sowohl Nahrungspräferenzen als auch die phylogenetische Identität der methanogenen Endosymbionten einzugrenzen. Dies war aufgrund der Fehlversuche bei der Kultivierung anaerober Ciliaten nicht an Kulturen möglich. Daher wurde zuerst die Technik für Bodenwasserproben optimiert. Als erstes wurde die beste Methode zur Isolierung der Ciliaten und dann die optimalen Fixierungsprotokolle ermittelt. Ciliaten wurden mit Hilfe einer fein ausgezogenen Pasteur-Pipette unter dem Mikroskop aus dem Bodenwasser gepickt. Als

Fixierungmethode bewährte sich 50% Bouin (20 – 45 min, Raumtemp.) für Ciliaten und Bakterien sowie 100% Ethanol (4 – 12 h, 4°C) für Archaea. Wiederholt wurden Ciliaten aus verschieden alten anoxischen Inkubationen fixiert und mit Fluoreszenz-gekoppelten Oligonukleotid-Sonden hybridisiert. Insgesamt 23 verschiedene Sonden wurden angewendet. Die für die Hybridisierungen im Bodenwasser optimalen Formamidanteile wurden der Literatur entnommenen und gegebenenfalls modifiziert (siehe Tab. 8.1).

4.4.2 Neue Sonden

Die neu erstellten Sonden (Tab. 3.4) führten zu keinem Ergebnis. Weder mit der Ciliophora-Sonde noch drei *Metopus palaeformis*-Sonden wurden erfolgreiche Hybridisierungen erzielt. In 25 Versuchen mit 2 bis 10 Objektträgern mit je 3 verschiedenen Hybridisierungen wurden insgesamt ca. 300 Zellen untersucht. Die taxonomische Zusammensetzung der bearbeiteten Zellen kann der Tab. 4.7 entnommen werden. Die während der Etablierung der Methode und später als Referenzorganismus verwendeten Zellen von *Euplotes crassus* und *Paramecium biaurelia* wurden dabei nicht mitgezählt. Das verwendete Protokoll wurde vielfach modifiziert um möglichst viele Parameter zu überprüfen. Primär wurde die Konzentration von Formamid und die Waschzeit im Waschpuffer modifiziert. Trotzdem konnten die optimalen Bedingungen für die neuen Sonden nicht gefunden werden.

Tabelle 4.7: Anzahl der mit FISH am CLSM bearbeiteten Ciliaten.

Taxon	Anzahl untersuchter Zellen
Metopus es	30
Metopus hasei	43
Metopus inversus	36
Metopus minor	52
Metopus palaeformis	107
Metopus setosus	23
Plagiocampa pentadactyla	6
Anzahl aller Zellen	297

4.4.3 Archaea in Ciliaten

Trotz Verwendung verschiedener Sonden bzw. ihrer Zielregionen auf dem 16S rRNS-Gen, verschiedenen Konzentrationen an Formamid und Waschzeiten gelang es nur selten endosymbiontische Methanogene zu hybridisieren (Abb. 4.15). Hybridisierungen mit der Positiv-Kontrolle (*M. arboriphilius*) gelangen hingegen fast immer. Allgemein wurden

Archaea nach einer Hybridisierung nur sehr selten innerhalb des Cytoplasmas von Ciliaten entdeckt (Abb. 4.12). Häufiger wurden hybridisierte Archaeazellen in zerstörten Ciliatenzellen (Abb. 4.15) oder in Nahrungsvakuolen (Abb. 4.13, Abb. 4.14) gefunden. Eine Anfärbung von Archaea im Cytoplasma nicht zerstörter Ciliatenzellen gelang in einem Fall (nicht dargestellt).

4.4.4 Bakteria in Ciliaten

Keinerlei Schwierigkeiten gab es bei Hybridisierungen mit Sonden für die Domäne Bakteria (Abb. 4.12 – 4.16). Zellen dieser Gruppe waren nach der Verwendung entsprechender Sonden jederzeit gut bis sehr gut sichtbar. Wiederholt wurden viele Zellen innerhalb von Nahrungsvakuolen (Abb. 4.16e und f) von *Metopus* sp. gefunden (Abb. 4.16c). Diese stammten aus unterschiedlichen phylogenetischen Gruppen (α-, β-, γ-*Proteobacteria*, *Clostridium* sp., u.a.; nicht dargestellt).

Zusätzlich wurde ein bisher nicht identifizierter Organismus im Cytoplasma von Zellen der Gattung *Metopus* gefunden. Es handelte sich dabei um ca. 5 · 1 µm lange kettenbildende Stäbchen, die mit der α–*Proteobacteria*-Sonde bei einer Konzentration von 30% Formamid hybridisierten (Abb. 4.16; Abb. 4.17). Verwendete Sonden für andere Bakteriagruppen (z.B. β–, γ–*Proteobacteria* oder *Clostridium* sp.; Tab. 8.1) hybridisierten nicht mit diesen Zellen. Diese Zellen wurden nur in den 5 größeren Arten der Gattung *Metopus* gefunden. In keinem Fall wurden sie in der kleinsten Art *M. minor* entdeckt.

Anhand der parallelen DAPI-Färbungen wurden deutlich mehr Signale detektiert (Abb. 4.12d; Abb. 4.14d; Abb. 4.17c). Die Abb. 4.14d zeigt exemplarisch im Cytoplasma liegende und mit DAPI anfärbbare Strukturen. Dabei kann es sich sowohl um cytoplasmatische Organellen wie Hydrogenosomen (bei anaeroben Ciliaten), Mitochondrien (bei aeroben Ciliaten) oder auch um Endobionten (z.B. Parasiten oder Endosymbionten) handeln. Letztlich war die Identität der Strukturen nicht festzustellen.

Die Fuoreszenz-Farbstoffe der Sonden wurden in allen Abbildungen gleich dargestellt. So entspricht Rot dem Cy3-, Blau dem Cy5- und Grün den FLUOS-Fluoreszenz-Farbstoff.

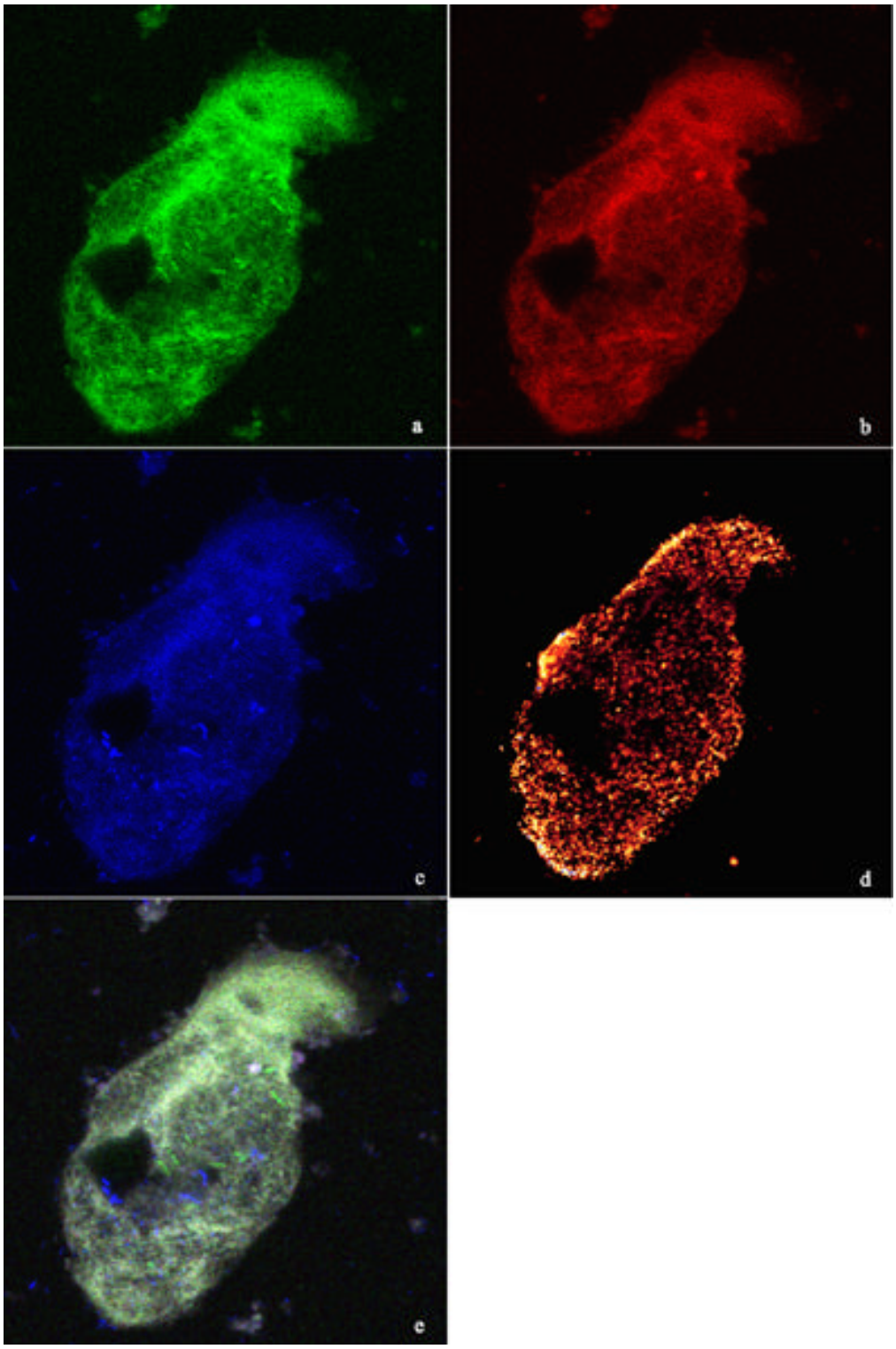


Abbildung 4.12: Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung von *Metopus es*; **a**: Grün – ARCMix-FLUOS, **b**: Rot – α-*Proteobacteria*-Cy3, **c**: Blau – EubMix-Cy5, **d**: DAPI, **e**: Projektion aus **a** – **c**; Bildausschnitt: 157 · 157 µm; Die Abbildung **e** zeigt die helle Autofluoreszenz der Ciliaten und die Differenz zwischen DAPI und FISH Signalen. Die Anzahl der DNS-enthaltenden Strukturen (Abb. 4.12d) ist dabei höher als die der mit FISH detektierten Signale.

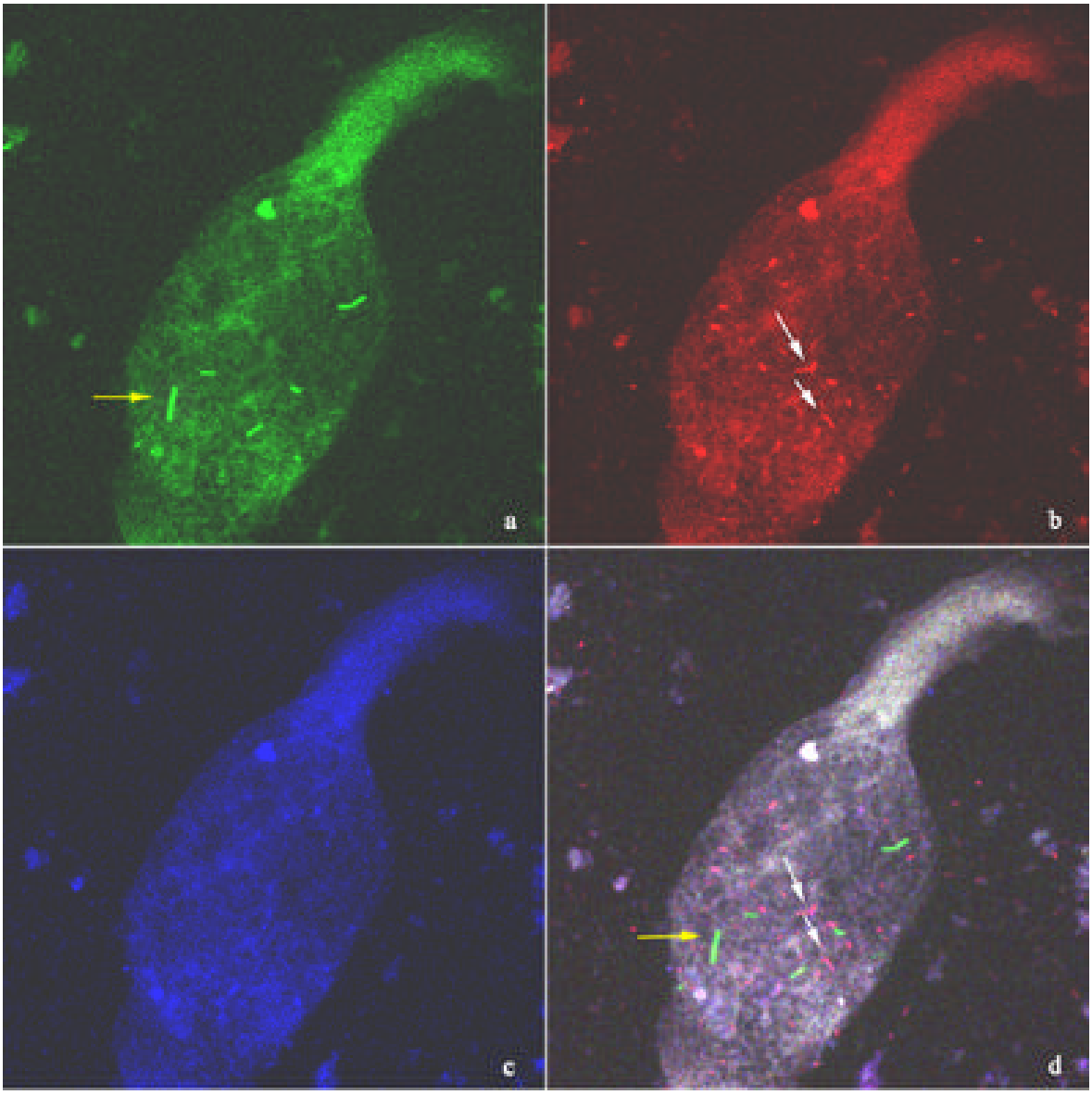


Abbildung 4.13: Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung von *Metopus es*; **a**: Grün – ARCMix-FLUOS, **b**: Rot – EubMix-Cy3, **c**: Blau – α-*Proteobacteria*-Cy5, **d**: Projektion aus **a** – **c;** Bildausschnitt: 157 · 157 µm; Die gelben Pfeile weisen auf Archaea, die weißen auf Bakteria hin. Die Abbildung zeigt die Verteilung der verschiedenen Zellen im Ciliaten. Nicht alle Zellen sind dabei einwandfrei in Nahrungsvakuolen lokalisierbar. Weitere Details der Abbildung werden in Abb. 4.14 hervorgehoben.

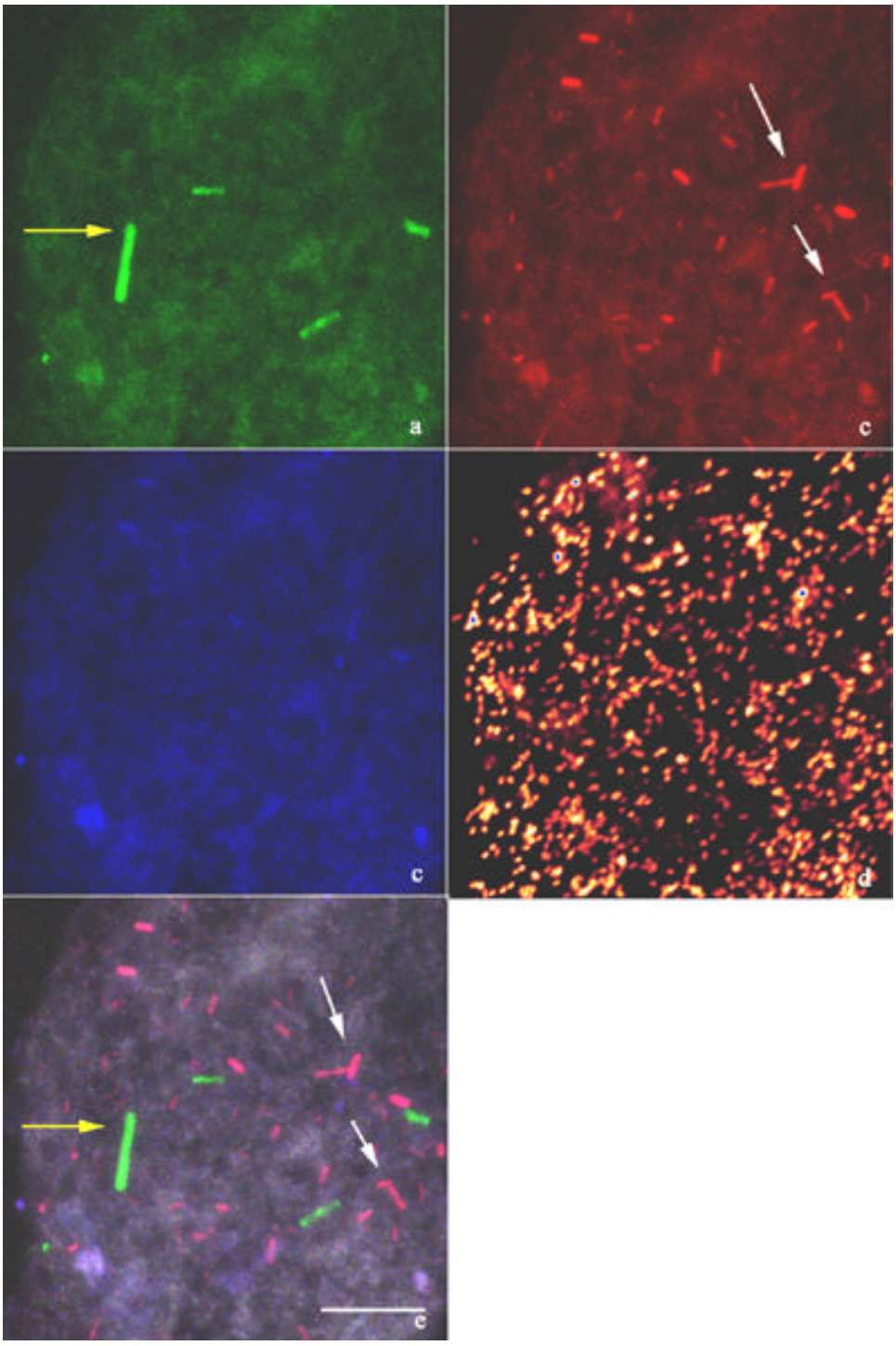


Abbildung 4.14: Detailvergrößerung aus Abb 4.13; **a**: Grün – ARCMix-FLUOS, **b**: Rot – EubMix-Cy3, **c**: Blau – α-*Proteobacteria*-Cy5, **d**: DAPI, **e**: Projektion aus **a** – **c**; Balkenlänge (**e**): 14 µm; Die gelben Pfeile weisen auf Archaea, die weißen auf Bakteria hin. Diese Vergrößerungen aus *Metopus es* zeigen die unterschiedlicheVerteilung der hybridisierten Zellen gegenüber den DAPI-Signalen. Das FISH-Signal wird dabei nur selten vom DAPI-Signal bestätigt.

