Friedrich-Schiller-Universität Jena Biologisch-Pharmazeutische Fakultät

angefertigt am Max-Planck-Institut für Biogeochemie (Prof. Dr. Gerd Gleixner)

GC/IRMS-Analyse an Membranlipiden zur Bestimmung des

Wasserstoffumsatzes im Boden

Diplomarbeit

zur Erlangung des Grades eines

Diplom-Biochemikers

vorgelegt von

Stefan Karlowsky

aus Jena

Jena, Oktober 2012

<u>Gutachter:</u>

Prof.Dr. Frank Grosse

Prof. Dr. Gerd Gleixner

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die Diplomarbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe, alle Ausführungen, die anderen Schriften wörtlich oder sinngemäß entnommen wurden, kenntlich gemacht sind und die Arbeit in gleicher oder ähnlicher Fassung noch nicht Bestandteil einer Studien- oder Prüfungsleistung war.

Jena, den 22.10.2012

Stefan Karlowsky

Inhaltsverzeichnis

Häufige Abkürzungen III				
AbbildungsverzeichnisIV				
TabellenverzeichnisV				
Forme	FormelverzeichnisVI			
1	Zusammenfassung1			
2	Einleitung 2			
3	Theoretische Grundlagen 4			
3.1	Bedeutung von molekularem Wasserstoff für Bodenorganismen4			
3.2	Wasserstoffnutzung bei Knallgasbakterien4			
3.3	Bakterielle Lipidbiosynthese und D/H-Isotopenfraktionierung			
3.3.1	Überblick6			
3.3.2	Fettsäure-Biosynthese9			
3.3.3	Isoprenoid-Biosynthese11			
3.4	PLFA-Muster und mikrobielle Gemeinschaft12			
4	Material und Methoden 14			
4.1	Verwendete Chemikalien14			
4.2	Beschreibung des Untersuchungsgebietes15			
4.3	Probenahme und -bearbeitung15			
4.3.1	Entnahme der Proben und Aufarbeitung15			
4.3.2	Lipid-Extraktion16			
4.4	Messung der Proben21			
4.4.1	Messung der δ D-Werte der Gesamt-Phospholipide21			
4.4.2	Bestimmung des PLFA-Gehaltes21			
4.4.3	Bestimmung der δ D-Werte einzelner PLFAs22			
4.4.4	Korrektur der Isotopenverhältnis-Messungen24			
4.5	Statistische Methoden25			
5	Ergebnisse 27			
5.1	Wettereinfluss 27			
5.2	Wasserstoffproduktion im Boden28			
5.3	Wasserstoffisotopie des Bodenwassers29			

5.4	Wasserstoffisotopie der Phospholipide	30
5.5	Untersuchung der mikrobiellen Gemeinschaft	31
5.5.1	PLFA-Zusammensetzung	32
5.5.2	Variabilität der PLFA-Muster	34
5.6	Einbau von Wasserstoff in Fettsäuren	36
5.6.1	Änderung des H-Isotopenverhältnisses	36
5.6.2	Unterschiede der Proben	40
5.7	Korrektur der IRMS-Messungen bei geringen Probenmengen	41
6	Diskussion	44
6.1	Einfluss der Umweltbedingungen	44
6.2	Änderung der mikrobiellen Gemeinschaft bei verschiedener H ₂ - Verfügbarkeit	45
6.3	Nachweis der H ₂ -Fixierung in die mikrobielle Biomasse	47
7	Schlussfolgerung und Ausblick	54
8	Literaturverzeichnis	56
A	Anhang	60
Anlage	enverzeichnis	60
A.1	Messwerte des H ₂ -Gehaltes der Bodenluft	61
A.2	δD-Werte Bodenwasser	62
A.3	δD-Messwerte der Phospholipide	62
A.4	Identifizierte PLFAs	62
A.5	Massenspektren	64
A.6	Messwerte PLFA-Gehalt	66
A.7	IRMS-Beispiel-Chromatogramm	68
A.8	PLFA-δD-Messwerte HS 2 und HS 3	68
A.9	Vektorplot der PLFA-δD-Änderung	70
A.10	pH Bodenwasser	70
A.11	Leitfähigkeit Bodenwasser	71
A.12	Sulfat Bodenwasser	71
A.13	Einfluss der Silberionen Chromategraphie	71
		, エ
A.14	Peaküberlagerung der C18-MUFAs	72

Häufige Abkürzungen

EL-PLFA	Ester-verknüpfte Phospholipid-Fettsäure		
FAME	Fettsäure-methylester		
GC	Gaschromatograph(ie)		
GC-Py-IRMS	Gaschromatographie-Pyrolyse-Isotopenverhältnismassenspektro- metrie		
HS	Hainich-Stelle (Probenahmeort)		
IRMS	Isotopenverhältnis-Massenspektrometer		
MPI-BGC	Max-Planck-Institut für Biogeochemie Jena		
MS	Massenspektrometer		
MUFA	einfach ungesättigte Fettsäure		
NAD(P)	Nicotinsäureamid-adenin-dinukleotid (-phosphat)		
РСА	Hauptkomponenten analyse		
PLEL	Phospho-Etherlipid		
PLFA	Phospholipid-Fettsäure		
ppbV	parts per billion (10 ⁻⁹), Volumen-bezogen		
PUFA	mehrfach ungesättigte Fettsäure		
SATFA	gesättigte Fettsäure		
VSMOW	Vienna Standard Mean Ocean Water (internationaler Vergleichs- Standard für den Deuterium-Gehalt)		

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Fun	ktion der beiden Hydrogenasen von Knallgasbakterien und ihre Einbindung in den Metabolismus	.5
Abbildung 2: Ver	einfachtes Schema des Wasserstoffeintrags in Fettsäuren und Isoprenoiden während der Biosynthese	.7
Abbildung 3: Rea	ktionsformel der Biosynthese gesättigter Fettsäuren bis zu 16 C- Atomen	.9
Abbildung 4: Rea	ktionsformel der Isoprenoidbildung über den Mevalonat-Weg	1
Abbildung 5: Boo	lenprofile von HS 2, HS 3 und HS 4 nach Entnahme mit dem Split-Tube	16
Abbildung 6: Flus	ssdiagramm der Probenaufarbeitung mit Zwischenstufen und Aufarbeitungsschritten	L7
Abbildung 7: Me	ssanordnung mit simultaner GC-Pyrolyse-IRMS und GC-MS	22
Abbildung 8: We	tterdaten des Untersuchungszeitraumes	27
Abbildung 9: Wa	sserstoffgehalt der Bodenluft der Probenahme-Stellen HS 2, HS 3 und HS 4 für 2011	29
Abbildung 10: δΕ	D-Werte des Bodenwassers im Untersuchungszeitraum für die zusammengefassten Stellen HS 2 und HS 3 sowie separat für HS 4	30
Abbildung 11: δD	0-Werte der Phospholipid-Proben	31
Abbildung 12: M	assen-Chromatogramme für SATFA (a, HS 4 Mai), MUFA (b, HS 4 Mai), PUFA (c, HS 4 Mai) und PLEL (d, HS 2 April)	32
Abbildung 13: Ph	ospholipid-Fettsäure-Gehalt des Bodens in März, April und Mai; a: für HS 2, b: für HS 3 und c: für HS 4	33
Abbildung 14: Bij	plot der Hauptkomponentenanalyse aus den PLFA-Zusammen- setzungen (mol%) der Bodenproben von HS 2, HS 3 und HS 4 während der drei Probenahmedaten	35
Abbildung 15: PC	CA-Biplot mit den δD-Messwerten der PLFAs (zu positiven werten transformiert) und des Bodenwassers aus HS2/3 sowie HS 4 während der drei Probenahmedaten	10
Abbildung 16: Ab	oweichung der δD-Messwerte von Fettsäuremethylestern im Vergleich zur Peak-Höhe (² H ₂ -Amplitude) und daraus berechnete inverse Funktion	12
Abbildung 17: Ab	oweichung der δD-Messwerte von Alkanen im Vergleich zur Peak- Höhe (² H ₂ -Amplitude) und daraus berechnete inverse Funktion4	13

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ester-verknüpfte PLFA-Marker für verschiedene taxonomische Einheiten
Tabelle 2: Liste mit den verwendeten Chemikalien und deren Reinheit
Tabelle 3: Wasserstoffisotopenwerte der PLFAs von HS 2 und HS 3 mit positiverKorrelation zur Änderung der H-Isotopie des Bodenwassers37
Tabelle 4: Wasserstoffisotopenwerte der PLFAs von HS 2 und HS 3 mit negativerKorrelation zur Änderung der H-Isotopie des Bodenwassers37
Tabelle 5: Wasserstoffisotopenwerte der PLFAs von HS 4 mit positiver Korrelation zurÄnderung der H-Isotopie des Bodenwassers
Tabelle 6: Wasserstoffisotopenwerte der PLFAs von HS 4 mit negativer Korrelation zur Änderung der H-Isotopie des Bodenwassers

Formelverzeichnis

4
5
6
24
24
25
41

1 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Fixierung von molekularem Wasserstoff durch Bodenbakterien in einem aeroben Waldboden im Nationalpark Hainich (Westthüringen, Deutschland) untersucht. Dazu wurde jeweils im März, April und Mai 2011 an drei Stellen im Hainich eine Bodenprobe entnommen. Aus jeder der 9 Bodenproben wurden die Phospholipid-Fettsäuren extrahiert. Davon konnten jeweils 21 individuelle Spezies auf ihre Abundanz (GC) sowie ihren Wasserstoff-Isotopengehalt (GC-Py-IRMS) untersucht werden. Letzteres sollte als Nachweis für den Wasserstoff-Einbau aus der Bodenluft dienen, welche im Untersuchungsgebiet ungewöhnlich hohe Konzentrationen an natürlich stark Deuterium-abgereicherten H₂-Gas besitzt. Dazu wurden die Messwerte der Proben auf Unterschiede in Bezug auf die Erhöhung der H₂-Verfügbarkeit im Verlauf des Frühjahres und verschiedener maximalen H₂-Konzentrationen zwischen den Stellen untersucht. Dabei musste der Trend des Bodenwassers zu einer Deuterium-Anreicherung im Untersuchungszeitraum berücksichtigt werden. Bei etwa der Hälfte der analysierten Fettsäuren konnte ein ähnliches Verhalten gefunden werden, was auf eine überwiegende bzw. alleinige Rolle des Bodenwassers als Wasserstoff-Donor hinweist. Ein Wasserstoffeinbau aus der Bodenluft konnte vor allem bei Fettsäuren gefunden werden die als Marker für Gram-positive Bakterien, insbesondere der Ordnung Acinomycetales, dienen (a15:0, 18:1w9, 10Me16:0 und 10Me18:0). Ein etwas schwächerer Einbau war bei zwei Markern für Gram-negative Bakterien (cy19:0 und 18:1ω7) zu beobachten. Bestimmte Bakterien aus der Ordnung Actinomycetales scheinen besonders stark von der H₂-Fixierung zu profitieren. Hier wurde eine starke Erhöhung der Abundanz des Markers 10Me16:0 bei einer der Hainich-Stellen gefunden, an der besonders viel Wasserstoff zur Verfügung steht. Dort wurde auch ein allgemeiner Anstieg der mikrobiellen Biomasse in Verbindung mit der erhöhten Wasserstoffproduktion im Frühjahr gefunden.

Durch die hier gefundenen Ergebnisse kann auf eine erweiterte Kapazität von aeroben Böden als Senke für atmosphärischen Wasserstoff geschlossen werden. Diese Eigenschaft ist vor allem für die Erstellung von biogeochemischen Modellierungen interessant, welche den potentiellen Einfluss einer stärker werdenden Nutzung von Wasserstoff als Energiequelle untersuchen.

2 Einleitung

Die potentielle Nutzung von Wasserstoff als "saubere" Energiequelle und die dabei möglichen Veränderungen der Atmosphäre werden verstärkt seit Beginn des 21. Jahrhunderts in der naturwissenschaftlichen Fachliteratur diskutiert^{1–4}. Wasserstoff ist nach Methan das zweithäufigste Spurengas in der Atmosphäre und kommt dort in einem Volumen-Mischungsverhältnis von durchschnittlich ~ 530 ppbV (ppbV = jedes 10⁻⁹te Teilchen in einem bestimmten Volumen) vor⁵. Durch ein erhöhtes Entweichen von H₂-Gas bei der ökonomischen Nutzung wäre ein deutlicher Anstieg des atmosphärischen Wasserstoff-Gehaltes, in verschiedenen Extremszenarien um bis zu 120-460 %^{1,4}, möglich. Da H₂ zu den indirekten Treibhausgasen zählt (verhindert atmosphärischen Methanabbau)³, könnten sich aus einer exzessiven ökonomischen Nutzung von Wasserstoff auch negative Konsequenzen für das Klima bilden. Aus dem bisherigen H₂-Zyklus ist bekannt, dass etwa 75 % der Wasserstoff-Fixierung im Boden erfolgt^{2,3}. Es wird argumentiert, dass dieser Prozess die möglichen neuen Wasserstoff-Emissionen kompensieren könnte¹. Die Bestimmung des Einflusses einer erhöhten H₂-Abundanz ist deshalb hier besonders interessant.

Ein durchgängiger saisonaler Anstieg der Wasserstoffkonzentration der Bodenluft im Frühjahr, deutlich über 530 ppbV, wurde an einer vom Max-Planck-Institut für Biogeochemie Jena (kurz: MPI-BGC) betriebenen Probenahmestelle im Nationalpark Hainich (naturbelassener alter Buchenwald) gefunden. Dabei wurden Spitzenwerte im Bereich von ~ $2 \cdot 10^5$ ppbV in den oberen aeroben Bodenschichten (5, 10 und 20 cm Tiefe) gemessen, während der Waldboden immer noch als Wasserstoffsenke fungierte (unveröffentlichte Ergebnisse; AG Gleixner, MPI-BGC). Die hohen Konzentrationen sprechen für eine starke biologische Produktion des Wasserstoffs z.B. in anaeroben Mikronischen durch Fermentation⁶.

Für die Fixierung von H₂ in aeroben Bodenschichten wurden von Schuler und Conrad 1990⁷ zwei Aktivitäten mit unterschiedlichen K_{M^-} und Schwellen-Werten festgestellt. Eine Aktivität besitzt dabei einen niedrigen K_M im nM-Bereich und ist aktiv bei H₂-Konzentrationen <500 pbbV^{7,8}. Aufgrund der Beständigkeit gegenüber der Chloroform-Fumigation des Bodens wurde die Existenz von abiotischen Boden-Hydrogenasen vorgeschlagen⁷. Die zweite Aktivität wies dagegen einen deutlich höheren K_M -Wert im µM-Bereich auf und war erst ab H₂-Konzentrationen >1000 pbbV aktiv^{7,8}. Letztere ist charakteristisch für aerobe Wasserstofffixierende Bakterien (Knallgasbakterien), die bei chemolithoautotrophem Wachstum mit H₂

als Energiequelle auch CO_2 fixieren^{6,9}. Beweise für eine simultane CO_2 -Fixierung wurden von Dong und Layzall 2001¹⁰ sowie Stein et al. 2005¹¹ durch die Begasung von Ackerboden mit einem H₂-Luft-Gemisch gefunden.

Wegen der hohen Schwellenkonzentration für die biotische H₂-Fixierung, wurde die Funktion der aeroben Böden als Wasserstoff-Senke von Conrad 1996⁶ jedoch hauptsächlich auf die abiotische Fixierung zurückgeführt. Die hohen gemessenen Wasserstoff-Konzentrationen im Hainich könnten jedoch auch die Möglichkeit einer starken biotischen Fixierung durch Knallgasbakterien bieten.

Neben den hohen Konzentrationen wurde auch eine ungewöhnlich starke Deuterium-Abreicherung des Wasserstoffs im Hainich-Boden gefunden (unveröffentlichte Ergebnisse; AG Gleixner, MPI-BGC). Der Wert von durchschnittlich etwa -700 ‰ vs. VSMOW nach der δ -Notation (δ D) kann als Isotopensignal genutzt werden und ermöglicht so die Nachverfolgung des Wasserstoffs per Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (IRMS).

Der Einbau des natürlich markierten Wasserstoffs in die mikrobielle Biomasse soll in dieser Arbeit anhand der im Boden enthaltenen Phospholipid-Fettsäuren (PLFAs) nachvollzogen werden. Diese eignen sich besonders gut, weil sie einen Großteil der *de novo* synthetisierten bakteriellen Biomasse ausmachen und zudem auch einen Rückschluss auf die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft erlauben¹². Die Quantifizierung des individuellen PLFA-Gehaltes in Bodenproben ist nach der Lipidextraktion und -aufreinigung durch eine Gaschromatographie (GC) möglich¹². Für die Messung am IRMS müssen die in der Probe enthaltenen PLFAs zuerst durch eine GC getrennt und dann pyrolysiert werden (GC-Py-IRMS), um das Wasserstoff-Isotopenverhältnis messen zu können¹³.

Für diese Untersuchung wurden an drei Stellen im Kerngebiet des Nationalparks Hainich Bodenproben, analog zum Verlauf der erhöhten Wasserstoffproduktion im Frühjahr, entnommen. Die Probenahmestellen wurden nahe der regelmäßig untersuchten Sammelanlagen für Bodenluft und -wasser, von denen auch schon die oben erwähnten Wasserstoffwerte gemessen wurden, gewählt.

Das Ziel der Arbeit ist es den Einbau von molekularem Wasserstoff bei aeroben Bodenbakterien unter natürlichen Versuchsbedingungen nachzuweisen.

3 Theoretische Grundlagen

3.1 Bedeutung von molekularem Wasserstoff für Bodenorganismen

Wasserstoff spielt bei vielen Mikroorganismen eine wichtige Rolle als Elektronenüberträger bei Redox-basierten Stoffwechselwegen. Die Bildung von molekularem (gasförmigem) Wasserstoff im Boden findet vor allem anaerob, durch Fermentation organischer Substrate sowie Methanoxidation statt (Wasserstoff als Elektronenakzeptor)¹⁴. Des Weiteren kann molekularer Wasserstoff auch bei der Stickstofffixierung (z.B. durch Knöllchenbakterien) unter aeroben Bedingungen gebildet werden^{14,15}.

Die Wasserstofffixierung kann ebenfalls unter anoxischen oder oxischen Bedingungen erfolgen. Bei (strikt) anaeroben Mikroorganismen kann molekularer Wasserstoff anstelle von Sauerstoff als Elektronendonor fungieren. Diese Möglichkeit besitzen sulfatreduzierende, methanogene, homoacetogene sowie Fe³⁺- und Mn⁴⁺-reduzierende Bakterien^{14,15}. Dagegen sind die aeroben Wasserstofffixierer in einer heterogenen Gruppe, den "Knallgasbakterien" (auch Wasserstoffbakterien genannt), zusammengefasst. Ihr Name rührt daher, dass sie den Wasserstoff mit Hilfe von Sauerstoff oxidieren. Die Gesamtreaktion lautet¹⁵:

$$H_2 + \frac{1}{2}O_2 \rightarrow H_2O$$
 $\Delta G_0' = -237 \, kJ$ Formel 1

Die aeroben Wasserstoffbakterien finden in den oberen Bodenschichten besonders gute Wachstumsbedingungen, da sie am besten mikroaerophil, in oxisch/anoxischen Übergangszonen mit erhöhter H_2 -Konzentration, wachsen^{15,16}.

3.2 Wasserstoffnutzung bei Knallgasbakterien

Knallgasbakterien können je nach Nährstoffangebot heterotroph oder autotroph wachsen. Bei Anwesenheit leicht zu metabolisierender organischer Verbindungen (z.B. Glucose) werden diese bevorzugt als Kohlenstoffquelle benutzt (Chemoorganotrophie). Die Synthese der Hydrogenasen und Enzyme des Calvinzyklus wird dabei inhibiert¹⁵. Erst wenn nicht mehr genug organisches Substrat vorhanden ist, wird diese Repression aufgehoben und die Knallgasbakterien können den Wasserstoff als Energiequelle nutzen. Als Kohlenstoffquelle dient dann CO₂, welches über den Calvinzyklus fixiert wird (Chemolithotrophie). Die beobachtete Stöchiometrie lautet dabei¹⁵:

$$6H_2 + 2O_2 + CO_2 \rightarrow (CH_2O) + 5H_2O$$
 (CH₂O): Zellmateril Formel 2

Die Funktionsweise der Hydrogenasen von Wasserstoffbakterien ist in Abb. 1 dargestellt. Durch die membrangebundene Hydrogenase wird über eine Elektronentransportkette mit Chinon und Cytochrom *a-c* ein Protonengradient zwischen äußerer und innerer Membranseite erstellt, wodurch wiederum eine ATPase angetrieben wird, welche ATP aus ADP generiert. Am Ende des Elektronenflusses werden die Elektronen auf Sauerstoff, der zu Wasser reduziert wird, übertragen. Die membrangebundene Hydrogenase gilt zwischen den verschiedenen Spezies der H₂-Bakterien als konserviert und besteht jeweils aus einer α - und einer β -Untereinheit (ca. 60 und 30 kDa)¹⁷. Durch die stark exergone Reaktion (siehe Formel 1) wird mindestens 1 ATP erzeugt¹⁵.



Abbildung 1: Funktion der beiden Hydrogenasen von Knallgasbakterien und ihre Einbindung in den Metabolismus; nach Brock Mikrobiologie, Spektrum Akademischer Verlag 2001¹⁵; I: membrangebundene Hydrogenase, II: ATPase, III: lösliche Hydrogenase, Cyt: Cytochrom, Q: Chinon.

Die lösliche Hydrogenase ist ein Tetramer (ca. 2x 60 und 2x 30 kDa)¹⁷ und kann H₂ direkt benutzen, um NAD⁺ aber auch NADP⁺ zu NAD(P)H zu reduzieren¹⁸. Die Reaktion wird nur durch das niedrige Redoxpotential von H₂ (-0,42 V)¹⁵ angetrieben. Das so produzierte NAD(P)H kann im Calvinzyklus verwendet werden, um CO₂ zu fixieren und damit neues Zellmaterial zu synthetisieren¹⁵. Die meisten Knallgasbakterien besitzen jedoch nur die membrangebundene Hydrogenase und müssen deshalb die notwendigen Reduktions-äquivalente über einen umgekehrten Elektronenfluss bereitstellen^{9,17}.

Ein Beispiel für das Vorhandensein beider Hydrogenasetypen sind der Knallgas-Modellorganismus *Ralstonia eutropha* sowie *Achromobacter ruhlandii*, Gram-negative β-Proteobakterien der Ordnung Burkholderiales^{9,17}. Jedoch finden sich auch Spezies, welche nur die lösliche Form der Hydrogenase besitzen. Dazu gehören *Rhodococcus opacus* und *Pseudonocardia autotrophica* aus der Ordnung Actinomycetales der Gram-positiven Actinobakterien⁹.

Vertreter von aerob Wasserstoff-oxidierenden Bakterien, welche nur die membrangebundene Hydrogenase besitzen, befinden sich weit verstreut im Bakterienreich. Belege dafür gibt es in den Phyla der Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes und Aquificae^{9,17,19,20}. Sogar unter einigen extrem thermoacidophilen Archae-Bakterien der Familie Sulfolobales wurden H₂-Fixierer gefunden²¹. Allgemein sind jedoch die meisten Wasserstoffbakterien mesophil und haben einen hohen Guanin/Cytosin-Gehalt in ihrem Genom¹⁷.

