Mikrobielle Aktivität in dem huminstoffreichen Moorsee Große Fuchskuhle

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat)

Dem Fachbereich Biologie/Chemie der
Universität Bremen vorgelegt von

Ulrike Burkert

Bremen, 2006

...Vor Jahren ging ein Sturm durch den Wald. Er hauste drei Tage, zauste und wühlte. Eine große Kiefer stürzte ins Wasser, und ihre Krone fiel in die Weihermitte.

Fünf Jahre vergingen; noch liegt die Kiefer im Weiher.
Die Gräser benutzen den Baumstamm als Straße; marschieren auf ihm vom Ufer ins Wasser.

Gestern entdeckte ich auf der vermodernden Kiefernkrone mitten im Weiher ein Weidenröschen, eine rote Blüte über dem Abgrund....

ERWIN STRITTMATTER
Schulzenhofer Kramkalender

Abkürzungen, Einheiten

ABTS	2,2´-Azino-bis (3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure), Diammoniumsalz
BZZ	Bakterielle Zellzahl
BBP	Bakterielle Biomasseproduktion
CARD-FISH	*Catalyzed-Reporter-Deposition-Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisation*: Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung mit Tyramid-Signalverstärkung
CDOC	*chromatographic dissolved organic carbon*: chromatografierbarer gelöster organischer Kohlenstoff
DAPI	4´,6´-Diamidino-2´-phenylindol
DGGE	Denaturierende-Gradienten-Gel-Elektrophorese
DOC	*Dissolved Organic Carbon*: gelöster organischer Kohlenstoff
DOM	*Dissolved Organic Material*: gelöstes organisches Material
ε	Extinktionskoeffizient
FCKW	Fluor-Chlor-Kohlenwasserstoffe
FISH	Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung
HMWA	*High Molecular Weight Acids*: hochmolekulare Säuren
HS	Huminstoffe
LC-OCD	*Liquid Chromatography-Organic Carbon Detection*: Flüssigkeits-chromatographie mit organischer Kohlenstoffdetektion
PCR	*Polymerase-Chain-Reaction*: Polymerase-Ketten-Reaktion
PS	Polysaccharide
SAK	Spektraler Absorptionskoeffizient
U	*Unit*: Einheit

Die wesentlichen Ergebnisse der Dissertation sind in Form von Publikationen zusammengefasst (siehe Artikel I – IV).

Inhaltsverzeichnis Seite

1. **Einleitung.**....3
2. **Zielstellung.**....7
3. **Methoden**....8
   3.1. Das Untersuchungsgewässer Große Fuchskuhle....8
   3.2. Probenahme....12
   3.3. Untersuchungen zur Kennzeichnung des Standortes....13
      3.3.1. Hydrogeologische Untersuchungen....13
      3.3.2. Charakterisierung des DOC....14
      3.3.3. Physikalische und chemische Untersuchungen....14
      3.3.4. Chlorophyll a und Primärproduktion....14
   3.4. Mikrobiologische Untersuchungen....15
      3.4.1. Messung von extrazellulären Peroxidasen und Laccasen....15
      3.4.2. Bakterielle Zellzahl und bakterielle Biomasseproduktion....16
      3.4.3. Heterotrophes Potential....16
   3.5. Strukturanalyse planktischer Bakterienpopulationen....16
   3.6. Statistische Analyse....17
4. **Ergebnisse**....17
   4.1. Untersuchungsgewässer....17
      4.1.1. Hydrogeologie....17
      4.1.2. DOC....20
      4.1.3. Physikalische und chemische Untersuchungen....21
      4.1.4. Chlorophyll a und Primärproduktion....22
   4.2. Mikrobiologische Untersuchungen....23
      4.2.1. Extrazelluläre Enzymaktivität....23
      4.2.2. Bakterielle Zellzahl, bakterielle Biomasseproduktion und heterotrophes Potential....24
   4.3. Strukturanalyse planktischer Bakterienpopulationen....27
5. **Diskussion**....28
6. **Zusammenfassung**....34
7. **Literaturverzeichnis**....36
8. **Anhang**....44
9. **Artikel**....49