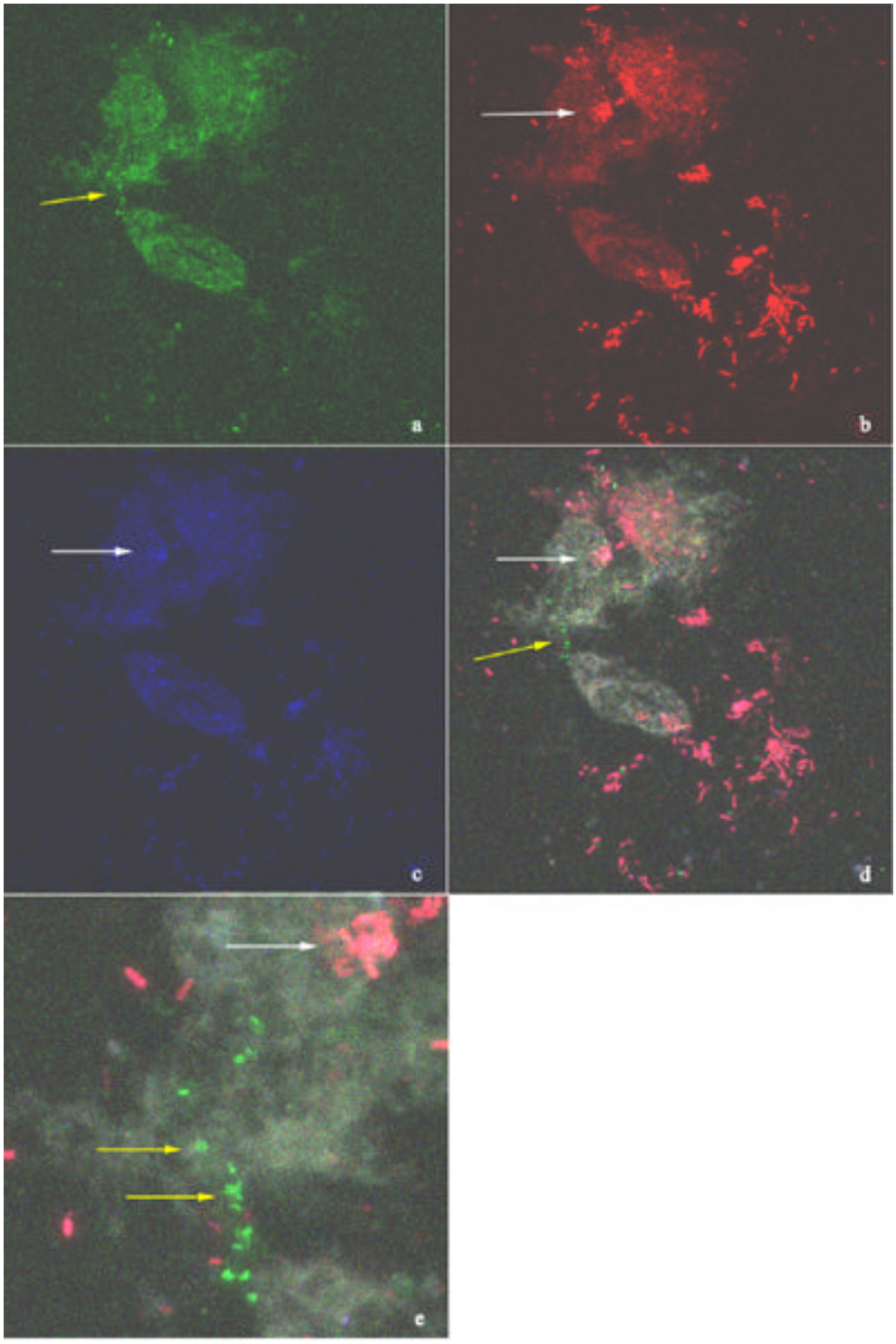


Abbildung 4.15: Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung von *Metopus es*: geplatzte Zelle; **a**: Grün – ARCMix-FLUOS, **b**: Rot – EubMix-Cy3, **c**: Blau – MB310-Cy5, **d**: Projektion aus **a** – **c, e**: Vergrößerung aus **d**; Bildausschnitt: **a** - **d**: 156 · 156 µm, **e**: 48 · 48 µm; Die gelben Pfeile weisen auf Archaea, die weißen auf Bakteria hin. Archaea wurden nur außerhalb oder innerhalb geplatzter Ciliaten hybridisiert. Die Form der Archaea legt nahe, daß sie mit denen in DAPI-Färbungen (z.B. Abb. 4.13d) sichtbaren Strukturen identisch sind.

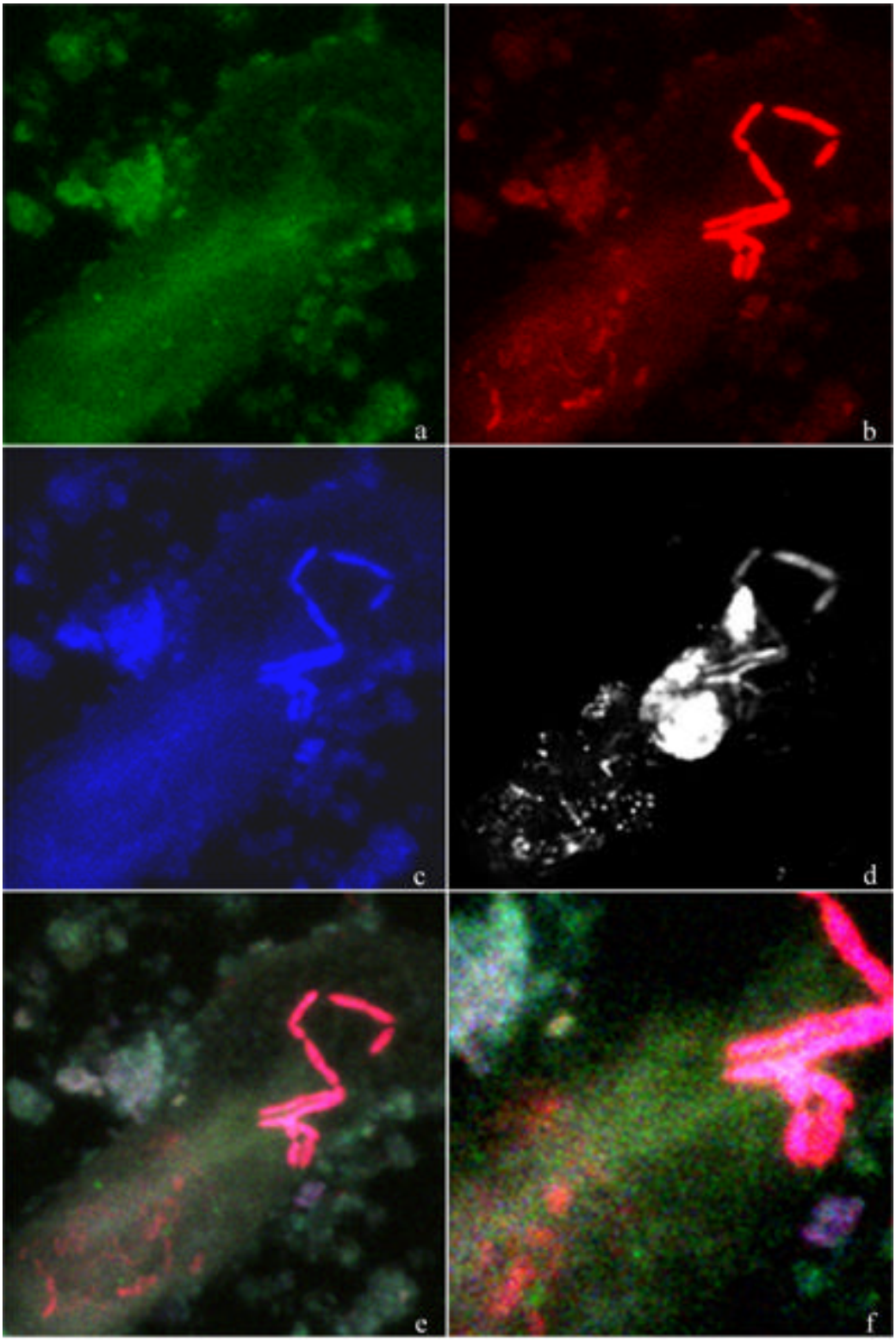


Abbildung 4.16: Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung von *Metopus palaeformis*; **a**: Grün – ARCMix-FLUOS, **b**: Rot – Eub 338-Cy3, **c**: Blau – α-*Proteobacteria*-Cy5, **d**: DAPI, **e**: Projektion aus **a** – **c**; Bildausschnitt: 80 · 80 µm, **f**: Detail aus **e**, 40 · 40 µm; Ca. 5 · 1 µm große, kettenbildende α-*Proteobacteria* waren im vorderen Zellabschnitt (rechte obere Ecke) deutlich zu erkennen. Im hinteren Zellabschnitt sind Nahrungsvakuolen mit Bakteria-Signalen, sowie vereinzelte Archaea-Signale im Cytoplasma erkennbar.

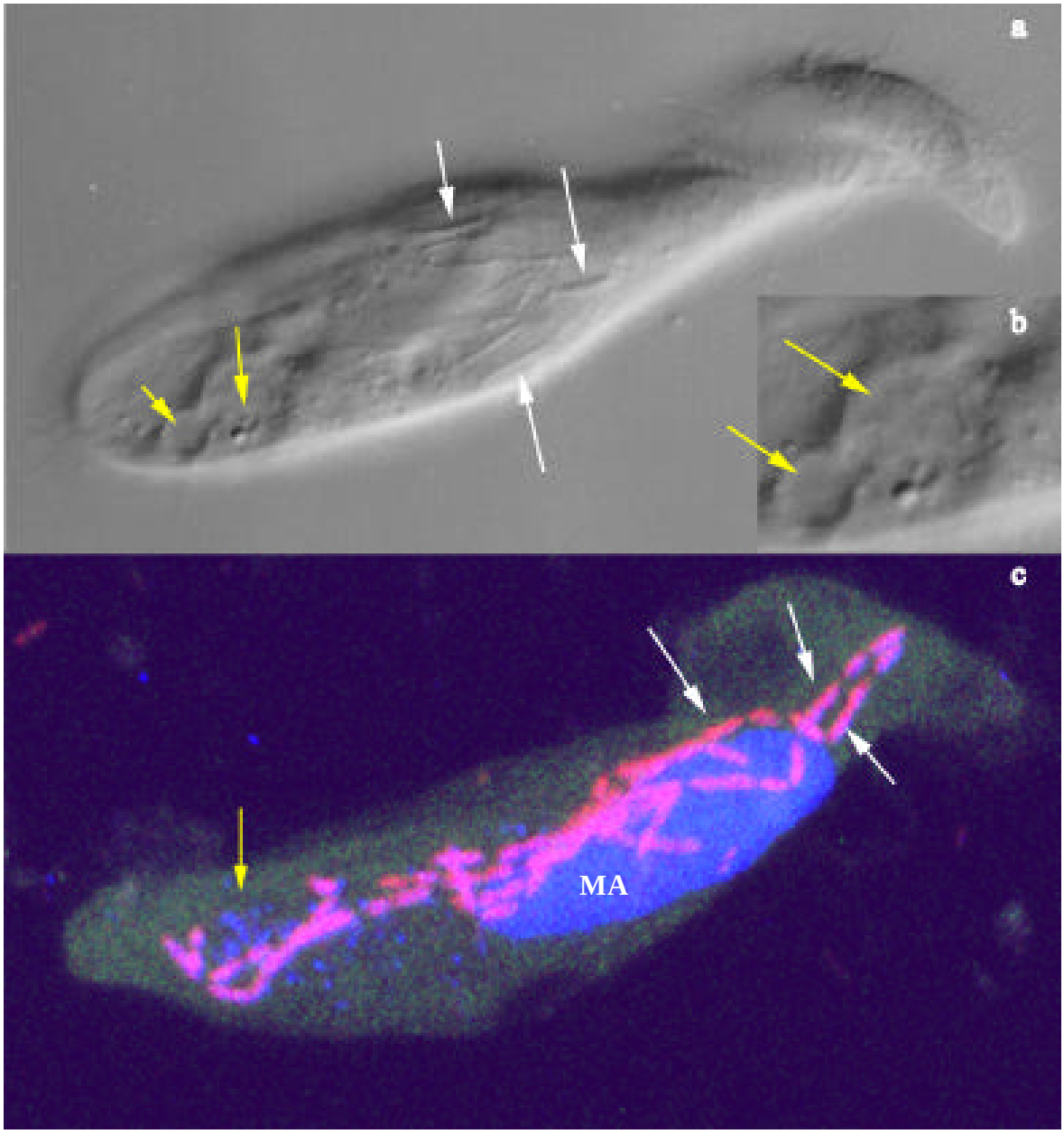


Abbildung 4.17: **a**: Endobionten in *M. palaeformis* im differenziellen Interferenz-Kontrast nach Nomarski (130 · 30 µm). Die gelben Pfeile markieren eine gefüllte Nahrungsvakuole (**a** und **b**); **c**: *M. palaeformis*-Zellen nach DAPI-Färbung (Blau) und Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung (120 · 26 µm) mit α–*Proteobacteria*-spezifischer Oligonukleotid-Sonde (Rot). Die starke Autofluoreszenz der Ciliatenzelle ist in Grün dargestellt. Die α–*Proteobacteria* (Stäbchen) sind durch weiße Pfeile markiert. Das DAPI-Signal zeigt deutlich den große Makronukleus (MA) und eine Nahrungsvakuole (gelber Pfeil) markiert.

5 Diskussion

5.1 Ciliatenfauna des Reisfeldbodens

5.1.1 Diversität

Die regelmäßige Untersuchung des Bodenwassers zeigte eine deutliche Dominanz der Ciliaten als wichtigste Protozoengruppe. Andere Protozoen wurden nur selten aktiv angetroffen. Dieses Ergebnis unterscheidet sich von den Resultaten anderer Arbeiten. In der Mehrzahl der dort untersuchten (*upland*) Böden dominierten Gymnamoeben vor Flagellaten und diese wiederum vor Thekamoeben und Ciliaten (Ekelund und Rønn, 1994, Finlay *et al*., 2000). In anaeroben Inkubationen scheinen jedoch die Ciliaten die dominierende Gruppe zu sein. Einige Autoren (Ekelund *et al*., 2001; Foissner, 1999b) weisen auf die Ungenauigkeit der direkten Zählungen zur Bestimmung der Zellzahlen von Gymnamoebae und Flagellata hin. Diese sind stark an Oberflächen von Partikeln gebunden bzw. setzen sich dort fest (Foissner, 1999b). Somit können sie nicht im Bodenwasser detektiert werden. In dieser Arbeit wurden Gymnamoeben, Flagellaten und Thekamoeben direkt gezählt, so daß eine Unterschätzung der relativen Populationsgrößen zwischen den einzelnen Gruppen nicht ausgeschlossen werden kann (Rønn *et al*., 1995; Ekelund *et al*., 2001). Andererseits hat sich jedoch die Direktzählung zur Evaluierung der Ciliatenabundanzen als beste Methode bewährt (Berthold und Palzenberg, 1995; Lüftenegger *et al*., 1988). Bei der Bestimmung von Ciliaten-Zellzahlen sind andere häufig verwendete Methoden wie die MPN-Methode stark fehlerbehaftet. Sie können zu Über- oder Unterschätzungen der Zellzahlen um den Faktor 10^3 (Berhold und Palzenberger, 1995) führen. Auch die direkte Zählung der Ciliaten ist mit einem Fehler in den Wiederfindungsraten von ca. 30% behaftet (Foissner, 1987). Dieser ist jedoch im Vergleich zu denen der anderen Methoden deutlich geringer. Die in den Versuchen gemessenen Zellzahlen geben somit die vorherrschenden Abundanzen gut bis sehr gut wieder.

Die Diversität der Ciliaten war mit 23 Taxa in den anoxischen Inkubationen sehr hoch. Im Vergleich zu einem kürzlich veröffentlichten Übersichtsartikel (Foissner, 1998), in dem nur 10 anaerobe Arten aufgeführt wurden, entspricht dies mehr als doppelt so vielen Arten. Zu den anaeroben Arten des Reisfeldbodens zählen Spezies der dominierenden Gattung *Metopus* (6 Arten) und *Cirranta mobilis.* Alle anderen Taxa wurden als fakultative Anaerobier klassifiziert. Diese Taxa wurden auch in den Bodenkulturen (NFPD- Methode) für 2 – 4 Wochen und unter oxischen Bedingungen gefunden. Die fakultativen Taxa sind in der Lage, unter anoxischen Bedingungen (z.B. *P. pentadactyla*) zu leben, sind jedoch vermutlich eher mikroaerophil. Ähnliche Beobachtungen machte Fenchel (1969), der wiederholt als

microaerophil klassifizierte Ciliaten in anoxischen Sedimenten unterhalb der Oxykline fand. Die Fähigkeit, unter anoxischen Bedingungen zu überleben, wurde von Ekelund und Rønn (1994) für viele bodenbewohnende Protozoen postuliert. Sie ist eine Grundvoraussetzung für die Überlebensfähigkeit im Boden, wo sich anoxische Bedingungen schnell etablieren können. Gerade Reisfeldböden sind durch ständigen Sauerstoffmangel über längere Zeiträume charakterisiert (Conrad und Frenzel, 2002). Auch in *upland* Böden etablieren sich zeitweilig anoxische Verhältnisse. In diesen Böden ist die Entstehung anoxischer Verhältnisse jedoch abhängig vom Bodenwassergehalt (z.B. nach starkem Regenfall) sowie der Bildung von *Hotspots* biologischer Aktivität um Aggregate partikulären organischen Materials (Sexstone *et al*., 1985; Tiedje *et al*., 1984; Wachinger *et al*., 2000). Die Toleranz gegenüber anoxischen Bedingungen stellt einen adaptiven Vorteil der Ciliatenfauna in vielen Böden dar.

Die gesamte Diversität der Ciliatenfauna ist mit 52 Taxa doppelt so hoch wie der europäische Mittelwert (26 Arten Bodenprobe^{-1}; Foissner, 1997c). Sie liegt jedoch, wie der folgende Vergleich zeigt, unterhalb der Zahlen, die von anderen Reisfeldern bekannt sind. So fand Foissner (1997a) 83 Arten in einem japanischen Reisfeldboden. Heckman (1979) berichtet von 83 Arten in einem Reisfeld aus dem Nordosten Thailands. Madoni (1987) fand 42 Arten in einem italienischen Reisfeld der Po-Ebene in Italien. Einzig Foissner (1997a) untersuchte explizit die Ciliatenfauna eines Reisfeldbodens, nennt aber nur die Anzahl der gefundenen Arten und nicht deren Zusammensetzung. Diese hier vorgelegte Arbeit stellt somit die erste genaue Auflistung der Ciliatenfauna und ihrer Zellzahlen in Reisfeldboden dar. Die anderen beiden genannten Autoren untersuchten die gesamte, also auch die Flutwasser-Ciliatenfauna und den Aufwuchs. Nur ein Vergleich mit Teilen der Ciliatenfauna in den im Feld gestochenen Bodenkernen (Tab. 4.6) ist zulässig. Da das Flutwasser bei den im Feld genommenen Proben mit untersucht wurde, können die Habitate verglichen werden. Ein Vergleich mit der Artenliste von Madoni (1987) zeigt, daß 4 Taxa (von 5 Taxa der Bodenkerne) des Flutwassers übereinstimmen. Eine geringere Übereinstimmung wurde für den Wasser-Sediment-Übergang gefunden (nur 2 Taxa von 7 der Bodenkerne). Die Untersuchung der Proben aus dem Feld erfolgte ca. sechs Wochen nach der Flutung. Die Diversität der Ciliaten im Feld lag zu diesem Zeitpunkt (ca. 42 Tage nach Beginn der Flutungsperiode) bei 7 Taxa und damit der im Labor (8 Taxa, Tag 44) ähnlich. Zwei der Taxa waren dabei in beiden Proben identisch (*Metopus hasei* und *Plagiocampa pentadactyla*). Aufgrund dieses Befundes wurde die Diversität beider Habitate als vergleichbar angesehen. Es kann davon ausgegangen werden, daß mit steigender Anzahl der Probennahmen im Reisfeld die beiden Ciliatenpopulationen zunehmend ähnlicher werden. Verschiedene

Autoren haben eine Korrelation zwischen Anzahl der genommenen Proben, dem Zeitraum (Dauer) der Probennahme und der Anzahl gefundener Arten aufgezeigt (z.B. Foissner, 1987, 1997c). Es ist deshalb sehr wahrscheinlich, daß Diversität und Anzahl der Arten im Feld im Laufe weiterer Messungen zugenommen hätte.

Die Gruppe Gymnostomatida (Tab.3.2) erreichte mit 17 Taxa (33%) im gesamten Arteninventar bzw. 10 Taxa (43%) in den anoxischen Inkubationen die größte Diversität. Ein Vergleich mit Daten aus der Literatur zeigte, daß die Gruppe Gymnostomatidae die zweitgrößte Ciliatengruppe des Bodens bilden (Foissner, 1998). In den anoxischen Inkubationen stellten sie die größte Gruppen (höchste Anzahl an Taxa). Die Gruppe Hypotrichida, welche laut Foissner (1998) die höchste Artenvielfalt aufweist, war im gesamten Arteninventar an zweiter und in den anoxischen Inkubationen an dritter Stelle. Heterotriche Ciliaten waren die dritt- (gesamt) bzw. zweithäufigste (anoxische Inkubationen) Gruppe im Reisfeldboden. Die Gruppe Colpodida, die in verschiedenen Böden abundant ist, war im Reisfeldboden von geringer Bedeutung. Heterotriche Ciliaten scheinen also von besonderer Bedeutung innerhalb des Reisfeldbodens zu sein. Der primäre Faktor ist der große Anteil an obligat anaeroben Formen innerhalb der Heterotrichida (insbesondere der Gattung *Metopus*).

Es zeigte sich, daß die Diversität der Ciliatenfauna in der Anzahl der vorkommenden Arten der anderer (vorwiegend von *upland*) Böden ähnlich ist. Im direkten Vergleich zu anderen Artenzahlen aus Reisfeldern ist die Diversität jedoch geringer. Die Dominanz der taxonomischen Gruppe Gymnostomatida ist ungewöhnlich und scheint aus den Besonderheiten des Reisfeldbodens, wie einer extrem kurzen Nahrungskette unter anoxischen Bedingungen, zu resultieren (Fenchel und Finlay, 1990). Die Diversität der Gruppe spricht dafür, daß diese Gruppe gut an die vorherrschenden anoxischen Bedingungen angepaßt ist. Der große Anteil der heterotrichen Ciliaten in den anoxischen Inkubationen ist vorrangig auf die primär anaeroben Formen der Gruppe zurückzuführen. Die Gruppe Colpodida scheint dagegen nicht mit anoxischen Bedingungen umgehen zu können. Dabei ist insbesondere die Art *Colpoda steinii* als mikroaerophil bekannt (Foissner, 1993).