3.3 Bakterielle Lipidbiosynthese und D/H-Isotopenfraktionierung

3.3.1 Überblick

Der Isotopengehalt eines Biomoleküls ist grundsätzlich von dem Weg seiner Biosynthese und der Zusammensetzung seiner Ausgangsmoleküle abhängig. Bei enzymatischen Prozessen wird i.d.R. ein Isotop bevorzugt, bei Wasserstoff das leichtere ¹H. Grund dafür ist die höhere Bindungsstärke von ²H zu Kohlenstoff, wodurch die benötigte Aktivierungsenergie für eine Bindungsspaltung erhöht wird²². Daraus folgt, je mehr metabolische Vorläufer bei einem Biomolekül vorhanden sind, desto geringer ist sein Deuterium-Anteil²³. Zur Angabe des Deuterium-Gehaltes wird hier die δ -Notation (δ D) verwendet, bei der die Angabe der Isotopenverhältnisse im Vergleich zu einem internationalen Standard erfolgt. Der δ D-Wert einer Probe berechnet sich wie folgt²⁴:

$$\delta D = \left[\frac{\left(\frac{{}^{2}H}{{}^{1}H}\right)_{Probe}}{\left(\frac{{}^{2}H}{{}^{1}H}\right)_{Standard}} - 1 \right] \cdot 1000\%_{00}$$

Formel 3

6

Für Wasserstoff wird meist der von der Internationalen Atomenergieorganisation definierte Standard für Wasserproben VSMOW (Vienna Standard Mean Ocean Water) mit einem 2 H/ 1 H-Verhältnis von 155,76·10⁻⁶ benutzt²⁴. Die Angabe des δ D-Wertes erfolgt demnach in [‰ vs. VSMOW] (in dieser Arbeit auch oft nur mit [‰] abgekürzt).

In Abb. 2 wird ein vereinfachtes Schema für den Wasserstoffeinbau bei der Biosynthese von Fettsäuren und Isoprenoiden gezeigt. Zur Reduktion von Ketogruppen und intermediären Doppelbindungen wird dabei NADPH benutzt. Der NADPH-Pool wird bei Bakterien normalerweise aus dem Pentosphosphat-Weg, dem umgekehrten Elektronenfluss (unter ATP-Verbrauch) und dem Citratzyklus (Isocitratdehydrogenase) gespeist¹⁵. Hinzu kommt die bereits erwähnte NADPH-Regeneration durch Hydrogenase-Enzyme unter Verwendung von molekularem Wasserstoff. Der NADPH-Pool ist mit einem δD-Wert von durchschnittlich -250 ‰ vs. VSMOW relativ negativ, was anhand der starken Bevorzugung von ¹H durch Dehydrogenasen begründet ist²³. Zusätzlich werden die H-Atome aus NADPH nicht direkt, sondern über ein Flavoprotein (FAD/FMN als Cofaktor) übertragen. Dabei kann es nochmals zu einer Fraktionierung des NADPH-Wassserstoffs kommen²³.



Abbildung 2: Vereinfachtes Schema des Wasserstoffeintrags in Fettsäuren und Isoprenoiden während der Biosynthese; gestrichelte Pfeile: zusätzliche Wege bei Knallgasbakterien; gepunktete/gestrichelte Pfeile: H-Übertragung bei Biosynthese; GAP: Glycerinaldehyd-3-phosphat, PDH: Pyruvatdehydrogenase.

Für die bakterielle ACP-Enoyl-Reduktase (siehe Abb. 3) wurde gezeigt, dass diese auch NADH direkt zum Reduzieren der intermediären Doppelbindung bei der Fettsäure-Synthese benutzen kann²⁵. NADH wird bei vielen Stoffwechselvorgängen durch Dehydrogenasen (Glykolyse, Citratzyklus, Fettsäure-β-Oxidation, umgekehrter Elektronenfluss, u.v.m.) sowie bei der Wasserstoff-Fixierung regeneriert^{15,26}.

Weitere H-Atome können bei der Biosynthese durch Protonierung eingeführt werden. Diese stammen aus dem Zellwasser, welches in seinem Isotopengehalt bei Mikroorganismen hauptsächlich vom umgebenden Medium abhängt²⁷ und bei Hydrogenase-Aktivität auch durch H₂ beeinflusst wird.

Das grundlegende D/H-Verhältnis ergibt sich aber auch aus den Ausgangsmolekülen. Für die Fettsäure-Biosynthese und die Isoprenoid-Biosynthese über den Mevalonatweg werden fast ausschließlich Acetat-Einheiten für den Aufbau des Kohlenstoffgerüstes verwendet. Deren Hauptbildungsweg verläuft wiederum über die Glykolyse und den Pyruvat-Pool²⁶. Für pflanzlich produzierte Kohlenhydrate ist der durchschnittliche δ D-Wert -70 ‰ vs. VSMOW²³. Der δ D-Bereich von Fettsäuren liegt dagegen bei -144 bis -260 ‰ vs. VSMOW, der von Terpenen bei -230 bis -330‰ vs. VSMOW²³. Diese Deuterium-Abreicherung ergibt sich zum Einen aus der Verwendung des NADPHs bei der Biosynthese und zum Anderen aus der Fraktionierung bei der Bildung der Ausgangsmoleküle. Während der Glykolyse treten ²H/¹H-Fraktionierungen durch mehrere Dehydrogenasen und den Einbau von H⁺ in die die Pyruvat-Methylgruppe (durch die Pyruvatkinase) auf²³. Anschließend kommt es zu einer weiteren Fraktionierung durch die Pyruvat-Dehydrogenase²³.

Bei Wasserstoffbakterien kann außerdem bei autotrophem Wachstum das Glykolyse-Intermediat Glycerin-aldehyd-3-phosphat (GAP) über den Calvinzyklus, durch Einbau von CO₂ in Ribulose-1,5-bisphosphat, gebildet werden¹⁵. Pro CO₂-Molekül entstehen dabei formal 2 GAP-Moleküle, in die jeweils ein H-Atom aus NADPH eingebaut wird.

Die Isoprenoid-Biosynthese kann prinzipiell auf zwei unterschiedliche Arten erfolgen. Der Mevalonatweg wird von allen höheren Eukaryoten, Archaebakterien und einigen Eubakterien benutzt²⁸. Der nicht-Mevalonatweg, auch DOXP (1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat)- oder MEP (2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat)-Weg genannt, wird von den meisten Eubakterien genutzt. Er kommt außerdem noch in den Plastiden von Pflanzen, Algen und Protozoen des Phylums Apicomplexa vor²⁸.

3.3.2 Fettsäure-Biosynthese

Die Biosynthese der gesättigten Fettsäuren bis C16 läuft bei allen Spezies nach dem gleichen Mechanismus ab und wird durch den Fettsäure-Synthase-Komplex katalysiert. Bei Bakterien besitzt dieser Multienzymkomplex 7 Untereinheiten mit je einem aktiven Zentrum²⁶. Der Reaktionsmechanismus ist in Abb. 3 dargestellt.



Abbildung 3: Reaktionsformel der Biosynthese gesättigter Fettsäuren bis zu 16 C-Atomen; fettgedruckt: Wasserstoff aus NADPH; kursivgedruckt: Wasserstoff aus Wasser; gepunkteter Pfeil: optionale Verlängerung des Acyl-ACP um 2 C-Atome durch Wiederholung des Zyklus bis C16; nach Sessions et. al²⁹ und Lehninger Biochemie, Springer-Verlag 2005²⁶; ACP: Acyl-Carrier-Protein, CoA: Coenzym A.

Allgemein dient bei der Fettsäure-Biosynthese ein, mit Coenzym A (CoA) als Thioester aktiviertes, Acetat als Startereinheit (Primer) und wird um jeweils zwei C-Atome aus Malonyl-CoA in mehreren Zyklen verlängert. Malonyl-CoA wird zuvor aus Acetat und HCO₃⁻ durch die Acetyl-CoA-Carboxylase gebildet. Die Beladung des Acylcarrierproteins (ACP) mit Acetyl- und Malonyl-Einheiten wird von der Acetyl-CoA-ACP-Transacetylase (a) sowie der Malonyl-CoA-Transferase (b) übernommen. Die Startereinheit befindet sich nach beendeter Biosynthese am ω -Ende der Fettsäure und wird demzufolge nicht in ihrer H-Zusammensetzung geändert. Das vorher in Malonyl-ACP eingeführte HCO₃⁻ wird bei der Kondensation mit Acetyl-ACP durch die β -Ketoacyl-ACP-Synthase (c) wieder als CO₂ und H⁺ (an ACP-S⁻)abgespalten. Das resultierende β -Keto-acyl-ACP wird von der β -Ketoacyl-ACP-Reduktase (d) zu β -Hydroxy-acyl-

ACP umgewandelt. Dabei wird die Ketogruppe durch NADPH/H⁺ reduziert, wodurch ein H-Atom aus NADPH mit C_{β} verknüpft wird. In der Folgereaktion wird aus dem β -OH-Acyl-ACP von der β -Hydroxy-acyl-ACP-Dehydratase (e) ein Wassermolekül abgespalten. Die dabei entstandene Doppelbindung zwischen C_{α} und C_{β} im *trans* Δ^2 -Enoly-ACP wird im nächsten Schritt von der Enoyl-ACP-Reduktase (f) wieder reduziert. Dabei werden ein H-Atom aus NAD(P)H an C_{α} und ein H⁺ aus Wasser an C_{β} geknüpft. Das resultierende Acyl-ACP kann durch Wiederholung des Zyklus (g) erneut um zwei C-Atome aus Malonyl-CoA verlängert werden.

Insgesamt werden also bei jedem Zyklus durch die Fettsäure-Synthase drei H-Atome, zwei aus NADPH und eines aus Wasser, in die Acylkette eingebaut. Vom ursprünglichen Malonyl-CoA bleibt nur ein H-Atom erhalten, so dass ausgenommen von der Starter-Einheit die Hälfte des Wasserstoffs in Fettsäuren aus NADPH stammt. Weitere Isotopenfraktionierungen können bei Verwenden anderer Primer sowie durch Elongation, Methylierung oder Desaturierung auftreten. Letztere entfernen an bestimmten Fettsäure-Positionen 2 H-Atome um eine *cis*-Doppelbindung zu bilden²⁶. Für Desaturase-Schritte ist eine starke Wasserstoffisotopen-Fraktionierung, aufgrund der Präferenz der Enzyme für ¹H bekannt²³.

Durch Verwenden anderer Primer entstehen meist verzweigte Fettsäuren. Von Bakterien werden dabei am häufigsten α-Ketosäuren, welche durch Transaminierung von Aminosäuren gewonnen werden, benutzt³⁰. Sie werden durch eine Decarboxylase mit CoA verknüpft und aktiviert. Iso-Fettsäuren entstehen durch Valin(geradzahlig)- und Leucin(ungeradzahlig)-Primer. Ungeradzahlige anteiso-Fettsäuren entstehen bei Verwendung von Isoleucin-Primern. Weniger verbreitet sind auch kurzkettige Carboxylsäuren (Isobutter-, Isovalerian und 2-Methylbutter-säure) als Primer³⁰. Bei Verwendung von Propionyl-CoA als Startereinheit können auch unverzweigte Fettsäuren, mit einer ungeraden Anzahl von C-Atomen, entstehen³¹.

Die Elongation gesättigter Fettsäuren über C16 hinaus erfolgt durch membrangebundene Isoenzyme der Fettsäure-Synthase, wobei die Kette nach dem gleichen Mechanismus mit Malonyl-CoA verlängert wird²⁶.

Cyclopropyl-Fettsäureketten entstehen durch postsynthetische Methylierung von einfach ungesättigten Fettsäuren in Membranlipiden³². Die Doppelbindung wird bei der Übertragung des Methyls aus S-Adenosyl-methionin aufgelöst, wobei ein Cyclopropanring entsteht. Cyclopropyl-Fettsäuren sind säurestabiler und werden in der stationären Phase oder bei ent-

sprechendem Stress gebildet³². Eine spezielle Form der postsynthetischen Methylierung ist die Bildung von 10-Methyl-Fettsäuren aus einfach ungesättigten Fettsäuren. Dabei wird zunächst das Intermediat 10-Methylen-Acyl, durch Übertragung einer Methylgruppe aus S-Adenosin-methionin auf die Doppelbindung der Fettsäure, gebildet. Die Doppelbindung des Methylens wird dann mit NADPH und H⁺ reduziert. Für die Fettsäure *10Me18:0* erfolgt die Synthese aus Ölsäure (*18:1w9*)³³. Für S-Adenosylmethionin ist bekannt, das die übertragene Methylgruppe im Vergleich zu Acetyl-CoA stark an ²H abgereichert ist²³.

3.3.3 Isoprenoid-Biosynthese

Die Verwendung von Etherlipiden mit Isoprenoiden als aliphatische Kette ist charakteristisch für archaebakterielle Biomembranen. Am häufigsten sind dabei Diphytanylglycerolipide³⁴. Die Biosynthese der Lipidketten beginnt bei den Archaen mit dem Aufbau von Isopentylpyrophosphat (IPP) und 1,1-Dimethyl-allyl-pyrophosphat (DMAPP) über den Mevalonatweg, aus Acetyl-CoA²⁸. In Abb. 4 ist dafür der Reaktionsweg dargestellt.



Abbildung 4: Reaktionsformel der Isoprenoidbildung über den Mevalonat-Weg; fettgedruckt: Wasserstoff aus NADPH; kursivgedruckt: Wasserstoff aus Wasser; HMG-CoA: 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA, 3-P-5PP-MVA: 3-Phospho-5-pyrophospho-mevalonat, IPP: Isopentyl-pyrophosphat, DMAPP: 1,1-Dimethyl-allyl-pyrophosphat.

Die Isoprenoid-Biosynthese beginnt mit der Bildung von 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA (HMG) aus Acetyl-CoA und Acetoacetyl-CoA durch die HMG-CoA-Synthase (a)³⁵. In der Folgeraktion wird aus HMG-CoA Mevalonat gebildet. Dabei werden durch die HMG-CoA-Reduktase (b) zwei H-Atome aus NADPH in das resultierende Mevalonat eingebaut³⁶. Das Mevalonat wird danach über dreifache Phosphorylierung durch verschiedene Kinasen (c) zu 3-Phospho-5-pyrophospho-mevalonat. Dieses wird dann von der Mevalonat-5-

pyrophosphat-Decarboxylase (d) in IPP umgewandelt. Die IPP-Isomerase (6) katalysiert schließlich die Isomerisierung von IPP zu DMAPP²⁶.

Wie aus Abb. 4 hervorgeht, verbleiben nur die beiden H-Atome aus NADPH im IPP, während die aus dem Wasser stammenden Protonen wieder abgespalten werden. Zu beachten ist jedoch, dass bei der Isomerisierung von IPP zu DMAPP ein Proton ausgetauscht wird³⁷.

IPP und DMAPP sind die Grundbausteine für die Bildung größerer Isoprenoide bzw. Terpenoide. Durch Kopf-Schwanz-Kondensation der beiden C5-Isopreneinheiten entsteht zunächst das Monoterpen Geranylpyrophosphat, welches sukzessive mit IPP um 5 C-Atome durch Kondensation, bis zu C25, verlängert werden kann³⁸.

Da die Isoprenoidketten in den Etherlipiden der Archaen gesättigt sind, müssen noch zusätzliche Wasserstoffatome eingebracht werden. Dies wird durch die 2,3-Digeranylgeranylglycerophospholipid-Reduktase ermöglicht³⁹. Die zur Reduktion der Doppelbindung nötigen H-Atome stammen wahrscheinlich aus FADH₂, welches wiederum durch NADH regeneriert wird.

Zusammengefasst verbleiben pro C5-Einheit 6 H-Atome aus Acetat in der Isoprenoidkette, während 1 H aus Wasser und je 2 H aus NADPH und NADH eingebaut werden. Über 50 % des Wasserstoffs aus den Acetat-Vorläufern bleibt also erhalten.

3.4 PLFA-Muster und mikrobielle Gemeinschaft

Die Zusammensetzung und Variabilität einer mikrobiellen Gemeinschaft lässt sich anhand des unterschiedlichen Gehaltes einzelner PLFAs untersuchen. Eine detaillierte Zuordnung von Fettsäure-Typen zu bestimmten Taxa wurde von Zelles et al. 1999 als Review publiziert¹². Die für diese Arbeit relevanten Ester-verknüpften PLFA-Marker sind in Tab. 1 (siehe nächste Seite) aufgelistet.

Abkürzung	Fettsäuretyp	Indikator für
> n20:0	geradkettige, gesättigte FS mit mehr als 20 C-	Eukaryoten
	Atomen	
су	FS mit Cyclopropylring	Gram-negative, cy17:0 für
		Sulfatreduzierer ⁴⁰ , einige
		Gram-positive
iso/anteiso	FS mit Methyl-Verzweigung in iso- oder anteiso-	Gram-positive, einige Gram-
	Position	negative (z.B. Sulfatreduzierer)
br	verzweigte (branched) FS, Methylposition unbe-	Gram-positive:
	kannt	Actinobakterien
10Me	FS mit Methyl-verzweigung am 10. C-Atom	Actinomycetales (10Me16:0,
		10Me17:0 und 10Me18:0),
		Sulfatreduzierer (10Me16:0) ⁴⁰
MUFA ω 7*	einfach ungesättigte FS mit Doppelbindung zwi-	Gram-negative aerobe und
	schen 7. und 8. C-Atom vom ω -Ende (Produkte aus	strikt anareobe Bakterien
	anaerobem Desaturaseweg)	
MUFA ω9*	einfach ungesättigte FS mit Doppelbindung zwi-	Gram-postive Bakterien, weit-
	schen 9. und 10. C-Atom vom ω -Ende; Ölsäuretyp	verbreitet
MUFA <i>ω8</i>	einfach ungesättigte FS mit Doppelbindung zwi-	Methan-oxidierende Bakteri-
	schen 8. und 9. C-Atom vom ω -Ende	en
MUFA <i>16:1</i>	einfach ungesättigte FS mit 16 C-Atomen	Typ I Methanotrophe
<i>16:1ω5*</i>		Arbuskuläre Mykorrhiza-Pilze ⁴¹
PUFA	mehrfach ungesättigte FS	Eukaryoten, Cyanobakterien
18:2ω6,9	Linolsäure	Pilze (in Abwesenheit von
		Pflanzenzellen)

Tabelle 1: Ester-verknüpfte PLFA-Marker für verschiedene taxonomische Einheiten. Modifiziert nach Zelles et al. 1999¹²; Fettgedruckt: Hauptcharakteristikum; FS: Fettsäure

*: MUFAs des ω 5-, ω 7- und ω 9-Typs (16:1 ω 9, 16:1 ω 7c, 16:1 ω 5, 18:1 ω 7 und 19:1)⁴² sind weit verbreitet; ein Anteil von >20 % wird als Indikator für Gram-negative Bakterien benutzt; für Grampositive ist ein Anteil <20 % typisch¹²

4 Material und Methoden

4.1 Verwendete Chemikalien

Die für diese Arbeit benutzten Chemikalien sind zusammen mit der angegebenen Reinheit in Tab. 2 aufgelistet.

Chemikalie	Bezugsquelle	Gehalt	weitere Angaben
		(Masse)	
Alkan-Standards C12-C33	Fluka AG, Buchs (CH)	≥98,5 %	purissimum, z.A. ^a
Bidestilliertes Wasser	Millipore-Wasseranlage (Milli-		Reinstwasser
	Q [®] Advantage A10; EMD Milli-		
	pore Corporation, Billerica,		
	Massachusetts, USA)		
Celite 545	Merck KGaA, Darmstadt (D)	k.A. ^b	0,02-0,1 mm
			Partikelgröße
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt (D)	k.A.	wasserfrei, z.A.
Dinatriumcarbonat	Merck KGaA, Darmstadt (D)	k.A.	wasserfrei, z.A.
Dinatriumsulfat	VWR International GmbH,	≥99 %	NORMAPUR, z.A.
	Darmstadt (D)		
Dinatriumthiosulfat-pentahydrat	Merck KGaA, Darmstadt (D)	k.A.	z.A.
Essigsäure	VWR Prolabo	100 %	wasserfrei
Fettsäuremethylester-Standards	Supelco Inc., Bellefonte, Penn-	k.A.	für GC ^c
C14-C23	sylvania (USA)		
Glaswolle	Acros Organics N.V., Geel (B)	k.A.	
1-lodo-ocatadecan	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)	95 %	
Iodwasserstoffsäure	Acros Organics N.V., Geel (B)	57 %	destilliert, stabili- siert, z.A.
Kaliumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt (D)	k.A.	z.A.
Organische Lösungsmittel (Aceton,	Merck KGaA, Darmstadt (D)	k.A.	für GC, SupraSolv
Acetonitril, Chloroform,			
Dichlormethan, Ethylacetat, Hexan,			
Isooktan, Methanol und Toluol)			
Salzsäure 15 % in Wasser	AppliChem GmbH, Darmstadt (D)	15 %	reinst
Salzsäure 37 % in Wasser	Merck KGaA, Darmstadt (D)	37 %	reinst
Silbernitrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,	>99,8 %	
	Steinheim (D)		
Zink	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,	≥99,99%	granuliert,
	Steinheim (D)		purissimum

Tabelle 2: Liste mit den verwendeten Chemikalien und deren Reinheit.

^{*a*}: zur Analyse; ^{*b*}: keine Angabe; ^{*c*}: Gaschromatopgraphie

4.2 Beschreibung des Untersuchungsgebietes

Der Untersuchungsstandort befindet sich im Nationalpark Hainich in Westthüringen, Deutschland (51,079° N, 10,452° O, 440 m ü. NN). Das Klima ist subozeanisch/subkontinental mit einer jährlichen Durchschnittstemperatur von 8 °C und Niederschlagsmengen von 750-800 mm pro Jahr⁴³. Das Untersuchungsgebiet ist ein naturbelassener Laubwald der dominiert wird von Rotbuchen (*Fagus sylvatica*, 65%) und Eschen (*Fraxinus excelsior*, 25%), die bis zu 250 Jahre alt sind⁴⁴. Der Wald besitzt eine dichte Baumkrone mit bis zu 30 m Höhe, weshalb nur im Frühling eine Unterwuchs-Vegetation zu finden ist (*Allium ursinum, Anemone nemorosa* und *Mercurialis perennis*)⁴³. Der Waldboden besteht aus 50-60 cm tiefer Braunerde mit einem hohen Tongehalt (40 %) und liegt auf einem Kalksteinuntergrund⁴⁴. Der obere humusreiche A-Horizont des Mineralbodens ist 5-15 cm tief und wird von einem tonigen T-Horizont gefolgt⁴⁴. Darüber liegt eine 1-2 cm dicke Streuschicht, welche die Bodenwasser-Verdampfung limitiert⁴³.