1. Einleitung

Dystrophe Gewässer sind durch einen hohen Anteil gelösten, organischen Materials (DOM) gekennzeichnet (Sarvala et al. 1981, Wetzel 1983, Hessen et al. 1990). Ein wesentlicher Teil des organischen Materials ist der gelöste organische Kohlenstoff (DOC), der sich aus unterschiedlichen Verbindungen zusammensetzt und in folgende Gruppen unterteilt wird: Huminstoffe, hydrophile Säuren, Kohlenhydrate, Karbonsäuren, Aminosäuren und Kohlenwasserstoffe (Thurman 1985). Davon stellen allein die hier thematisch und für eine Reihe von Untersuchungen ausgewählten Huminstoffe (HS) mit ihren beiden Komponenten Fulvin – und Huminsäure den quantitativ größten Anteil von etwa der Hälfte des DOC in Gewässern dar (Thurman 1985, Münster 1985).

Die primäre Eintragsquelle für Huminstoffe (allochthone Stoffe) in Gewässer sind nach Arvola et al. (1990), Hemond (1990) und Mulholland et al. (1990) terrestrische Ökosysteme. Hiernach haben Einzugsgebiete für Gewässer eine erhebliche Bedeutung, da sie deren Stoffhaushalt, insbesondere die DOC Qualität, nachhaltig beeinflussen. So wiesen Mulholland & Hill (1997) einen deutlichen Einfluss des Einzugsgebietes auf saisonale Veränderungen in DOC Konzentrationen in Flüssen nach. Dabei hängt der Einfluss des Einzugsgebietes von den jeweiligen hydrogeologischen Gegebenheiten im Gelände ab. So neigen vor allem Feuchtgebiete wie die Moore im Unterschied zu mineralischen Böden zu höheren Wassereinträgen in Gewässer (Mulholland & Kuenzler 1979; Hemond 1990). Außerdem spielen Moore eine essentielle Rolle bei der Regulation von Oberflächenwasser (Succow & Jeschke 1986), wie u.a. von Soulsby et al. (2002) durch hydrologische Untersuchungen im schottischen Hochland belegt wurde.

Neben den eingetragenen Huminstoffen (allochthone Stoffe) können diese auch durch physiko-chemische Prozesse (Tranvik & Kokalj 1998) und biologische Aktivität im Gewässer selbst gebildet werden (autochthone Stoffe) (Claus et al. 1999).

Die an der Genese von Huminstoffen potentiell beteiligten verschiedenen biologischen, chemischen und physikalischen Prozesse lassen sich wie folgt zusammenfassen: Einerseits können sie über den Abbau hochmolekularer Verbindungen wie Lignin durch Photooxidation (Argyropoulos & Sun 1996, Vähätalo et al. 1999), aber auch durch mikrobielle Enzymsysteme (Dagley et al. 1960, Hofrichter et al. 1999, Chamuris et al. 2000) entstehen. Andererseits ist auch die Polymerisation niedrigmolekularer Stoffe zu hochmolekularen Huminstoffen möglich. Dies erfolgt entweder biotisch durch Enzyme (Stevenson 1982, Piccolo 2000) oder abiotisch über die Maillard Reaktion (Maillard 1912, Ziechmann 1994).