5.1.2 Populationsdynamik

In den anoxischen Inkubationen wurde ein typischer Populationsverlauf beobachtet. So wurden innerhalb der ersten drei Wochen die meisten Arten, die höchsten Abundanzen und die größte zusammenhängende Artengemeinschaft (Tab. 4.3 und Abb. 4.1) gefunden. Nach

ca. 30 Tagen wurde eine Veränderung der Populationsgröße und –struktur beobachtet. Ähnliche Populationsveränderungen wurden für diesen Zeitraum häufig aus Inkubationen von luftgetrockneten und mit der NFPD-Methode inkubierten Böden beschrieben (z.B. Foissner, 1987). Diese Beobachtung wurde unter dem Begriff Ciliatostasis zusammengefaßt (Foissner, 1987). Die diese bedingenden Parameter wurden bislang nicht ermittelt (z.B. Tomaru, 2002). Der Begriff beschreibt die Beobachtung, daß auch unter „optimalen“ (Foissner, 1987) Bedingungen große Teile der in Cysten vorkommenden Ciliaten in diesen verbleiben. Auch dieser Mechanismus ist bisher ungeklärt. Es wird vermutet, daß er über die Dichte aktiver Ciliaten gesteuert wird (Ekelund *et al.*, 2002). Der Begriff Ciliatostasis wird im weiteren Verlauf dieser Diskussion nur verwendet, um die beobachteten Veränderungen der Populationsstruktur (den Einbruch der Zellzahlen) zu beschreiben.

Die in den anoxischen Inkubationen beobachtete Dynamik der Population ließ sich in zwei Phasen teilen, die durch die Ciliatostasis getrennt waren. In der Phase 1 waren die höchsten Abundanzen, die größte Diversität und der höchste Artenumsatz zu finden (Tab. 4.3). In vielen Böden wurden deutlich höhere Abundanzen gefunden (Foissner, 1987). So entsprachen das Maximum der im Reisfeldboden gezählten Zellzahlen ca. 2% der von Finlay *et al*. (2000) in *upland* Boden gefundenen Individuenzahlen. Da es sich jedoch um ein anaerobes Ökosystem handelt

Die Gattung *Metopus*, insbesondere *M. hasei*, wird häufig für anoxische Böden angeführt und gilt als Indikator für Sauerstofflimitation. *M. minor* wurde als häufigste Art während der letzten 70 Tage der Inkubation gefunden. Sie wurde in der zweiten Phase die häufigste Art des anoxischen Reisfeldbodens (56 - 90%). Generell waren andere (nicht *Metopus*) Arten von geringer Bedeutung. Interessanterweise wurden auch die auf der taxonomischen Ebene häufigste Gruppe der Gymnostomatida in nur sehr geringen Zellzahlen gefunden. Innerhalb der ersten drei Wochen lag ihr Anteil im Mittel bei 12 und danach bei 1,25% der Gesamtpopulation. Zieht man in Betracht, daß es sich primär um Jäger anderer Ciliaten handelt, kann man so Rückschlüsse auf die Beutesituation und –selektion ziehen. In der ersten Phase der Inkubation konnte sich also eine größere Jägerpopulation entwickeln.

Die Auftragung der taxaspezifischen Abundanzmaxima über den untersuchten Zeitraum (Tab. 4.3) zeigt deutlich eine Abfolge der Taxa in einem sukzessiven Muster, das durch die Cluster-Analyse (Abb. 4.1) gestützt wird. Der Begriff Sukzession kann bei den hier vorgefundenen Verteilungsmustern der Taxa in der Definition von Begon *et al*. (1991, S. 696: „*...das nicht*

saisonale, gerichtete und kontinuierliche Muster von Besiedlung und Aussterben von Populationen an einer Lokalität.“) verwendet werden. So lassen sich 4 verschiedene Cluster finden. Die ersten 3 wurden der 1. Phase zugeordnet. Interessanterweise bilden die *Metopus*-Arten je 2 Cluster (*M. inversus, M. palaeformis, M. setosus* - in der 1. Phase; *M. hasei, M. minor* - in der 2. Phase). Die einzige Ausnahme bildet *M. es*. Der 4. Cluster bestand aus kleinen Arten, welche die Phase 2 dominierten. Auch in diesem Cluster befanden sich zwei fakultative Arten, die zwar eine geringere Abundanz als die *Metopus*-Arten aufwiesen, aber trotzdem regelmäßig angetroffen wurden. Keines der Cluster bzw. der Taxa zeigte seine maximale Abundanz während der Ciliatostasis (Tab. 4.3).

Der nach 30 Tagen zu beobachtende Rückgang der Zellzahlen ist typisch für Ciliatenpopulationen in luftgetrockneten und mit der NFPD-Methode bearbeiteten Inkubationen (Foissner, 1987). Die Gründe für diesen Rückgang sind bisher nicht bekannt. Petz (1997) merkt jedoch an, daß es sich um einen typischen Effekt von Böden gemäßigter Klimazonen handelt, während er in antarktischen Böden keine solche Beobachtung machte. Die Veränderung der Population ließ sich mit keinem der gemessenen biogeochemischen Parameter (z.B. der wichtigsten alternativen Elektronen-Akzeptoren; Abb. 4.7) in Verbindung bringen. Die Ciliatenpopulation bricht jedoch nicht komplett zusammen. Sie hält sich auf niedrigem Niveau, das aber höher ist als das zu Beginn der Inkubation (Tag 1; Abb. 4.2).

Die Artenzahl und Individuendichte der Ciliaten in anoxischen Inkubationen ist vergleichbar mit denen von *upland* Böden. Allerdings unterscheidet sich die Dominanz der Gruppe von *upland* Böden. Die Zellzahlen und Diversität der Gruppe sind aber stark vom Gehalt an partikulärem organischen Material abhängig. So verursachte der Zusatz von Reisstroh in die anoxischen Inkubationen einen Anstieg der Häufigkeit von Flagellaten also eine Veränderung innerhalb der Protozoenfauna. Zudem wurden nur sechs Ciliatenarten gefunden. Diese sechs Arten wurden in den anoxischen Inkubationen ohne zusätzliches Reisstroh als dominierende Spezies innerhalb der Phase 2 gefunden. In diesem Versuch waren sie bereits während nach 30 Tagen, also zum vermutlichen Beginn der Ciliatostasis die dominierenden Arten. Höhere Anteile an Reisstroh bewirken somit auch eine beschleunigte Sukzession der Ciliatenfauna im anoxischen Reisfeldboden.

Die verwendete direkte Zählung ist nicht für alle Protozoengruppen des Bodens gleich gut geeignet. Ein weiterer Anstieg von Ciliatenzahlen und Diversität ist in bepflanzten Mikrokosmen mit Reisfeldboden zu erwarten, da durchwurzelte Systeme meist höhere

Zellzahlen enthalten (z.B. Ekelund und Rønn, 1994). Diese Beobachtung wird z.B. auf Wurzelexsudate zurückgeführt. Im gefluteten Reisfeld kommt hinzu, daß sich oxische Bereiche um die Reiswurzeln bilden. Einen Hinweis auf abweichende Umweltbedingungen ergab die Probennahme im Feld, bei der eine andere Zusammensetzung der Ciliatenfauna nachgewiesen wurde.

5.1.2.1 Obligat und fakultativ anaerobe Arten

Was die fakultativ anaeroben Ciliaten in die Lage versetzt, im anoxischen Milieu zu überleben oder zu wachsen, ist bisher unbekannt (Bernard und Fenchel, 1996). Bei einigen limnischen und marinen fakultativen anaeroben Formen wurden unter anoxischen Bedingungen Wachstumsraten beobachtet, die denen obligat anaerober ähnlich waren (Bernard und Fenchel, 1996). Die physiologischen Hintergründe dieser Fähigkeit sind jedoch noch nicht geklärt. Es wurde jedoch wiederholt eine morphologische Veränderung der Mitochondrien beobachtet. Dies führte zu Spekulationen über eine Beteiligung der Mitochondrien am anaeroben Stoffwechsel (Bernard und Fenchel, 1996). Andere Autoren bringen eine Vergrößerung der Mitochondrien vielmehr in Verbindung mit dem Abbau oder Verlust der mitochondrialen DNS bzw. der mitochondrialen Aktivität (Bertoni-Freddari *et al*., 2003; Dimmer *et al*., 2002). Bernard und Fenchel (1996) und Fenchel und Finlay (1995) vermuten, daß der Energiehaushalt primär auf Glykolyse beruht, halten aber auch andere Stoffwechselwege für möglich. Fenchel und Finlay (1990) errechneten, daß anaerobe Ciliaten etwa 20% Wachstumseffizienz im Vergleich zu aeroben Ciliaten besitzen. Die im Vergleich zu Aerobiern schlechtere Energieausbeute kann die beobachtete Abweichung zwischen geringer Abundanz der Ciliaten in den anoxischen Inkubationen bei gleichzeitig gut gefüllten Nahrungsvakuolen erklären.

Die Mehrzahl der in Phase 1 gefundenen Arten mit sehr geringer Abundanz dürfte gerade bei den nur an wenigen Meßtagen vorkommenden Arten (z.B. *Colpoda steinii*, Tab. 4.3) auf einem Excystieren einzelner Individuen und nicht auf Wachstum beruhen. Insbesondere die Gattung *Colpoda* ist als microaerophiler Pionier in neuen Habitaten bekannt (Foissner, 1993). Es handelt es sich bei dem Erscheinen der Art vermutlich um ein offensives Testen der Umweltbedingungen. Gerade die Familie Colpodidae enthält viele Arten, die schnell excystieren und encystieren können. Als typische Gruppe des Bodens (Foissner, 1998) wurden sie im Gesamtarteninventar mit einem Anteil ca 13,5% (7 Arten) gefunden. In den anoxischen Inkubationen wurde eine größere Diversität aufgrund der Anpassung an den Boden erwartet. Das Auftauchen nur einer Art dieser Gruppe war überraschend. Dieses

Ergebnis deutet auf eine geringe Toleranz gegenüber anoxischen bzw. eine Bevorzugung von mikroaerophilen Umweltbedingungen im Boden hin.

Zwei fakultativ anaerobe Arten, *Plagiocampa pentadactyla* und *Spathidium* cf. *crassum*, wurden über längere Zeiträume (ca. 120 Tage) in aktivem Zustand gefunden (Tab. 4.3). Bei der ersten Art (*P. pentadactyla*) läßt sich diese Fähigkeit möglicherweise über ektobiontische Symbionten erklären. Diese wurden bereits in der Artbeschreibung (Foissner *et al*., 2002) erwähnt und an den Individuen im anoxischen Reisfeldboden wiederholt beobachtet. Bisher war es nicht möglich, diese Ektosymbionten näher zu charakterisieren. Bei *Spathidium* cf. *crassum* ist diese Fähigkeit zur Zeit nicht erklärbar. Zu keinem Zeitpunkt konnten in bzw. auf dieser Art Endo- oder Ektosymbionten dargestellt werden. Es handelt sich bei dieser Art wahrscheinlich um eine obligat anaerobe Art, da sie nur in den anoxischen Inkubationen entdeckt wurde. Um diese These zu prüfen, müßte die Art jedoch in Kultur gebracht werden. Dies wäre nötig, da in der Artbeschreibung von Kahl (1926) kein Hinweis auf diese Fähigkeit gegeben wurde. Diese Art wurde jedoch aus einer Pfütze auf einer Weide isoliert, was eine solche Eigenschaft nahelegen könnte.

Die in den anoxischen Inkubationen dominierenden Arten der Gattung *Metopus* besaßen aktive methanogene Endosymbionten (Abb. 4.5a und b). Nur für die größeren *Metopus*-Arten sind diese Symbionten für die Wachstumseffizienz der Zellen von Bedeutung (Fenchel und Finlay, 1995).

5.1.2.2 Ernährungsgilden

Die Tab. 4.1 zeigt eine klare Dominanz der bakteriovoren Taxa mit insgesamt 33 Taxa. Dieser Ernährungstyp dominiert in Abundanz und Biomasse deutlich die Ciliatenfauna. Insbesondere in den ersten 3 Wochen der Inkubation ging von diesem Typ ein Beweidungs-Effekt auf die bakterielle Gemeinschaft aus (Abb. 4.6). Betrachtet man den Verlauf der Ciliatenpopulation in Bezug auf die Wachstumseffizienz der Ciliaten im anoxischen Ökosystem, so muß eine große Menge an mikrobieller Biomasse konsumiert worden sein, um die vorgefundene Populationsgröße zu ermöglichen.

Im gesamten Arteninventar liegt der Anteil carnivorer Taxa bei 19. Carnivore Arten repräsentieren in einem anaeroben Ökosystem die oberste trophische Ebene, da in einem anoxischen Ökosystem die Nahrungskette sehr kurz ist (Fenchel und Finlay, 1990). So wurde in den anoxischen Inkubationen *Spathidium* cf. *crassum* über ca. 140 Tage regelmäßig, wenn

auch in sehr geringen Abundanzen, gefunden. Dies weist darauf hin, daß diese Art in diesem Zeitraum ein Mitglied der obersten trophischen Ebene in anoxischen gefluteten Böden ist. Die Abundanzen der carnivoren Arten stehen in einem Verhältnis von ca. 1:10 bis 1:100 zu den potentiellen Beuteorganismen.

Die in Tab. 4.1 aufgelisteten Gruppen enthalten einige omnivore Taxa, die auch Pilze (Hyphen oder Sporen) fressen können. Explizit fungivore Arten fehlen. Ihr Fehlen läßt sich durch die relativ geringe Abundanz und Biomasse von Pilzen im anoxischen Reisfeldboden erklären (Reichardt *et al*., 2001). In *upland* Böden sind Pilze eine wichtige Gruppe bei der Remineralisation von organischem Material (Clarholm, 1994). Das Fehlen der Pilze im anoxischen gefluteten Boden ist ein wichtiger Unterschied zu *upland* Böden.

5.2 Kultivierung von Ciliaten

Ziel dieser Versuche waren Reinkulturen indigener aerober und anaerober Ciliaten. Kulturen verschiedener Taxa hätten die Messung spezifischer Stoffwechselraten und ihrer Endosymbionten (z.B. Biagini *et al*., 1998) sowie die Bestimmung von Beweidungsraten erlaubt (Fenchel und Finlay, 1990). Die in Kulturbanken erhältlichen Kulturen anaerober Ciliaten sind häufig in schlechtem Zustand. So wurde beispielsweise die *Metopus palaeformis* CCAP 1653/3 Kultur in sehr geringer Zelldichte geliefert. Eine Kontrolle der wenigen aktiven *Metopus*-Zellen zeigte zudem keine methanogenen Endosymbionten (F_{420}-Autofluoreszenz) mehr. Es ist bekannt, daß kultivierte anaerobe Ciliaten ihre methanogenen Endosymbionten mit der Zeit verlieren können (z.B. *Trimyema compressum*; Wagener und Pfennig, 1987). Dies war bei der Kultur von *M. palaeformis* anscheinend der Fall. Worin die Schwierigkeiten genau liegen, wurde im Laufe der Versuche trotz einer Vielzahl von Kulturbedingungen nicht geklärt. Im Fall der aeroben und fakultativ anaeroben Ciliaten, die auch in den aeroben Standardkulturen (Volvic und Weizenkörner) gefunden wurden, gelang eine Kultivierung häufig. Auf diesem Weg wurden wiederholt Ciliaten für Protargol-Färbungen und FISH angereichert.

5.3 Der Elektromigrationsapparat

Ziel dieses Versuches war es, Ciliaten in größerer Anzahl aus dem Bodenwasser zu isolieren. Verschiedenen Autoren gelang es so, Ciliaten aus Umweltproben zu isolieren (z.B. van Hoek *et al*., 1998), so daß es möglich gewesen wäre, auch ohne Kultivierung an größere Zellzahlen relevanter Organismen zu gelangen.

Der Elektromigrationsapparat nach Wagener *et al*. (1986) war hinsichtlich eines zusammenhängenden Gasraums beider Migrationskammern modifiziert worden (Abb. 3.2). Dadurch wurde es möglich, beide Kammern getrennt oder zusammen mit N_2 oder N_2/CO_2 zu begasen. Der modifizierte Elektromigrationsapparat zeigte in Vorversuchen gute Ergebnisse. Eingebrachte aerobe Ciliaten (*Paramecium biaurelia*) aus einer Mixkultur mit Flagellaten wanderten innerhalb von 2 min zur Kathode (20 V, ca. 1 mA). Schon in den Vorversuchen wurde deutlich, daß die Isolierungskammer (zur Entnahme) im Fall der *Paramecien* zu groß geplant war. Das machte ein erneutes Aufkonzentrieren, z.B. durch Zentrifugieren, nötig. Bei einem Neubau würde es sich empfehlen, die Isolierkammer auf maximal 1/3 der Volumina der Probenkammer zu verkleinern.

Der gleiche Versuch wurde mit Bodenwasser-Ciliaten bei verschiedenen Spannungen und Flußrichtungen (siehe Wagener *et al*., 1986) ohne Erfolg durchgeführt. Auch ein Austausch des Elektromigrationspuffers durch steril filtriertes, anoxisches Bodenwasser brachte keine Veränderung. Bei einer abschließenden mikroskopischen Kontrolle wurden keine Ciliaten wiedergefunden. Die Möglichkeit, Ciliaten mit Hilfe des Elektromigrationsapparates zu isolieren, scheint auf aquatische Habitate beschränkt zu sein. Für wassergeflutete Böden und die darin lebenden Ciliaten wurde kein Effekt gefunden. Dies resultierte möglicherweise aus den chemischen Unterschieden, die letztlich die Leitfähigkeit des Bodenwasser beeinflussen. Weitere Gründe liegen in einer potentiellen Lysierung der Ciliaten oder einem artspezifischen Migrationsverhalten im elektrischen Feld (siehe Wagener *et al*., 1986).

Als weitere Methode zum Anreichern von Ciliaten wurde Bodenwasser mit einer Spritze abgezogen und zentrifugiert. Bei anschließenden Färbungen mit Protargol, Silbernitrat oder Anwendung von FISH stellte sich heraus, daß sich zu viel partikuläres Material anreicherte. Die Ciliaten wurden komplett verdeckt.

Als die Methode der Wahl kristallisierte sich letztlich das Picken einzelner Ciliaten unter dem Mikroskop heraus. Alle Hybridisierungen (FISH) und taxonomischen Bestimmungen wurden mit so isolierten Ciliaten durchgeführt.

5.4 Versuche mit FISH

FISH erlaubte eine direkte Untersuchung der Ciliaten und ihrer Endosymbionten im Bodenwasser. Im Laufe der Untersuchung wurde eine grobe phylogenetische

Charakterisierung bevorzugter Beuteorganismen und einiger endobiontischer bzw. endosymbiontischer Mikroorganismen erstellt (siehe unten).

Anhand von DAPI-Färbungen wurde ersichtlich, daß viele DNS-haltige Strukturen nicht mit den Sonden hybridisierten. Entweder handelte es sich dabei um mikrobielle Zellen oder Zellorganellen. Möglich wäre auch, daß es sich um extrem große Viren handelt, wie kürzlich von La Scola *et al*. (2003) beschrieben.

Eine Hybridisierung mit 4 *Metopus palaeformis*-spezifischen Sonden (Tab. 3.4 und *Metopus*-Sonde aus Embley *et al*., 1992) brachte keinen Erfolg. Die Gründe dafür waren vermutlich Unterschiede der 18S rRNS-Gensequenzen (bezogen auf die in der ARB-Datenbank) oder der 18S rRNS-Struktur. Die in Sequenzen in ARB enstammen alle einer Veröffentlichung (Embley *et al*., 1992). Die Zugänglichkeit der Sonden zum rRNS-Molekül ist von deren *in-situ* Struktur abhängig (Behrens *et al*., 2003). Detailliertere Informationen über mögliche Sequenz- bzw. Strukturunterschiede wird eine noch geplante Sequenzierung einzelner Ciliatenarten und ihrer Endosymbionten liefern.

Mit FISH wurde ein zusätzlicher (nicht-methanogener) Endobiont in *Metopus* entdeckt (Abb. 4.16, Abb. 4.17). Die Bezeichnung Endobiont wurde gewählt, da keinerlei physiologische Daten über diesen Organismus vorlagen, welche eine Einordnung als Endosymbiont oder Parasit erlaubt hätten. Durch spezifische Hybridisierungen wurde der kettenbildende Organismus als Mitglied der α–*Proteobacteria* identifiziert. Er wurde in den 5 größeren *Metopus*-Arten, aber nicht in *M. minor* gefunden. Daß es weitere nicht-methanogene Endobionten in *Metopus* gibt, war bekannt. Bakterielle Endobionten, die nicht-methanogen sind, wurden bereits beschrieben. So beschrieben van Bruggen *et al*. (1984) und Wagener *et al*. (1990) ähnliche Zellformen aus dem Cytoplasma von *M. inversus* bzw. *M. setosus* die aber nicht näher charakterisiert wurden. Neu ist die phylogenetische Klassifizierung dieser Endobionten. Die phylogenetische Klassifizierung dieses Mikroorganismus war wichtig, um ihn im lichtmikroskopischen Bild nicht den methanogenen Archaea zuzuordnen (Abb 4.17a, *M. palaeformis* mit Endobiont im differentieller Interferenz-Kontrast nach Nomarski).