4.3 Probenahme und -bearbeitung

4.3.1 Entnahme der Proben und Aufarbeitung

Am oben beschriebenem Standort sind bereits seit 2001 vier Sammelvorrichtungen für Bodengas und -wasser vorhanden. Diese sind mit HS (Hainich-Stelle) 1-4 benannt und werden in einem Zyklus von zwei Wochen entleert und untersucht. Die Stellen HS 1-3 liegen jeweils rund 20 m auseinander. HS 4 befindet sich etwa 200 m weiter weg und liegt ca. 10-20 m tiefer. Allgemein liegen alle Stellen auf einer Linie in diesem Höhengradienten (Abnahme von HS 1 zu HS 4). Der Standort HS 4 hebt sich auch durch eine höhere Dichte an Unterwuchs (weniger dichtes Blätterdach) und vergleichsweise lockerem Boden (siehe Abb. 5) von den anderen Stellen ab.

Die hier untersuchten Bodenproben wurden in der Nähe (Entfernung <3 m) der Stellen HS 2, HS 3 und HS 4 entnommen und dementsprechend benannt. Da bei HS 1 keine Wasserstoff-Gehaltsmessung erfolgt, wurde diese Stelle außer Acht gelassen. Von HS 2-4 wurde jeweils eine Mischprobe aus drei Einzelbohrkernen im März (10.03.2011 bei HS 2 und HS 4, 24.03.2011 bei HS 3), im April (07.04.2011) und im Mai (10.05.2011) entnommen. Dazu wurde ein Split-Tube (Eijkelkamp Agrisearch Equipment, Giebeek, Niederlande) mit einer Länge von 40 cm und einem Innendurchmesser von 5,3 cm benutzt. Dieses besteht aus einer zweigeteilten Röhre, die sich nach der Bodenentnahme öffnen lässt, wodurch die Proben zugänglich werden (siehe Abb. 5). Für diese Arbeiten wurde jeweils der Boden aus 5-10 cm Tiefe entnommen und zum Transport in verschließbaren Plastiktüten (Polyethylen) aufbewahrt. Nach dem Transport ins MPI-BGC wurden die Proben entweder bei -20 °C bis zum Sieben zwischengelagert oder direkt gesiebt und dann bei -20 °C bis zur Extraktion weiter in Plastiktüten aufbewahrt. Das Sieben der Bodenproben wurde mit einem Edelstahlsieb (Retsch GmbH, Haan, Deutschland) mit 1 mm Maschenweite durchgeführt. Sichtbares Pflanzen- und Tiermaterial wurde dabei aussortiert (vor allem Wurzeln). Der gesiebte Boden wurde nochmals visuell auf Kontaminationen kontrolliert.



Abbildung 5: Bodenprofile von HS 2 (oben links), HS 3 (oben rechts) und HS 4 (unten links) nach Entnahme mit dem Split-Tube (unten rechts).

4.3.2 Lipid-Extraktion

Aus jeder Bodenprobe wurden jeweils drei Extraktionen als unabhängige Wiederholungen durchgeführt. Zur Lipidextraktion wurde die Methode nach Bligh und Dyer 1959⁴⁵ in einer von Zelles 1999 (Ester-verknüpfte PLFAs, kurz: EL-PLFA)¹² und Gattinger et al. 2003 (Phosphoetherlipide, kurz: PLEL)⁴⁶ modifizierten Form benutzt. Eine Übersicht der Aufarbeitungsschritte ist in Abb. 6 als Flussdiagramm dargestellt. Alle dazu verwendeten Glasgefäße wurden bei 500 °C über 5 Stunden ausgeglüht um Kontaminationen zu entfernen. Nichtausglühbare Gebrauchsgegenstände wurden vor der Benutzung mit den dabei verwendeten

organischen Lösungsmitteln gereinigt. Beim Transfer von Proben in ein neues Gefäß wurde das alte Gefäß jeweils 2mal mit Teilen des nachfolgend verwendeten Lösungsmittels gespült.

Gewinnung der Lipidrohextrakte:

Vor der Extraktion wurde der Feuchtigkeitsgehalt der gesiebten Bodenproben bestimmt, durch Wiegen einer geringen Teilmenge vor und nach dem Trocknen bei 105 °C über min. 24 Stunden. Für die Lipidextraktion wurde eine Bodenmenge die rund 50 g Trockenboden entspricht eingewogen. Geringe Abweichungen wurden notiert und später als Faktor bei der Berechnung des PLFA-Gehaltes berücksichtigt.



Messung am GC(-MS/-Py-IRMS)

Abbildung 6: Flussdiagramm der Probenaufarbeitung mit Zwischenstufen und Aufarbeitungsschritten; OH: Hydroxid, FAME: Fettsäure-methylester SCX: Benzolsulfonsäure, SATFA: gesättigte Fettsäuren, MUFA: einfach ungesättigte Fettsäuren, PUFA: mehrfach ungesättigte Fettsäuren.

Die Lidpidextraktion wurde in 1000 ml Laborglasflaschen durchgeführt. Dabei wurde zu dem Boden 125 ml Methanol und 62,5 ml Chloroform gegeben. Der Wasseranteil (vorhandene Bodenfeuchte) wurde mit einem 0,5 M Phosphatpuffer (K₂HPO₄ in bidestilliertem Wasser gelöst und mit 15 % HCl auf pH 7,4 eingestellt) auf 50 ml aufgefüllt. Die Flaschen wurden mit Polytetrafluorethylen(PTFE)-beschichteten Schraubdeckeln verschlossen und für 2 Stunden in einen Überkopfschüttler (15 min⁻¹) gestellt. Danach wurden nochmals 62,5 ml Chloroform und 62,5 ml bidestilliertes Wasser (fortan nur H₂O genannt) zugegeben, um eine bessere Phasentrennung zu gewährleisten. Nach 24 Stunden Aufbewahrung bei 4°C wurde die obere, wässrige Phase grob mit einer Glaspipette abgenommen. Die restliche Lösung wurde über eine mit Celite 545 bedeckte Glasfritte gegeben und so von den Bodenpartikeln befreit. Die Restwasserphase des Filtrates wurde mit einem Scheidetrichter abgetrennt (nach min. einer Stunde Ruhezeit). Die im Glaskolben aufgefangene Chloroformphase wurde am Rotationsverdampfer (Rotavapor R-114; Büchi Labortechnik AG, Flawil, Schweiz) auf ca. 2 ml bei 40 °C und 474 mbar eingeengt und danach in einen 10 ml Messzylinder transferiert. Die Lagerung des Rohextraktes erfolgte danach in Braunglasflaschen mit PTFE-Deckel bei -20 °C.

Gewinnung der Phospholipide:

Hierfür wurden vom Rohextrakt Aliquote entsprechend 10 g Trockenmasse (EL-PLFA und Gesamt-Phospholipide) bzw. 12,5-25 g Trockenmasse (PLEL) benutzt. Die unterschiedlichen eingesetzten Mengen wurden später als Faktor bei der Berechnung des PLFA-Gehaltes berücksichtigt. Die Trennung der Phospholipide erfolgte durch Silicat-Säulen (Mega Bond Elut; Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen, Deutschland) mit 2 g stationärer Phase und 12 ml Volumen. Nach Konditionierung mit einem Säulenvolumen (SV) Chloroform und Probenzugabe wurden die Neutrallipide (mit 1 SV Chloroform) sowie die Glykolipide (mit 1 SV Aceton) von den Phospholipiden abgetrennt. Letztere wurden zum Schluss mit 4 SV Methanol in einen Glaskolben eluiert. Das Lösungsmittel wurde danach auf etwa 0,5 ml eingedampft (40 °C und 337 mbar). Die Aufbewahrung erfolgte, wenn nötig, bei 4 °C.

Gewinnung der EL-PLFA-Proben:

Hierfür wurden die gewonnen Phospholipide in Zentrifugengläser mit PTFE-Schraubverschluss transferiert. Danach wurden je 0,5 ml Methanol und Toluol zugegeben. Die mildalkalische Hydrolyse/Methylierung wurde unter Zugabe von 5 ml 0,2 M methanolischer KOH-Lösung und anschließender Inkubation für 15 min bei 37°C durchgeführt. Nach beendeter Reaktion wurden die Proben mit 1 M Essigsäure (aus 100 %iger Essigsäure und H₂O) auf pH 6 mit Hilfe von pH-Indikatorpapier eingestellt (möglichst geringe Entnahme durch Glaskanüle). Danach erfolgte ein Reinigungsschritt durch Zugabe von je 10 ml H₂O und Chloroform mit anschließender Zentrifugation bei 3500 min⁻¹ für 5 min. Die Chloroformphase wurde danach abgenommen, über Na₂SO₄ (über Glaswolle in Glastrichter) von Wasser-Rückständen befreit und in einem Glaskolben aufgefangen. Dieser Reinigungsschritt wurde noch zweimal mit je 5 ml Chloroform widerholt. Danach wurde die Chloroformphase mit den FAMEs und unverseifbaren Lipiden auf ca. 0,5 ml eingeengt (40 °C und 474 mbar).

Die Trennung der nicht-substituierten FAMEs von hydroxylierten FAMEs und unverseifbaren Lipiden wurde mit NH₂-Säulen mit 0,5 g stationärer Phase und 3 ml Volumen (Chromabond; MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) durchgeführt. Die Säulen wurden zuerst mit 1 SV Hexan/Dichlormethan im Mischungsverhältnis 3:1 (V:V) konditioniert. Nach Auftragen der Proben wurden die nicht-substituierten FAMEs mit 1 SV des gleichen Hexan/Dichlormethan-Gemisches in einen Glaskolben eluiert. Das Lösungsmittel wurde anschließend komplett im Stickstoffstrom verdampft.

Die Trennung der nicht-substituierten FAMEs nach Anzahl ihrer Doppelbindungen wurde anhand Silber-imprägnierter Benzolsulfonsäure(SCX)-Säulen (Bond Elut; Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen, Deutschland) mit 0,5 g stationärer Phase und 3 ml Volumen durchgeführt. Die Imprägnierung erfolgte dabei mit je 0,1 g AgNO₃ welches vorher in Acetonitril/H₂O (10:1, V:V) gelöst wurde. Danach wurden die Säulen mit 2 SV Acetonitril, 2 SV Aceton und 4 SV Dichlormethan konditioniert. Nach Zugabe der in 0,5 ml Dichlormethan/Hexan (7:3, V:V) gelösten Proben wurden zuerst die gesättigten FAMEs (SATFAs) mit 2 SV des gleichen Lösungsmittelgemisches eluiert und in Glaskolben aufgefangen. Danach wurden die einfach ungesättigten FAMEs (MUFAs) mit 2 SV Dichlormethan/Aceton (9:1, V:V) und zuletzt die mehrfach ungesättigten FAMEs (PUFAs) mit 4 SV Aceton/Acetonitril (9:1, V:V) eluiert und in separaten Glaskolben aufgefangen. Die SATFA-, MUFA- und PUFA-Proben wurden anschließend im Stickstoffstrom komplett eingedampft. Die Aufbewahrung erfolgte, wenn nötig, bei 4 °C.

Gewinnung der PLEL-Proben:

Hierfür wurden die per Silicat-Säulen gewonnen Phospholipide zuerst in Zentrifugengläser mit PTFE-Schraubverschluss transferiert. Das Lösungsmittel wurde dann im Stickstoffstrom komplett entfernt. Danach wurden die Proben in 2 ml eines Gemisches aus Methanol, Chloroform und 37 %iger Salzsäure im Verhältnis von 10:1:1 (V:V:V) wieder aufgenommen. Die saure Hydrolyse/Methylierung wurde über Nacht bei 60 °C durchgeführt. Nach Abkühlen wurde die Reaktion durch Zugabe von 4 ml H₂O gestoppt. Die Extraktion der Ether-Kernlipide (Dialkylglycerolether) erfolgte mit 5 ml Hexan durch Zentrifugation bei 3500 min⁻¹ für 5 min. Die Hexanphase wurde abgenommen, mit Na₂SO₄ von Wasserresten befreit und wieder in Zentrifugengläsern aufgenommen. Die Hexanextraktion wurde auf diese Weise noch zweimal wiederholt. Das Lösungsmittel wurde danach wieder komplett im Stickstoffstrom entfernt.

Die Spaltung der Etherbindungen wurde mit 2 ml 57 %iger lodwasserstoffsäure über 18 Stunden bei 100 °C durchgeführt. Die Reaktion wurde wieder nach dem Abkühlen mit 4 ml H₂O gestoppt. Die Extraktion erfolgte mit 3mal 5 ml Hexan und Zentrifugation bei 3500 min⁻¹ für 5 min. Diesmal wurden die Hexanphasen im Scheidetrichter gesammelt. Dort wurden die Säurereste mit 10 ml 10 %iger Na₂CO₃-Lösung neutralisiert und bei der Reaktion entstandenes I₂ mit 10 ml 50 %iger Na₂S₂O₃·5H₂O-Lösung reduziert. Nach ca. 30 min wurde die wässrige Phase verworfen. Die Hexanphase wurde mit Na₂SO₄ von Wasserresten befreit und im Glaskolben aufgefangen. Das Lösungsmittel wurde danach wieder komplett im Stickstoffstrom verdampft.

Die reduktive Dehalogenierung wurde mit 6 ml Eisessig und ca. 1 g (5 Stück) Zinkgranulat für 18 Stunden unter Rückfluss durchgeführt. Nach Abkühlen wurden 10 ml 0,1 M Na₂CO₃-Lösung zugegeben. Die Extraktion der Kohlenwasserstoffe erfolgte mit 3mal 7 ml Hexan, welches nach der Phasenbildung in einem Scheidetrichter gesammelt wurde. Danach wurde die Hexanphase mit 10 ml 0,1 M Na₂CO₃ neutralisiert und 2mal mit je 8 ml H₂O gewaschen. Die untere Phase wurde nach ca. 15 min verworfen. Die Hexanphase wurde wieder mit Na₂SO₄ von Wasserresten befreit und zusätzlich über eine mit 1 SV Hexan konditionierte Silicat-Säule (2 g stationäre Phase, 12 ml Volumen; Chromobond, MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) laufen gelassen, um potenzielle polare Rückstände zu entfernen. Wegen der Flüchtigkeit der Kohlenwasserstoffe wurde die Hexanphase, wenn nötig, bei 4°C aufbewahrt und erst direkt vor der Messung vorsichtig bis auf einen kleinen Rest (< 5 µl) eingedampft.

4.4 Messung der Proben

4.4.1 Messung der δD-Werte der Gesamt-Phospholipide

Für diese Messung wurden die von der Silicat-Säule gewonnenen Phospholipide komplett eingeengt und in mehreren Lösungs- und Verdampfungsschritten mit je 10 μl Chloroform in 12 μl Silberschiffchen transferiert. Nachdem kein Lösungsmittel mehr sichtbar vorhanden war, wurden die befüllten Silberschiffchen über Nacht in einen Exsikkator gestellt. Am nächsten Tag wurden die Silberschiffchen gewogen und nach min. einer Stunde nochmals auf eine Gewichtsänderung kontrolliert. Bei Massekonstanz wurden die Proben zur Messung weiter gegeben. Diese wurde vom Stabile-Isotopenlabor (IsoLab) des MPI-BGC durchgeführt. Für die Messung wurde ein Hochtemperatur-Pyrolysesystem (HEKAtech GmbH, Wegberg, Deutschland) in Kopplung mit einem Delta^{Plus} XL IRMS (Finnigan MAT GmbH, Bremen, Deutschland) benutzt.

4.4.2 Bestimmung des PLFA-Gehaltes

Für die quantitative Messung wurden die eingedampften EL-PLFA-Proben in 200 µl Isooktan mit einer bestimmten Konzentration (250 ng/ μ l für SATFAs und MUFAs, 50 ng/ μ l für PUFAs) des internen FAME-Standards Nonadecyl-methylester (IS 19:0) gelöst. Auf diese Weise konnte die verdampfte Menge an Lösungsmittel beim Transfer in die 1,5 ml GC-Fläschchen mit Glaseinsatz berücksichtigt werden. Diese wurden mit einem PTFE(Probenseite)/Silcon-Septum abgedichtet. Zur Messung wurde eine HP 6890 GC-Anlage (Hewlett Packard, Waldbronn, Deutschland) mit einer HP-Ultra 2-Säule (50m Länge/0,32 mm Innendurchmesser/0,52 µm Filmdicke; Agilent Technologies) benutzt. Von den Proben wurde jeweils 1 µl über einen Autosampler (7683-Serie, Agilent Technologies) injiziert und mit einem Split 1:10 verdünnt. Als Trägergas diente synthetische Luft (20,5 % O₂; Kohlenwasserstoff-frei; Westfalen AG, Münster, Deutschland) mit einer Flussrate von 2 ml/min. Für die SATFAs war das Temperaturprogramm 1 min 140 °C, + 2 °C/min bis zu 270 °C, 6 min 270 °C, +30 °C/min bis zu 320 °C und 3 min 320 °C. Für die MUFAs war dieses 1 min 140 °c, + 2°C/min bis zu 240 °C, + 30°C/min bis zu 320 °C und 3 min 320 °C. Der Temperaturverlauf der GC für die PUFAs war 1 min 140 °C, + 2°C/min bis zu 266 °C, + 30°C/min bis zu 320 °C und 3 min 320 °C. Die Detektion erfolgte über einen Flammenionisationsdetektor (Agilent Technologies). Die gesamte Anlage wurde vor jeder Messreihe mit einer Konzentrationsreihe (25-400 ng/µl) von FAME-

Standards (C14:0 bis C23:0) in Isooktan kalibriert. Zur Auswertung der Messdaten wurde die Software *Agilent ChemStation Rev. A.10.02* (Agilent Technologies) unter Benutzung der automatischen Peakintegration benutzt. Aus je drei Messwiederholungen wurden die Mittelwerte gebildet.

Die Messung der PLEL-Proben erfolgte analog zu den EL-PLFAs. Als interner Standard diente bei den Proben von HS 2 und HS 3 das n-Alkan C27:0 mit 100 ng/µl in Isooktan und es wurden Alkanstandards (C12:0 bis C33:0; 12,5-200 ng/µl in Isooktan) zur Kalibrierung der Messanlage benutzt. Das Temperaturprogramm war 2 min 50 °C, + 10 °C/min bis zu 320 °C und 20 min 320 °C. Für die Proben von HS 4 wurde 1-Iodo-octadecyliodid zur Kalibrierung (25-400 ng/µl in Isooktan) und als interner Standard mit 100 ng/µl in Isooktan benutzt. Der Temperaturverlauf der GC war hier 1 min 140 °C, + 3 °C/min bis zu 300 °C, 10 min 300 °C, + 3 °C/min bis zu 320 °C und 10 min 320 °C.

4.4.3 Bestimmung der δD-Werte einzelner PLFAs

Für die δ D-Messung per GC-Py-IRMS wurden die zuvor quantifizierten Proben soweit eingeengt, dass der größte Peak etwa eine Konzentration von 1000 ng/µl besitzt, jedoch nur bis zu einem min. Volumen von 20 µl. Der Aufbau der Messanlage ist schematisch in Abb. 7 dargestellt. Über einen Autosampler (AS200S; Finnigan MAT) wurde jeweils 1 µl Probe in die GC-Anlage (HP 5890; Hewlett Packard) im Splitless-Verfahren (unverdünnt) injiziert. Als Trägergas wurde Helium (5.0; Westfalen AG) benutzt.



Abbildung 7: Messanordnung mit simultaner GC-Pyrolyse-IRMS und GC-MS; modifiziert nach Gleixner 1999⁴⁷.

Für die EL-PLFAs erfolgte die Trennung mit einer HP-Ultra 2-Säule (50m Länge/0,32 mm Innendurchmesser/0,52 μm Filmdicke; Agilent Technologies). Die Flussrate betrug 2 ml/min und das Temperaturprogramm war 1 min 140°C, + 3 °C/min bis zu 300 °C und 30 min 300 °C. Die PLEL wurden zuerst von HS 4 als Alkyliodide am GC-Py-IRMS gemessen. Diese wurden mit einer Rxi[®] 1ms-Säule (30 m Länge/0,32 mm Innendurchmesser/0,50 μm Filmdicke; Restek GmbH, Bad Homburg, Deutschland) bei einer Flussrate von 1,5 ml/min getrennt. Das Temperaturpragramm war 1 min 50 °C, + 10 °C/min bis zu 320 °C und 8 min 320 °C.

Die PLEL von HS 2 und HS 3 wurden dagegen als Kohlenwasserstoffe gemessen, da bei den Alkyliodiden keine auswertbaren Ergebnisse erhalten werden konnten. Hier wurde dann mit einer BP1-Säule (60 m Länge/0,32 mm Innendurchmesser/0,50 µm Filmdicke; SGE Europe Ltd, Milton Keynes, Vereinigtes Königreich) bei einer Flussrate von 2 ml/min getrennt. Das Temperaturprogramm war 1 min 140 °C, + 8 °C/min bis zu 300 °C, 21 min 300 °C, + 20 °C/min bis zu 340 °C und 6 min 340 °C.

Nach der GC wurden die Proben mit einem fixierten Split zu ca. 95 % über eine Pyrolyseröhre (Degussit, Friatec AG, Mannheim, Deutschland), die auf 1440 °C geheizt wurde⁴⁸, an das IRMS (Delta^{Plus} XL; Finnigan MAT) weitergeleitet. Die Zwischenverbindungen bestanden dabei aus Glaskapillaren. Das bei der Pyrolyse entstandene ²H₂- und ³H₂-Gas wurde in das IRMS geleitet, wo es ionisiert und dann unterschiedlich stark (nach der Molekülmasse) von einem Magneten abgelenkt wurde (siehe Abb. 7). Die in den separaten Faraday-Kollektoren gemessenen Spannungen wurden mit der Software Isodat NT 2.0 (SP 2.67; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) ausgewertet. Die Peak-Integration erfolgte dabei mit individuellem Hintergrund (5 s Historie) und einem Start-/Endanstieg von je 0,2 mV/s des ²H-Peaks. Zur Kalibrierung des IRMS wurde H₂-Referenzgas (5.0; Linde AG, Pullach, Deutschland) mit einem bekanntem δD-Wert benutzt. Dieses wurde am Anfang und am Ende jeder Messung (je drei Impulse) in die Ionenquelle des IRMS geleitet. Außerdem wurde damit für jede Messreihe die Linearität des IRMS geprüft und der H₃⁺-Faktor (entsteht bei Ionisierung) ermittelt. Letzterer wurde von der Software berechnet und automatisch in die Messwerte integriert. Auch bei der GC-Py-IRMS wurden aus je drei Messwiederholungen die Mittelwerte gebildet und zur Auswertung benutzt.

Neben der Py-IRMS war an die GC-Anlage auch ein Ionenfallen-Massenspektrometer (GCQ[™]; ThermoQuest Analytische Systeme GmbH, Egelsbach, Deutschland) angeschlossen, an dass

23

die restlichen ~ 5 % der Proben aus der GC-Trennung weitergeleitet wurden (siehe Abb. 7). Durch die Software *Xcalibur*[™] (Version 1.4 SR 1; Thermo Fisher Scientific) konnten die am GCQ[™] gewonnen Massenspektren ausgewertet werden.

4.4.4 Korrektur der Isotopenverhältnis-Messungen

Offset-Korrektur

Zur Bestimmung des Offsets (Abstand des gemessen δD vom Referenzwert) der GC-Py-IRMS wurde vor und nach jeder Probe ein externer Standard-Mix gemessen. Der Offset in [‰] wurde nach folgender Formel berechnet:

$$Offset = \frac{\delta D_{mess} - \delta D_{ref}}{1 + \left(\frac{\delta D_{mess}}{1000 \ \frac{0}{00}}\right)}$$
Formel 4

Dabei gibt δD_{mess} den δD -Messwert und δD_{ref} den δD -Referenzwert des jeweiligen Standards an. Für die EL-PLFA-Proben wurde jeweils der Offset des FAME-Standards C19:0 berechnet, der Mittelwert aus allen externen Standardmessungen gebildet und von den Proben- δD -Messwerten abgezogen. Bei den PLEL-Proben von HS 2 und HS 3 wurden analog dazu mit den Offset-Werten des n-Alkan-Standards C27:0 korrigiert. Vor der Bildung der Offset-Mittelwerte wurden die Extremwerte (per Box-Plot bestimmt) entfernt.

Korrektur eingebauter H-Atome

Bei den EL-PLFAs wurden während der mildalkalischen Hydrolyse/Methylierung drei H-Atome aus Methanol in die resultierenden FAMEs eingebaut. Für das Methanol wurde ein δ D-Wert von -239,5 ‰ vs. VSMOW gemessen (S. Rühlow, AG Gleixner). Dieser Wert wurde benutzt, um die δ D-Messwerte wie folgt zu korrigieren:

$$\delta D_{roh} = \frac{n \cdot \delta D_{mess} - m \cdot \delta D_{neu}}{n - m}$$
 Formel 5

Dabei ist *n* die Anzahl aller Wasserstoffatome in der gemessenen Probe und *m* die Anzahl der neu eingebauten H-Atome. δD_{roh} steht für den Ausgangs- δD -Wert und δD_{mess} für den gemessenen δD -Wert. δD_{neu} ist der δD -Wert der bei der Derivatisierung eingeführten H-Atome. Bei den PLEL-Proben von HS 2 und HS 3 wurde ein H-Atom bei der reduktiven Dehalogenierung mit Zn/Eisessig eingebaut. Für dieses wurde ein δ D-Wert von -506,7 ‰ vs. VSMOW aus der Messung des 1-lodo-octadecyl-Standards vor und nach der Reduktion zu Octadecan, durch Umstellen von Formel 5 (nach δD_{neu}), berechnet. Zur Korrektur der untersuchten Proben wurde hier ebenfalls die Formel 5 benutzt.

Korrektur bei niedrigen Probenkonzentrationen:

Für diese Korrektur wurden FAME-Standardmixturen mit den Konzentrationen 25, 50, 100, 200 (C12:0-C23:0) und 400 (C14:0-C23:0) ng/µl sowie Alkan-Standardmixturen (C12:0-C33:0) mit den Konzentrationen 12,5, 25, 50, 100 und 200 ng/µl am GC-Py-IRMS gemessen. Diese Messreihen wurden 5mal für die FAMEs und 11mal für die Alkane wiederholt. Damit wurde die Abhängigkeit der δ D-Werte von der Probenkonzentration (unter Verwendung der gemessenen ²H₂-Amplitude) durch eine inverse Regression der Messdaten berechnet. Die daraus abgeleitete Formel (siehe Ergebnisteil) wurde für die Korrektur der δ D-Werte wie in 5.7 beschrieben benutzt.

4.5 Statistische Methoden

Die Standardabweichung S wurde allgemein nach der Formel:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} (x_i - \bar{x})^2}{(n-1)}}$$
Formel 6

berechnet. Dabei ist *n* die Anzahl der Einzelwerte x_i und \bar{x} deren Mittelwert.

Für die Durchführung von Hauptkomponentenanalysen (PCAs) wurde die Software *Canoco for Windows Version 4.5* (Microcomputer Power Inc., Ithaca, New York, USA) benutzt. Die PCAs wurden basierend auf einer Kovarianz-Matrix, mit den vorgegebenen Standardeinstellungen (ohne post-Transformierung), durchgeführt. Die Zentrierung erfolgte dabei durch die Spezies-Werte (mol% bzw. δD der PLFAs). Die PCA-Ergebnisse wurden als Biplot der Gesamtproben und der darin enthaltenen Spezies dargestellt. Die PCA als indirekte Gradientenanalyse wurde zur Dimensionsreduzierung und Musterextraktion aus den multivariaten PLFA-Messwerten genutzt.

Die Regressionsanalysen (linear und invers) wurden mit der Software *PASW Statistics 18* (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) durchgeführt. Dieses benutzt die Methode der kleinsten (Fehler-)Quadrate, um eine mathematische Funktion zu erstellen, die möglichst nahe an den zweidimensionalen Datenpunkten verläuft. Neben den Kurvenparametern (Konstante und Anstieg) wird dabei auch die Regressionsqualität (Bestimmtheitsmaß R²) sowie die Signifikanz der gefundenen Abhängigkeit (Irrtumswahrscheinlichkeit p) aus einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) angegeben.

Die Software *PASW Statistics 18* wurde auch zur Bestimmung von Extremwerten durch Erstellung von Box-Plots genutzt.
5 Ergebnisse

5.1 Wettereinfluss



Abbildung 8: Wetterdaten des Untersuchungszeitraumes; Tagesdurchschnittswerte; a: Temperaturen der Luft (2m Höhe) sowie des Bodens (2,5,15 und 30 cm Tiefe); b: Niederschlagswerte sowie Bodenfeuchte (2,5,15 und 30 cm Tiefe); berechnet aus Daten der MPI-BGC-Messstation im Hainich (AG Feiland); gestrichelte Linien: Zeitpunkte der Probenahmen.

27

In Abb. 8 sind die Wetterparameter von Januar bis Mai 2011 dargestellt. Bis Anfang März herrschten winterliche Verhältnisse mit Lufttemperaturen unter 0°C sowie Frost in den oberen Bodenschichten Die erste Probenahme am 10. März war kurz nach Anstieg der Luft-temperatur über den Gefrierpunkt und nach der Schneeschmelze. Zu dieser Zeit ist die Bodentemperatur in 2 bis 30 cm Tiefe noch ca. 0°C gewesen. Die Bodenfeuchte in 5 cm Tiefe ist im März von ~40 % auf ~20 % gesunken. Gleichzeitig lagen auch die entsprechenden Bodentemperaturen knapp unter 0°C. Nach Anstieg der Bodentemperaturen über 0°C (Mitte März), stieg auch die Bodenfeuchte in 5 cm Tiefe wieder auf ca. 35 % an. Im Verlauf von April und Mai stiegen die Luft- und Bodentemperaturen weiter an. Dagegen sank die Bodenfeuchte, aufgrund relativ geringer Niederschlagsmengen, in 5 cm und 15 cm Tiefe auf ~ 15 % bzw. ~25 % ab. Ab Anfang Mai sank auch die Bodenfeuchte in 30 cm Tiefe langsam ab.

5.2 Wasserstoffproduktion im Boden

Die Ergebnisse der Messungen des Wasserstoffgehaltes im Bodengas von -5 und -10 cm sind in Abb. 9 dargestellt. Anfang des Jahres, im Winter, ist bei allen Stellen noch kein erhöhter Wasserstoffgehalt zu erkennen. Ein Anstieg findet erst Ende Februar statt und wird mit Einbruch des Frühlings verstärkt. Die höchsten Werte sind dabei von Anfang April bis Anfang Mai zu finden. Dabei ist der Höchstwert von HS 4 mit ca. $1,1\cdot10^6$ ppbV mehr als dreimal so hoch wie für HS 2 und HS 3 (je ca. $3\cdot10^5$ ppbV). Ein zweiter, kleinerer Anstieg des Wasserstoffgehaltes ist von Mitte Juni bis Anfang Juli zu beobachten. Im September sinken die Werte bei HS 2 und HS 3 wieder fast auf 0 ppbV ab, während bei HS 4 Anfang Oktober immer noch etwa $1\cdot10^5$ ppbV Wasserstoff vorhanden sind.

Generell gleicht sich der Verlauf der Wasserstoffmessung bei HS 2 und HS 3. Demgegenüber sind die Werte von HS 4 erhöht. Fehlende Messwerte können durch Fehler bei der Probenahme oder durch Verstopfung der Messsysteme im Boden (speziell bei HS 3 im Juli und August) entstanden sein. Die einzelnen Messwerte sind im Anhang A1 (Messwerte des H₂-Gehaltes der Bodenluft) zu finden.



Abbildung 9: Wasserstoffgehalt der Bodenluft der Probenahme-Stellen HS 2, HS 3 und HS 4 für 2011; jeweils Werte aus 5 und 10 cm Tiefe zusammengefasst, Fehlerbalken: Standardabweichung der Mittelwerte (wenn kein Fehlerbalken vorhanden, nur ein Messswert); gemessen im MPI-BGC-Gasanalytik-Labor (B. Steinberg, A. Jordan).

5.3 Wasserstoffisotopie des Bodenwassers

Abb. 10 zeigt das Wasserstoffisotopenverhältnis des Bodenwassers von Mitte Januar bis Ende August 2011. Im Winter, wenn kaum Wasser verbraucht wird oder verdunstet, ist der δ D-Wert des Bodenwassers relativ niedrig (ca. -90 ‰ bei HS 2 und HS 3 sowie ca. -80 ‰ bei HS 4). Im März, nach der Schneeschmelze, sinkt dieser nochmals um etwa 10 ‰ ab. Danach steigt der δ D-Wert des Bodenwassers kontinuierlich bis August an (auf ca. -45 ‰ bei HS 2 und HS 3 sowie auf ca. -40 ‰ bei HS 4). Damit ergibt sich eine Anreicherung um etwa +30 ‰ von Anfang April bis Ende August. Dieses Verhalten wurde schon von Sachse et al. 2009 beschrieben⁴³.

Insgesamt ist das gleiche Verhalten des Bodenwasser- δ D-Wertes bei den verschiedenen Stellen zu sehen. Bei HS 4 gibt es allgemein eine Anreicherung von etwa +10 ‰ zu HS 2 und HS 3. Die beiden letzteren sind zusammengelegt und haben relativ ähnliche Werte, wie an den Fehlerbalken zu sehen ist. Einige Messwerte fehlen, da nicht immer genug Bodenwasser entnommen werden konnte. Eine Liste der Messergebnisse befindet sich im Anhang A.2 (δ D-Werte Bodenwasser).



Abbildung 10: δ D-Werte des Bodenwassers im Untersuchungszeitraum für die zusammengefassten Stellen HS 2 und HS 3 sowie separat für HS 4; jeweils Werte aus 5 und 10 cm Tiefe zusammengefasst; Fehlerbalken: Standardabweichung der Mittelwerte beider Proben (HS 2/3) bzw. unabhängiger Wiederholungen (HS 4); wenn kein Fehlerbalken vorhanden ist existiert nur ein Messswert; Daten der AG Gleixner, gemessen im MPI-BGC-IsoLab (H.Geilmann).

5.4 Wasserstoffisotopie der Phospholipide

Auch bei den Phospholipid- δ D-Werten sind für die Auswertung die Probenahmeorte HS 2 und HS 3 zusammengefasst. Die Werte der von HS 3 am 24.03.2011 entnommenen Proben sind hier und im Weiteren zur Vereinfachung den Werten von HS 2 vom 10.03.2011 zugeordnet. Wie man in Abb. 11 sehen kann, geht der Trend für beide Stellen in Richtung höherer δ D-Werte von März bis Mai (ca. + 15 ‰), mit einem Maximum im April (nochmals ca. + 5 ‰). Bei HS 4 gibt es dagegen nach zwei Monaten nur eine geringe Änderung in Richtung niedrigerer δ D-Werte und ein Minimum im April (ca. -5 ‰). Während sich die Werte bei HS 2/3 von etwa -150 ‰ auf ca. -130 ‰ ändern, bleiben sie bei H4 in der Nähe von -120 ‰. Die einzelnen Messwerte sind im Anhang A.2 (δ D-Messwerte der Phospholipide) aufgelistet.



Abbildung 11: δ D-Werte der Phospholipid-Proben; Fehlerbalken: Standardabweichung der Mittelwerte beider Proben (HS 2/3) bzw. unabhängiger Wiederholungen (HS 4 und Buche); gemessen im MPI-BGC-IsoLab (H.Geilmann).

5.5 Untersuchung der mikrobiellen Gemeinschaft

Die mikrobielle Gemeinschaft wird hier anhand der Verteilung von Phospholipid-Fettsäuren (PLFA) untersucht. In Abb. 12 ist je ein Beispiel für das Verteilungsmuster von gesättigten (SATFA), einfach ungesättigten (MUFA), mehrfach ungesättigten (PUFA) und aus Etherlipiden (PLEL) stammenden PLFAs dargestellt. Letztere können teilweise durch Vergleich des Chromatogramms mit den Resultaten von Gattinger et al. 2003⁴⁶ identifiziert werden. Die SATFA-, MUFA- und PUFA-Muster sind dagegen bekannt und decken sich mit anderen Ergebnissen aus der AG Gleixner. In Abb. 12 sind nur die in dieser Arbeit weiter untersuchten PLFAs benannt. Eine ausführlichere Liste mit allen identifizierten Peaks sowie die Begründung, warum Einige davon nicht untersucht werden konnten, ist im Anhang A.4 (identifizierte PLFAs) zu finden. Von den PLEL wird nur das Isoprenoid *iso20:0* benutzt, da es der einzige Archae-spezifische Marker ist, der in genügender Menge für weitere Analysen vorliegt.

Zusätzlich ist stellvertretend für jeden Fettsäuretyp ein Beispielmassenspektrum im Anhang



A.5 (Massenspektren) eingefügt. Die Messwerte der quantitativen Bestimmung des PLFA-Gehaltes sind in Anhang A6 (Messwerte PLFA-Gehalt) aufgelistet.

Abbildung 12: Massen-Chromatogramme für SATFA (a, HS 4 Mai), MUFA (b, HS 4 Mai), PUFA (c, HS 4 Mai) und PLEL (d, HS 2 April); gewonnem am GC-MS; IS: interner Standard.

5.5.1 PLFA-Zusammensetzung

Die Mengenverhältnisse der einzelnen PLFAs ändern sich im Verlauf des Frühjahres nur geringfügig und sind für alle Stellen nahezu gleich (siehe Abb.13). Am häufigsten kommt immer die einfach ungesättigte Fettsäure $18:1\omega7$ vor. Die Fettsäuren *cy19:0*, $18:1\omega9$, n16:0 und *a15:0* sind auch in relativ großen Mengen vorhanden und bilden zusammen mit $18:1\omega7$ mehr als 50 % des Gesamtgehaltes der 21 untersuchten PLFAs. Die Fettsäuren *10Me16:0*, *16:1\omega7*, *iso15:0* und *16:1\omega5* kommen ebenfalls relativ häufig vor und machen etwa 20-25 % des Gesamtgehaltes aus. Die restlichen 20-25 % werden von 12 relativ selten vorkommenden PLFAs gebildet. Die MUFAs *18:1\omega7*, *18:1\omega9*, *16:1\omega5*, *16:1\omega7* und *16:1\omega9* haben bei allen Proben in etwa einen Anteil von 40 %. Das aus archaebakteriellen Membranen stammende Lipid *iso20:0* ist im Vergleich zu den restlichen PLFAs kaum zu erkennen.



Abbildung 13: Phospholipid-Fettsäure-Gehalt des Bodens in März, April und Mai; a: für HS 2, b: für HS 3 und c: für HS 4.

Bei HS 2 ist eine deutliche Zunahme des Pilzmarkers $18:2\omega6,9$ von März bis Mai zu erkennen. Dieser liegt hier, verglichen mit den beiden anderen Stellen, in einer erhöhten Menge vor. Ansonsten gibt es bei HS 2 keine eindeutigen Veränderungen. Der Gesamtgehalt der untersuchten PLFAs liegt hier während des gesamten Untersuchungszeitraums bei ca. 120 nmol/g_{Trockenmasse}.

Bei HS 3 gibt es eine Abnahme der PLFAs *cy19:0*, *n16:0*, *a15:0*, *10Me16:0*, *cy17:0*, *a17:0*, *n18:0*, *i17:0* und *10Me17:0* im April. Dagegen nehmen die PLFAs *16:1w7*, *16:1w5*, *16:1w9* und *18:2w6,9* im selben Monat zu. Im Mai gibt es schließlich eine Zunahme bei allen PLFAs, außer bei *iso20:0* und *18:1w5*. Insgesamt liegt der Gehalt der analysierten PLFAs von HS 3 mit einem Durchschnitt von etwa 100 nmol/g_{Trockenmasse} leicht unter dem Vergleichswert von HS 2. Zu Beginn (März) beträgt der Wert ~ 100 nmol/g_{Trockenmasse}. Im April fällt der Gesamtgehalt auf etwa 80 nmol/g_{Trockenmasse} ab und steigt im Mai wieder über 100 nmol/g_{Trockenmasse} an. Der Anteil von *cy19:0* ist bei HS 3 deutlich größer als bei den zwei anderen Stellen.

Bei HS 4 gibt es für alle PLFAs, außer *iso20:0*, eine Gehalts-Zunahme von März nach April (besonders deutlich für $18:1\omega7$, $18:1\omega9$ und 10Me16:0). Die meisten PLFAs nehmen jedoch im Mai wieder leicht ab, mit Ausnahme der 10Me-Fettsäuren (Actinobakterien-Marker) sowie *cy19:0*. Generell ist der PLFA-Gehalt von HS 4, mit etwa 150-200 nmol/g_{Trockenmasse} deutlich höher als der von den beiden anderen Stellen. Der Maximalwert (>200 nmol/g_{Trockenmasse}) ist dabei im April zu finden. Im März ist der Gesamt-PLFA-Gehalt ~ 150 nmol/g_{Trockenmasse} und im Mai ca. 180 nmol/g_{Trockenmasse}. Verglichen mit HS 2 und HS 3 ist der Anteil von 10Me16:0bei HS 4 deutlich erhöht.

5.5.2 Variabilität der PLFA-Muster

Der Vergleich der Variabilität individueller PLFAs kann mit einer PCA durchgeführt werden. In Abb. 14 sind die Resultate einer solchen, unter Verwendung der mol%-Werte der PLFA-Proben von HS 2, HS 3 und HS 4, für die drei Untersuchungsmonate dargestellt. HS 2 und HS 3 werden einzeln betrachtet, um potentielle Unterschiede in der mikrobiellen Gemeinschaft festzustellen, die weitere Analysen beeinflussen könnten. Bei dem PCA-Biplot sind sowohl die Varianzen zwischen den einzelnen Proben, als auch die Varianzen zwischen den PLFA-Spezies dargestellt. Die beiden ersten Hauptkomponeneten (PC) aus Abb. 14 erklären zusammen 85,9 % der Variabilität der PLFA-Zusammensetzung zwischen den drei Stellen im März, April und Mai. Die zu den jeweiligen Stellen gehörenden Probenahmedaten liegen, mit Ausnahme von HS 3 März, relativ eng beieinander.

Auf PC 1 (58,7 %) ist eine Diskriminierung von HS 4 zu HS 2 und HS 3 anhand der Korrelations-Ladungen (im Folgenden auch nur als Ladungen bezeichnet) zu beobachten. HS 4 weist hier gegenüber den beiden anderen Stellen eine negative Ladung (ca. -0,5) auf. Die Probe von HS 3 im März hat jedoch eine hohe positive Ladung (> +0,9) auf PC 1 und weicht stark von den Proben derselben Stelle aus April und Mai ab (Ladung ca. +0,2). PC 2 zeigt vor allem einen Unterschied zwischen HS 2 und den zwei anderen Stellen. HS2 hat eine positive Ladung (ca. +0,6) auf dieser Achse, während HS 3 und HS 4 überwiegend eine negative Ladung (durchschnittlich ca. -0,2 bzw. ca. -0,4) besitzen. Für die beiden Letzteren gibt es auf der Achse von PC 2 deutliche Unterschiede zwischen den Probenahme-Daten.



Abbildung 14: Biplot der Hauptkomponentenanalyse aus den PLFA-Zusammensetzungen (mol%) der Bodenproben von HS 2, HS 3 und HS 4 während der drei Probenahmedaten (März, April und Mai 2011); *1: $16:1\omega 9/10Me18:0$, *2: i16:0/10Me17:0, *3: $18:1\omega 5$, *4: i17:0, *5: iso20:0/a17:0, *6: cy17:0/n18:0.

Betrachtet man die einzelnen PLFAs, so sind drei starke Korrelationen zu erkennen. 10Me16:0 besitzt auf PC 1 und PC 2 jeweils eine negative Ladung von ca. -0,5 und korreliert damit gut mit HS 4 (auf PC 2 besonders mit den Proben aus März und Mai). $18:1\omega7$ zeigt mit einer Ladung von etwa +0,6 auf PC 2 eine starke Korrelation zu HS 2. Auf PC 1 liegt diese PLFA dagegen mit einer Ladung von ca. -0,2 auf PC 1 nur zwischen HS 2 und HS 4. Die Fettsäure-Spezies *cy19:0* korreliert auf PC 1 sehr stark mit HS 3 im März. Ihre Ladung ist hier ebenfalls größer als +0,9. Mit etwa -0,2 liegt die Ladung von *cy19:0* auf PC 2 im Bereich von HS 3 Mai bzw. Nahe des Durchschnitts für HS 3.

Neben den oben erwähnten starken, sind in Abb. 14 auch schwächere Korrelationen der PLFAs zu erkennen. Die *16:1*-Spezies, im Besonderen *16:1\omega7*, haben alle eine negative Ladung auf PC 1 und korrelieren somit mit den Proben von HS 4. Die PLFAs *a15:0*, *n16:0* und *18:2\omega6,9* liegen mit einer leicht positiven Ladung von jeweils etwa +0,2 auf PC 1 und PC 2 zwischen den Proben von HS 2 und HS 3.

Untersucht man die hier nicht dargestellte dritte Hauptkomponente (8,2 %), werden Unterschiede der Mai-Proben von HS 2 und HS 3 im Vergleich zu den März- und April-Proben sichtbar. Dabei gibt es eine positive Korrelation von $18:2\omega6,9$ zu beiden Stellen im Mai. $18:1\omega7$ korreliert dagegen mit den Proben aus März und April (vor allem bei HS 2).

5.6 Einbau von Wasserstoff in Fettsäuren

5.6.1 Änderung des H-Isotopenverhältnisses

Der Einbau des Wasserstoffs aus zwei verschiedenen Quellen (Bodenwasser vs. biologisch produziertes H₂-Gas) in die Biomasse von Bodenorganismen wird im Folgenden durch die Messergebnisse des Deuterium-Anteils der mikrobiellen PLFAs analysiert. Es wird davon ausgegangen, dass es bei dem Einbau des mikrobiell produzierten H₂ zu einer Verringerung des δ D-Wertes, im Vergleich zum Einbau des Wasserstoffs aus dem Bodenwasser, kommt. Ein Beispiel für das Resultat einer δ D-Messung am IRMS ist im Anhang A.7 (IRMS-Beispiel-Chromatogramm) als Graphik eingefügt.