Burggraf *et al*. (1994) beschrieb Schwierigkeiten bei der Hybridisierung von Archaea. So hatten beispielsweise formaldehydhaltige Fixierungsmittel die Zellwand versiegelt, statt sie zugänglicher zu machen (Burggraf *et al*., 1994). In dieser Arbeit waren Archaea außerhalb der Ciliaten hybridisierbar, jedoch nicht, wenn sie innerhalb von Ciliaten vorkamen. Fixierungen in Ethanol konnten dieses Problem nur teilweise lösen. Einzelne Archaeazellen wurden im

Laufe der Versuche innerhalb von Nahrungsvakuolen hybridisiert (Abb. 4.13 und Abb. 4.14). Hier hatte vermutlich bereits ein Aufschluß der Zellwände stattgefunden, der bei den im Cytoplasma liegenden Zellen noch nicht erfolgt war. Vom Cytoplasma sind die Endosymbionten nach Angaben von van Bruggen *et al*. (1984) durch eine Doppelmembran separiert. Diese scheint auch nach einer Fixierung nicht durchlässig genug zu sein, um die Sonden passieren zu lassen. Liegen die Archaea nach dem Platzen einer Zelle außerhalb des Cytoplasmas, konnten sie mittels FISH detektiert werden (Abb. 4.15). Wieso dann die α–*Proteobacteria* hybridisierbar waren, bleibt jedoch fraglich. Die Autoren um van Bruggen *et al*. (1984) beschreiben, daß auch die anderen gefundenen gram-positiven Endosymbionten durch eine Doppelmembran vom Cytoplasma getrennt wurden. Die gute Hybridisierbarkeit der α–*Proteobacteria* im Cytoplasma legt die Vermutung nahe, daß hier ein archaea-spezifisches Problem der Zellzugänglichkeit vorliegt.

Es war demnach nicht möglich, eine phylogenetische Zuordnung der methanogenen Archaea auf Familien- oder Gattungsebene mit Hilfe spezifischer Sonden durchzuführen. Eine phylogenetische Klassifizierung soll bei einer noch ausstehenden Sequenzierung von Ciliaten und ihrer endocytobiontischen Zellen beantwortet werden. Damit könnten auch physiologische Eigenschaften der Endobionten und Endosymbionten abgeleitet werden.

5.5 Interaktion Ciliaten – Mikrobielle Gemeinschaft

5.5.1 Effekte der Beweidung durch Ciliaten auf die mikrobielle Gemeinschaft

Viele Versuche zeigten, daß die Protozoenfauna eine „formende Kraft“ (Jürgens und Matz, 2002; Hahn und Höfle, 2001) der mikrobiellen Gemeinschaft in aquatischen Ökosystemen ist. Diese resultiert aus einer Selektion der Nahrungspartikel (Fraßdruck), der biochemischen Veränderung der direkten Umwelt (Remineralisierung) und der Reaktion der Beuteorganismen (morphologische Veränderung) auf Fraß und veränderte Umweltbedingungen. Ähnliche Befunde sind aus terrestrischen Habitaten bekannt (z.B. Rønn *et al*., 2002). Diese Arbeit ist die erste, die sich mit Beweidungseffekten in anoxischen Reisfeldböden beschäftigt.

Die mikrobielle Gemeinschaft des anoxischen Reisfeldbodens gehört zu den am besten charakterisierten eines Bodens (Conrad und Frenzel, 2002). Die Auswirkung der Beweidung der mikrobiellen Gemeinschaft durch Protozoen wurde bisher nicht studiert. Die lichtmikroskopischen Untersuchungen (Abb. 4.17a) und FISH-Präparate zeigten häufig mit

Bakterien gefüllte Nahrungsvakuolen. Mitglieder der Domäne Bakteria scheinen dabei die bevorzugte Beute der Ciliaten zu sein.

Auch im lichtmikroskopischen Bild (Abb. 4.17a) wurden regelmäßig gut gefüllte Nahrungsvakuolen in frisch isolierten Ciliaten entdeckt. Höhere Vergrößerungen zeigten, daß die Nahrungsvakuolen mit mikrobenähnlichen Partikeln gefüllt waren (Abb. 4.17a). Anhand der F_{420}-Autofluoreszenz wurden bei *Metopus* sp. wiederholt Methanogene innerhalb von Nahrungsvakuolen entdeckt. Mit FISH wurden Archaea nur sehr selten im Cytoplasma, dafür jedoch häufiger in Nahrungsvakuolen von *M. palaeformis* und *M. es* sowie ausserhalb der Ciliaten detektiert (Abb. 4.13 und Abb. 4.14). Die Zellen in *M. palaeformis* und *M. es* wurden in den Nahrungsvakuolen vermutlich bereits lysiert und somit durch den beginnenden Abbau der Zellwände hybridisierbar. In den Nahrungsvakuolen von *M. inversus* (Abb. 4.5b) wurden hohe Zellzahlen aktiver (d.h. F_{420}-Autofluoreszenz zeigender) Methanogener beobachtet. Ob diese Methanogenen verdaut oder dort als „quasi-Endosymbionten“ gehalten wurden, war nicht zu klären. Letzteres wurde für einige Ciliaten bereits nachgewiesen. Von *Paramecium* ist bekannt, daß einzellige Algen der Gattung *Chlorella* (Meier und Wiessner, 1988), aber auch Bakterien und Hefen (Görtz, 1982) auf diesem Wege als Endosymbionten gehalten wurden. Leider wurden bei allen Hybridisierungen keine Zellen von *M. inversus* gefunden, die mit Methanogenen gefüllte Nahrungsvakuolen aufwiesen. *M. inversus*–Zellen ohne Methanogene in den Nahrungsvakuolen wurden hingegen öfter detektiert. Die Zugänglichkeit der Zellen in den Nahrungsvakuolen für die archaea-spezifischen Oligonukleotid-Sonden würde eine Einschätzung über eine Lysierung der Zellen erlauben. Die hohe Intensität der F_{420}-Autofluoreszenz ließ jedoch auf eine Aktivität der Methanogenen schließen. Für die erfolgte Berechnung der Methanproduktionsraten endosymbiontischer Methanogener (siehe unten) wurden die in Nahrungsvakuolen liegenden Zellen nicht mitgezählt.

Es wurde davon ausgegangen, daß die Ciliaten im anoxischen Boden durch Beweidung auf die mikrobielle Gemeinschaft einwirken. Die Korrelation von Ciliaten- und mikrobiellem Volumen machte diesen Zusammenhang wahrscheinlich (Abb. 4.6). Das Verhältnis beider Werte zueinander war innerhalb der ersten Woche negativ und wurde ab der zweiten Woche positiv. Es gab demnach eine Zunahme der Ciliatenvolumina, bei gleichzeitiger Abnahme der Bakterienvolumina. Dies erlaubt den Rückschluß, daß das Wachstum der Ciliatenpopulation auf Kosten der Mikroorganismen geschah. Gestützt wird dieser Befund durch die Ergebnisse der Bestimmung mikrobieller Volumenfraktionen. Nach der Einordnung in verschiedene Volumenklassen (Abb. 4.4b) wurde gezeigt, daß an Tag 4 eine typische Zellvolumen-

Verteilung auftritt, die wiederholt aus aquatischen Ökosystemen beschrieben wurde (Hahn und Höfle, 2001; Jürgens und Matz, 2002). Diese diversifizierte Volumenverteilung wurde nur in der ersten Woche gefunden (Abb. 4.6). Beweidung induziert häufig eine Abweichung von mittleren Volumina und Zellgrößen hin zu sehr kleinen und sehr großen Zellen (Abb. 4.4b, Links). Häufig sind diese Beweidungseffekte auch von morphologischen Veränderungen wie einer Verkürzung bzw. Zunahme der Zellängen oder auch der Bildung von Zellaggregaten begleitet (Jürgens und Matz, 2002, Hahn *et al.*, 1999). Nach 80 Tagen wurde diese Verteilung der Zellvolumina nicht mehr nachgewiesen (Abb. 4.6; Abb. 4.4b, Rechts). Eine Kontrolle der mikrobiellen Population durch Bodenprotozoen im anoxischen Reisfeldboden erfolgte demnach nur in den ersten Wochen nach Inkubationsbeginn. Eine ähnliche Beobachtung machten Strauss und Dodds (1997). Die Autoren fanden, daß die Protozoen eines Graslandes bzw. eines landwirtschaftlich genutzen Bodens die mikrobielle Population innerhalb der ersten 3 Wochen, aber nicht mehr nach 6 Wochen kontrollierten.

Ob die Veränderung der mikrobiellen Population nur auf einen Einfluß der Protozoen beruht oder auch auf biogeochemischen Veränderungen (siehe Abb. 4.7), konnte nicht abschließend geklärt werden. Es ist jedoch aufgrund dieser und anderer Ergebnisse (siehe nächsten Abschnitt) von einem solchen Einfluß auszugehen.

5.5.2 Einfluß der Ciliaten auf biogeochemische Prozeße

In den Experimenten zur Hemmung von Eukaryonten wurde versucht, den Einfluß der Protozoenfauna auf biogeochemische Prozesse exemplarisch am Beispiel der Methanogenese nachzuweisen. Ein Einfluß der Protozoenfauna war diesen Ergebnissen zufolge sehr wahrscheinlich. In diesen Versuchen hatte eine Hemmung der Eukaryonten durch zwei verschiedene Inhibitoren nahezu eine Verdoppelung der CH_4-Produktion bewirkt (Abb. 4.9).

Anhand der Summenformeln beider Inhibitoren wurde die eingesetzte Menge an Kohlenstoff berechnet. So wurde in Form von Colchicin ($C_{15}H_{23}NO_4$) und Cycloheximid ($C_{22}H_{25}NO_6$) insgesamt 24 nmol C gTG^{-1} Boden eingebracht. Da unter anoxischen Bedingungen vermutlich nur die leichter bioverfügbaren Gruppen an den Inhibitormolekülen zugänglich sind, war die Menge an verfügbarem Kohlenstoff wahrscheinlich deutlich niedriger. Trotzdem kann die Menge an zusätzlich eingebrachtem Kohlenstoff nicht die Erhöhung der CH_4-Produktion um 1,08 µmol CH_4 gTG^{-1} Boden in den Hemmversuchen erklären.

Eine weitere Erklärung für diesen CH_4-Anstieg könnte in einer Lysierung der Ciliaten liegen. Die dabei freigesetzte Biomasse könnte von Mikroorganismen mineralisiert und zu CH_4 abgebaut werden. Eine Umrechnung der Biovolumina in Kohlenstoff wurde unter Verwendung der Konvertierungsfaktoren von Putt und Stoecker (1989) durchgeführt. Die Autoren fanden in marinen oligotrichen Ciliaten einen Kohlenstoff-Anteil von 0,16 bzw. 0,28 pg C μm^{-3}. Berechnet wurde die bioverfügbare Menge an Kohlenstoff anhand der Biovolumina des ersten Tages. Das Biovolumen resultierte in Kohlenstoffanteilen von 38 bzw. 66 nmol C gTG^{-1} Boden. Auch diese Mengen sind zu niedrig, um den beobachteten Anstieg der CH_4-Produktionsrate zu erklären.

Betrachtet man die bisher gefundenen Beweidungsmuster (siehe oben), kann daraus geschlossen werden, daß die beobachtete Hemmung bzw. Unterdrückung der Methanogenen nur in den ersten Tagen bis Wochen wichtig sein dürfte. Ab der zweiten Woche dürfte dieser Effekt nach den bisherigen Daten nur noch vernachlässigbar gering sein.

5.6 Anteil methanogener Endosymbionten an der Methanogenese

Wie bereits erwähnt, ist die frühe Methanogenese nur teilweise verstanden. Roy *et al*. (1997) fanden bei Hemmversuchen, daß die Methanogenese in den ersten 3 Tagen nach Inkubationsbeginn primär hydrogenotroph war, während ab dem dritten Tag die acetoclastische Methanogenese dominierte. Diese frühe Phase ist charakterisiert durch ein für Methanogene ungünstiges Redoxpotential, sowie Konkurrenz um Substrate wie z.B. Acetat (insbesondere mit Fe^{3+}- und SO_4^{2-}-Reduzierern; Roy *et al*., 1997). Zudem besteht anfangs eine Hemmung der Methanogenese durch toxische Stickstoffverbindungen (z.B. NO, N_2O u.a.; Klüber *et al*. 1998; Roy *et al*., 1997; Scheid *et al*., 2003) bei gleichzeitigem langsamen Wachstum einiger methanogener Gruppen (Lüders und Friedrich, 2002). Die Frage nach der Bedeutung aktiver methanogener Endosymbionten aus Ciliaten während dieser frühen CH_4-Produktion ergab sich, da wiederholt aktive Methanogene anhand von F_{420}-Autofluoreszenz in der Gattung *Metopus* gefunden wurden. Weitere Hinweise auf die Bedeutung der Ciliaten für die frühe Methanogenese ergaben sich dadurch, daß die Methanogenese der *Metopus*-Endosymbionten hydrogenotroph ist (Fenchel und Finlay, 1992). Auch ist bekannt, daß diese Ciliaten eine chemostatähnliche Funktion haben, die den Methanogenen beste Wachstumsbedingungen ermöglicht (Fenchel und Finlay, 1995). Hydrogenotrophe methanogene Endosymbionten hätten also eine ideale Umgebung zur CH_4-Produktion.

Die erste Möglichkeit, die Anzahl methanogener Endosymbionten zu bestimmen, ergab sich aus der direkten Zählung aktiver methanogener Endosymbionten anhand der F_{420}-Autofluoreszenz (Tab. 4.4, Modell 1). Die zweite Möglichkeit ergab sich aus den Daten von Fenchel und Finlay (1995). Diese Autoren errechneten einen Biovolumenanteil der Methanogenen von ca. 2% am gesamten Zellvolumen der Ciliaten. Anhand der Biovolumina der Gattung *Metopus* wurden potentielle artspezifische Endosymbiontenzahlen berechnet (Tab. 4.4, Modell 2). Ein Vergleich zeigte, daß die anhand der Anteile am Volumen berechneten Zellzahlen um den Faktor 10 – 110 über den Ergebnissen der direkten Zählungen lagen. Entsprechende Unterschiede ergaben sich zwischen den beiden berechneten Modellen zur CH_4-Produktion aus methanogenen Endosymbionten (Abb. 4.8). Modell 1 konnte ca. 2% jenes innerhalb der ersten zwei Wochen gemessenen Gesamt-CH_4 erklären, Modell 2 jedoch ca. 59%. Da die Direktzählung (Modell 1) die Verhältnisse im Reisfeldboden genauer widerspiegelt, wird es bevorzugt. Das Ergebnis wurde zudem über den Befund von Fenchel (1993) bestätigt, der in marinen Sedimenten vergleichbare CH_4-Bildungsraten fand (ca. 2%). Trotz dieser Übereinstimmung ist davon auszugehen, daß die verwendeten Modelle die wahren Verhältnisse nur ungenau wiedergeben.

Aus allen Ergebnissen läßt sich ein deutlicher, aber zeitlich begrenzter Einfluß der Ciliaten auf die mikrobielle Gemeinschaft und Biogeochemie des anoxischen Reisfeldbodens ableiten. Dabei setzten die Ciliaten die CH_4-Produktion durch bisher nicht verstandene Hemmung bzw. Unterdrückung der Methanogenen oder der Methanogenese stark herab, trugen aber gleichzeitig mit ca 2% zur gesamten CH_4-Produktion bei. Vergleichbar sah es bei den Beweidungeffekten aus. Der Verlauf der relativen mikrobiellen Zellzahlen und Volumina wieß auf Beweidungsdruck innerhalb der ersten Woche hin, der nach einigen Autoren (z.B. Biagini *et al.*, 1998) hohe Remineralisierungsraten bewirkt. Diese Remineralisierung mikrobieller Biomasse ließ sich in den anoxischen Inkubationen nicht nachweisen. Dies wäre dadurch erklärbar, daß die freigesetzten Ionen sofort aufgenommen wurden, d.h. nicht erst in nachweisbaren Mengen akkumulieren konnten. Zusätzlich ergab sich die Frage ob Ciliaten in anoxischen Böden einen stimulierenden Effekt auf die mikrobielle Gemeinschaft haben. Für die methanogene Population konnte eine Hemmung nachgewiesen werden. Für andere mikrobielle Populationen war ein solcher Einfluß nicht nachweisbar. Die Hemmung der Methanogenese oder der Methanogenen widersprach dem, was aus Experimenten mit anoxischen Kulturen (Biagini *et al.*, 1998) bekannt war. In diesen hatte das Hinzufügen von anaeroben Ciliaten stets eine Erhöhung der gesamten CH_4-Produktion zurfolge.

In den meisten Böden sind Ciliaten nur die vierthäufigste Gruppe der Protozoen. Da vereinzelte aktive Exemplare anderer Protozoen gefunden wurden, können die gemessenen Veränderungen letztlich allen Protozoen zugeschrieben werden. Da Ciliaten jedoch die häufigste Gruppe waren, wurden sie als Hauptgruppe mit entsprechend großem Einfluß angesehen. Die Protozoenfauna hat allen Ergebnissen zufolge in italienischem, anoxischem Reisfeldboden einen sowohl zeitlich als auch auf bestimmte mikrobielle Populationen begrenzten Einfluß.

6 Ausblick

Um einen Überblick über die Diversität aller Bodenprotozoen im Reisfeldboden zu bekommen, ist geplant, die im Versuch mit dem anoxischen Reisfeldboden gewonnen Bodenproben molekular auf Basis der 18S rDNS zu charakterisieren. Zusätzlich soll versucht werden, einzelne Ciliaten direkt aus dem Bodenwasser zu isolieren, konventionell (lichtmikroskopisch) zu bestimmen und anschließend per PCR und Sequenzierung der 18S rRNS-Gene genau zu beschreiben. Dies würde die molekulare Charakterisierung der Protozoenfauna wie auch das Erstellen neuer ciliaten-spezifischer Oligonukleotid-Sonden für FISH erleichtern. Ein positiver Effekt dieser Arbeit wäre die Zunahme an 18S rRNS-Gen bzw. 18S rDNS Sequenzen der Ciliaten, die es langfristig erlauben würden, auf einer erweiterten Datenbasis, die Phylogenie und Taxonomie der Ciliaten abzugleichen.

Ein weiteres Ziel wird auch weiterhin die Etablierung von Kulturen anaerober Ciliaten sein. Diese würde eine spezifische Berechnung der CH_4-Produktion von methanogenen Endosymbionten, sowie Wachstums- und Beweidungs-Raten erlauben.

7 Literaturverzeichnis

Alm, E. W., Oerther, D. B., Larsen, N., Stahl, D. A., und Raskin, L. (1996) The oligonucleotide probe database. *Appl. Environ. Microbiol* **62:** 3557-3559.

Amann, R. I., Krumholz, L., und Stahl, D. A. (1990) Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* **172:** 762-770.

Amann, R., Springer, N., Ludwig, W., Görtz, H. D., und Schleifer, K. H. (1991) Identification in situ and phylogeny of uncultured bacterial endosymbionts. *Nature* **351:** 161-164.

Aßmus, B. (1996) In-situ Detektion von Bakterien aus Boden- und Gewässerhabitaten mit spezifischen Markierungen sowie optischen und zytometrischen Methoden. Dissertation, Shaker Verlag, Aachen.

Azam, F., Fenchel, T., Field, J. G., Gray, J. S., Meyerreil, L. A., und Thingstad, F. (1983) The Ecological Role of Water-Column Microbes in the Sea. *Mar. Ecol. -Prog. Ser.* **10:** 257-263.

Begon, M., Harper, J. L., and Townsend, C. R. (1991) Ökologie. Individuen, Populationen, Lebensgemeinschaften. Birkhäuser, Basel.

Behr, T., Koob, C., Schedl, M., Mehlen, A., Meier, H., Knopp, D. et al. (2000) A nested array of rRNA targeted probes for the detection and identification of enterococci by reverse hybridization. *Syst. Appl. Microbiol.* **23:** 563-572.

Behrens, S., Ruhland, C., Inacio, J., Huber, H., Fonseca, A., Spencer-Martins, I. et al. (2003) In situ accessibility of small-subunit rRNA of members of the domains Bacteria, Archaea, and Eucarya to Cy3-labeled oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **69:** 1748-1758.

Berger, H., Foissner, W., und Adam, H. (1984) Taxonomy Biometry and Morphogenesis of Some Soil Ciliates Protozoa Ciliophora. *Zool. J. Syst.* **111:** 339-367.

Berger, H. (1999) Monograph of the Oxytrichidae (Ciliophora, Hypotrichia). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Bernard, C. und Fenchel, T. (1996) Some Microaerobic Ciliates Are Facultative Anaerobes. *Eur. J. Protistol.* **32:** 293-297.

Bernhard, D., Stechmann, A., Foissner, W., Ammermann, D., Hehn, M., und Schlegel, M. (2001) Phylogenetic relationships within the class Spirotrichea (Ciliophora) inferred from small subunit rRNA gene sequences. *Mol. Phylogent. Evol.* **21:** 86-92.

Berthold, A. und Palzenberger, M. (1995) Comparison between direct counts of active soil ciliates (Protozoa) and most probable number estimates obtained by Singh's dilution culture method. *Biol. Fertil. Soils* **19:** 348-356.

Bertoni-Freddari, C., Fattoretti, P., Paoloni, R., Caselli,U., Giorgetti, B. und Solazzi, M. (2003) Inverse correlation between mitochondrial size and metabolic competence: a quantitative cytochemical study of cytochrome oxidase activity. *Naturwissenschaften*. **90**: 68-71

Biagini, G. A., Finlay, B. J., und Lloyd, D. (1998) Protozoan stimulation of anaerobic microbial activity: enhancement of the rate of terminal decomposition of organic matter. *FEMS Microbiol. Ecol.* **27:** 1-8.