Aufgrund der festgestellten Gemeinsamkeiten der Stellen HS 2 und HS 3 (siehe 5.2 bis 5.5), sind diese hier zusammengefasst. Die Einzelmesswerte der beiden Stellen sind im Anhang A.8 (PLFA- δ D-Messwerte für HS 2 und HS 3) zu finden. Die zusammengefassten Messergebnisse sind in den Tabellen 3 und 4 zu finden. Diese bestehen aus den Mittelwerten der δ D-Messungen und den dazugehörigen Standardabweichungen für beide Stellen. Aufgrund der unbekannten und individuellen H-Isotopen-Fraktionierung kann der Einfluss des Bodenwassers nicht direkt in die δ D-Werte der PLFAs einberechnet werden. Stattdessen wird hier eine lineare Regression der PLFA- δ D-Werte aus den drei Untersuchungsmonaten, gegen die jeweiligen δ D-Werte des Bodenwassers (siehe 5.3 und A.2) zur Ermittlung der Abhängigkeit benutzt. Die Ergebnisse davon (Anstieg, Bestimmtheitsmaß R² und Irrtumswahrscheinlichkeit p) sind ebenfalls in Tab. 3 und Tab. 4 zu finden. Da für das Bodenwasser am 10. Mai kein Wert vorhanden ist, wird an dessen Stelle der letze Wert im April (28.04.2011) verwendet.

Tabelle 3: Wasserstoffisotopenwerte der PLFAs von HS 2 und HS 3 (Mittelwerte aus beiden Stellen ±Standardabweichung) mit positiver Korrelation (lineare Regression) zur Änderung der H-Isotopie desBodenwassers. Fettgedruckt: PLFAs mit p < 0,4

PLFA	δD vs. VSMOW in [‰]			lineare Regression gegen Boden-H ₂ O		
	10.03.2011	07.04.2011	10.05.2011	Anstieg	R ²	p-Wert
17:1	-142,3 ± 9,4	-153,2 ± 23,5	-105,2 ± 5,0	1,499	0,342	0,602
i16:0	-109,6 ± 17,0	-85,0 ± 3,5	-82,1 ± 5,1	1,496	0,951	0,142
10Me17:0	-145,9 ± 1,8	-114,0 ± 4,7	-122,5 ± 5,1	1,405	0,701	0,369
n18:0	-59,4 ± 26,3	-49,2 ± 7,3	-36,4 ± 2,8	1,125	0,929	0,172
i15:0	-104,4 ± 12,3	-92,9 ± 3,9	-83,8 ± 0,1	1,04	0,981	0,088
cy17:0	-157,7 ± 23,2	-145,9 ± 10,0	-139,7 ± 10,5	0,928	0,999	0,017
i17:0	-104,3 ± 25,2	-94,7 ± 3,8	-88,4 ± 0,2	0,814	0,992	0,055
16:1ω7	-151,9 ± 15,2	-146,8 ± 3,6	-141,3 ± 1,5	0,53	0,952	0,141
a17:0	-105,4 ± 15,0	-101,9 ± 1,1	-96,8 ± 10,0	0,42	0,911	0,193
10Me16:0	-143,6 ± 6,1	-144,2 ± 5,0	-136,0 ± 0,1	0,324	0,488	0,508
16:1ω9	-149,0 ± 26,9	-130,9 ± 4,7	-150,8 ± 13,4	0,139	0,015	0,921
18:2ω6,9	-157,0 ± 22,2	-162,9 ±10,5	-152,9 ± 1,2	0,11	0,046	0,863
18:1ω7	-199,7 ± 10,2	-191,9 ± 9,6	-201,0 ±3,0	0,032	0,004	0,959

Tabelle 4: Wasserstoffisotopenwerte der PLFAs von HS 2 und HS 3 (Mittelwerte \pm Standardabweichung) mit negativer Korrelation (lineare Regression) zur Änderung der H-Isotopie desBodenwassers. Fettgedruckt: PLFAs mit p < 0,4</td>

PLFA	δD vs. VSMOW in [‰]			lineare Regression gegen Boden-H ₂ O		
	10.03.2011	07.04.2011	10.05.2011	Anstieg	R ²	p-Wert
18:1ω5	-141,9 ± 2,1	-177,6 ± 0,8	-174,7 ± 14,3	-1,863	0,854	0,249
a15:0	-139,0 ± 4,3	-147,8 ± 7,9	-149,6 ± 0,6	-0,568	0,974	0,104
18:1ω9	-62,3 ± 8,6	-70,4 ± 0,1	-70,4 ± 7,8	-0,454	0,903	0,201
iso20:0	-161,1 ± 2,4	-177,3 ± 10,8	-165,5 ± 2,9	-0,385	0,203	0,703
16:1ω5	-126,2 ± 12,6	-136,8 ± 16,1	-127,3 ± 13,0	-0,177	0,089	0,807
cy19:0	-171,1 ± 0,8	-180,0 ± 2,5	-172,0 ± 2,7	-0,147	0,086	0,810
n16:0	-113,2 ± 4,4	-118,2 ± 13,3	-113,4 ± 1,9	-0,069	0,057	0,847
10Me18:0	-138,0 ± 11,2	-139,9 ± 2,2	-137,9 ± 3,3	-0,021	0,036	0,878

In Tab. 3 sind die PLFAs, welche eine positive Korrelation mit dem Bodenwasser besitzen, dargestellt. Entsprechende Ergebnisse mit negativer Korrelation befinden sich in Tab. 4. In beiden Fällen sind die PLFAs mit einer Regressions-Irrtumswahrscheinlichkeit unter 40 % hervorgehoben. Die Auswahl des vergleichsweise hohen Signifikanzniveaus ergibt sich aus der geringen Anzahl von Messpunkten (jeweils drei) und der Probenart. Da es sich hier um komplexe Umweltproben handelt, können nicht alle Einflussfaktoren berücksichtigt werden.

Für HS 4 sind die Ergebnisse analog zu HS 2/3 in Tab. 5 für PLFAs mit positiver Korrelation und in Tab. 6 für PLFAs mit negativer Korrelation zur Bodenwasser-Isotopie aufgelistet. Hier werden jedoch im Gegensatz zu HS 2/3 direkt die δ D-Messwerte und Standardabweichungen aus den drei unabhängigen Wiederholungen angegeben. Für HS 4 gibt es aufgrund von Problemen bei der Messung keine δ D-Werte für *iso20:0*. Die Messung am GC-Py-IRMS als Alkyliodid (siehe 4.4.3) erwies sich hier als nicht möglich.

Tabelle	5:	Wasserstoffisotopenwerte	der	PLFAs	von	HS	4	(Mittelwerte	der	unabhängigen
Wiederh	olur	ngen ± Standardabweichung) mit	positive	er Kor	relat	ion	(lineare Regre	ession) zur Änderung
der H-Iso	otop	ie des Bodenwassers. Fettge	druc	kt: PLFA	s mit	p < 0),4			

PLFA	δD vs. VSMOW in [‰]			lineare Regression gegen Boden- H_2O		
	10.03.2011	07.04.2011	10.05.2011	Anstieg	R ²	p-Wert
17:1	-137,4 ± 11,3	-108,2 ± 9,4	-108,9 ± 2,5	1,240	0,991	0,060
10Me17:0	-118,8 ± 14,6	-98,3 ± 9,3	-95,2 ± 7,0	0,959	0,998	0,031
cy17:0	-146,9 ± 25,6	-121,8 ± 2,7	-127,9 ± 7,3	0,935	0,911	0,193
i16:0	-85,8 ± 36,2	-59,4 ± 10,0	-73,8 ± 3,5	0,791	0,637	0,412
i17:0	-85,4 ± 30,6	-59,6 ± 0,4	-74,9 ± 11,4	0,744	0,585	0,446
16:1ω7	-147,7 ± 5,1	-138,3 ± 3,1	-126,8 ± 5,5	0,682	0,761	0,325
18:2ω6,9	-168,5 ± 8,9	-151,7 ± 8,5	-158,3 ± 11,5	0,563	0,793	0,301
i15:0	-96,8 ± 21,1	-88,5 ± 3,0	-84,9 ± 2,9	0,445	0,947	0,147
a17:0	-102,3 ± 8,6	-91,1 ± 3,9	-94,3 ± 16,0	0,405	0,881	0,224
16:1ω9	-138,6 ± 6,7	-127,6 ± 6,1	-135,4 ± 17,8	0,285	0,452	0,530
16:1ω5	-125,1 ± 11,2	-134,5 ± 9,8	-106,9 ± 10,0	0,262	0,062	0,840
n18:0	-47,3 ± 23,2	-37,3 ± 3,9	-47,5 ± 1,9	0,183	0,175	0,726
18:1ω7	-190,2 ± 10,4	-188,7 ± 11,1	-185,5 ± 3,7	0,141	0,629	0,417
cy19:0	-169,8 ± 8,9	-169,7 ± 0,7	-166,9 ± 1,5	0,073	0,334	0,607

Generell folgt sowohl bei HS2/3 als auch bei HS 4 der Großteil der PLFA- δ D-Werte dem Trend des Bodenwassers. Die einzelnen PLFAs ähneln sich zwischen den Stellen in ihrem δ D-Wert, besitzen aber oft einen unterschiedlichen Anstieg aus der linearen Regression gegen den Bodenwasser- δ D. Die Ausgangs- δ D-Werte im März sind bei einigen PLFAs aus HS 4 um

~ 10 ‰ (*n18:0*, *i15:0* und *cy17:0*) bzw. ~ 20 ‰ (*i16:0*, *i17:0* und *10Me17:0*) niedriger, verglichen mit HS 2/3. Die einzige PLFA, die im März einen niedrigeren δ D-Wert (~ -10 ‰) bei HS 4 aufweist, ist *18:1ω9*.

Tabelle 6: Wasserstoffisotopenwerte der PLFAs von HS 4 (Mittelwerte der unabhängigenWiederholungen ± Standardabweichung) mit negativer Korrelation (lineare Regression) zur Änderungder H-Isotopie des Bodenwassers. Fettgedruckt: PLFAs mit p < 0,4

PLFA	δD vs. VSMOW in [‰]			lineare Regression gegen Boden-H ₂ O		
	10.03.2011	07.04.2011	10.05.2011	Anstieg	R ²	p-Wert
18:1ω5	-138,9 ± 9,2	-215,0 ± 10,4	-174,2 ± 17,5	-2,291	0,646	0,406
10Me18:0	-137,4 ± 5,9	-146,5 ± 16,5	-145,9 ± 3,4	-0,380	0,984	0,081
18:1ω9	-73,7 ± 17,4	-86,0 ± 4,1	-75,8 ± 4,1	-0,284	0,331	0,610
10Me16:0	-145,2 ± 7,1	-154,0 ± 1,2	-147,2 ± 1,1	-0,215	0,390	0,570
a15:0	-144,9 ± 5,8	-148,5 ± 1,0	-145,6 ± 0,3	-0,085	0,353	0,595
n16:0	-105,4 ± 12,8	-110,0 ± 3,7	-104,3 ± 4,0	-0,059	0,067	0,833

Die sehr breit gestreuten Anstiegswerte sind teilweise so niedrig, dass sie aufgrund der Variabilität zwischen den drei Untersuchungszeitpunkten nicht signifikant sind ($p \ge 0,4$). Bei HS 2/3 sind vor allem für die SATFAs höhere positive Anstiegswerte vorhanden. Die Ausnahme bilden dabei *a15:0* und *cy19:0* (letztere bei HS 4 positiv), die hier größere negative Anstiege besitzen. Dementgegen sind bei HS 4 größere negative Anstiege für *10Me18:0* und *10Me16:0* (letztere bei HS2/3 positiv) zu finden.

Die ungesättigten PLFAs haben eher bei HS 4 höhere Anstiegswerte, außer 17:1 und 18:1 ω 5. Letztere besitzt in beiden Fällen den stärksten negativen Anstieg mit ~ -1,9 bei HS2/3 und ~ -2,3 bei HS4. 17:1 hat dagegen mit ~ +1,5 bzw. ~ +1,2 jeweils den höchsten Anstieg. Neben 18:1 ω 5 und 18:1 ω 9 hat bei HS2/3 ebenfalls die MUFA 16:1 ω 5 einen negativen Anstieg (bei HS 4 positiv).

Eine zusätzliche Veranschaulichung mit den Ausgangswerten und deren Änderung im Untersuchungszeitraum, getrennt nach HS2/3 und HS4, befindet sich im Anhang A.9 (Vektorplot der PLFA-δD-Änderung). Auf die Unterschiede des Wasserstoffisotopenverhältnisses der untersuchten PLFAs wird noch ausführlich, unter Berücksichtigung verschiedener Biosynthesewege, im Diskussionsteil eingegangen.

5.6.2 Unterschiede der Proben

Zur besseren Visualisierung der Ergebnisse aus der Wasserstoffisotopenanalyse wird auch hier eine PCA, diesmal unter Verwendung der δ D-Werte aus 5.6.1 benutzt. Die Ergebnisse dazu sind in Abb. 15 als PCA-Biplot der einzelnen PLFAs zusammen mit dem Bodenwasser im Vergleich zu den Gesamtproben (HS 2 und HS 3 zusammengefasst) dargestellt. Die negativen δ D-Werte sind hier in die entsprechenden positiven Werte transformiert, so dass die Vektoren in Richtung des niedrigeren Anteils von ²H zeigen. Die beiden ersten Hauptkomponenten erklären zusammen 84,7 % der Variabilität zwischen HS2/3 und HS4 im März, April und Mai.



Abbildung 15: PCA-Biplot mit den δ D-Messwerten der PLFAs (zu positiven Werten transformiert) und des Bodenwassers aus HS2/3 (Mittelwerte) sowie HS 4 während der drei Probenahmedaten (März, April und Mai 2011); *1: n18:0/ a17:0, *2: 18:2 ω 6,9/18:1 ω 7, *3: a15; BW: Bodenwasser.

Die Stellen liegen für März und für Mai relativ eng zusammen. Im April hat jedoch HS 4 eine stark positive Ladung (~+0,9) auf PC 1 (71,5 %), während HS 2/3 im negativen Bereich (~-0,2) dieser Achse liegt. Ansonsten werden durch PC 1 Unterschiede zwischen März (mittlere Ladung etwa -0,6) und Mai (mittlere Ladung etwa +0,3) sichtbar. Auf PC 2 (13,2 %) setzen sich vor allem die Proben aus April (im Mittel etwa +0,7) von denen aus März (ca. -0,2) und Mai (ca. -0,6) ab.

Die Änderung des D-Gehaltes im Bodenwasser wird fast ausschließlich durch PC 1 erklärt. Der Trend geht hier mit rund -0,4 deutlich Richtung März. Die meisten PLFAs zeigen auf dieser Achse ein ähnliches, wenn auch unterschiedlich starkes, Verhalten. Kaum eine Änderung ist bei *n16:0, cy19:0* und *16:1w5* zu sehen. Ein entgegen gerichteter Trend ist bei den Spezies *a15:0, 10Me16:0, 10Me18:0* (je ca. +0,1), *18:1w9* (ca. +0,25) und *18:1w5* (> +0,9) zu erkennen. Letztere hat auf beiden Hauptkomponenten eine starke Korrelation mit HS 4 April. Auf PC 2 ist für *16:1w5* und *17:1* mit einer Ladung von ca. +0,4 ebenfalls eine Tendenz zu niedrigeren δ D-Werten im April zu beobachten.

5.7 Korrektur der IRMS-Messungen bei geringen Probenmengen

Aufgrund der unterschiedlich großen Mengen der verschiedenen PLFAs in einer Probe, gibt es bei denen mit geringerem Gehalt einen größeren Einfluss des Messhintergrundes. Die gemessenen δ D-Werte tendieren dazu, größer zu werden. Aus der Analyse von entsprechenden Standards mit bekanntem δ D-Wert in verschiedenen Konzentrationen ergibt sich eine inverse Abhängigkeit der Abweichung von der Signalintensität, für welche die am IRMS registrierte ²H₂-Amplitude eines Peaks eingesetzt werden kann. In Abb. 16 sind die Ergebnisse der Messung der Fettsäuremethylester-Standards (für Ester-verknüpfte PLFAs) zusammen mit der daraus berechneten inversen Funktion dargestellt.

Mit dem berechneten Regressionsfaktor (RF) für die Erstellung der inversen Funktion lässt sich eine Formel zur Korrektur der Messwerte erstellen:

$$\delta D_{korr} = \delta D_{mess} - \frac{RF}{Amp2}$$
 Formel 7

Dabei steht δD_{korr} für den korrigierten und δD_{mess} für den gemessenen δD -Wert. *Amp2* gibt die gemessene ²H₂-Amplitude in [mV] an.

Für die FAMEs ergibt sich aus der inversen Regression für RF ein Wert von 6956 ‰·mV

 $(R^2 = 0,809; p < 0,001)$. Durch einsetzten dieses Wertes in Formel 7 und anschließende Korrektur der Messdaten von Standards verschiedener Konzentrationen, gibt es eine Verbesserung der Resultate im Bereich von 100-400 mV (gemessen am Mittelwert und der Standardabweichung mehrerer Proben). Bei ²H₂-Amplituden über 400 mV erweist sich die im Methodenteil beschriebene Offset-Korrektur als günstiger.



Abbildung 16: Abweichung der δ D-Messwerte von Fettsäuremethylestern im Vergleich zur Peak-Höhe (²H₂-Amplitude) und daraus berechnete inverse Funktion.

Aus der Aufarbeitung der Etherlipide resultieren Kohlenwasserstoffe. Deshalb ist hier eine separate Messung der Intensitäts-abhängigen Abweichung bei Alkan-Standards nötig. Die Ergebnisse davon sowie die berechnete inverse Funktion sind in Abb. 17 zu sehen. Der Regressionsfaktor ist hier 5752 ‰·mV (R² = 0,654; p < 0,001) und kann entsprechend in Formel 7 eingesetzt werden. Aus dem Vergleich der Mittelwerte und Standardabweichungen mehrfach gemessener Alkan-Standards, mit verschieden großen Konzentrationen, ergibt sich eine Verbesserung der Resultate ab einer ²H₂-Amplitude von mind. 100 mV. Durch Anwendung dieser Korrektur werden hier für Alkane durchgängig bessere Resultate als mit der Offset-Korrektur erzielt.



Abbildung 17: Abweichung der δ D-Messwerte von Alkanen im Vergleich zur Peak-Höhe (²H₂-Amplitude) und daraus berechnete inverse Funktion.

Die oben erläuterten Korrekturen sind in dieser Form nur bei den hier untersuchten Proben anwendbar, da diese nur eine Aussage über den Momentanzustand des Mess-Systems bieten.

6 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit ist der Nachweis des Einbaus von biologisch produziertem molekularem Wasserstoff in die Biomasse von bestimmten Boden-Mikroorganismen. Die entnommenen Bodenproben wurden zu diesem Zweck untersucht auf:

- 1. die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft (gaschromatographische PLFA-Analyse) und deren Änderung bei erhöhter Verfügbarkeit des Wasserstoffs
- 2. das dazu gehörige Wasserstoff-Isotopenverhältnis (δD) der einzelnen PLFAs (GC-Py-IRMS)
- 3. das Verhalten der PLFA-δD-Werte gegenüber den δD-Werten des Bodenwassers

6.1 Einfluss der Umweltbedingungen

Der schon zuvor beobachtete außergewöhnlich hohe Anstieg des Wasserstoffgehaltes der Bodenluft im untersuchten Gebiet des Nationalparks Hainich, mit Beginn des Frühlings, kann auch hier bestätigt werden. Durch Vergleich der Wetterdaten (Abb. 8) und des H₂-Gehaltes der Bodenluft (Abb. 9) ist ein direkter Zusammenhang zwischen dem Anstieg der Temperaturen von Luft und Boden offensichtlich. Ab Mitte März steigen die Temperaturen schrittweise an und gleichzeitig wird auch der H₂-Gehalt stark erhöht. Letzterer geht ab Anfang Mai wieder zurück. Grund dafür ist möglicherweise das Absinken der Bodenfeuchtigkeit, auch in tieferen Bodenschichten (-30 cm) mit erhöhtem Tongehalt, in denen wahrscheinlich die Hauptproduktion von molekularem Wasserstoff durch Fermentierungsprozesse stattfindet (keine Belege für N₂-fixierung oder Methanbildung, unveröffentlichte Ergebnisse AG Gleixner). Zu beachten ist auch dass bei niedrigerer Bodenfeuchte die Bodenporösität erhöht wird und somit der Wasserstoff besser diffundieren kann.

Die deutlich höheren Werte des Bodenluft-H₂-Gehaltes für HS 4 (1,1 \cdot 10⁶ ppbV) gegenüber HS 2 und HS 3 (je ca. 3 \cdot 10⁵ ppbV) könnten durch die niedrigere Lage von HS 4 erklärt werden. Durch den hydrologischen Gradienten ist es möglich, dass sich an dieser Stelle mehr Feuchtigkeit im Boden befindet, was auch durch i.d.R. höhere Volumina der Bodenwasserproben angedeutet wird. Bei normalerweise oxischen Böden wurde gezeigt, dass es bei einer Überflutung eine anschließende Phase der Wasserstoffproduktion gibt⁶, was darauf hindeutet, dass eine hohe Bodenfeuchtigkeit wichtig bzw. notwendig für die H₂-Produktion im Boden ist. Die generelle Erhöhung des Wasserstoffgehalts im Boden des untersuchten Gebietes resultiert wahrscheinlich vor allem auch aus dessen sehr tonigen Beschaffenheit, die zur Bildung von anaeroben Mikronischen führen kann⁶ und ein schnelles Verdunsten der Bodenfeuchte verhindert. Ein weiterer Einflussfaktor ist die Beschaffenheit des Waldes, mit hochgewachsenen Bäumen der Gattungen *Fagus* und *Fraxinus*, welche ein dichtes Blätterdach bilden. Um diese Umgebungseinflüsse besser zu charakterisieren, wäre ein Vergleich der H₂-Produktion bei verschiedenartigen Standorten empfehlenswert.

Aus dem Verhalten der H-Isotopie des Bodenwassers ist ebenfalls ein Unterschied zwischen HS 4 und HS2/3 zu erkennen (siehe Abb. 10). Dabei ist zwar der gleiche Trend (ca. +25 ‰ im Untersuchungszeitraum) zu beobachten, die Absolutwerte sind bei HS 4 jedoch um etwa +10 ‰ höher. Dieser Unterschied lässt sich aus den vorhandenen Daten nicht erklären, ist aber für diese Untersuchung auch nicht von großer Relevanz. Einen Einfluss könnten die tendenziell erhöhten pH- und Leitfähigkeits-Werte des Bodenwassers von HS 4, verglichen mit HS 2/3, haben (siehe Anhang A.10 und A.11, pH bzw. Leitfähigkeit Bodenwasser).

Der allgemeine Trend des Bodenwassers zu einer D-Anreicherung bei steigender Umgebungstemperatur hängt mit der gleichzeitigen Zunahme der Verdunstung in oberen Bodenschichten zusammen⁴⁹. Weil HDO einen niedrigeren Dampfdruck besitzt als H₂O, verdampft dieses langsamer und es kommt zu einer Anreicherung des schweren Isotops⁵⁰.

Die Gesamtphospholipid-Proben folgen bei HS 2/3 dem Trend des Bodenwassers mit einem Anstieg von 15-20 ‰ im Untersuchungszeitraum (siehe Abb. 11). Dagegen ändert sich der δ D-Wert der Phospholipide bei HS 4 insgesamt kaum und sinkt im April sogar um ca. 5 ‰ ab. Im Zusammenhang mit der hohen Verfügbarkeit von H₂ biologischen Ursprungs bei HS 4, liegt die Vermutung nahe, dass dieser hier auch in einem größeren Maße fixiert wird. Zu erwähnen ist allerdings noch, dass auch bei den Phospholipiden die Absolut- δ D-Werte von HS 4 höher sind als bei HS2/3 (im März sogar rund 30 ‰). Dieser Unterschied wird zumindest teilweise durch die bereits diskutierte H-Isotopie des Bodenwassers erklärt.

6.2 Änderung der mikrobiellen Gemeinschaft bei verschiedener H₂-Verfügbarkeit

Die mikrobielle Biomasse im Boden ändert sich bei den Stellen HS 2 und HS 3 im Verlauf des Frühjahres kaum (siehe Abb. 13). Lediglich für HS 4 ist eine Erhöhung von etwa 30 % von März zu April, welche im Mai wieder um etwa die Hälfte zurückgeht, erkennbar. Dieses Verhalten korreliert mit dem stärkeren Absinken der Phospholipid- δ D-Werte im April bei HS 4 (siehe Abb. 11). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass ein Zusammenhang zwischen der Erhöhung einer bestimmten mikrobiellen Aktivität und dem Absinken der δ D-Werte der mikrobiellen Membranlipide besteht. Da sich die Wasserstoff-Isotopie des Bodenwassers in die entgegengesetzte Richtung ändert, kann diese Aktivität nur durch die Fixierung des stark Deuterium-abgereicherten H₂-Gases im Boden erklärt werden. Für die Stelle HS 4 könnte sich durch die höhere Verfügbarkeit des Wasserstoffs außerdem eine Begünstigung des Wachstums für H₂-fixierende Bakterien ergeben, worauf auch der erhöhte PLFA-Gesamtgehalt der Proben von HS 4 (~ 150-200 nmol/g_{Trockenmasse}) im Vergleich zu HS 2 und HS 3 (~ 80-120 nmol/g_{Trockenmasse}) hindeutet.

Besonders begünstigt scheint dabei das Wachstum von Actinobakterien zu sein, wie das vergleichsweise erhöhte Vorkommen der für diese charakteristische Fettsäure 10Me16:0 zeigt. Für diese PLFA wurde auch bei der PCA-Analyse (siehe Abb. 14) eine signifikant erhöhte relative Abundanz in HS 4 nachgewiesen. Betrachtet man die Biosynthese von 10Me16:0, so wird diese wahrscheinlich aus 16:1w7 gebildet. Diese Fettsäure ist laut Tab. 1 eher ein Indikator für Gram-negative oder strikt anaerobe Bakterien. 16:1 ω 7 zeigt jedoch in der PCA auf der wichtigeren ersten Hauptkomponente eine ähnlich stark erhöhte Abundanz bei HS 4 wie 10Me16:0. In Richtung Gram-negativer Bakterien deutet das Vorkommen von 10-Methyl-Fettsäuren bei Sulfatreduzierern hin, die lange als strikt anaerob betrachtet wurden. Aus neueren Studien geht jedoch hervor, dass die sulfatreduzierenden Bakterien (SRB) auch geringe Mengen an Sauerstoff tolerieren und somit auch in mikroarophilen Umgebungen vorkommen können. Diese Eigenschaft ist ausführlich in einem Review von Baumgartner et al. 2006⁵¹ beschrieben worden. Ein geringes Vorkommen (<10³ Zellen/g_{Trockenmasse}) von SRBs in einem ähnlichen Waldboden sowie eine Induktion deren Wachstums unter Begasung mit einem H₂/CO₂-Gemisch und Zugabe von Sulfat wurde 1995 von Peters und Conrad⁵² gefunden. Jedoch ist die dort verwendete Sulfatkonzentration von 10 mM sehr viel höher als die des im Hainich entnommenen Bodenwassers mit max. 0,1 mM (siehe Anhang A.12, Sulfat Bodenwasser). Außerdem wurde von Könneke und Widdel 2003⁵³ gezeigt, dass die Fettsäure 10Me16:0 in SRBs bei niedrigen Temperaturen (12°C), wie im Hainich-Boden während des Frühjahrs (siehe Abb. 8), nur in sehr geringem Maße vorkommt. Zusätzlich dazu wurde in selbiger Arbeit ein höherer Anteil von cy17:0 gegenüber 10Me16:0 bei den untersuchten SRBs festgestellt. Die PLFA cy17:0 ist jedoch bei den Hainich-Proben nur in geringen Mengen, verglichen mit 10Me16:0, vorhanden und zeigt auch kein ähnliches Verhalten bei der PCA aus 5.5.2. Aufgrund dieser Tatsachen ist der Anteil von 10-Methyl-Fettsäuren aus Sulfatreduzierern in den hier untersuchten Proben sehr wahrscheinlich vernachlässigbar.

Auf bessere Wachstumsbedingungen für Mikroorganismen bei HS 4 deutet auch die geringere relative Häufigkeit von *cy19:0* im Vergleich zu HS 2 und im besonderen HS 3 (niedrigste mikrobielle Biomasse) hin. Diese Fettsäure wird erhöht bei Stresssituationen (am stärksten bei Nahrungsmangel) gebildet⁴².

Generell scheinen bei allen Proben die Gram-negativen Bakterien zu dominieren, wie man Anhand des großen Anteils an zyklischen und einfach ungesättigten Fettsäuren erkennen kann. Letztere liegen mit einem Anteil der Gesamt-PLFA-Menge von ~40 % deutlich über der Marke von 20 %, die als Indikator für Gram-negative Bakterien dient (siehe 3.4).

Eine signifikante Beteiligung von Archaebakterien an der Wasserstofffixierung im untersuchten Waldboden kann schon durch die Analyse der mikrobiellen Gemeinschaft ausgeschlossen werden. Das für deren Membranen charakteristische Isoprenoid *iso20:0* liegt hier nur in sehr geringen Mengen, verglichen mit den eubakteriellen PLFAs, vor.

6.3 Nachweis der H₂-Fixierung in die mikrobielle Biomasse

Wenn der im Boden produzierte Wasserstoff von Mikroorganismen wieder aufgenommen und durch die cytoslische Hydrogenase fixert wird (als NADH/NADPH), sollte sich daraus eine Änderung des H-Isotopengehaltes in de novo synthetisiertem Zellmaterial ergeben. Für dieses eignen sich die PLFAs besonders gut als Vertreter, nicht nur weil sie einen Großteil der mikrobiellen Biomasse ausmachen, sondern auch durch ihre charakteristische Verteilung in bestimmten Taxa. Außerdem sind bei deren Biosynthese zahlreiche Reduktionsschritte vorhanden, bei denen H-Atome in die wachsende Fettsäurekette eingebaut werden (siehe 3.3.2 und 3.3.3). Im Folgenden soll aus den δ D-Messwerten aus 5.6.1 (Tab. 3-6) und der damit durchgeführten PCA aus 5.6.2 (Abb. 15) die Existenz des Einbaus von fixierten Wasserstoffs bei verschiedenen Fettsäuregruppen, unter Betrachtung der unterschiedlichen H₂-Verfügbarkeit bei HS 2/3 und HS4, diskutiert werden. Dabei soll auch auf die verschiedenen Biosynthesewege und die daraus resultierenden Unterschiede der PLFA- δ D-Werte eingegangen werden. Zu deren Vergleich werden die Ausgangswerte der Probenahme im März benutzt. Als graphische Veranschaulichung kann hier auch der Vektorplot im Anhang A.9 (Vektorplot der PLFA- δ D-Änderung) genutzt werden. Bei diesem ist jedoch zu beachten, dass dort die H-Isotopie des Bodenwassers nicht berücksichtigt werden kann.

Die ubiquitär vorkommenden Fettsäuren **n16:0** und **n18:0** werden zumindest teilweise von der Wasserstofffixierung beeinflusst. Letztere zeigt bei HS2/3 eine starke Korrelation mit

dem Bodenwasser. Bei HS 4 gibt es dagegen keine signifikante Abhängigkeit von diesem für *n18:0*. Das Hauptprodukt des Fettsäure-Synthase-Komplexes *n16:0* zeigt in beiden Fällen keine Korrelation zum Bodenwasser. Aufgrund der Funktion von *n16:0* und *n18:0* als biosynthetischer Vorgänger für viele andere Fettsären, ist davon auszugehen, dass diese auch im Untersuchungszeitraum in hohem Maße neu gebildet wurden. Eine fehlende Korrelation zur H-Isotopie des Bodenwassers weist hier auf eine deutliche Beteiligung von Wasserstofffixieren hin.

Ausgehend vom ²H-Isotopengehalt von *n16:0* lassen sich gut die Unterschiede bei der Fettsäurebiosynthese verfolgen. Dieser liegt im März bei etwa -110 ‰ vs. VSMOW. Theoretisch sollte der δD-Wert von *n18:0* im gleichen Bereich liegen (Kettenverlängerung durch Fettsäure-Synthase-Isoenzyme). Tatsächlich ist hier jedoch eine D-Anreicherung von ca. 50-60 ‰ zu finden. Ein ähnliches Ergebnis wurde von Chikaraishi et al. 2004⁵⁴ bei der Fettsäure-Biosynthese in marinen Makroalgen gefunden. Dort wurde diskutiert, dass diese relative D-Anreicherung aufgrund der höheren Produktion von ungesättigten Fettsäuren mit 18 C-Atomen gegenüber solchen mit 16 C-Atomen entsteht. Da die Desaturasen bevorzugt ¹H-Atome abspalten, entsteht hier eine starke Isotopen-Fraktionierung, welche zur Anreicherung des verbliebenen *n18:0*-Pools führen kann⁵⁴. Dieses Verhalten ist offensichtlich auch in den hier untersuchten Proben zu finden, wenn man die deutlich höheren Abundanzen der 18:1-PLFAs gegenüber den 16:1-PLFAs und die geringere Größe des *n18:0*-Pools im Vergleich zum *n16:0*-Pool betrachtet.

Für die verzweigten Fettsäuren *i15:0, a15:0, i16:0, i17:0* und *a17:0* sind aufgrund der Biosynthese ähnliche Werte wie bei *n16:0* zu erwarten, da hier lediglich andere Startereinheiten verwendet werden. Für *i15:0, i16:0, i17:0* und *a17:0* trifft das relativ gut zu. Deren δ D-Werte liegen i.d.R. knapp unter -100 ‰ vs. VSMOW. Eine Ausnahme bilden *i16:0* und *i17:0* bei HS 4 mit jeweils ~ -85 ‰ vs. VSMOW. Dabei sollten jedoch auch die großen Standardabweichungen von >30 ‰ bei HS 4 im März beachtet werden. Die geringe D-Anreicherung von ~ 10 ‰ gegenüber *n16:0* kann durch die Verwendung der größeren Startereinheiten (4-5 statt 2 C-Atomen) und der daraus resultierenden geringeren Anzahl an Reduktionsschritten während der Kettenverlängerung erklärt werden.

Bei *i15:0, i16:0, i17:0* und *a17:0* gibt es in fast allen Fällen eine signifikant positive Korrelation zur H-Isotopie des Bodenwassers. Für *i16:0* und *i17:0* fallen die Regressionsergebnisse bei

Diskussion

HS 4 nicht in den gewählten Signifikanzbereich. Grund dafür könnten die schon erwähnten hohen Standardabweichungen im März seien.

Besonders interessant sind die deutlich abgereicherten δ D-Werte von *a15:0*. Diese liegen bei etwa -140 ‰ vs. VSMOW, was eine Abreicherung von -40 ‰ gegenüber den anderen verzweigten Fettsäuren ergibt. Bei HS 2/3 ist dabei sogar ein Trend zu beobachten, welcher der H-Isotopie des Bodenwassers über den Untersuchungszeitraum signifikant entgegen gesetzt ist (negativer Regressions-Anstieg). Dabei ist zu berücksichtigen, dass *a15:0* bei HS 2/3 in einer höheren Abundanz als bei HS 4 vorkommt. Demzufolge kann hier von einem Eindeutigen Einbau von Wasserstoff in die Biomasse von Gram-positiven Bakterien, die besonders hohe Mengen an *a15:0* bilden, ausgegangen werden. Diese These wird zusätzlich dadurch gestützt, dass *a15:0* im Vergleich zu den anderen verzweigten PLFAs in einer deutlich höheren Abundanz in den Proben vorliegt (siehe Abb. 13) und außerdem auch bei der PCA aus den δ D-Messwerten (siehe Abb. 15) einen dem Bodenwasser gegenläufigen Trend besitzt.

Dem hinzuzufügen ist noch, dass die PLFAs *i15:0* und *i16:0* bei HS 4 eine weniger starke Korrelation mit der H-Isotopie des Bodenwassers aufweisen, als in HS2/3. Der nur halb so große Regressions-Anstieg deutet hier auf eine größere Beteiligung von Gram-positiven H_2 -Fixierern bei HS 4 hin.

Die einfach ungesättigten Fettsäuren **16:1ω9**, **16:1ω7**, **16:1ω5**, **17:1**, **18:1ω9**, **18:1ω7** und **18:1ω5** sollten durch die H-Isotopen-Fraktionierung während der Desaturierung, im Vergleich zu den gesättigten Fettsäuren, eine D-Abreicherung zeigen. Dies trifft für alle MUFAs, außer *18:1ω9*, welche im Vergleich um ca. 70-80 ‰ mit ²H angereichert ist, zu. Eine Fraktionierung bei der Trennung der Fettsäuren nach Anzahl der Doppelbindungen durch eine Silberionen-Chromatographie, wie von Zhang und Sachs 2007 diskutiert²⁷, kann hier durch die Untersuchung von PLFA-Standards (siehe Anhang A.13, Einfluss der Silberionen-Chromatographie) ausgeschlossen werden.

Die meisten MUFAs besitzen δ D-Werte von -125 bis -150 ‰ vs. VSMOW im März. Geringe Unterschiede können dabei durch die Beteiligung verschiedener Hydrogenase-Enzyme entstehen. Für *18:1ω9* ist jedoch zu beachten, dass dessen Retentionszeit bei der GC-Trennung knapp vor der von *18:1ω7* liegt (siehe Abb. 12) und die Peaks deshalb nicht sauber getrennt werden konnten. Die PLFA-Moleküle mit höherem D-Gehalt interagieren schwächer mit der GC-Säule und durchlaufen diese deshalb etwas schneller⁵⁵. Bei *18:1ω9* wird ein Stück des

49

hinteren Molekülpeaks, in dem sich eher Moleküle mit geringem D-Gehalt befinden, von dem deutlich intensiverem $18:1\omega7$ -Peak überdeckt und deshalb nicht berücksichtigt. Ein vergrößerter Ausschnitt eines IRMS-Chromatogramms mit den 18:1-MUFAs ist im Anhang A.14 (Peak-Überlagerung der C18-MUFAs) eingefügt. Die relative D-Anreicherung der Messwerte von $18:1\omega9$ kann damit hinreichend erklärt werden. Es wird im Weiteren davon ausgegangen, dass die Änderung der δ D-Werte von $18:1\omega7$ und $18:1\omega9$ im Untersuchungszeitraum trotz Peaküberlagerung noch aussagekräftig ist. Um dies abzusichern müsste jedoch noch eine bessere Trennmethode für die MUFAs entwickelt werden. Durch die Peak-Überlagerung kann zumindest auch teilweise die relative D-Abreicherung von $18:1\omega7$ um ~-30 bis -40 ‰ gegenüber den anderen MUFAs im März erklärt werden. Ein weiterer Grund dafür kann durch die Beteiligung des anaeroben Desaturase-Weges bei der Biosynthese von $\omega7$ -Fettsäuren gegeben sein. $16:1\omega7$ ist gegenüber den anderen 16:1-PLFAs ebenfalls um etwa 10-20 ‰ an ²H abgereichert.

Die MUFAs 16:1 ω 7 und 17:1 zeigen bei HS 2/3 und HS 4 eine signifikant positive Korrelation mit der Bodenwasser-Isotopie, wobei diese für 17:1 deutlich stärker ist (siehe auch PCA in 5.6.2). Die für arbuskuläre Mykorrhiza-Pilze typische Fettsäure 16:1 ω 5 zeigt bei HS 4 eine eher positive und in HS2/3 eine eher negative Korrelation mit dem Bodenwasser, die jedoch in beiden Fällen nicht signifikant sind. Der leichte Unterschied zwischen den Stellen könnte durch die erhöhte Abundanz der PLFA bei HS 4 (siehe Abb. 14) entstanden sein. 16:1 ω 5 ist jedoch auch bei Gram-positiven und -negativen Bakterien zu finden, wodurch auch hier ein Einfluss des Wasserstoffeinbaus durchaus möglich ist. Gleiches gilt für 18:1 ω 7, bei dem ebenfalls fast keine Änderung der δ D-Werte und nur eine schwache Korrelation mit der H-Isotopie des Bodenwassers (siehe Abb. 15) im Untersuchungszeitraum zu finden ist.

Besonders überraschend ist das starke Absinken der δ D-Werte bei *18:1ω5*, welches mit Abstand den größten Trend gegen die H-Isotopie des Bodenwassers besitzt. Bei HS 2/3 nimmt der δ D-Wert von *18:1ω5* von März nach April um rund 35 ‰ ab und ändert sich dann zum Mai kaum. Bei HS 4 gibt es dagegen eine noch stärkere D-Abreicherung im April von etwa 75 ‰, welche von einer D-Anreicherung im Mai um ca. 40 ‰ gefolgt wird. Daraus ergibt sich eine starke Tendenz zu niedrigeren δ D-Werten von *18:1ω5* bei HS 4 April (siehe Abb. 15), welche auch als Gesamtprobe am weitesten vom Bodenwassertrend abweicht. Diese Fettsäure kommt jedoch zum Einen allgemein nur selten in den untersuchten Proben vor (siehe Abb. 13) und zum Anderen kann sie, nach aktuellem Stand der Forschung, zu keinem bestimmten Taxon zugeordnet werden. Vor allem aber wegen der geringen Abundanz eignet sich $18:1\omega5$ eher schlecht für die Beschreibung der hier untersuchten Wasserstofffixierung. In Betracht zu ziehen ist auch ein Einfluss des direkt vorhergehenden $18:1\omega7$ -Peaks, ähnlich wie bei $18:1\omega9$, bloß hier in Richtung niedrigerer δ D-Werte. Zwar wird hier nur ein relativ kleiner, vorderer Teil des $18:1\omega5$ -Peaks überlagert (siehe Anhang A.14, Peak-Überlagerung der C18-MUFAs), aufgrund der größeren Probenmengen-Differenz zwischen $18:1\omega7$ und $18:1\omega5$ ist hier jedoch auch ein größerer Einfluss denkbar. Für $18:1\omega5$ wäre deshalb eine Wiederholung der Analyse mit einer besseren Trennung nötig, um das hier gefundene Ergebnis zu verifizieren/falsifizieren.

Neben 18:1 ω 5 zeigen auch die δ D-Werte von 18:1 ω 9 (ungeachtet der Peak-Überschneidung mit 18:1 ω 7 bei der IRMS-Messung) einen deutlichen Trend der sich gegen die Änderung des Bodenwassers im Frühjahr richtet (siehe Abb. 15). Hier beträgt die D-Abreicherung jedoch nur rund 10 ‰ von März nach April und Mai. Zusammen mit der nur geringen unsignifikanten Korrelation von 16:1 ω 9 mit der Bodenwasser-Isotopie ist dies ebenfalls ein Hinweis auf den Wasserstoffeinbau durch Gram-positive Bakterien.

Die Cyclopropyl-Fettsäuren *cy17:0* und *cy19:0* sollten einen ähnlichen bzw. leicht niedrigeren δ D-Wert (Einbau von CH₃ aus S-Methyl-adenosin) als ihre Vorläufer $16:1\omega7$ und $18:1\omega7$ besitzen. Bei den δ D-Werten aus *cy17:0* werden im März nur geringe Abweichungen (<6 ‰) von denen aus $16:1\omega7$ gefunden. Die δ D-Werte von cy19:0 sind etwa 20-30 ‰ höher als bei $18:1\omega7$, was wahrscheinlich auf den oben beschriebenen Messfehler bei $18:1\omega7$ zurückzuführen ist.

Für *cy17:0* gibt es eine starke, signifikant positive Korrelation zur H-Isotopie des Bodenwassers von März bis Mai, in Übereinstimmung mit dem biosynthetischen Vorläufer $16:1\omega7$. Damit kann eine Beteiligung von Sulfatreduzierern beim Einbau des Wasserstoffs in PLFAs ausgeschlossen werden. Bei *cy19:0* ist dagegen keine Korrelation mit dem Bodenwasser vorhanden, die δ D-Werte ändern sich kaum. Dieses Verhalten stimmt ebenfalls mit dem der Vorläufer-PLFA *18:1ω7* überein. Vorausgesetzt, dass *cy19:0* im Untersuchungsraum aktiv gebildet wird, ist eine Beteiligung von Gram-negativen Bakterien am H₂-Einbau in die untersuchten PLFAs demzufolge nicht auszuschließen.

Bei den für Actinobakterien charakteristischen 10-Methyl-Fettsäuren **10Me16:0**, **10Me17:0** und **10Me18:0** ist zu erwarten, dass sie ähnliche δ D-Werte wie ihre biosynthetischen Vorläufer $16:1\omega7$, $17:1\omega8$ und $18:1\omega9$ besitzen. Die gemessenen δ D-Werte für die 10-Methylfettsäuren befinden sich mit durchschnittlich etwa -140 ‰ vs. VSMOW für den März im Bereich der MUFA-Messwerte. Die einzige Ausnahme bildet 10Me17:0 mit einer relativen D-Anreicherung von ~ 20 ‰. Diese besitzt im Gegensatz zu den beiden anderen 10-Methylfettsäuren auch eine signifikant positive Korrelation mit der Änderung der Bodenwasser- δ D-Werte während des Frühjahres. 10Me17:0 zeigt dabei einen ähnlich starken Trend sowie ähnliche Ausgangswerte wie die hier gemessene PLFA 17:1. Deren Doppelbindungsposition wurde noch nicht durch eine Derivatisierungsreaktion bestimmt. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass es sich hier um den biosynthetischen Vorläufer ($17:1\omega8$) für 10Me17:0 handelt, da von den anderen MUFAs mit 17 C-Atomen nur vergleichsweise sehr geringe Mengen vorhanden sind.