Bick, H. (1972) Ciliated Protozoa; An illustrated guide to the species used as biological indicators in freshwater biology. World Health Organisation, Geneva.

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

Bonkowski, M., Jentschke, G., und Scheu, S. (2001) Contrasting effects of microbial partners in the rhizosphere: interactions between Norway Spruce seedlings (Picea abies Karst.), mycorrhiza (Paxillus involutus (Batsch) Fr.) and naked amoebae (protozoa). *Appl. Soil Ecol.* **18:** 193-204.

Bonkowski, M. (2002) Protozoa and plant growth: trophic links and mutualism. *Eur. J. Protistol.* **37:** 363-365.

Brosius, J. , Palmer, M. L., Kennedy, P. J., Noller, H. H. (1978) Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from Escherichia coli. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **75:** 4801-4805

Burggraf, S., Mayer, T., Amann, R., Schadhauser, S., Woese, C. R., und Stetter, K. O. (1994) Identifying Members of the Domain Archaea with Ribosomal-Rna-Targeted Oligonucleotide Probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **60:** 3112-3119.

Clarholm, M. (1994) The microbial loop in soil. S. 221-230. In: *Beyond the Biomass*. Ritz, K., Dighton, J., und Giller, K. E. (Hrsg.). British Society of Soil Science (BSSS), Wiley-Sayce, New York.

Clarholm, M. (2002) Bacteria and protozoa as integral components of the forest ecosystem their role in creating a naturally varied soil fertility. *Antonie Van Leeuwenhoek Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* **81:** 309-318.

Coleman, D. C. (1994) The Microbial Loop Concept As Used in Terrestrial Soil Ecology Studies. *Microbiol. Ecol.* **28:** 245-250.

Conrad, R. und Frenzel, P. (2002) Flooded soils. S. 1316-1333. In: *Encyclopedia of Environmental Microbiology*. Britton, G. (Hrsg.). John Wiley and Sons, New York.

Crutzen, P. J. und Lelieveld, J. (2001) Human impacts on atmospheric chemisty. *Ann. Rev. Earth Plan. Sci.* **29:** 17-45.

Daims, H., Bruhl, A., Amann, R., Schleifer, K. H., und Wagner, M. (1999) The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst. Appl. Microbiol.* **22:** 434-444.

Dimmer, K. S., Fritz, S., Fuchs, F., Messerschmitt, M., Weinbach, N., Neupert, W., und Westermann, B. (2002) Genetic basis of mitochondrial function and morphology in Saccharomyces cerevisiae. *Mol. Biol. Cell* **13:** 847-853.

Doddema, H. J. und Vogels, G. D. (1978) Improved identification of methanogenic bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* **36:** 752-754.

Eigner, P. (2001) Key to the species of the Hypotrichida (Protozoa, Ciliophora) on CD. Erhältlich unter: http://members.nextra.at/p.eigner/CD.html; Letzter Zugriff: 21. Mai 2003

Ekelund, F. und Rønn, R. (1994) Notes on protozoa in agricultural soil with emphasis on heterotrophic flagellates and naked amoebae and their ecology. *FEMS Microbiol. Rev.* **15:** 321-353.

Ekelund, F., Rønn, R., und Griffiths, B. S. (2001) Quantitative estimation of flagellate community structure and diversity in soil samples. *Protist* **152:** 301-314.

Ekelund, F., Frederiksen, H. B., und Rønn, R. (2002) Population dynamics of active and total ciliate populations in arable soil amended with wheat. *Appl. Environ. Microbiol.* **68:** 1096-1101.

Embley, T. M., Finlay, B. J., Thomas, R. H., und Dyal, P. L. (1992) The Use of Ribosomal-Rna Sequences and Fluorescent-Probes to Investigate the Phylogenetic Positions of the Anaerobic Ciliate Metopus-Palaeformis and Its Archaeobacterial Endosymbiont. *J. Gen. Microbiol.* **138:** 1479-1487.

Esteban, G. F., Fenchel, T., und Finlay, B. J. (1995) Diversity of Free-Living Morphospecies in the Ciliate Genus Metopus. *Arch. Protistenkd.* **146:** 137-164.

FAOSTAT (2003) http://apps.fao.org/default.html, Letzter Zugriff: 21. Mai 2003

Fenchel, T. (1969) The Ecology of Marine Micro Benthos IV Structure and Function of the Benthic Ecosystem. Its Chemical and Physical Factors and the Micro Fauna Communities with Special Reference to the Ciliated Protozoa. *Ophelia* **6:** 1-182.

Fenchel, T. und Finlay, B. J. (1990) Anaerobic Free-Living Protozoa - Growth Efficiencies and the Structure of Anaerobic Communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* **74:** 269-275.

Fenchel, T. und Finlay, B. J. (1992) Production of Methane and Hydrogen by Anaerobic Ciliates Containing Symbiotic Methanogens. *Arch. Microbiol.* **157:** 475-480.

Fenchel, T. (1993) Methanogenesis in marine shallow water sediments: The quantitative of anaerobic protozoa with endosymbiotic methanogenic bacteria. *Ophelia* **37:** 67-82.

Fenchel, T. und Finlay, B. J. (1995) Ecology and evolution in anoxic worlds. In: *Oxford Series in Ecology and Evolution.* Fenchel, T. und Finlay, B. J. (Hrsg.). Oxford University Press, Oxford

Finlay, B. J. und Fenchel, T. (1991) An Anaerobic Protozoan, with Symbiotic Methanogens, Living in Municipal Landfill Material. *FEMS Microbiol. Ecol.* **85:** 169-179.

Finlay, B. J., Embley, T. M., und Fenchel, T. (1993) A new polymorphic methanogen, closely related to Methanocorpusculum parvum, living in stable symbiosis within the anaerobic ciliate Trimyema sp. *J. Gen. Microbiol.* **139:** 371-378.

Finlay, B. J. (1998) The global diversity of protozoa and other small species. *Int. J. Parasitol.* **28:** 29-48.

Finlay, B. J. und Fenchel, T. (1999) Divergent perspectives on protist species richness. *Protist* **150:** 229-233.

Finlay, B. J., Black, H. I. J., Brown, S., Clarke, K. J., Esteban, G. F., Hindle, R. M. et al. (2000) Estimating the growth potential of the soil protozoan community. *Protist* **151:** 69-80.

Finlay, B. J. und Esteban, G. F. (2001) Exploring Leeuwenhoek's legacy: the abundance and diversity of protozoa. *Int. Microbiol.* **4:** 125-133.

Foissner, W. (1987) Soil Protozoa: Fundamental Problems Ecological Significance Ciliates and Testaceans Bioindicators and Guide to the Literature. S. 69-212. In: *Progress in Protistology*. Biopress, Ltd., Bristol, England, Uk.

Foissner, W., Blatterer, H., Berger, H., and Kohmann, F. (1991) Taxonomische und ökologische Revision der Ciliaten des Saprobiensystems - Band I: Cyrtophorida, Oligotrichida, Hypotrichia, Colpodea. Informationsberichte des Bayrischen Landesamtes für Wasserwirtschaft 1/91, München.

Foissner, W. (1991) Basic Light and Scanning Electron-Microscopic Methods for Taxonomic Studies of Ciliated Protozoa. *Eur. J. Protistol.* **27:** 313-330.

Foissner, W., Blatterer, H., and Kohmann, F. (1992) Taxonomische und ökologische Revision der Ciliaten des Saprobiensystems - Band II: Peritrichia, Heterotrichida, Odontostomatida. Informationsberichte des Bayrischen Landesamtes für Wasserwirtschaft 5/92, München.

Foissner, W. (1993) Colpodea (Ciliophora). Gustav Fischer Verlag, Stuttgart - Jena - New York.

Foissner, W., Blatterer, H., and Kohmann, F. (1994) Taxonomische und ökologische Revision der Ciliaten des Saprobiensystems - Band III: Hymenostomata, Prostomatida, Nassulida. Informationsberichte des Bayrischen Landesamtes für Wasserwirtschaft 1/94, München.

Foissner, W., Blatterer, H., Berger, H., and Kohmann, F. (1995) Taxonomische und ökologische Revision der Ciliaten des Saprobiensystems - Band IV: Gymnostomatea, Loxodes, Suctoria. Informationsberichte des Bayrischen Landesamtes für Wasserwirtschaft 1/95, München.

Foissner, W. (1997a) Protozoa as bioindicators in agroecosystems, with emphasis on farming practices, biocides, and biodiversity. *Agric. Ecosyst. Environ.* **62:** 93-103.

Foissner, W. (1997b) Soil ciliates (Protozoa: Ciliophora) from evergreen rain forests of Australia, South America and Costa Rica: diversity and description of new species. *Biol. Fertil. Soils* **25:** 317-339.

Foissner, W. (1997c) Global soil ciliate (Protozoa, ciliophora) diversity: a probability-based approach using large sample collections from Africa, Australia and Antarctica. *Biodivers. Conserv.* **6:** 1627-1638.

Foissner, W. (1998) An updated compilation of world soil ciliates (Protozoa, Ciliophora), with ecological notes, new records, and descriptions of new species. *Eur. J. Protistol.* **34:** 195-235.

Foissner, W. (1999a) Protist diversity: estimates of the near-imponderable. *Protist* **150:** 363-368.

Foissner, W. (1999b) Soil protozoa as bioindicators: pros and cons, methods, diversity, representative examples. *Agric. Ecosyst. Environ.* **74:** 95-112.

Foissner, W., Berger, H., and Schaumburg, J. (1999) Identification and ecology of limnetic plankton ciliates. Informationsberichte des Bayerischen Landesamt für Wasserwirtschaft 3/99, München.

Foissner, W., Agatha, S., and Berger, H. (2002) Soil Ciliates (Protozoa, Ciliophora) from Namibia (Southwest Africa), with Emphasis on two Contrasting Environments, the Etosha Region and the Namib Desert. Oberösterreichisches Landesmuseum Linz, Linz.

Frenzel, P., Thebrath, B., und Conrad, R. (1990) Oxidation of Methane in the Oxic Surface-Layer of a Deep Lake Sediment (Lake Constance). *FEMS Microbiol. Ecol.* **73:** 149-158.

Frenzel, P. und Bosse, U. (1996) Methyl Fluoride, an Inhibitor of Methane Oxidation and Methane Production. *FEMS Microbiol. Ecol.* **21:** 25-36.

Fried, J., Ludwig, W., Psenner, R., und Schleifer, K. H. (2002) Improvement of ciliate identification and quantification: a new protocol for fluorescence in situ hybridization (FISH) in combination with silver stain techniques. *Syst. Appl. Microbiol.* **25:** 555-571.

Fritsche, T. R., Horn, M., Seyedirashti, S., Gautom, R. K., Schleifer, K. H., und Wagner, M. (1999) In situ detection of novel bacterial endosymbionts of Acanthamoeba spp. phylogenetically related to members of the order Rickettsiales. *Appl. Environ. Microbiol.* **65:** 206-212.

Glissmann, K. und Conrad, R. (2000) Fermentation pattern of methanogenic degradation of rice straw in anoxic paddy soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **31:** 117-126.

Glissmann, K., Weber, S., und Conrad, R. (2001) Localization of processes involved in methanogenic in degradation of rice straw in anoxic paddy soil. *Environ. Microbiol.* **3:** 502-511.

Görtz, H. D. (1982) Infections of Paramecium bursaria with bacteria and yeasts. *J. Cell Sci.* **58:** 445-453.

Görtz, H. D. und Brigge, T. (1998) Intracellular bacteria in protozoa. *Naturwissenschaften* **85:** 359-368.

Güde, H. (1979) Grazing by Protozoa As Selection Factor for Activated-Sludge Bacteria. *Microbiol. Ecol.* **5:** 225-237.

Hahn, M. W., Moore, E. R. B., und Höfle, M. G. (1999) Bacterial filament formation, a defense mechanism against flagellate grazing, is growth rate controlled in bacteria of different phyla. *Appl. Environ. Microbiol.* **65:** 25-35.

Hahn, M. W. und Höfle, M. G. (2001) Grazing of protozoa and its effect on populations of aquatic bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* **35:** 113-121.

Hausmann, K., Hülsmann, N., Machemer, H., Mulisch, M., and Steinbrueck, G. (1996) Protozoology. Georg Thieme Verlag, Stuttgart - New York, FRG/USA.

Heckman, C. W. (1979) Rice field ecology in Northeastern Thailand: the effect of wet and dry seasons on a cultivated aquatic ecosystem. Junk, The Hague.

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

Jankowski, A. W. (1964) Morphology and Evolution of Ciliophora. III. Diagnosis and Phylogenesis of 53 Sapropelebionts, Mainly of the order Heterotrichida. *Arch. Protistenkd.* **107:** 185-294.

Janssen, P. H. und Frenzel, P. (1997) Inhibition of Methanogenesis by Methyl Fluoride - Studies of Pure and Defined Mixed Cultures of Anaerobic Bacteria and Archaea. *Appl. Environ. Microbiol.* **63:** 4552-4557.

Jürgens, K. und Matz, C. (2002) Predation as a shaping force for the phenotypic and genotypic composition of planktonic bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* **81:** 413-434.

Kahl, A. (1926) Neue und wenig bekannte Formen der holotrichen und heterotrichen Ciliaten. *Arch. Protistenkd.* **55:** 197-438.

Kahl, A. (1927) Neue und ergänzende Beobachtungen heterotricher Ciliaten. *Arch. Protistenkd.* **57:** 121-203.

Kahl, A. (1930) Urtiere oder Protozoa I: Wimperntiere oder Ciliata (Infusoria) 1. Allgemeiner Teil und Prostomata. In: *Die Tierwelt Deutschl*. **18**. Dahl, F. (Hrsg.). Gustav Fischer Verlag, Jena.

Kahl, A. (1931) Urtiere oder Protozoa I: Wimperntiere oder Ciliata (Infusoria) 2. Holotricha außer den im 1 Teil behandelten Prostomata. In: *Die Tierwelt Deutschl*. **21**. Dahl, F. (Hrsg.). Gustav Fischer Verlag, Jena.

Kahl, A. (1932) Urtiere oder Protozoa I: Wimperntiere oder Ciliata (Infusoria) 3. Spirotricha. In: *Die Tierwelt Deutschl*. **25**. Dahl, F. (Hrsg.). Gustav Fischer Verlag, Jena.

Kahl, A. (1935) Urtiere oder Protozoa I: Wimperntiere oder Ciliata (Infusoria) 4. Peritricha und Chonotricha. In: *Die Tierwelt Deutschl*. **30**. Dahl, F. (Hrsg.). Gustav Fischer Verlag, Jena.

Klüber, H. D. und Conrad, R. (1998) Inhibitory effects of nitrate, nitrite, NO and N_2O on methanogenesis by Methanosarcina barkeri and Methanobacterium bryantii. *FEMS Microbiol. Ecol.* **25:** 331-339.

Krüger, M., Frenzel, P., und Conrad, R. (2001) Microbial processes influencing methane emission from rice fields. *Glob. Change Biol.* **7:** 49-63.

Krumböck, M. und Conrad, R. (1991) Metabolism of Position-Labeled Glucose in Anoxic Methanogenic Paddy Soil and Lake Sediment. *FEMS Microbiol. Ecol.* **85:** 247-256.

Küsel, K., Pinkart, H. C., Drake, H. L., und Devereux, R. (1999) Acetogenic and sulfate-reducing bacteria inhabiting the rhizoplane and deep cortex cells of the sea grass Halodule wrightii. *Appl. Environ. Microbiol.* **65:** 5117-5123.

La Scola, B., Audic, S., Robert, C., Jungang, L., de Lamballerie, X., Drancourt, M. et al. (2003) A giant virus in amoebae. *Science* **299:** 2033.

Lüders, T. und Friedrich, M. (2000) Archaeal population dynamics during sequential reduction processes in rice field soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **66:** 2732-2742.

Lüders, T. und Friedrich, M. W. (2002) Effects of amendment with ferrihydrite and gypsum on the structure and activity of methanogenic populations in rice field soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **68:** 2484-2494.

Lüftenegger, G., Petz, W., Foissner, W., und Adam, H. (1988) The Efficiency of a Direct Counting Method in Estimating the Numbers of Microscopic Soil Organisms. *Pedobiologia* **31:** 95-101.

Madoni, P. (1987) Colonization Seasonal Succession and Productivity of the Ciliated Protozoa Populations in a Rice Field Ecosystem. *Rivista di Idrobiologia* **26:** 81-96.

Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M., und Schleifer, K. H. (1992) Phylogenetic Oligodesoxynucleotide Probes for the Major Subclasses of Proteobacteria - Problems and Solutions. *Syst. Appl. Microbiol.* **15:** 593-600.

Massana, R., Stumm, C. K., und Pedros-Alio, C. (1994) Effects of Temperature, Sulfide, and Food Abundance on Growth and Feeding of Anaerobic Ciliates. *Appl. Environ. Microbiol* **60:** 1317-1324.

Meier, R. und Wiessner, W. (1988) Infection of Algae-Free Paramecium-Bursaria with Symbiotic Chlorella sp. Isolated from Green Paramecia I. Effect of the Incubation Period. *Eur. J. Protistol.* **24:** 69-74.

Nüsslein, B., Chin, K. J., Eckert, W., und Conrad, R. (2001) Evidence for anaerobic syntrophic acetate oxidation during methane production in the profundal sediment of subtropical Lake Kinneret (Israel). *Environ. Microbiol.* **3:** 460-470.

Paulin, J. J. (1996) Morphology and Cytology of Ciliates.S. 1-40. In: Hausmann, K. und Bradbury, P. C. (Hrsg.) *Ciliates: cell as organisms*. Gustav-Fischer-Verlag, Stuttgart - Jena - Lübeck - Ulm

Peters, V. und Conrad, R. (1996) Sequential reduction processes and initiation of CH4 production upon flooding of oxic upland soils. *Soil Biol. Biochem.* **28:** 371-382.

Petz, W. (1997) Ecology of the active soil microfauna (Protozoa, Metazoa) of Wilkes Land, East Antarctica. *Polar Biol.* **18:** 33-44.

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

Putt, M. und Stoecker, D. K. (1989) An Experimentally Determined Carbon Volume Ratio for Marine Ciliates from Estuarine and Coastal Waters. *Limnol.* **34:** 1097-1103.

Raskin, L., Stromley, J. M., Rittmann, B. E., und Stahl, D. A. (1994) Group-Specific 16S Ribosomal-Rna Hybridization Probes to Describe Natural Communities of Methanogens. *Appl. Environ. Microbiol* **60:** 1232-1240.

Ratering, S. und Conrad, R. (1998) Effects of short-term drainage and aeration on the production of methane in submerged rice soil. *Glob. Change Biol.* **4:** 397-407.

Reichardt, W., Briones, A., de Jesus, R., und Padre, B. (2001) Microbial population shifts in experimental rice systems. *Appl. Soil Ecol.* **17:** 151-163.

Roy, R., Klüber, H. D., und Conrad, R. (1997) Early initiation of methane production in anoxic rice soil despite the presence of oxidants. *FEMS Microbiol. Ecol.* **24:** 311-320.

Rønn, R., Ekelund, F., und Christensen, S. (1995) Optimizing Soil Extract and Broth Media for Mpn-Enumeration of Naked Amoebae and Heterotrophic Flagellates in Soil. *Pedobiologia* **39:** 10-19.

Rønn, R., McCaig, A. E., Griffiths, B. S., und Prosser, J. I. (2002) Impact of Protozoan Grazing on Bacterial Community Structure in Soil Microcosms. *Appl. Environ. Microbiol* **68:** 6094-6105.

Scheid, D., Stubner, S., und Conrad, R. (2003) Effects of nitrate- and sulfate-amendment on the methanogenic populations in rice root incubations. *FEMS Microbiol. Ecol.* **43:** 309-315.

Sexstone, A. J., Revsbech, N. P., Parkin, T. B., und Tiedje, J. M. (1985) Direct measurement of oxygen profiles and denitrification rates in soil aggregates. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **49:** 645-651.

Stahl, D. A. und Amann, R. (1991) Development and application of nucleic acid probes. S.205-248. In: Stackebrandt, E. und Goodfellow, M. (Hrsg.) *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England.

Strauss, E. A. und Dodds, W. K. (1997) Influence of Protozoa and Nutrient Availability on Nitrification Rates in Subsurface Sediments. *Microbiol. Ecol.* **34:** 155-165.

Tiedje, J. M., Sexstone, A. J., Parkin, T. B., Revsbech, N. P., und Shelton, D. R. (1984) Anaerobic Processes in Soil. *Plant and Soil* **76:** 197-212.