Für 10Me16:0 stimmen die Ausgangs-δD-Werte ebenfalls mit denen aus dem Biosynthese-Vorläufer $16:1\omega7$ überein. Im Gegensatz zu diesem gibt es jedoch bei 10Me16:0 keine signifikante Korrelation mit der H-Isotopie des Bodenwassers. Bei HS2/3 gibt es kaum eine Änderung der δ D-Werte im untersuchten Zeitraum, es ist nur ein geringer Anstieg (ca. +8 ‰) von März/April zu Mai vorhanden. Bei HS 4 gibt es dagegen einen leichten Abfall (ca. -9 ‰) des δD-Wertes von März nach April, gefolgt von einem geringen Anstieg (ca. +7 ‰) im Mai. Dadurch ergibt sich auch hier in der PCA aus 5.6.2 (siehe Abb. 15) eine leichte Tendenz zu HS 4 April, in entgegengesetzter Richtung zum Bodenwasser-Trend. Durch die Erhöhung des Gehaltes von März nach April/Mai (siehe Abb. 13), die auf eine relativ hohe Aktivität der 10Me16:0-Biosynthese hinweist, ist hier eindeutig ein Einbau des stark D-abgereicherten Wasserstoffs der Bodenluft vorhanden. Diese These wird zusätzlich durch ähnliche Ergebnisse für einen weiteren Actinomycetales-Marker, nämlich 10Me18:0, untermauert. Dieser zeigt zwar nur eine vergleichsweise gering erhöhte Aktivität bei HS 4 April und keine eindeutig erhöhte Abundanz bei HS 4, besitzt aber dafür einen ähnlich starken Trend gegen die H-Isotopie des Bodenwassers wie 10Me16:0 (siehe Abb. 15). Bei HS 4 ist dieser für 10Me18:0 sogar signifikant entgegen der Änderung der Bodenwasser-δD-Werte im Frühjahr gerichtet. Die unterschiedliche Korrelation mit der H-Isotopie des Bodenwassers zwischen 10Me16:0/10Me18:0 (negativ) und 10Me17:0 (positiv) könnte aus einer Bildung der jeweili-

gen Fettsäuren durch verschiedene Spezies der Actinomycetales resultieren. Entsprechende

Hinweise konnten jedoch nicht in der hier verwendeten Fachliteratur gefunden werden.

52

Der Pilzmarker **18:2***w*6,**9** sollte aufgrund der zweiten Desaturierung, verglichen mit den MUFAs, noch mehr an Deuterium abgereichert seien. Mit δ D-Werten von ca.-160 (HS 2/3) und -170 (HS 4) ‰ vs. VSMOW, ist dies auch der Fall. Bei HS 4 ist dafür eine signifikant positive Korrelation zur H-Isotopie des Bodenwassers vorhanden. Bei HS 2/3 ist diese relativ klein und nicht signifikant. Grund dafür ist wahrscheinlich eine geringe Aktivität von März zu April, wenn sich die Bodenwasser- δ D-Werte am stärksten ändern (siehe Abb. 10). Erst von April zu Mai kommt es bei HS 2/3, einhergehend mit einer Zunahme des Gehaltes, zu einer D-Anreicherung von ~ 10 ‰ in *18:2w6,9*. Pilze bauen also wie erwartet keinen Bodenluft-H₂ in ihre Biomasse ein.

Für das archaebakterielle Isoprenoid *iso20:0* gibt es bisher noch keine direkten δ D-Vergleichswerte. Bei pflanzlichen Sterolen und Triterpenoiden, die auch aus der Isoprenoid-Biosynthese über den Mevalonat-Weg stammen, wurden δ D-Werte von rund -250 ‰ vs. VSMOW berichtet²³. Im Vergleich zu den klassischen Fettsäuren (durchschnittlich 180 ‰ vs. VSMOW) besitzen diese dort eine D-Abreicherung von ungefähr 70 ‰. In den hier untersuchten Proben von HS 2/3 liegt der δ D-Wert von *iso20:0* bei ~ -170 ‰ vs. VSMOW im März. Im Vergleich zu dem Durchschnittswert aller Fettsäuren aus HS 2/3 März, der ca. -130 ‰ vs. VSMOW beträgt, ergibt dies eine D-Abreicherung von ~40 ‰ bei *iso20:0*. Bedenkt man, dass am komplexeren Aufbau der pflanzlichen Sterole und Triterpenoide eine größere Anzahl an Enzymaktivitäten beteiligt ist, scheint eine geringere Fraktionierung bei *iso20:0* realistisch zu sein.

Bei HS 2/3 nimmt der δ D-Wert von *iso20:0* im April vorübergehend um etwa 20 ‰ ab und kehrt im Mai wieder fast zu seinem Ausgangspunkt zurück. Eine eindeutige Assoziation zum Einbau von H₂ aus der Bodenluft ist aber durch die beinahe konstant bleibenden sehr niedrigen Mengen von *iso20:0* während des Untersuchungszeitraumes nicht möglich.

7 Schlussfolgerung und Ausblick

Durch die Analyse von Änderungen in der mikrobiellen Gemeinschaft, basierend auf den Abundanzen und δ D-Werten individueller PLFAs aus Bodenproben, kann in dieser Arbeit eine wichtige Rolle von Gram-positiven Knallgasbakterien der Ordnung Actinomycetales bei der Fixierung von molekularem Wasserstoff unter aeroben Bedingungen im Boden nachgewiesen werden.

Diese Schlussfolgerung basiert im Wesentlichen auf der Gehalts-Zunahme des Actinomycetales-spezifischen PLFA-Markers *10Me16:0* bei erhöhter Wasserstoff-Verfügbarkeit und der Tatsache, dass dieser in seinem Wasserstoffisotopengehalt (δ D) nicht dem Trend des Bodenwassers (sonst Haupt-Wasserstofflieferant) zu einer Deuterium-Anreicherung im Untersuchungszeitraum folgt. Dabei kommt es sogar noch zu einer D-Abreicherung. Unterstützt wird die These zusätzlich durch ein vergleichbares Verhalten der δ D-Werte einer weiteren Actinomycetales-spezifischen Fettsäure (*10Me18:0*) sowie von zwei PLFAs, die für Gram-positive Bakterien charakteristisch sind (*a15:0, 18:1ω9*).

Eine Beteiligung von Gram-negativen Knallgasbakterien bei der Wasserstoff-Fixierung im Boden scheint ebenfalls gegeben zu sein. Auch hier nimmt der Gehalt einiger charakteristischer PLFAs (*cy17:0, cy19:0, 16:1w7* und *18:1w7*) bei erhöhter Wasserstoff-Verfügbarkeit zu, wobei *cy19:0* und *18:1w7* nicht der H-Isotopie des Bodenwassers folgen.

Der Einbau von fixiertem H₂ in die Biomasse könnte bei den Actinomycetales allgemein stärker als bei anderen Bakterientaxa seien, weil bei ihnen die Möglichkeit besteht, dass sie nur die lösliche Hydrogenase besitzen (bei zwei Spezies nachgewiesen¹⁷). Dadurch, dass diese den Wasserstoff auch direkt auf NAD(P)⁺ unter Bildung von NAD(P)H überträgt und nicht wie die membrangebundene Hydrogenase nur H⁺ bildet, sollte ihr Einfluss auf die Fettsäure-Biosynthese deutlich höher sein. Da viele Knallgasbakterien nur die membrangebundene Hydrogenase besitzen, wären hier weitere Untersuchungen nötig um ein komplettes Bild von der aeroben Wasserstofffixierung im untersuchten Ökosystem zu erhalten. Eine genauere Betrachtung könnte phylogenetisch durch Sequenzierung von 16S rRNA- und Hydrogenase-Genen der Bodenproben erfolgen (siehe Chowdhury et al. 2009⁵⁶, Will et al. 2010⁵⁷ sowie Lechner und Conrad 1997⁵⁸). Desweiteren könnten auch Bodenproben entnommen und unter kontrollierten Laborbedingungen mit einem Luft-Wasserstoff-Gemisch begast werden (siehe Stein et al. 2005¹¹). Dies würde, neben der besseren Betrachtung des H_2 -Einbaus, auch den Vorteil bieten isotopisch markiertes (δ^{13} C) CO₂ zu verwenden. Damit könnte gleichzeitig auch die CO₂-Fixierung durch die Knallgasbakterien nachvollzogen werden.

Generell scheint die Erhöhung der Wasserstoff-Verfügbarkeit im Boden des hier untersuchten Ökosystems einen positiven Effekt auf die mikrobielle Gemeinschaft auszuüben. Eine erhöhte H₂-Freisetzung von Seiten der Wasserstoff-Ökonomie könnte dadurch zumindest teilweise wieder ausgeglichen werden und sollte bei entsprechenden biogeochemischen Modellierungen berücksichtigt werden. Zu erforschen ist noch ob es sich dabei um ein allgemeines Phänomen in aeroben Böden handelt oder ob im hier untersuchten Gebiet Bedingungen herrschen, welche die Wasserstoff-Produktion und anschließende -Fixierung besonders fördern.

8 Literaturverzeichnis

- 1. Tromp, T. K., Shia, R.-L., Allen, M., Eiler, J. M. & Yung, Y. L. Potential Environmental Impact of a Hydrogen Economy on the Stratosphere. *Science* **300**, 1740–1742 (2003).
- 2. Rahn, T. *et al.* Extreme deuterium enrichment in stratospheric hydrogen and the global atmospheric budget of H2. *Nature* **424**, 918–921 (2003).
- 3. Prather, M. J. An Environmental Experiment with H2? *Science* **302**, 581–582 (2003).
- 4. Schultz, M. G., Diehl, T., Brasseur, G. P. & Zittel, W. Air Pollution and Climate-Forcing Impacts of a Global Hydrogen Economy. *Science* **302**, 624–627 (2003).
- 5. Novelli, P. C. *et al.* Molecular hydrogen in the troposphere: Global distribution and budget. *Journal of Geophysical Research* **104**, 30427 (1999).
- 6. Conrad, R. Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H2, CO, CH4, OCS, N2O, and NO). *Microbiol. Rev.* **60**, 609–640 (1996).
- Schuler, S. & Conrad, R. Soils contain two different activities for oxidation of hydrogen. *FEMS Microbiology Letters* 73, 77–83 (1990).
- 8. Guo, R. & Conrad, R. Extraction and characterization of soil hydrogenases oxidizing atmospheric hydrogen. *Soil Biology and Biochemistry* **40**, 1149–1154 (2008).
- 9. Bowien, B. & Schlegel, H. G. Physiology and Biochemistry of Aerobic Hydrogen-Oxidizing Bacteria. *Annual Review of Microbiology* **35**, 405–452 (1981).
- 10. Dong, Z. & Layzell, D. B. H2 oxidation, O2 uptake and CO2 fixation in hydrogen treated soils. *Plant and Soil* **229**, 1–12 (2001).
- 11. Stein, S. *et al.* Microbial activity and bacterial composition of H2-treated soils with net CO2 fixation. *Soil Biology and Biochemistry* **37**, 1938–1945 (2005).
- Zelles, L. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review. *Biology and Fertility of Soils* 29, 111–129 (1999).
- Sessions, A. L., Burgoyne, T. W., Schimmelmann, A. & Hayes, J. M. Fractionation of hydrogen isotopes in lipid biosynthesis. *Organic Geochemistry* **30**, 1193–1200 (1999).
- 14. Hoehler, T. M. *et al.* Comparative ecology of H2 cycling in sedimentary and phototrophic ecosystems. *Antonie Van Leeuwenhoek* **81**, 575–585 (2002).
- 15. Madigan, M. T., Martinko, J. M. & Parker, J. *Mikrobiologie*. (Spektrum Akad. Verl.: Berlin [u.a.], 2001).
- 16. Conrad, R. & Seiler, W. Decomposition of atmospheric hydrogen by soil microorganisms and soil enzymes. *Soil Biology and Biochemistry* **13**, 43–49 (1981).
- 17. Friedrich, B. & Schwartz, E. Molecular Biology of Hydrogen Utilization in Aerobic Chemolithotrophs. *Annual Review of Microbiology* **47**, 351–383 (1993).
- 18. Schneider, K. & Schlegel, H. G. Purification and properties of soluble hydrogenase from Alcaligenes eutrophus H 16. *Biochim. Biophys. Acta* **452**, 66–80 (1976).
- 19. Leul, M., Normand, P. & Sellstedt, A. The phylogeny of uptake hydrogenases in Frankia. *Int. Microbiol.* **12**, 23–28 (2009).
- 20. Maimaiti, J. *et al.* Isolation and characterization of hydrogen-oxidizing bacteria induced following exposure of soil to hydrogen gas and their impact on plant growth. *Environ. Microbiol.* **9**, 435–444 (2007).

- Huber, G., Drobner, E., Huber, H. & Stetter, K. O. Growth by Aerobic Oxidation of Molecular Hydrogen in Archaea —a Metabolic Property so far Unknown for this Domain. *Systematic and Applied Microbiology* **15**, 502–504 (1992).
- 22. Bigeleisen, J. & Wolfsberg, M. Theoretical and Experimental Aspects of Isotope Effects in Chemical Kinetics. *Advances in Chemical Physics* 15–76 (2007).
- Schmidt, H.-L., Werner, R. A. & Eisenreich, W. Systematics of <sup>2</sup>H patterns in natural compounds and its importance for the elucidation of biosynthetic pathways. *Phytochemistry Reviews* 2, 61–85 (2003).
- 24. Manfred, G. Chapter 40 International Stable Isotope Reference Materials. *Handbook of Stable Isotope Analytical Techniques* 874–906 (2004).
- 25. Marcinkeviciene, J. *et al.* Enoyl-ACP Reductase (FabI) of Haemophilus influenzae: Steady-State Kinetic Mechanism and Inhibition by Triclosan and Hexachlorophene. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **390**, 101–108 (2001).
- 26. Nelson, D. & Cox, M. Lehninger Biochemie. (Springer Berlin Heidelberg: 2001).
- 27. Zhang, Z. & Sachs, J. P. Hydrogen isotope fractionation in freshwater algae: I. Variations among lipids and species. *Organic Geochemistry* **38**, 582–608 (2007).
- 28. Lombard, J. & Moreira, D. Origins and Early Evolution of the Mevalonate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis in the Three Domains of Life. *Mol Biol Evol* **28**, 87–99 (2011).
- 29. Sessions, A. L., Jahnke, L. L., Schimmelmann, A. & Hayes, J. M. Hydrogen isotope fractionation in lipids of the methane-oxidizing bacterium Methylococcus capsulatus. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **66**, 3955–3969 (2002).
- 30. Kaneda, T. Iso- and anteiso-fatty acids in bacteria: biosynthesis, function, and taxonomic significance. *Microbiol. Rev.* **55**, 288–302 (1991).
- 31. Volpe, J. J. & Vagelos, P. R. Mechanisms and regulation of biosynthesis of saturated fatty acids. *Physiol. Rev.* **56**, 339–417 (1976).
- Chang, Y.-Y. & Cronan, J. E. Membrane cyclopropane fatty acid content is a major factor in acid resistance of Escherichia coli. *Molecular Microbiology* 33, 249–259 (1999).
- 33. Dewick, P. M. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. (John Wiley & Sons: 2011).
- 34. Paltauf, F. Ether lipids in biomembranes. *Chemistry and Physics of Lipids* **74**, 101–139 (1994).
- 35. Bahnson, B. J. An atomic-resolution mechanism of 3-hydroxy-3-methylglutaryl– CoA synthase. at <http://www.pnas.org>
- 36. Tabernero, L., Bochar, D. A., Rodwell, V. W. & Stauffacher, C. V. Substrateinduced closure of the flap domain in the ternary complex structures provides insights into the mechanism of catalysis by 3-hydroxy-3-methylglutaryl–CoA reductase. at <http://www.pnas.org>
- Rohdich, F., Bacher, A. & Eisenreich, W. Perspectives in anti-infective drug design. The late steps in the biosynthesis of the universal terpenoid precursors, isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate. *Bioorganic Chemistry* 32, 292–308 (2004).
- 38. Koga, Y. & Morii, H. Biosynthesis of Ether-Type Polar Lipids in Archaea and Evolutionary Considerations. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**, 97–120 (2007).

- 39. Nishimura, Y. & Eguchi, T. Biosynthesis of archaeal membrane lipids: digeranylgeranylglycerophospholipid reductase of the thermoacidophilic archaeon Thermoplasma acidophilum. *J. Biochem.* **139**, 1073–1081 (2006).
- Dowling, N. J. E., Widdel, F. & White, D. C. Phospholipid Ester-linked Fatty Acid Biomarkers of Acetate-oxidizing Sulphate-reducers and Other Sulphide-forming Bacteria. *J Gen Microbiol* **132**, 1815–1825 (1986).
- 41. Olsson, P. A. Signature fatty acids provide tools for determination of the distribution and interactions of mycorrhizal fungi in soil. *FEMS Microbiology Ecology* **29**, 303–310 (1999).
- 42. Kaur, A., Chaudhary, A., Kaur, A., Choudhary, R. & Kaushik, R. Phospholipid fatty acid A bioindicator of environment monitoring and assessment in soil ecosystem. *Current science* **89**, 1103–1112
- 43. Sachse, D., Kahmen, A. & Gleixner, G. Significant seasonal variation in the hydrogen isotopic composition of leaf-wax lipids for two deciduous tree ecosystems (*Fagus sylvativa and Acer pseudoplatanus*). *Organic Geochemistry* **40**, 732–742 (2009).
- 44. Gleixner, G. *et al.* Soil Carbon Accumulation in Old-Growth Forests. *Old-Growth Forests* **207**, 231–266 (2009).
- 45. Bligh, E. G. & Dyer, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* **37**, 911–917 (1959).
- 46. Gattinger, A., Günthner, A., Schloter, M. & Munch, J. c. Characterisation of Archaea in Soils by Polar Lipid Analysis. *Acta Biotechnologica* **23**, 21–28 (2003).
- 47. Gleixner, G. Molekulare Überprüfung einer globalen Bilanz. *MaxPlanckForschung* **3/99**, 20–21 (1999).
- 48. de Groot, P. A. Chapter 1 Hydrogen. *Handbook of Stable Isotope Analytical Techniques* 1–224 (2009).
- 49. Riley, W. J., Still, C. J., Torn, M. S. & Berry, J. A. A mechanistic model of H2180 and C1800 fluxes between ecosystems and the atmosphere: Model description and sensitivity analyses. *Global Biogeochem. Cycles* **16**, 1095 (2002).
- 50. Craig, H. Isotopic Variations in Meteoric Waters. *Science* **133**, 1702–1703 (1961).
- 51. Baumgartner, L. K. *et al.* Sulfate reducing bacteria in microbial mats: Changing paradigms, new discoveries. *Sedimentary Geology* **185**, 131–145 (2006).
- 52. Peters, V. & Conrad, R. Methanogenic and other strictly anaerobic bacteria in desert soil and other oxic soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 1673–1676 (1995).
- 53. Könneke, M. & Widdel, F. Effect of growth temperature on cellular fatty acids in sulphate-reducing bacteria. *Environmental Microbiology* **5**, 1064–1070 (2003).
- 54. Chikaraishi, Y., Suzuki, Y. & Naraoka, H. Hydrogen isotopic fractionations during desaturation and elongation associated with polyunsaturated fatty acid biosynthesis in marine macroalgae. *Phytochemistry* **65**, 2293–2300 (2004).
- 55. Matucha, M., Jockisch, W., Verner, P. & Anders, G. Isotope effect in gas—liquid chromatography of labelled compounds. *Journal of Chromatography A* **588**, 251–258 (1991).
- Chowdhury, S. P., Schmid, M., Hartmann, A. & Tripathi, A. K. Diversity of 16SrRNA and nifH genes derived from rhizosphere soil and roots of an endemic drought tolerant grass, Lasiurus sindicus. *European Journal of Soil Biology* 45, 114–122 (2009).

- 57. Will, C. *et al.* Horizon-Specific Bacterial Community Composition of German Grassland Soils, as Revealed by Pyrosequencing-Based Analysis of 16S rRNA Genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 6751–6759 (2010).
- Lechner, S. & Conrad, R. Detection in soil of aerobic hydrogen-oxidizing bacteria related to Alcaligenes eutrophus by PCR and hybridization assays targeting the gene of the membrane-bound (NiFe) hydrogenase. *FEMS Microbiology Ecology* 22, 193–206 (1997).

A Anhang

Anlagenverzeichnis

A.1	Messwerte des H ₂ -Gehaltes der Bodenluft 61
A.2	δD-Werte Bodenwasser
A.3	δD-Messwerte der Phospholipide62
A.4	Identifizierte PLFAs
A.5	Massenspektren 64
A.6	Messwerte PLFA-Gehalt
A.7	IRMS-Beispiel-Chromatogramm68
A.8	PLFA-δD-Messwerte HS 2 und HS 368
A.9	Vektorplot der PLFA-δD-Änderung
A.10	pH Bodenwasser
A.11	Leitfähigkeit Bodenwasser71
A.12	Sulfat Bodenwasser71
A.13	Einfluss der Silberionen-Chromatographie71
A.14	Peaküberlagerung der C18-MUFAs72

A.1 Messwerte des H₂-Gehaltes der Bodenluft

Probenahme-	H ₂ -Gehalt in	[ppbV]				
Datum	HS2 -5 cm	HS2 -10 cm	HS 3 -5 cm	HS 3 -10 cm	HS 4 -5 cm	HS 4 -10 cm
28.12.2010	14033	5035	6518	6046	544	9373
13.01.2011	13274	5771	10223	8291	672	11502
27.01.2011	n.v.	n.v.	11919	n.v.	n.v.	n.v.
10.02.2011	n.v.	n.v.	11134	7906	n.v.	n.v.
24.02.2011	165957	212089	11098	125805	n.v.	154584
10.03.2011	161027	61655	10778	111060	2985	356756
24.03.2011	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	269524	281813
07.04.2011	370246	38417	n.v.	164465	619620	1250677
28.04.2011	622533	37721	n.v.	300112	799800	860541
10.05.2011	340120	21419	n.v.	190435	262091	1878779
20.05.2011	n.v.	24245	187742	n.v.	55626	22771
06.06.2011	242657	53661	n.v.	199181	n.v.	n.v.
17.06.2011	191630	25066	n.v.	367998	204140	481251
01.07.2011	133746	21141	n.v.	n.v.	164596	1064429
18.07.2011	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
02.08.2011	100323	20595	n.v.	n.v.	86227	299666
19.08.2011	77033	11610	n.v.	n.v.	47818	321463
30.08.2011	26847	5870	n.v.	n.v.	28231	217804
08.09.2011	13741	6315	n.v.	5862	138680	68695
07.10.2011	43070	18931	n.v.	9359	45568	123424
21.10.2011	12690	5766	n.v.	n.v.	36260	48027
04.11.2011	12400	5162	1362	n.v.	29822	24041
21.11.2011	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	24318	18399
02.12.2011	4130	2525	n.v.	n.v.	13767	10124
12.12.2011	4030	2001	n.v.	n.v.	8266	7764
30.12.2011	9362	3150	n.v.	n.v.	15128	13864

Messwerte des H_2 -Gehaltes der Bodenluft bei HS 2, HS 3 und HS 4 in 5 und 10cm Tiefe für 2011; gemessen im MPI-BGC-Gasanalytik-Labor (B. Steinberg, A. Jordan); n.v.: nicht verfügbar.