Tomaru, A. (2002) Encystment-inducing factors in the ciliate Euplotes elegans. *Zool. Sci.* **19:** 741-746.

van Bruggen, J. J. A., Stumm, C. K., und Vogels, G. D. (1983) Symbiosis of Methanogenic Bacteria and Sapropelic Protozoa. *Arch. Microbiol.* **136:** 89-95.

van Bruggen, J. J. A., Zwart, K. B., van Assema, R. M., Stumm, C. K., und Vogels, G. D. (1984) Methanobacterium formicium, an endosymbiont of the anaerobic ciliate Metopus striatus McMurrich. *Arch. Microbiol.* **139:** 1-7.

van Bruggen, J. J. A., Zwart, K. B., Hermans, J. G. F., van Hove, E. M., Stumm, C. K., und Vogels, G. D. (1986) Isolation and characterization of Methanoplanus endosymbionticus sp. nov. an endosymbiont of the marine saprobelic ciliate Metopus contortus Quennerstedt. *Arch. Microbiol.* **144:** 367-374.

van Hoek, A. H. A. M., van Alen, T. A., Sprakel, V. S. I., Hackstein, J. H. P., und Vogels, G. D. (1998) Evolution of anaerobic ciliates from the gastrointestinal tract: Phylogenetic analysis of the ribosomal repeat from Nyctotherus ovalis and its relatives. *Mol. Biol. Evol.* **15:** 1195-1206.

Verhoeven, R. (2001) Response of soil microfauna to organic fertilisation in sandy virgin soils of coastal dunes. *Biol. Fertil. Soils* **34**: 390-396.

Wachinger, G., Fiedler, S., Zepp, K., Gattinger, A., Sommer, M., und Roth, K. (2000) Variability of soil methane production on the micro-scale: spatial association with hot spots of organic material and Archaeal populations. *Soil Biol. Biochem.* **32:** 1121-1130.

Wagener, S., Stumm, C. K., und Vogels, G. D. (1986) Electromigration a Tool for Studies on Anaerobic Ciliates. *FEMS Microbiol. Ecol.* **38:** 197-204.

Wagener, S. und Pfennig, N. (1987) Monoxenic Culture of the Anaerobic Ciliate Trimyema-Compressum. *Arch. Microbiol.* **149:** 4-11.

Wagener, S., Schulz, S., und Hanselmann, K. (1990) Abundance and Distribution of Anaerobic Protozoa and Their Contribution to Methane Production in Lake Cadagno Switzerland. *FEMS Microbiol. Ecol.* **74:** 39-48.

Weber, S., Lüders, T., Friedrich, M. W., und Conrad, R. (2001) Methanogenic populations involved in the degradation of rice straw in anoxic paddy soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **38:** 11-20.

Widdel, F. und Bak, F. (1992) Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria. In: *The Prokaryotes*. Balows A., Trüper, H. G; Dworkin, M., Harder, W. und Schleifer, H.H. (Hrsg.) 2. Aufl. Springer-Verlag, New York.

Yao, H., Conrad, R., Wassmann, R., und Neue, H. U. (1999) Effect of soil characteristics on sequential reduction and methane production in sixteen rice paddy soils from China, the Philippines, and Italy. *Biogeochemistry* **47:** 269-295.

8 Anhang

A Manuskript:

“Population dynamics and ecology of ciliates (Protozoa, Ciliophora) in an anoxic rice field soil”

Angenommen bei: Biology and Fertility of Soils, Springer Verlag; April / Mai 2003

B Tab. 8.1: Liste aller verwendeten Oligonukleotid-Sonden

C Danksagung

D Lebenslauf

E Erklärung

Angenommen im April / Mai 2003

Population dynamics and ecology of ciliates (Protozoa, Ciliophora) in an anoxic rice field soil

M.V. Julian Schwarz · Peter Frenzel

Max-Planck-Institute for Terrestrial Microbiology, Karl-von-Frisch Straße, D-35043 Marburg, Germany

Corresponding author:

Peter Frenzel

e-mail: frenzel@staff.uni-marburg.de

Tel: +49/(0)6421/178820
Fax: +49/(0)6421/178809

Abstract

Wetland rice fields cover 1.46 million km^2 globally; the flooded soil of these fields is largely anoxic. While biogeochemistry and microbiology have been studied in detail, the microbial loop and especially the dynamics and function of ciliates are largely unknown. We used anoxic microcosms prepared with soil from an Italian rice field and recorded species composition, abundance and volume of ciliates together with numbers, volume and size distribution of bacteria.

Ciliates were the dominating protists observed in the microcosms, but could be outnumbered by flagellates if the soil was amended with rice straw. The number of ciliate taxa was 23. *Metopus* species were dominating, but 16 of the species recorded in the anoxic soil were facultative anaerobes. Another 29 species were found in accompanying experiments that included the oxic soil surface. Total abundance in the anoxic soil was an average of 110 cells gDW^{-1} and comparable to other soils. The population of ciliates declined around 30 days after flooding, but recovered later. The period before the population declined was characterized by a rapid species-turnover, many facultative anaerobes and large species. After recovery, the average cell size was much smaller, but even then a facultative anaerobe, *Plagiacampa pentadactyla*, was common. About 90% of all species were bacteriovores while the others -mainly Gymnostomatidae- were predators. Grazing ciliates may have controlled bacteria during the first five days after flooding, as could be shown by a negative correlation between the respective volumes and by the size spectra of the bacteria.

Keywords: ciliates · community structure · anoxic soil · rice field · grazing

Introduction

Ciliates are an important group of soil-inhabiting protozoa. About 800 species have been described so far, and this number is still increasing (Foissner et al. 2002). Ciliates and other protozoans are essential elements of the microbial loop in soils (Clarholm 1994). The effect of protozoan grazing on growth rate, activity and morphology of bacteria was discovered more than twenty years ago (Güde 1979). Recent work has shown that protozoan grazing may influence the bacterial community structure in soils (Rønn et al. 2002), with secondary effects on plant growth (Bonkowski 2002).

A major factor controlling the abundance and diversity of soil ciliates is the soil water content (Finlay et al. 2000). Water is often limiting in soils, and many soil-inhabiting ciliates are able to produce drought-resistant resting stages or cysts (Foissner 1987). This ability is reduced, or even lost, in species from the constantly moist soils of evergreen rainforests (Foissner 1997b). Flooded soils are often characterized by a cyclic change between drying and flooding. In wetland rice agriculture this is the case where water is not limiting during the vegetation period. Further, diffusion of oxygen in water is slower by a factor of 10,000 compared to diffusion in gas, making rice field soils anoxic within hours of flooding. Thus, ciliates in rice field soils have to be adapted to dual limitations: by water and by oxygen during the dry and the vegetation period, respectively.

Flooding has also consequences for the biogeochemistry and microbiology of rice field soils. When oxygen is reduced a typical sequence of reduction processes follows until methanogenesis becomes the terminal step in the microbial food chain (Conrad and Frenzel 2002). The eukaryotic food chain using the bacterial biomass in anoxic rice field soils is

largely unknown. Growth rates of anaerobic protozoa are low compared to those known from oxic environments resulting in short food chains in anoxic sediments (Fenchel and Finlay 1990, 1995). Hence, a similarly restrained biocoenosis may be expected for flooded soils.

Wetland rice fields covered 1.46 million km^2 in 2002 (FAOSTAT 2003). Assuming an active layer of 0.2 m deep, this sums up to the enormous volume of 290 km^3 of mostly anoxic soil. However, only a little information is available about ciliates from these soils (Foissner 1997a; Heckmann 1979; Madoni 1987), and their population structure and dynamics are largely unknown. We focused on the dynamics and function of ciliates in a rice field soil following flooding. We used soil from Vercelli (Italy) that has become a model system. Biogeochemistry and microbiology have been studied at this site for more than a decade. We focused on the situation in the anoxic soil during flooding and used anoxic microcosms over more than five months. In particular, species composition, abundance, and volume of ciliates were recorded together with numbers, volume and size distribution of bacteria.

Material and Methods

Soil and field site

Soil was sampled from a rice field of the Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura, Vercelli (Italy) in spring 2000, air dried and stored at ambient temperature. Prior to use, the soil was ground in a jaw-crusher (Retsch, Hahn, Germany) and sieved to ≤ 2 mm. The field site and the local management practice have been described in detail by Krüger et al. (2001). Briefly, the field is left dry after harvest until next spring, when it is ploughed and harrowed. The rice field is usually flooded at the beginning of May. A few days later rice is seeded onto the flooded field. Drainage takes place in October. Silt and clay dominate the soil (>1 mm 20% by weight, 1 – 0.2 mm 30.5%, and <0.2 mm 49.5%), and organic C is low (15.5 mg $C_{org} \cdot g$ dry $soil^{-1}$; Yao et al. 1999).

Species inventory

The species inventory was established with the non-flooded Petri dish method (Foissner 1987, 1997a). Fifty to 200 gDW (dryweight) soil where saturated with distilled water. Care was taken to keep the water table at the very soil surface and to avoid a water phase on top of the soil. Otherwise, a different fauna might develop in the floodwater (Foissner et al. 2002). However, we use the term “flooded soil” below to be consistent with its use in wetland ecology and microbial ecology (Conrad and Frenzel 2002). The pore water was sampled by tilting the Petri dishes at an angle of 45°. Samples were taken daily during the first ten days and twice a week for the following three months.

All taxa were documented by video, photography and drawings. Additionally, selected taxa were stained with protargol and/or silver nitrate (Foissner 1991). For species identification the following sources were used: Berger (1999); Bick (1972); Eigner (2001); Foissner (1993, 1998); Foissner et al. (1991, 1992, 1994, 1995, 1999, 2002); Kahl (1930, 1931, 1932, 1935).

In addition, a few samples were taken from a rice field in Vercelli at the end of June 2001. The floodwater and the top 10 cm of the soil were sampled with a stainless-steel corer

(6 cm inner diameter and 20 cm long). Duplicate cores were taken and processed on the site immediately. Subcores of 3 ml volume were taken every 2 cm through lateral openings (Frenzel et al. 1990). The subcores were pushed into a beaker with 5-10 ml sterile-filtrated (0.2 µm pore size, Schleicher and Schuell, Dassel, Germany) tap water and suspended carefully. The coarse particles were allowed to settle and the supernatant was sampled for microscopic identification of ciliates. Anaerobic ciliates survived this treatment for up to 10 minutes, which was long enough for identification and counting.

Microcosms

Microcosms were made from rectangular culture bottles ($14 \cdot 7 \cdot 4$ cm^3) containing 50 g soil and sealed with butyl stoppers. After flushing the headspace with N_2 for 15 min, 30 ml autoclaved, O_2-free water was injected. This volume was enough to saturate the soil completely. The bottles were incubated, horizontally so that the soil layer was about 2 cm thick, in the dark at 25°C. In analogy to the dynamics of microbial processes and populations in this soil, we expected rapid changes during the first weeks and a more constant pattern on the long term. Hence, sampling was done daily during the first 9 days, every 3 to 4 days until day 58, and on days 80 and 163. At each time point a set of 5 bottles was sacrificed and analyzed as described below.

Additionally, several microcosms were prepared with 1 g chopped rice straw per 100 g soil. Amendment with rice straw causes a faster reduction of electron acceptors together with changes in the microbial community (Glissmann and Conrad 2000) that in turn might also affect the ciliates. Two microcosms were sacrificed on nine occasions each between day 32 and day 75.

Ciliates

Ciliates were counted according to standard protocols (Finlay et al. 2000, Foissner 1997a). The microcosms were kept at an angle of ca. 30° with the butyl stopper at the lower end. This angle allowed the pore water to flow out from the soil matrix without disturbance. One ml of this pore water was sampled through the stopper by needle and syringe. First, 500 µl were used to check at 200- to 1000-fold magnification for the species present. Next, the abundance of the different species was counted in 25 µl. This sample was put on a slide and covered with an $18 \cdot 18$ mm^2-coverslip supported with small spots of Vaseline at the edges. Species not detected in the quantitative counts but in the 500-µl-sample were assumed to have an abundance of 1 ml^{-1}.

Numbers are given per g dry weight (DW) soil. Soil was mixed with water at a ratio of 5:3 and water saturated soil in the microcosms had a density of 1.57 $g \cdot cm^{-3}$. Hence, cells per gDW can be converted to cells$\cdot cm^{-3}$ pore water and cm^{-3} wet soil by multiplication with a factor of 1.67 and 0.98, respectively. Averages are given with standard errors (SE). The species diversity was calculated from the Shannon-formula:

$$H' = \sum_{i=1}^{n} p_i \cdot \log(p_i)$$

Simple geometric shapes like an ellipsoid (e.g. *Plagiocampa*), a cylinder with hemispherical ends (e.g. *Metopus palaeformis*) or cuboid (e.g. Oxytrichidae) were used to calculate the volume of the different species (Ekelund and Rønn 1994). All measurements were taken from living cells (Table 1).

Bacteria

Soil samples (1 g fresh weight) were fixed in 1 ml 4% paraformaldehyde (final 3%), vortexed and incubated for 45 min at room temperature. The sample was centrifuged at 13,000 g for 10 min. The pellet was resuspended five times and centrifuged in 1 ml sterile-filtered (0.2 µm, Schleicher and Schuell, Germany) PBS-buffer (pH 7.0). Finally 1 ml ethanol (98-100 %, sterile filtrated) was added and the sample stored at -20° C until further examination

Teflon-coated eight-field glass slides (Menzel, Braunschweig, Germany) were prepared by applying 20 µl low-melting agarose (1%) to each field. The slides were allowed to dry over night in a dusk-free place. Fixed soil samples were thawed and vortexed. After 30 sec, three 2-µl sub-samples of the supernatant were taken and spotted on separate fields. The slides were allowed to dry for 2 h at 40° C and stained with 10 µl DAPI staining solution (0.55 µM; 4´, 6-diamidino-2-phenylindole; Sigma-Aldrich, Germany) per field for 15 min at room temperature. The slides were carefully rinsed with ice-cold double-distilled water, dried for 35 min at 40° C, and covered with an anti-fading reagent (AF1, Citifluor, London, UK) and a cover glass. Cells were counted at 850-fold magnification on a confocal laser scanning microscope (CLSM) equipped with an argon-krypton and an UV-laser (Leica DMR XE, Type TCS NT, Leica Microsystems AG, Heidelberg, Germany).

Consecutive view-fields were counted along a transect from one edge through the centre of the sample to the other edge. The cells and particles were unevenly distributed with higher densities usually at the outer edge. Because in this case transect sampling might systematically underestimate the real average, the counts were weighted by a factor proportional to the second power of the radial distance of the respective view-field from the center. A weighted average was calculated according to

$$\overline{X} = \frac{\sum_{i=1}^{n} W_i \cdot X_i}{\sum_{i=1}^{n} W_i}.$$

Counts were made in triplicate, and averages between the parallels per sample were transformed to cells gDW^{-1} using the known volume of subsample (2 µl), of fixative (1 ml) plus porewater, and of the dry weight of the soil contained in 1 g fresh weight.

Bacterial biovolumes were measured in soil from microcosms aged four and 80 days. At each day three microcosms were sampled. Samples were fixed and processed as described above. However, the slides were co-stained with DAPI and FITC (fluorescein-5-isothiocyanate; Merck, Germany). DAPI staining was done as described above while FITC staining followed the protocol of Babiuk and Paul (1970). With the CLSM six stacks were recorded per sample. The stacks had an area of 80·80 μm^2 and covered the respective depth of the preparation (4.5-7.8 µm). Depending on depth, these stacks contained 12-20 images. The

stacks were processed with ImageJ v. 1.27 (http://rsb.info.nih.gov/ij/). After adjustment of the thresholds, the number of bacteria was counted with the plug-in 'Analyse Particles'. The automated counts were checked manually in representative stacks by co-localization of the DAPI- (DNA staining) and the FITC-signal (protein staining). According to this criterion virtually all counted particles could be regarded as bacteria. The stacks contained 54-345 cells each. The plug-in 'Voxel Count' was used to measure the total volume of bacteria per stack, from which in turn average cell volumes were calculated. Only the FITC-signal was used for volumes measurements.

Results

A total of 52 taxa was found (Table 1). Overall, the anaerobic biocoenosis was dominated by Gymnostomatidae, Heterotricha, and Hymenostomatidae (Table 2). Twenty-three species occurred in anoxic incubations. Surprisingly, 16 out of these species had hitherto not been regarded as anaerobes. On the contrary, obligate anaerobes were present immediately after flooding (*Metopus es*: Fig. 1), but even at day 163 we found species that were previously regarded as aerobes. A similar observation was made in the cores taken from the field in Vercelli, where in a much smaller sample one of seven species was regarded as an anaerobe (Table 3). Four others belonged to the facultative anaerobes found in the anoxic microcosms.

In the microcosms, the first ciliates appeared on the day following the start of the experiment (Fig. 1, 2A). The overall abundance reached quite a constant level between days 4 and 23, but dropped sharply afterwards. This decline and the subsequent recovery correlated with a major shift in the species composition (see below). The overall average was 110±9 cells·gDW^{-1}. Most abundant were the bacteriovorous species (Table 1) *Metopus minor*, *Metopus hasei* and *Plagiocampa bitricha* with 33.6±6.2, 18.0±2.8, and 14.6±3.2 cells·gDW^{-1}, respectively. The Shannon-diversity decreased with time (Fig. 2B), mainly due to the decreasing number of species (Figure 1). Functional diversity in terms of food preferences decreased, too. During the first three weeks a variety of carnivorous Spathidiidae was found in the anoxic microcosms (Table 1; Fig. 1). However, from day 23 on the other species except *Cirranta mobilis*, *Plagiocampa pentadactyla*, *Metopus hasei*, *Spathidium* cf. *crassum*, and *Metopus minor* had nearly disappeared. The persisting species were bacterivorous (Table 1) with the exception of the carnivorous *Spathidium* cf. *crassum* that was at the top of the anaerobic foodchain at that time. Those species found only in the "non-flooded Petri dishes" represent a much wider spectrum of food preferences (Table 1), showing the importance of the oxic-anoxic interfaces to the diversity of ciliates in a flooded soil.

The temporal change in species composition also affected the average size of the ciliates that decreased gradually by two orders of magnitude (Fig. 2C) following day 8. Flagellates were observed regularly, but were not abundant except in the incubations amended with rice straw. Here they outnumbered the ciliates that were on average less abundant (81±27). Otherwise, the same ciliate species were found in the straw-amended microcosms (data not shown).

The volume of the two groups was calculated to test the possibility that ciliates may control the microbes (Fig. 3). Because the number of predatory ciliates was small and never exceeded 34 cells gDW^{-1} or 7.1%, the total volume is used in Fig. 3A.

For the bacteria, the average volume (n=18) was 1.17 (±0.11) and 1.12 (±0.06) $\mu m^3 \cdot cell^{-1}$ at days 4 and 80, respectively (Fig. 4). Hence, the total volume of bacteria was calculated from the number per gDW times the average volume of 1.145 $\mu m^3 \cdot cell^{-1}$ (Fig. 3C). The quotient of the two volumes shows that the bacterial abundance and biomass during the first days is negatively correlated with the ciliates biomass (Fig. 3B). Number and volume of bacteria recovered and stayed nearly constant with time. However, number and average volume of ciliates decreased with time (Fig. 2C and 3A) and caused the quotient to go up again to about 40. The size distribution of bacteria was more diverse on day 4 but showed a pronounced peak at a volume of 1 μm^3 at day 80 (Fig. 4).

Discussion

For an anoxic soil, the diversity of ciliates was unexpectedly high. Previously, only ten soil ciliates have been described as anaerobes (Foissner 1998), but we found 23 taxa (Fig. 1). Our observations are in accordance with findings in anoxic sediments, where microaerobic ciliates were repeatedly found below the oxycline (Fenchel, 1969). Some species are even capable of growth under anoxic conditions at rates lower than, or almost similar to those attained under oxygen (Bernard and Fenchel 1996). Rice field soil, like all flooded soils, is characterized by prolonged periods of oxygen deprivation (Conrad and Frenzel 2002). However, upland soils may become anoxic from time to time, too, depending on rainfall and on the formation of hotspots of biological activity around aggregates of organic matter (Sexstone et al. 1985; Tiedje et al. 1984; Wachinger et al. 2000). Hence, such a tolerance against anoxic conditions is an adaptive advantage for ciliates in many soils and is to be expected to be more widespread than assumed as yet.

In the temporal pattern two periods can be distinguished that are separated by a population decline around day 30 (Fig. 1, 2A). The first period is characterized by a rapid species-turnover. The biogeochemistry is characterized by the sequential reduction of different electron acceptors, among which ferrous iron is most important (Frenzel et al. 1999). During this period the microbial community undergoes also some structural changes, while it remains constant thereafter (Lüders and Friedrich 2000).

The high diversity during the first period (Fig. 1, 2B) may be the result of the excystment of species that were probing the environment after flooding. The numbers of species occurring during the first 9 days were relatively large (Fig. 2 C). This may indicate that not only the lack of oxygen but also the small pore spaces in the water-saturated soil was adverse to some of these species (Foissner 1987). Two taxa (Oxytrichidae taxon 2 and Spathidiidae taxon 1) and the obligate anaerobes *Metopus palaeformis* and *M. setosus* persisted during the first period for 2 to 3 weeks (Fig. 1). For these taxa we assume a yet unknown, but more specific set of factors being responsible for their population breakdown.

The species forming the ciliate community after the recovery of the population can be assumed to grow and to divide. In *Metopus palaeformis* this was further supported by the observation of different morphovariants that are formed successively during the cell cycle (Esteban et al. 1995). In the facultative anaerobe, *Plagiocampa pentadactyla*, dividing and conjugating cells were observed. Two species occurring in the microcosms during the second period, *Plagiocampa pentadactyla* and *Metopus hasei*, were also found in the soil cores taken from the rice field (Table 3). This indicates that the microcosms reproduced at least a certain aspect of the field. The two species not found in the microcosms may depend on specific

microniches in the field like for example the oxic rhizosphere around the roots. This feature was excluded by design from the microcosms. About half of these species (Table 3) were also reported from the water-soil interfaces of rice fields from another province of the River Po lowlands (Madoni 1987).

The common anaerobic ciliates, like the *Metopus* species, have methanogenic endosymbionts that are characterized by their F_{420} autofluorescence (Stumm and Zwart 1986). We verified this for all *Metopus* species found in our soil using epifluorescence microscopy (data not shown). The endosymbionts are tightly associated with the hydrogenosomes and keep the partial pressure of hydrogen produced by these organelles low enough to enable an effective fermentation (Fenchel and Finlay 1995). In contrast, we failed to find any indication for methanogenic endosymbionts in the obligate anaerobe *Cirranta mobilis* or in *Plagiocampa pentadactyla*. The latter, however, had bacteria of unknown phylogenetic affiliation and function attached to the surface (Foissner et al. 2002).

The carnivorous Gymnostomatidae accounted in the anoxic soil for nearly 10% of all ciliates and for about 40% of the species (Table 2). This differs from the distribution of taxonomic groups as listed in Foissner (1998), which was dominated by hypotrich taxa. The Gymnostomatidae are also on the top of the entire anaerobic food chain that may be quite complex on the microbial level (Conrad and Frenzel 2002). The eukaryotes, however, are represented by only two guilds: bacterial feeders and carnivores. This fits well to the theory that the poor energy efficiency of anaerobic metabolism restricts the number of levels in the foodchain (Fenchel and Finlay 1990).

The grazers include also some flagellates and probably amoebae, but the latter were not taken into account in our study. Even if we did not enumerate the flagellates exactly we observed surprisingly few cells (usually less than ciliates) in the anoxic incubations. However, the flagellates increased and outnumbered largely the ciliates when the soil was amended with rice straw. The dominance of ciliates makes a major difference to upland soils in which the protozoan community is dominated by flagellates and naked amoebae (Ekelund and Rønn 1994; Finlay et al. 2000). The species list includes some omnivorous species that are capable to ingest fungi, but no exclusively fungivorous species (Table 1). This lack makes another difference to upland soils, where fungi are expected to be more important for the mineralization of organic matter than in flooded soils or sediments (Clarholm 1994).

Since the seminal paper of Azam et al. (1983), the importance of the microbial loop has been validated not only for aquatic ecosystems but also for soils (Clarholm 1994). The particular effects of protozoan grazing on the microbial community have been reviewed repeatedly (e.g. Hahn and Höfle 2001). Our data showed an inverse relationship between the volume of bacteria and ciliates during the first five days that is consistent with a grazing effect of the latter (Fig. 3B). Later on, the volume of bacteria became 50- to 70-fold larger than that of ciliates making a pronounced effect of the grazers less probable. The size spectrum of bacteria on day 4 compared to that on day 80 is also consistent with grazing during the first day of the experiment only (Fig. 4). Protozoan grazers act upon median size classes and favor the occurrence of bacteria at both ends of the size distribution (Hahn and Höfle 2001). Other factors, like the adhesion of bacteria (Eisenmann et al. 1998) or the size of available pore space (Foissner 1987), may also have contributed to the interaction between bacteria and ciliates, but were not taken into account in our experiment.

We conclude that in this anoxic soil the control of grazers on bacteria is restricted to the very first period after flooding. In spite of the complexity of the microbial food chain, the

eukaryotic food chain contained only two guilds, grazers and carnivores. Obligate fungivores were missing. The high diversity observed was in part caused by potential anaerobes that disappeared with time. However, facultative anaerobes persisted even after months of totally anoxic conditions. With respect to the persistence and large number of facultative anaerobes, this group of ciliates and their physiological adaptations may be more widespread and more important for soil ecology than previously assumed.

Acknowledgements

This study was supported by a grant of the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) within the SFB395 “Interactions, adaptations, and catalytic capabilities of soil microorganisms”.
The authors like to thank Stephan Stubner for help with confocal laser scanning microscopy

References

Azam F, Fenchel T, Field JG, Gray JS, Meyerreil LA, Thingstad F (1983) The ecological role of water-column microbes in the sea. Mar Ecol Prog Ser 10: 257-263

Babiuk LA, Paul EA (1970) The use of fluorescein isothiocyanate in the determination of the bacterial biomass of grassland soil. Can J Microbiol 16: 57-62

Berger H, Foissner W, Adam H (1984) Taxonomy Biometry and Morphogenesis of Some Soil Ciliates Protozoa Ciliophora. Zool Jb Syst 111: 339-367

Berger H (1999) Monograph of the Oxytrichidae (Ciliophora, Hypotrichia). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht

Bernard C, Fenchel T (1996) Some microaerobic ciliates are facultative anaerobes. Eur J Protistol 32: 293-297

Bick H (1972) Ciliated Protozoa; An illustrated guide to the species used as biological indicators in freshwater biology. World Health Organisation, Geneva

Bonkowski M (2002) Protozoa and plant growth: trophic links and mutualism. Eur J Protistol 37: 363-365

Clarholm M (1994) The microbial loop in soil. In: Ritz K, Dighton J, Giller KE (eds) Beyond the Biomass. BSSS, Wiley-Sayce, New York, pp 221-230

Conrad R, Frenzel P (2002) Flooded soils. In: Britton G (ed) Encyclopedia of Environmental Microbiology. John Wiley and Sons, New York, pp 1316-1333

Eigner P (2001) Key to the Species of the Hypotrichida (Protozoa, Ciliophora) on CD. Last time accessed 08 Feb 2003 at: http://members.nextra.at/p.eigner/CD.html

Eisenmann H, Harms H, Meckenstock R, Meyer EI, Zehnder AJB (1998) Grazing of a Tetrahymena sp. on adhered bacteria in percolated columns monitored by in situ hybridization with fluorescent oligonucleotide probes. Appl Environ Microbiol 64: 1264-1269

Ekelund F, Rønn R (1994) Notes on protozoa in agricultural soil with emphasis on heterotrophic flagellates and naked amoebae and their ecology. FEMS Microbiol Rev 15: 321-353

Esteban G, Fenchel T, Finlay BJ (1995) Diversity of free-living morphospecies in the ciliate genus Metopus. Arch Protistenkd 146: 137-164

FAOSTAT (2003) Last time accessed 08 February 2003 at: http://apps.fao.org/default.htm

Fenchel T (1969) The ecology of marine micro benthos IV Structure and function of the benthic ecosystem its chemical and physical factors and the micro fauna communities with special reference to the ciliated protozoa. Ophelia 6: 1-182

Fenchel T, Finlay BJ (1990) Anaerobic free-living protozoa - growth efficiencies and the structure of anaerobic communities. FEMS Microbiol Ecol 74: 269-275

Fenchel T, Finlay BJ (1995) Ecology and evolution on anoxic worlds. In: May RS and Harvey HH (eds) Oxford Series in Ecology and Evolution. Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo

Finlay BJ, Black HIJ, Brown S, Clarke KJ, Esteban GF, Hindle RM, Olmo JL, Rollett A, Vickerman K (2000) Estimating the growth potential of the soil protozoan community. Protist 151: 69-80

Foissner W (1987) Soil protozoa: fundamental problems, ecological significance, ciliates and testaceans, bioindicators and guide to the literature. In: Corliss JO, Patterson DJ (eds) Progress in Protistology. Biopress, Ltd., Bristol pp 69-212

Foissner W, Blatterer H, Berger H, Kohmann F (1991) Taxonomische und ökologische Revision der Ciliaten des Saprobiensystems - Band I: Cyrtophorida, Oligotrichida, Hypotrichia, Colpodea. Informationsberichte des Bayrischen Landesamtes für Wasserwirtschaft, München

Foissner W (1991) Basic light and scanning electron-microscopic methods for taxonomic studies of ciliated protozoa. Eur J Protistol 27: 313-330

Foissner W, Blatterer H, Kohmann F (1992) Taxonomische und ökologische Revision der Ciliaten des Saprobiensystems - Band II: Peritrichia, Heterotrichida, Odontostomatida. Informationsberichte des Bayrischen Landesamtes für Wasserwirtschaft, München

Foissner W (1993) Colpodea (Ciliophora). Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York

Foissner W, Blatterer H, Kohmann F (1994) Taxonomische und ökologische Revision der Ciliaten des Saprobiensystems - Band III: Hymenostomata, Prostomatida, Nassulida. Informationsberichte des Bayrischen Landesamtes für Wasserwirtschaft, München

Foissner W, Blatterer H, Berger H, Kohmann F (1995) Taxonomische und ökologische Revision der Ciliaten des Saprobiensystems - Band IV: Gymnostomatea, Loxodes, Suctoria. Informationsberichte des Bayrischen Landesamtes für Wasserwirtschaft, München

Foissner W (1997a) Protozoa as bioindicators in agroecosystems, with emphasis on farming practices, biocides, and biodiversity. Agric Ecosyst Environ 62: 93-103

Foissner W (1997b) Soil ciliates (Protozoa: Ciliophora) from evergreen rain forests of Australia, South America and Costa Rica: diversity and description of new species. Biol Fertil Soils 25: 317-339

Foissner W (1998) An updated compilation of world soil ciliates (Protozoa, Ciliophora), with ecological notes, new records, and descriptions of new species. Eur J Protistol 34: 195-235

Foissner W, Berger H, Schaumburg J (1999) Identification and ecology of limnetic plankton ciliates. Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft, München

Foissner W, Agatha S, Berger H (2002) Soil ciliates (Protozoa, Ciliophora) from Namibia (Southwest Africa), with emphasis on two contrasting environments, the Etosha Region and the Namib Desert. Oberösterreichisches Landesmuseum Linz, Linz

Frenzel P, Thebrath B, Conrad R (1990) Oxidation of methane in the oxic surface layer of a deep lake sediment (Lake Constance). FEMS Microbiol Ecol 73: 149-158

Frenzel P, Bosse U, Janssen PH (1999) Rice roots and methanogenesis in a paddy soil: ferric iron as an alternative electron acceptor in the rooted soil. Soil Biol Biochem 31: 421-430

Glissmann K, Conrad R (2000) Fermentation pattern of methanogenic degradation of rice straw in anoxic paddy soil. FEMS Microbiol Ecol 31: 117-126

Güde H (1979) Grazing by protozoa as selection factor for activated-sludge bacteria. Microb Ecol 5: 225-237

Hahn MW, Höfle MG (2001) Grazing of protozoa and its effect on populations of aquatic bacteria. FEMS Microbiol Ecol 35: 113-121

Heckman CW (1979) Rice field ecology in Northeastern Thailand: the effect of wet and dry seasons on a cultivated aquatic ecosystem. Junk, The Hague

Kahl A (1930) Urtiere oder Protozoa I: Wimperntiere oder Ciliata (Infusoria) 1. Allgemeiner Teil und Prostomata. In: Dahl F (ed) Tierwelt Dtl. 18: 1-180

Kahl A (1931) Urtiere oder Protozoa I: Wimperntiere oder Ciliata (Infusoria) 2. Holotricha außer den im 1 Teil behandelten Prostomata. In: Dahl F (ed) Tierwelt Dtl. 21: 181-398

Kahl A (1932) Urtiere oder Protozoa I: Wimperntiere oder Ciliata (Infusoria) 3. Spirotricha. In: Dahl F (ed) Tierwelt Dtl. 25: 399-650

Kahl A (1935) Urtiere oder Protozoa I: Wimperntiere oder Ciliata (Infusoria) 4. Peritricha und Chonotricha. In: Dahl F (ed) Tierwelt Dtl. 30: 651-886

Krüger M, Frenzel P, Conrad R (2001) Microbial processes influencing methane emission from rice fields. Glob Change Biol 7: 49-63

Lüders T, Friedrich M (2000) Archaeal population dynamics during sequential reduction processes in rice field soil. Appl Environ Microbiol 66: 2732-2742

Madoni P (1987) Colonization seasonal succession and productivity of the ciliated protozoa populations in a rice field ecosystem. Rivista di Idrobiologia 26: 81-96

Rønn R, McCaig AE, Griffiths BS, Prosser JI (2002) Impact of protozoan grazing on bacterial community structure in soil microcosms. Appl Environ Microbiol 68: 6094-6105

Sexstone AJ, Revsbech NP, Parkin TB, Tiedje JM (1985) Direct measurement of oxygen profiles and denitrification rates in soil aggregates. Soil Sci Soc Am J 49: 645-651

Stumm CK, Zwart KB (1986) Symbiosis of protozoa with hydrogen-utilizing methanogens. Microbiol Sci 3: 100-105

Tiedje JM, Sexstone AJ, Parkin TB, Revsbech NP, Shelton DR (1984) Anaerobic processes in soil. Plant Soil 76: 197-212

Verhoeven R (2001) Response of soil microfauna to organic fertilisation in sandy virgin soils of coastal dunes. Biol Fertil Soils 34: 390-396

Wachinger G, Fiedler S, Zepp K, Gattinger A, Sommer M, Roth K (2000) Variability of soil ethane production on the micro-scale: spatial association with hot spots of organic material and Archaeal populations. Soil Biol Biochem 32: 1121-1130

Yao H, Conrad R, Wassmann R, Neue HU (1999) Effect of soil characteristics on sequential reduction and methane production in sixteen rice paddy soils from China, the Philippines, and Italy. Biogeochemistry 47: 269-295

Figures

Legends

Figure 1: Simplified representation of community changes based on quantitative cell counts. The abundance is classified into five classes from peak occurrence of the respective taxon (maximum, dark shading) to the lowest value encountered (minimum, white). The taxa are ordered according to the sequence of their peak occurrence. The width of the columns is proportional to the time (days) when the samples were taken.

Figure 2: Temporal changes of the abundance of ciliates (A), the Shannon-diversity $H' = \sum_{i=1}^{n} p_i \cdot \log(p_i)$ (B), and the average individual volume of ciliates (C). Logarithmic time axis to show the dynamic pattern during the first weeks in detail.

Figure 3: Temporal changes of the total volume of ciliates (A, logarithmic axis), number and total volume of bacteria (C, logarithmic axis), and the quotient between the two volumes (B). Logarithmic time axis to show the dynamic pattern during the first weeks in detail.

Figure 4: Distribution of average cell size of bacteria measured in 18 stacks at day four and day 80. The stacks contained 34 to 345 cells each. For details see text.

Fig. 1:

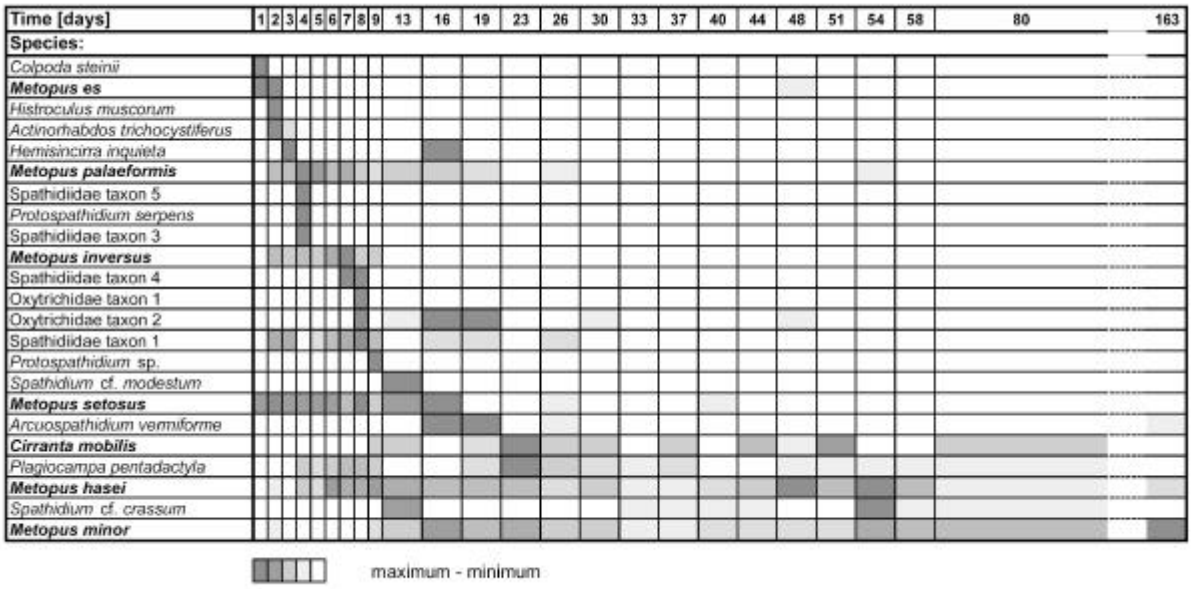

Time [days]
1 2 3 4 5 6 7 8 9 13 16 19 23 26 30 33 37 40 44 48 51 54 58 80 163
Species:
Colpoda steinii
Metopus es
Histroculus muscorum
Actinorhabdos trichocystiferus
Hemisincira inquieta
Metopus palaeformis
Spathidiidae taxon 5
Protospathidium serpens
Spathidiidae taxon 3
Metopus inversus
Spathidiidae taxon 4
Oxytrichidae taxon 1
Oxytrichidae taxon 2
Spathidiidae taxon 1
Protospathidium sp.
Spathidium cf. modestum
Metopus setosus
Arcuospathidium vermiforme
Cirranta mobilis
Plagiocampa pentadactyla
Metopus hasei
Spathidium cf. crassum
Metopus minor
maximum - minimum

Fig. 2

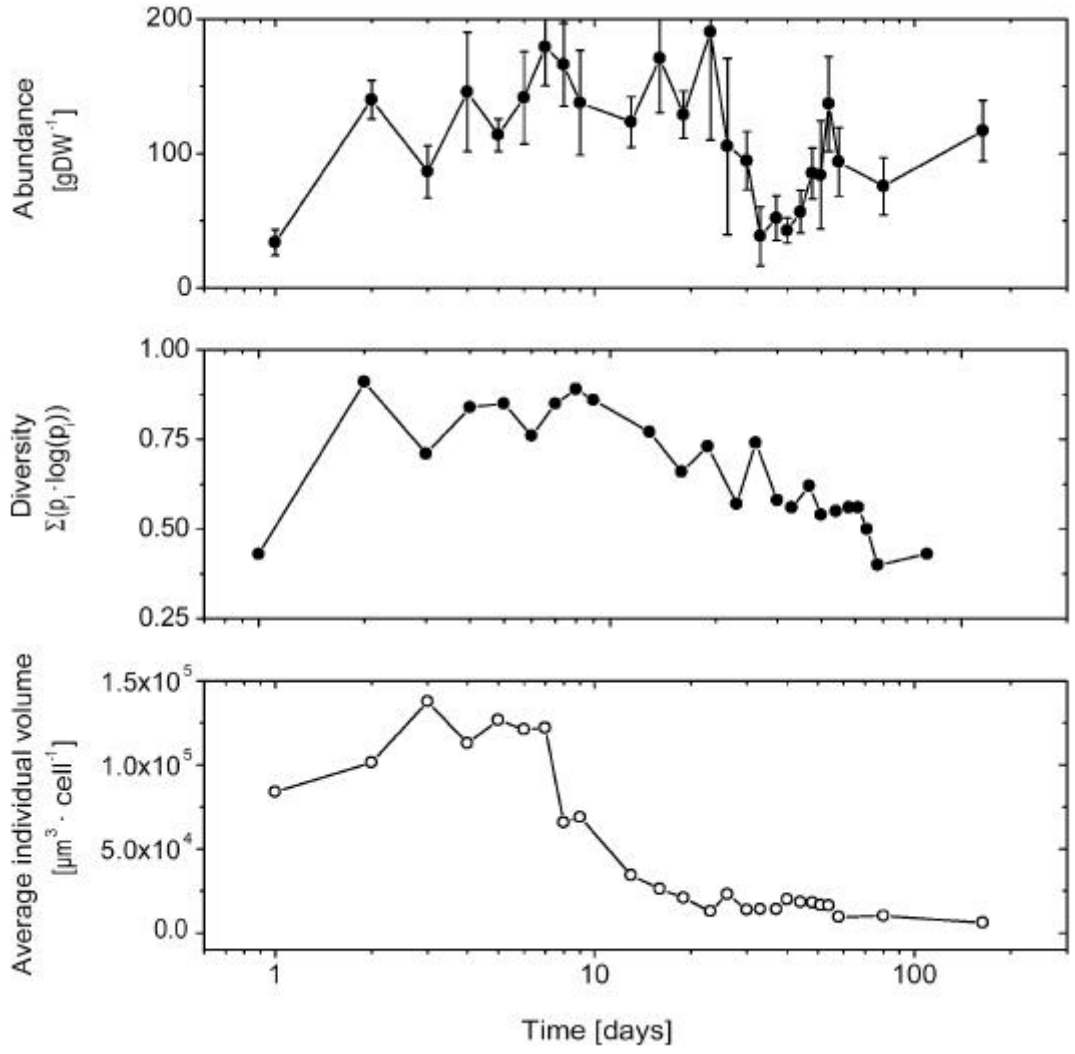

Abundance
[gDW^{-1}]
200
100
0
Diversity
$\Sigma(p_i \cdot \log(p_i))$
1.00
0.75
0.50
0.25
Average individual volume
[$\mu m^3 \cdot cell^{-1}$]
1.5x10^5
1.0x10^5
5.0x10^4
0.0
1
10
100
Time [days]