A.2 δD-Werte Bodenwasser

Probenahme-	δD vs. VSMO	W in [‰]				
Datum	HS2 -5 cm	HS2 -10 cm	HS 3 -5 cm	HS 3 -10 cm	HS 4 -5 cm	HS 4 -10 cm
13.01.2011	-94,2	-96,8	n.v.	n.v.	-80,5	-81,7
27.01.2011	-88,6	-84,3	-86,7	-83,7	-74,4	-86,7
10.02.2011	-82,5	n.v.	n.v.	n.v.	-77,3	-75,7
24.02.2011	-85,8	-87,2	-88,8	n.v.	-80,1	n.v.
10.03.2011	-90,7	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	-87,6
24.03.2011	-100,4	-95,0	n.v.	n.v.	-67,4	-69,6
07.04.2011	-70,6	-79,8	-76,0	-84,2	-62,3	-68,6
28.04.2011	-67,6	-75,7	-71,1	n.v.	-60,6	-66,5
02.08.2011	-46,4	n.v.	n.v.	n.v.	-37,3	-45,4

 δ D-Messwerte des Bodenwassers von Januar bis August 2011 in 5 und 10 cm Tiefe für HS 2, HS 3 und HS 4; aus Daten der AG Gleixner, gemessen im MPI-BGC-IsoLab (H.Geilmann); n.v.: nicht verfügbar.

A.3 δD-Messwerte der Phospholipide

 δ D-Werte der Gesamtphospholipide der Bodenproben aus 5-10 cmTiefe von HS 2, HS 3 und HS 4 (Mittelwerte ± Standardabweichung aus drei unabhängigen Wiederholungen); gemessen im MPI-BGC-IsoLab (H.Geilmann).

Probe	Probenahme-Datum	δD vs. VSMOW in [‰]
HS 2	10.03.11	-149,0 ± 27,8
HS 3	24.03.11	-144,6 ± 26,5
HS 4	10.03.11	-118,3 ± 4,4
HS 2	07.04.11	-123,0 ± 9,3
HS 3	07.04.11	-131,4 ± 3,4
HS 4	07.04.11	-125,8 ± 1,8
HS 2	10.05.11	-126,3 ± 3,3
HS 3	10.05.11	-136,4 ± 10,6
HS 4	10.05.11	-121,0 ± 1,2

A.4 Identifizierte PLFAs

Liste aller identifizierten PLFAs (aus Daten der AG Gleixner) mit Angabe der Retentionszeiten aus Abbildung 12 und dem Ausscheidungsgrund für weitere Analysen, falls vorhanden. Fettgedruckt: untersuchte PLFAs

i15:0	SATFA	27,1	-
n14:0	SATFA	24.1	zu wenig Probe für IRMS
i14:0	SATFA	22,5	potentielles Fragmentierungsprodukt
PLFA	Untergruppe	Retentionszeit aus Abb. 12	Ausscheidungsgrund
PLFA	Untergruppe	Retentionszeit aus Abb. 12	Ausscheidungsgrund
----------	-------------	----------------------------	--------------------------------------
a15:0	SATFA	27,5	-
i16:0	SATFA	31,6	-
n16:0	SATFA	33,5	-
br17:0	SATFA	33,6	zu Dicht an Vorläufer-Peak
10Me16:0	SATFA	35,5	-
i17:0	SATFA	36,2	-
a17:0	SATFA	36,7	-
cy17:0	SATFA	37,3	-
10Me17:0	SATFA	38,0	-
br18:0	SATFA	38,3	zu wenig Probe für IRMS
br18:0	SATFA	39,6	zu wenig Probe für IRMS
n18:0	SATFA	42,3	-
10Me18:0	SATFA	44,0	-
br19:0	SATFA	44,1	zu wenig Probe für IRMS
су19:0	SATFA	46,3	-
n20:0	SATFA	50,6	zu wenig Probe für IRMS
br23:0	SATFA	54,5	zu wenig Probe für IRMS
15:1	MUFA	25,9	zu wenig Probe für IRMS
16:1	MUFA	30,5	zu wenig Probe für IRMS
16:1ω9	MUFA	32,0	-
16:1ω7	MUFA	32,3	-
16:1ω5	MUFA	32,7	-
17:1	MUFA	35,0	-
17:1ω7	MUFA	37,0	zu wenig Probe für IRMS
18:1ω9	MUFA	41,1	-
18:1ω7	MUFA	41,5	-
18:1ω5	MUFA	41,8	-
19:1	MUFA	42,5	zu wenig Probe für IRMS
20:1ω9	MUFA	49,4	zu wenig Probe für IRMS
18:2	PUFA	40,2	zu wenig Probe für IRMS
18:2ω6,9	PUFA	40,8	-
18:3ω3	PUFA	41,0	zu wenig Probe für IRMS
20:4ω6	PUFA	47,8	zu wenig Probe für IRMS
iso15:0	PLEL	16,6	zu wenig Probe für IRMS
i15:0	PLEL	19,1	nicht spezifisch für Archaebakterien
a15:0	PLEL	19,2	nicht spezifisch für Archaebakterien
n16:0	PLEL	21,1	nicht spezifisch für Archaebakterien
iso19:0	PLEL	23,4	nicht spezifisch für Archaebakterien
n18:0	PLEL	23,8	nicht spezifisch für Archaebakterien
iso20:0	PLEL	23,9	-
iso20:1	PLEL	24,0	zu wenig Probe für IRMS
n28:0	PLEL	34,8	nicht spezifisch für Archaebakterien

Fortsetzung: Liste aller identifizierten PLFAs.

A.5 Massenspektren

Die folgenden Massenspektren (aus HS 4 Mai, nur *iso20:0* aus HS 2 April) wurden am Ion-Trap-Massenspektrometer aufgenommen:





• a15:0



• n16:0



• 10Me16:0



Fortsetzung: Massenspektren





18:1ω7



18:2ω6,9



• iso20:0



A.6 Messwerte PLFA-Gehalt

Messwerte des PLFA-Gehaltes der Proben von **HS 2** (Mittelwerte ± Standardabweichung aus drei unabhängigen Wiederholungen); gemessen am GC-Flammenionisationsdetektor; Verdünnung und bei Extraktion verwendete Trockenmasse mit eingerechnet.

PLFA	Gehalt in [ng/g _{Trockenmasse}]			
	10.03.2011	07.04.2011	10.05.2011	
i15:0	1560,9 ± 232,6	1521,7 ± 269,1	1567,2 ± 282,4	
a15:0	2612,5 ± 377,9	2474,5 ± 453,5	2591,5 ± 493,2	
i16:0	560,6 ± 52,7	587,5 ± 101,0	623,9 ± 117,5	
n16:0	2832,5 ± 338,2	3157,2 ± 366,3	3118,7 ± 744,8	
10Me16:0	1799,6 ± 172,2	1992,9 ± 382,1	2014,3 ± 382,5	
i17:0	493,5 ± 54,0	537,6 ± 102,4	544,8 ± 113,0	
a17:0	614,7 ± 65,3	668,3 ± 126,6	670,3 ± 135,7	
cy17:0	916,3 ± 103,0	903,9 ± 182,3	914,7 ± 203,0	
10Me17:0	235,2 ± 14,6	282,6 ± 48,2	322,0 ± 61,8	
n18:0	610,8 ± 71,9	699,0 ± 123,5	670,6 ± 143,8	
10Me18:0	601,3 ± 64,9	668,5 ± 115,1	705,1 ± 151,7	
cy19:0	3875,2 ± 135,0	4342,8 ± 1008,3	4015,5 ± 861,4	
16:1ω9	681,0 ± 86,2	682,0 ± 138,7	678,5 ± 141,8	
16:1ω7	2000,6 ± 275,5	1847,9 ± 375,7	1776,9 ± 392,6	
16:1ω5	1339,1 ± 178,3	1361,7 ± 281,1	1309,3 ± 281,8	
17:1ω?	773,5 ± 106,9	772,4 ± 150,0	715,0 ± 156,4	
18:1ω9	3270,6 ± 421,0	3586,8 ± 797,5	3503,0 ± 756,3	
18:1ω7	7528,7 ± 818,7	7687,0 ± 1753,4	7174,0 ± 1601,4	
18:1ω5	524,6 ± 66,7	572,3 ± 133,6	573,7 ± 120,8	
18:2ω6,9	428,2 ± 216,7	471,6 ± 123,5	1221,0 ± 288,2	
iso20:0	119,3 ± 46,6	119,9 ± 5,7	107,6 ± 14,2	

Messwerte des PLFA-Gehaltes der Proben von **HS 3** (Mittelwerte ± Standardabweichung aus drei unabhängigen Wiederholungen); gemessen am GC-Flammenionisationsdetektor; Verdünnung und bei Extraktion verwendete Trockenmasse mit eingerechnet.

PLFA	Gehalt in [ng/g _{Trockenmasse}]		
	24.03.2011	07.04.2011	10.05.2011
i15:0	1301,4 ± 134,3	1114,0 ± 163,7	1488,3 ± 227,3
a15:0	2176,8 ± 217,2	1622,8 ± 242,9	2269,3 ± 347,9
i16:0	566,9 ± 33,5	431,0 ± 62,2	571,8 ± 83,1
n16:0	2505,6 ± 70,4	2092,8 ± 215,6	2582,4 ± 369,8
10Me16:0	1678,6 ± 87,1	1378,6 ± 99,1	1847,5 ± 221,7
i17:0	516,9 ± 25,6	391,0 ± 39,7	523,7 ± 64,4
a17:0	602,9 ± 27,1	470,7 ± 42,9	635,6 ± 77,1
cy17:0	809,8 ± 39,4	670,0 ± 47,7	881,6 ± 102,0
10Me17:0	344,3 ± 18,9	199,8 ± 26,1	285,2 ± 40,1
10Me17:0	344,3 ± 18,9	199,8 ± 26,1	285,2 ± 40,1

PLFA	Gehalt in [ng/g _{Trockenmasse}]			
	24.03.2011	07.04.2011	10.05.2011	
n18:0	635,6 ± 0,8	522,9 ± 47,1	647,4 ± 86,9	
10Me18:0	437,3 ± 19,2	420,9 ± 60,0	578,5 ± 79,8	
cy19:0	4865,3 ± 126,8	3102,2 ± 218,4	4016,9 ± 492,0	
16:1ω9	455,0 ± 119,6	498,4 ± 35,7	593,2 ± 92,7	
16:1ω7	1113,2 ± 263,7	1440,4 ± 100,6	1559,7 ± 243,0	
16:1ω5	754,5 ± 171,4	1031,4 ± 69,2	1198,2 ± 185,3	
17:1ω?	489,6 ± 107,2	552,1 ± 41,8	671,1 ± 95,2	
18:1ω9	2687,9 ± 406,4	2457,5 ± 184,4	3046,7 ± 418,7	
18:1ω7	5183,9 ± 800,8	4831,0 ± 304,4	5568,4 ± 769,6	
18:1ω5	423,1 ± 66,6	411,2 ± 22,4	553,4 ± 79,9	
18:2ω6,9	309,2 ± 82,7	249,3 ± 18,3	613,6 ± 161,5	
iso20:0	116,8 ± 4,2	117,0 ± 23,6	119,0 ± 4,6	

Fortsetzung	Messwerte	des PLFA-Gehaltes	der Proben von H	S 3.
-------------	-----------	-------------------	------------------	------

Messwerte des PLFA-Gehaltes der Proben von **HS 4** (Mittelwerte ± Standardabweichung aus drei unabhängigen Wiederholungen); gemessen am GC-Flammenionisationsdetektor; Verdünnung und bei Extraktion verwendete Trockenmasse mit eingerechnet.

PLFA	Gehalt in [ng/g _{Trockenmasse}]			
	10.03.2011	07.04.2011	10.05.2011	
i15:0	2245,7 ± 143,5	2955,9 ± 183,0	2696,5 ± 53,5	
a15:0	2857,0 ± 223,8	3898,9 ± 208,5	3566,7 ± 60,1	
i16:0	890,6 ± 48,1	1185,8 ± 50,5	1101,4 ± 20,7	
n16:0	3491,9 ± 221,2	4512,2 ± 158,8	3864,0 ± 70,4	
10Me16:0	3704,6 ± 338,4	4894,4 ± 178,2	4526,1 ± 91,0	
i17:0	763,7 ± 38,5	989,9 ± 41,1	931,0 ± 18,8	
a17:0	867,3 ± 44,9	1101,8 ± 37,0	1057,3 ± 21,8	
cy17:0	1206,1 ± 102,4	1488,8 ± 79,2	1300,5 ± 26,1	
10Me17:0	497,4 ± 10,9	626,0 ± 39,5	759,2 ± 20,9	
n18:0	816,1 ± 51,6	1051,9 ± 34,0	926,3 ± 20,4	
10Me18:0	951,4 ± 19,2	1190,5 ± 91,5	1177,9 ± 27,6	
cy19:0	4571,8 ± 273,6	5969,7 ± 306,1	5853,4 ± 54,6	
16:1ω9	988,0 ± 157,6	1349,2 ± 88,2	1135,9 ± 21,7	
16:1ω7	2801,0 ± 404,0	3909,5 ± 252,9	3029,0 ± 68,9	
16:1ω5	1894,8 ± 278,0	2667,0 ± 178,1	2127,8 ± 45,5	
17:1ω?	1212,4 ± 191,7	1710,9 ± 109,5	1398,7 ± 36,4	
18:1ω9	4106,4 ± 621,3	6006,3 ± 399,9	4620,5 ± 121,0	
18:1ω7	8633,8 ± 1372,6	12132,0 ± 397,2	10124,4 ± 207,3	
18:1ω5	743,7 ± 114,7	1048,1 ± 55,1	771,7 ± 22,2	
18:2ω6,9	185,8*	396,8 ± 148,6	357,0 ± 201,0	
iso20:0	186,6 ± 35,5	182,8 ± 64,0	122,0 ± 15,3	

*: nur ein Wert durch Fehler bei der Peak-Integration



A.7 IRMS-Beispiel-Chromatogramm

Ausschnitt des IRMS-Chromatogramms der SATFAs von HS 4 Mai; oben: Verhältnis ${}^{3}H_{2}/{}^{2}H_{2}$; unten: gemessene Intensitäten für ${}^{3}H_{2}$ (obere Basislinie) und ${}^{2}H_{2}$ (untere Basislinie).

A.8 PLFA-δD-Messwerte für HS 2 und HS 3

 δ D-Messwerte der PLFAs für **HS 2** (Mittelwerte ± Standardabweichung aus drei unabhängigen Wiederholungen); gemessen am Py-GC/IRMS.

PLFA	δD vs. VSMOW in [‰]		
	10.03.2011	07.04.2011	10.05.2011
17:1	-135,7 ± 33,9	-136,6 ± 15,1	-101,6 ± 6,8
i16:0	-97,6 ± 6,0	-87,5 ± 16,0	-78,5 ± 23,9
10Me17:0	-144,6 ± 11,0	-117,3*	-118,9 ± 12,3
n18:0	-40,8 ± 7,3	-44,0 ± 7,6	-38,4 ± 1,8
i15:0	-95,8 ± 3,6	-95,7 ± 6,9	-83,9 ± 3,0
cy17:0	-141,3 ± 14,2	-138,8 ± 11,6	-132,3 ± 8,8
i17:0	-86,5 ± 11,6	-97,4 ± 9,2	-88,5 ± 8,5
16:1ω7	-141,2 ± 2,3	-149,3 ± 13,4	-140,2 ± 2,9
a17:0	-94,9 ± 5,8	-101,1 ± 14,6	-89,7 ± 13,6
10Me16:0	-139,3 ± 4,6	-147,8 ± 1,7	-136,0 ± 2,5
16:1ω9	-130,0 ± 15,2	-134,2*	-141,3 ± 13,8
18:2ω6,9	-141,3*	-155,5 ± 15,1	-153,7*
18:1ω7	-206,9 ± 11,7	-198,7 ± 7,2	-203,2 ± 6,8
18:1ω5	-117,3 ± 8,9	-125,5 ± 11,8	-118,2 ± 12,5
a15:0	-142,0 ± 3,4	-153,4 ± 3,9	-150,0 ± 2,8
18:1ω9	-56,2 ± 22,7	-70,4 ± 7,4	-64,9 ± 4,5
iso20:0	-162,8 ± 13,6	-184,9 ± 1,1	-167,5 ± 7,1
16:1ω5	-140,4 ± 22,7	-178,2 ± 21,5	-184,8 ± 13,7
cy19:0	-170,5 ± 1,1	-181,8 ± 5,1	-170,1 ± 2,5
n16:0	-110,1 ± 2,1	-127,6 ± 6,3	-114,8 ± 3,9
10Me18:0	-130,0 ± 12,7	-138,3 ± 6,6	-140,2 ± 5,1

*: nur ein Wert wegen niedriger Probenmengen vorhanden

PLFA	δD vs. VSMOW in [‰]		
	10.03.2011	07.04.2011	10.05.2011
17:1	-148,9 ± 13,2	-169,9 ± 8,8	-108,7 ± 13,3
i16:0	-121,6 ± 19,5	-82,6 ± 15,0	-85,7 ± 7,9
10Me17:0	-147,1 ± 13,3	-110,7*	-126,1 ± 4,9
n18:0	-77,9 ± 27,3	-54,4 ± 5,2	-34,4 ± 14,6
i15:0	-113,1 ± 16,5	-90,2 ± 7,1	-83,8 ± 3,4
cy17:0	-174,1 ± 25,5	-153,0 ± 10,4	-147,2 ± 7,7
i17:0	-122,2 ± 23,3	-92,0 ± 2,8	-88,2 ± 9,3
16:1ω7	-162,7 ± 12,6	-144,2 ± 6,3	-142,3 ± 6,2
a17:0	-116,0 ± 22,2	-102,7 ± 8,6	-103,9 ± 11,7
10Me16:0	-147,9 ± 11,7	-140,7 ± 4,4	-136,1 ± 4,1
16:1ω9	-168,0*	-127,6 ± 6,1	-160,2 ± 9,2
18:2ω6,9	-172,7 ± 9,5	-170,4 ± 0,6	-152,0 ± 31,2
18:1ω7	-192,4 ± 2,4	-185,1 ± 1,3	-198,9 ± 2,1
18:1ω5	-143,4 ± 8,0	-177,0 ± 8,5	-164,6 ± 20,7
a15:0	-136,0 ± 3,5	-142,2 ± 2,2	-149,2 ± 1,9
18:1ω9	-68,4 ± 8,7	-70,5 ± 5,1	-75,9 ± 6,0
iso20:0	-159,4 ± 4,0	-169,7 ± 3,2	-163,4 ± 10,5
16:1ω5	-135,1 ± 12,2	-148,2 ± 1,5	-136,5 ± 10,4
cy19:0	-171,7 ± 6,4	-178,2 ± 1,1	-173,9 ± 0,8
n16:0	-116,3 ± 9,0	-108,9 ± 1,2	-112,1 ± 2,8
10Me18:0	-145,9 ± 0,1	-141,5 ± 9,4	-135,6 ± 10,6

 δ D-Messwerte der PLFAs für **HS 3** (Mittelwerte ± Standardabweichung aus drei unabhängigen Wiederholungen); gemessen am Py-GC/IRMS.

*: nur ein Wert wegen niedriger Probenmengen vorhanden



A.9 Vektorplot der PLFA-δD-Änderung

Vektorplot zur Änderung der δ D-Werte der PLFAs von HS 2/3 und HS4 im Untersuchungszeitraum; Anfangswerte und Änderungsvektoren berechnet aus linearer Regression der Messwerte über die Dauer der Untersuchung in Tagen; sortiert nach biosynthetischen Gemeinsamkeiten und Länge.



A.10 pH Bodenwasser

pH-Werte des Bodenwassers aus HS2/3 und HS 4 (Mittelwerte aus 5 und 10cm Tiefe, Standardabweichung als Fehlerbalken) von Januar bis August 2012; aus Daten der AG Gleixner.

A.11 Leitfähigkeit Bodenwasser



Leitfähigkeitswerte des Bodenwassers aus HS2/3 und HS 4 (Mittelwerte aus 5 und 10cm Tiefe, Standardabweichung als Fehlerbalken) von Januar bis August 2012; aus Daten der AG Gleixner.

A.12 Sulfat Bodenwasser

Messwerte der Sulfatkonzentration des Bodenwassers (Mittelwerte aus 2 Messwiederholungen , mit Standardabweichungen < 10^{-3}); aus Daten der AG Gleixner; n.v.: nicht verfügbar.

Probenahme-	Sulfatkonzentration in [mM]					
Datum	HS 2 -5 cm	HS 2 -10 cm	HS 3 -5 cm	HS 3-10 cm	HS 4 -5 cm	HS 4 -10 cm
10. Mrz	0,019	0,059	n.v.	n.v.	n.v.	0,115
24. Mrz	0,052	0,055	0,046	0,050	0,041	0,105
07. Apr	0,064	0,055	0,043	0,051	0,033	0,094
28. Apr	0,067	0,059	n.v.	n.v.	n.v.	0,096

A.13 Einfluss der Silberionen-Chromatographie

IRMS-Messwerte (δ D) verschiedener PLFA-Standards vor und nach Trennung durch Silberionen-Chromatographie (Messwerte aus drei unabhängigen Wiederholungen ± Standardabweichung).

PLFA-Standard	δD vor Trennung	δD nach Trennung
n16:0	-241,2 ± 3,3	-237,8 ± 5,1
n18:0	-250,4 ± 15,5	-250,5 ± 2,2
16:1	-209,8 ± 10,6	-209,7 ± 20,0
18:1	-218,3 ± 8,3	-207,9 ± 10,0



A.14 Peaküberlagerung der C18-MUFAs

Ausschnitt des IRMS-Chromatogramms mit den *18:1*-MUFAs aus HS 4 April; oben: Verhältnis ${}^{3}H_{2}/{}^{2}H_{2}$; unten: gemessene Intensitäten für ${}^{3}H_{2}$ (obere Basislinie) und ${}^{2}H_{2}$ (untere Basislinie).

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all den Personen bedanken, die mir beim Anfertigen dieser Diplomarbeit geholfen haben.

Mein besonderer Dank gilt:

Hr. Prof. Dr. Gerd Gleixner für die Überlassung des interessanten Themas, für die Möglichkeit diese Diplomarbeit in seiner Arbeitsgruppe des Max-Planck-Instituts für Biogeochemie in Jena durchzuführen sowie für die vielen Anregungen und Hilfestellungen.

Hr. Prof. Dr. Frank Grosse für die freundliche Bereitschaft diese extern angefertigte Diplomarbeit als interner Gutachter der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Uni Jena zu betreuen.

Fr. Cindy Tefs und Hr. Prof. Dr. Hermann Jungkunst für die wertvollen Anregungen zur Themenfindung dieser Diplomarbeit.

Hr. Steffen Rühlow für die Einführung in die GC-Py-IRMS, für die Hilfe bei technischen Fragen und für die Wartung der Messgeräte.

Fr. Anne-Gret Seifert und Fr. Stefany Thiessen für die Einführung in die PLFA-Analyse.

Hr. Olaf Kolle für die Bereitstellung der Hainich-Wetter-Daten von der AG Freiland.

Fr. Heike Geilmann für die Durchführung der Pyrolyse/EA-IRMS-Messungen.

Hr. Bert Steinberg und Hr. Dr. Armin Jordan für die Bereitstellung der Hainich-Bodengas-Daten.

Und allen Angehörigen des MPI-BGC, die mir auf die eine oder andere Weise geholfen haben.

Vor allem aber danke ich meinen lieben Eltern, Gabriele und Karl Heinz Karlowsky, für die stete Unterstützung bei meinem Studium.

Ganz besonderer Dank gilt auch meiner liebsten Gantsetseg für die ständige Ermutigung.