Fig. 3:

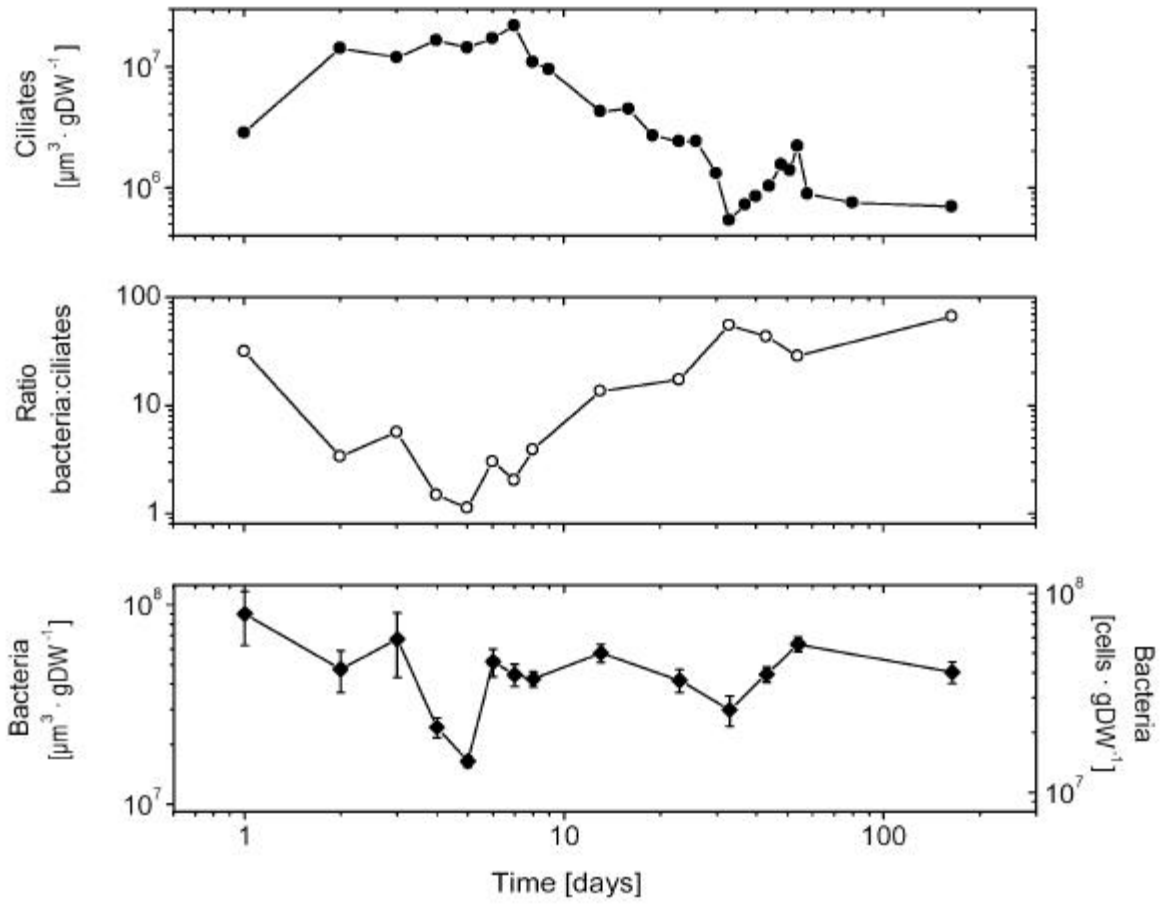
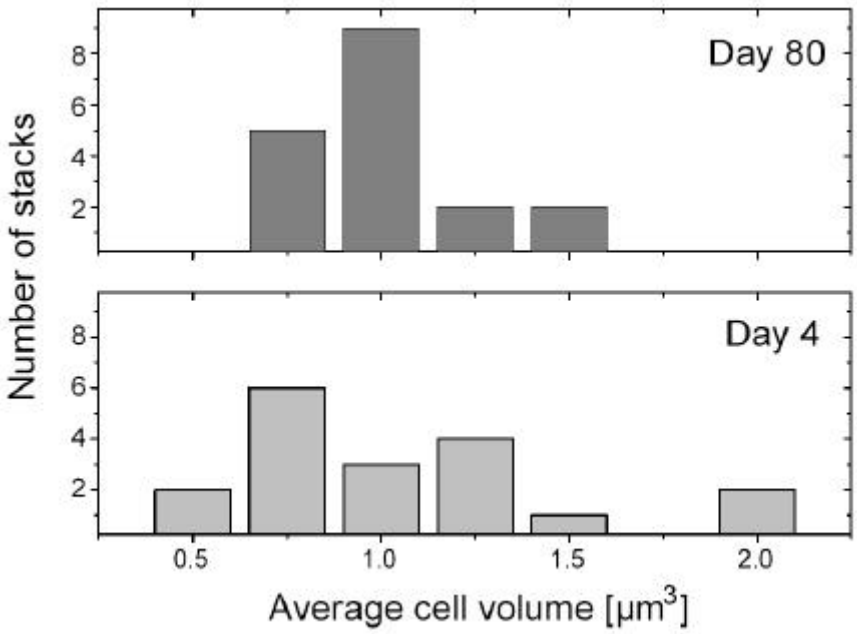

Ciliates
[µm³ · gDW⁻¹]
10⁷
10⁶
Ratio
bacteria:ciliates
100
10
1
Bacteria
[µm³ · gDW⁻¹]
10⁸
10⁷
Bacteria
[cells · gDW⁻¹]
10⁸
10⁷
1
10
100
Time [days]

Fig. 4:


Day 80
Day 4
Number of stacks
Average cell volume [µm³]
0.5
1.0
1.5
2.0
2
4
6
8

Tab. 1:

Ciliates from microcosms containing Vercelli rice field soil

Taxon	Found in anoxic incubations	Obligate anaerobe[a]	Methanogenic endosymbionts[b]	Volume calculation[c]	Typical dimensions [µm][d]	Food items[e]	Taxonomic group[f]
Actinobalbus trichocystiformis Foissner, 1984	+	–	–	A	56 · 23	C	GY
Arcuospathidium vermiforme Foissner, 1984	+	–	–	A & B	140 · 18	C	GY
Blepharisma hyalinum Perty, 1852	–	–	–	C	82 · 26	B, H[b]	HE
Blepharisma sp.	–	–	–	C	72 · 21	B[b]	HE
Bothrostoma cf. *undulans* Stokes, 1887	–	–	–	A	72 · 21 · 23	B, F	HE
Bryometopus sphagni (Penard, 1922) Kahl, 1932	–	–	–	A	64 · 40 · 20	B,C,D,G[b]	CO
Bryophyllum tegulatum Kahl, 1931	–	–	–	A	148 · 28 · 20	C,R[b]	GY
Chaena terricolor Foissner, 1984	–	–	–	A	80 · 21	C	GY
Chilodonella uncinata (Ehrenberg, 1838) Strand, 1928	–	–	–	A	40 · 21 · 20	B[b]	CY
Cinetum mobile (Penard, 1922) Jankowski, 1964	+	+	–	B & C	44 · 35 · 20	B	HE
Colpoda inflata (Stokes, 1884) Kahl, 1931	–	–	–	C	50 · 40[c]	B,F[b]	CO
Colpoda magna (Gruber, 1879) Lynn, 1978	–	–	–	A	140 · 60 · 60	B[b]	CO
Colpoda maupasi (Alekperov, 1985) Foissner, 1993	–	–	–	C	125 · 80[c]	B[b]	CO
Colpoda steinii Maupas, 1883	+	–	–	A	22 · 17 · 15	B,E,G,H[b]	CO
Colpodidium caudatum Wilbert, 1982	–	–	–	A & C	69 · 31	B[b]	NA
Cyclidium glaucoma Müller, 1773	–	–	–	C	32 · 17	B,G[b]	HM
Cyrtolophosis acicula Stokes, 1885	–	–	–	C	28 · 15	B[b]	CO
Frontonia cf. *acuminata* Ehrenberg, 1833	–	–	–	B	45 · 12 · 8	B[b]	HM
Gonostomum affine (Stein, 1859) Sterki, 1878	–	–	–	A	96 · 27 · 16	B,F,S[b]	HY
Halteria grandinella (Müller, 1773) Dujardin, 1841	–	–	–	B	65 · 45	B,F,G[b]	OL
Hemisincirra tupatera Hemberger, 1985	+	–	–	A & B	126 · 12	B[b]	HY
Histriculus muscorum Kahl, 1932	+	–	–	A	98 · 42 · 23	B,F	HY
Holosticholides chardezi Foissner, 1987	–	–	–	A	84 · 23	E,H,S[b]	HY
Leptopharynx costatus Mermod, 1914	–	–	–	A	25 · 15 · 10	B,Fh	NA
Meseres cr (Müller, 1776) Lauterborn, 1916	+	+	+	C	140 · 52	B,E,F,S[b]	HE
Metopus hasei Sondheim, 1929	+	+	+	B	58 · 20	B[b]	HE
Metopus inversus (Jankowski, 1964) Agatha & Foissner, 1999	+	+	+	B	115 · 63	B[b]	HE
Metopus minor Kahl, 1927	+	+	+	C	25 · 12	B[b]	HE
Metopus palaeformis Kahl, 1927	+	+	+	B	105 · 30	B[b]	HE
Metopus setosus Kahl, 1927	+	+	+	A	63 · 31	B[b]	HE
Oxytricha setigera Stokes, 1891	–	–	–	A	45 · 20 · 15	B,F[b]	HY
Oxytrichidae taxon 1	+	–	–	A	70 · 20 · 18	B,F[b]	HY
Oxytrichidae taxon 2	+	–	–	A	73 · 24 · 15	B,F	HY
Oxytrichidae taxon 3	–	–	–	A	104 · 26 · 13	B,F	HY
Oxytrichidae taxon 4	–	–	–	–	n.d.	B,F	HY
Oxytrichidae taxon 5	–	–	–	–	n.d.	B,F	HY
Oxytrichidae taxon 6	–	–	–	–	n.d.	B,F	HY
Phialina binucleata Berger, Foissner & Adam, 1984	–	–	–	B	62 · 13[f]	C[b]	GY
Plagiocampa pentadactyla Foissner, Agatha & Berger 2002	+	–	–	C	32 · 16	B[b]	PR
Pleuroplitoides smithi Foissner 1996	–	–	–	B	86 · 26	C[b]	GY
Prorodon sp.	–	–	–	B	80 · 40	C	PR
Protospathidium serpens (Kahl, 1930)	+	–	–	C	55 · 11	C[b]	GY
Protospathidium sp.	+	–	–	C	150 · 24	C	GY
Spathidiidae taxon 1	+	–	–	C	33 · 9	C	GY
Spathidiidae taxon 2	-	–	–	–	n.d.	C	GY
Spathidiidae taxon 3	+	–	–	B	40 · 8	C	GY
Spathidiidae taxon 4	+	–	–	–	n.d.	C	GY
Spathidiidae taxon 5	+	–	–	–	n.d.	C	GY
Spathidium cf. *crassum* Kahl, 1928	+	–	–	A	37 · 9	C	GY
Spathidium longicaudatum (Wilbert & Buitkamp, 1974) Buitkamp, 1977	–	–	–	A	150 · 30	C,N[b]	GY
Spathidium cf. *moderatum* Kahl, 1930	+	–	–	A & B	85 · 18	C	GY
Spathidium cf. *vermicola* Kahl, 1926	–	–	–	A	45 · 15 · 8	C	GY

[a]According to Foissner (1998)
[b]Verified from own observations.
[c]Volume was calculated from: a cube (**A**), a cylinder with hemi-spherical ends (**B**), or an ellipse (**C**)
[d]Length · width · height (three numbers) or length · diameter (two numbers) from own measurements; n.d.: not determined
[e]Foissner (1998)
[f]Berger et al. (1984)
[g]Food items are, from own observations: bacteria (**B**); ciliates (**C**); cyanobacteria (**E**); colourless flagellates (**F**); green algae including green flagellates (**G**); hyphae and spores of fungi, yeast (**H**); naked amoebae (**N**); rotifers, nematodes (**R**); soil particles (**S**)
[h]Foissner (1998)

[i]colpodid (**CO**); cyrtophorid (**CY**); gymnostomatid (**GY**); heterotrich (**HE**); hymenostome (**HM**); hypotrich (**HY**); nassulid (**NA**); oligotrich (**OL**); prostomatid (**PR**); according to Foissner (1998)

Tab. 2:

Taxa found in microcosms grouped by higher categories

	All microcosms		Anoxic soil incubation	
Taxonomic group[1)]	Number of species	%	Number of species	%
CO	7	14	1	4
CY	1	2		
GY	17	33	10	44
HE	10	19	7	30
HM	2	4		
HY	11	21	4	17
NA	1	2		
OL	1	2		
PR	2	4	1	4
sum:	52		23	

[1)] CO - colpodid, CY - cyrtophorid, GY - gymnostomatid, HE - heterotrich, HM - hymenostome, HY - hypotrich, NA - nassulid, OL - oligotrich, PR - prostomatid

Tab. 3:

Ciliates from a rice field in Vercelli, June 2001

	Ciliata	Obligate anaerobe[1)]	Found in microcosms[2)]
floodwater	*Acineria uncinata*	–	–
	Cinetochilum magaritaceum	–	–
	Cyclidium cf. *glaucoma*	–	–
	Halteria grandinella	–	–
	Uronema sp.	–	–
soil	*Acineria uncinata*	–	–
	Aspidisca cicada	–	–
	Bryophyllum sp.	–	+
	Cyclidium glaucoma	–	+
	Metopus hasei	+	+
	Oxytricha taxon 2	–	+
	Plagiocampa pentadactyla	–	+

[1)] According to Foissner (1998)

[2)] See Table 1

Tabelle 8.1: Zusammenstellung aller verwendeter Oligonukleotid-Sonden.

Name	Sequenz (5' - 3')	Zielorganismus	*E. coli* Position[1)]	FA [%][2)]	Literatur[3)]
Alpha1b	AGCGTTCGYTCTGAGCC	α-*Proteobacteria*	19-35	30	Manz *et al.* (1992)
Arc344	TCGCGCCTGCTGCICCCCGT	Archaea	344-363	35	Raskin *et al*. (1994)
Arch915	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT	Archaea	915-934	35	Stahl und Amann (1991)
Beta42a[4)]	TTGCCTTCCCACATCGT	β-*Proteobacteria*	1027-1043	30	Manz *et al.* (1992)
Clo I	TTCTTCCTAATCTCTACGCA	Clostridium sp.	696-715	30	Küsel *et al*. 1999
Clo III	CCTGTGTTATCCCCCTGT	Clostridium sp.	140-157	30	Weber *et al*. (2001)
Clo IV	GCACCCTTTACACCC	Clostridium sp.	565-579	30	Weber *et al*. (2001)
Clo XIVa	CTGTATGAGGCAGGT	Clostridium sp.	129-143	30	Weber *et al*. (2001)
Clo XIVa-c	CAGCTGTTATCCCCCTGTAT	Clostridium sp.	138-157	40	Weber *et al*. (2001)
Clo XIVa-amino	GTACCATGCGGCACT	Clostridium sp.	183-197	40	Weber *et al*. (2001)
EUB338	ACUCCUACGGGAGGCAGC	Bakteria	338-355	30	Amann *et al*. (1990)
EUB338-II	GCAGCCACCCGTAGGTGT	Bakteria	338-355	30	Daims *et al*. (1999)
EUB338-III	GCTGCCACCCGTAGGTGT	Bakteria	338-355	30	Daims *et al*. (1999)
Gam42a[4)]	TTTGGTCCGTGTCTCAG	γ-*Proteobacteria*	1027-1043	30	Manz *et al.* (1992)
MB310	CTTGTCTCAGGTTCCATCTCCG	*Methanobacterium* spp., *Methanobrevibacter* spp., *Methanosphaera* spp.	310-331	35	Raskin *et al*. (1994)
MC1109	GCAACATAGGGCACGGGTCT	*Methanococcus* spp.	1109-1128	35	Raskin *et al*. (1994)
MG1200	CGGATAATTCGGGGCATGCTG	*Methanomicrobium* spp., *Methanogenium* spp., *Methanoculleus* spp., *Methanospirillum* spp., *Methanocorpusculum* spp., *Methanoplanus* spp.	1200-1220	35	Raskin *et al*. (1994)
Mpal	TTTACGTTTGGCCCATTC	*Metopus palaeformis*	435-453	n.b.[5)]	Embley *et al*., 1992
MS821	CGCCATGCCTGACACCTAGCGAGC	*Methanosarcina frisius*, *Methanosarcina* spp., *M. acidovorans*, *M. thermophila*, *M. barkeri*, *Methanoholophilus mahii*, *Methanophilus* sp.	321-844	35	Alm *et al*. (1996)

[1)]Zielbereich im *E. coli* Genom (nach Brosius *et al*., 1978); Die Position im *E. coli*-Genom bezieht sich auf die in ARB (Stand: 12. Juni 2002) genannte; [2)]Optimale Konzentration von Formamid im Hybridisierungspuffer [%]; [3)]Literaturquelle; [4)]Oligonukleotid Beta42a wurde mit der fünffachen Menge nicht-Fluoreszenz gekoppeltem Oligonukleotid Gam42a substituiert, bzw Gam42a wurde mit der fünffachen Menge nicht-Fluoreszenz gekoppeltem Oligonukleotid Beta42a substituiert; [5)]n.b.: nicht bestimmt;

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Peter Frenzel für die Bereitstellung des Themas meiner Doktorarbeit, die sehr gute Betreuung und die ständige Diskussionsbereitschaft. Herrn Prof. Dr. Ralf Conrad danke ich für die Möglichkeit, an diesem Institut zu arbeiten.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Rolf Thauer für die Begutachtung der Arbeit.

Bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft bedanke ich mich für die Finanzierung meiner Arbeit im Rahmen des SFB 395, „Interaktion, Anpassung und katalytische Fähigkeiten von Bodenmikroorganismen“.

Bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Frenzel bedanke ich mich für ihre ständige Hilfsbereitschaft, das sehr gute Arbeitsklima und die Gesellschaft bei unzähligen Tassen Kaffee. Im Detail danke ich: Alexandra Hahn, Andrea Lindemann, Martina Metje, Jochen Scheld und Bellinda Schneider.

Für die Diskussionsbereitschaft und vielfältigen Ratschläge danke ich meinen Kollegen Dr. Tillmann Lüders und Dr. Stefan Stubner. Auch andere Kollegen haben mir nicht nur die Arbeit leichter gemacht. Zu nennen sind: Dr. Gesche Braker, Markus Drescher, Markus Egert, Andrea Graff, Dr. Bernhard Nüsslein, Carmen Stubner, Nicole Treude, Bianca Wagner sowie die gesamte AG Biogeochemie.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. W. Foissner der mir den Weg zu den „Viechern“ zeigte. Herrn Dr. J. Fried danke ich für seine Tips, Tricks und Protokolle zu den Hybridisierungen (FISH). Bei Herrn Prof. Dr. J. H. P. Hackstein möchte ich für seine Ratschläge und Empfehlungen in bezug auf die Arbeit mit anaeroben Protozoen bedanken. Frau Dr. R. Hemmersbach danke ich für die *Paramecium biaurelia*-Kultur. Herrn J. Ullmann danke ich für viele anregende Gespräche sowie die *Moneuplotes*-Kultur.

Ich danke meinen Eltern, daß sie mich immer gefördert haben. Sie gaben mir stets die Unterstützung die ich brauchte.

Insbesondere danke ich meiner Sus. Für ihre Liebe, ihre Toleranz gegenüber mir und meiner Arbeit (auch in stressigen Zeiten) sowie ihrer stetigen Unterstützung bin ich ihr sehr dankbar.

Lebenslauf

Mathieu Vincent Julian Schwarz, geboren am 23.01.1970 in Bremen

Schulbildung:

1976 – 1979	Grundschule, Schule an der Horner Heerstraße, Bremen
1979 – 1983	Grundschule und Orientierungsstufe, Freie Evangelische Bekenntnis Schule Bremen
1983 – 1987	Realschule, Freie Evangelische Bekenntnis Schule, Bremen
1987 - 1990	Gymnasium, Schulzentrum des Sekundarbereichs II Horn, Bremen
Mai 1990	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst:

1990 – 1992	Zivildienst, Arbeiter Samariterbund Bremen

Studium:

1992 – 2000	Biologie (Diplom), Universität Bremen
1999 – 2000	Abschluß Dipl.-Biol., Universität Bremen, Fachbereich 2 – Biologie
	Thema Diplomarbeit: „Sukzession und Abundanzdynamik von Ciliaten (Protozoa, Ciliophora) in Überschußschlamm während der Überschußschlammalterung“

Promotion:

2000 – 2003	Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg / Lahn. Arbeitsgruppe Biogeochemie unter Leitung von Prof. Dr. R. Conrad. Betreuung und Anleitung: Prof. Dr. P. Frenzel.

Erklärung

Ich versichere, daß ich meine Dissertation

„Ciliaten (Protozoa, Ciliophora) des Reisfeldbodens“

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

Marburg / Lahn, den 24. Juli 2003

(M.V. Julian Schwarz)