Huminstoffe werden in der Literatur häufig als komplexe Makromoleküle bezeichnet, die Molekülgrößen von 1 000 000 Da und darüber hinaus erreichen können (Schulten & Schnitzer 1993, Swift 1989). Jüngere Untersuchungen deuten jedoch darauf hin, dass relativ große Moleküle durch eine Assoziation kleinerer Komponenten mit potentiell makromolekularen Eigenschaften entstehen können (Piccolo et al. 1996, 1999, Wershaw 1999, Simpson et al. 2002). Burdon (2001) schlägt darüber hinaus eine Assoziation aus rein pflanzlichen und mikrobiologischen Verbindungen sowie deren Abbauprodukte vor. Desweiteren führt Burdon aus, dass diese Komponenten bei gewissen Umweltbedingungen aggregieren und dann im weiteren Verlauf wieder umgesetzt bzw. verwertet werden. Inwieweit die einzelnen angeführten Prozesse im Boden und in Gewässern an der Genese beteiligt sind und inwieweit bisherige hochkomplexe, rekalzitrante Strukturvorstellungen realistisch sind, bleibt bislang offen und wird erst nach einer Reihe weiterer grundlegender Untersuchungen zu klären sein. Jedoch ist bei der Genese von Huminstoffen davon auszugehen, dass aufgrund des Zusammenspiels zahlreicher Umweltfaktoren in Böden und Gewässern synergistische Effekte eine Rolle spielen. Dabei entstehen Huminstoffe in großer Heterogenität, jedoch mit einheitlicher Funktionalität (Frimmel & Christman 1988).
Wegen ihrer besonderen Eigenschaften greifen Huminstoffe auf unterschiedliche Weise direkt oder indirekt in den Stoffumsatz von Gewässern ein (siehe Steinberg (2003) und Keskitalo & Eloranta (1999)). Eine indirekte Wirkung liegt beispielsweise vor, wenn sie aufgrund ihrer Färbung die Eindringtiefe des photosynthetisch wirksamen Lichtes verringern, somit die Primärproduktion des Phytoplanktons verringern und sich auf die Exsudation und folglich auch auf den Substratpool für Mikroorganismen auswirken. Des weiteren können Huminstoffe die Verfügbarkeit von Substraten im Gewässer durch Maskierung beeinflussen (DUDLEY & CHURCHILL 1995, STEWART & WETZEL 1982). Ein weiterer, ganz wesentlicher Gesichtspunkt ist die Erkenntnis, dass Huminstoffe zur Aktivierung (Münster et al. 1998 b) oder zur Hemmung extrazellulärer Enzyme (Ladd & Butler 1975, Pflug 1980, Serban & Nissenbaum 1986) führen können.

Neben diesen indirekten Einflüssen auf den Stoffumsatz sind Huminstoffe direkt am Stoffffluss beteiligt. Sie galten lange Zeit als persistent (STEINBERG & MÜNSTER 1985), ein nur langsamer mikrobieller Abbau wurde daher vermutet.

Erst in den letzten Jahren zeigte sich die Bedeutung von Huminstoffen für mikrobielle Aktivitäten in dystrophen Gewässern. Dabei wurde die Nutzung bzw. Verwertung von Huminstoffen für die bakterielle Produktion von Biomasse nachgewiesen (Tranvik 1988).

Hessen (1985) wies einen engen, direkten Zusammenhang zwischen bakterieller Biomasse und Huminstoffkonzentrationen in dystrophen Gewässern Skandinaviens nach.

Da nur Huminstoffe bis zu einer Größe von ungefähr 1,0 kDa von Organismen aufgenommen werden können (Visser 1985, Beer et al. 2000, Steinberg et al. 2003), größere Moleküle jedoch für die Cytoplasmamembran wahrscheinlich impermeabel sind (Payne & Gilvarg 1969, Decad & Nikaido 1976), ist ein Abbau von hochmolekularen Verbindungen durch extrazelluläre Enzyme zu kleineren Molekülen notwendig. An diesem Abbau können beispielsweise extrazelluläre Laccasen und Peroxidasen beteiligt sein. Extrazelluläre Peroxidasen katalysieren in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid sowohl die Oxidation alifatischer als auch aromatischer Verbindungen unter Bildung instabiler, freier Radikale. Die entstandenen Radikale können dann im weiteren Verlauf spontan chemische Reaktionen eingehen, durch die die alifatischen und aromatischen Bindungsverhältnisse innerhalb der Molekülstruktur aufgelöst werden.

Typische Mikroorganismen, die sich am Abbau bzw. der Verwertung von Huminstoffen durch die Bildung von extrazellulären Peroxidasen beteiligen, sind vor allen Dingen bodenbesiedelnde Weißfäulepilze. Einige Vertreter aus der Gruppe der Aktinobakterien z.B. *Streptomyces* sp. (Ramachandra et al. 1988, Yee et al. 1996) oder aus der Gruppe der Gammaproteobakterien wie *Pseudomonas* sp. (Woo et al. 2000, Mishustin & Nikitin 1961) können ebenfalls, allerdings zu einem geringeren Maße, beteiligt sein. Organismen, die in der Lage sind, extrazelluläre Peroxidasen zu bilden, sind bisher nur aus der Bodenkunde bekannt. In aquatischen Ökosystemen wurden in einigen wenigen Untersuchungen Aktivitäten von Peroxidasen nachgewiesen (Münster et al. 1998 a, Sinsabaugh et al. 1992).

Der Moorsee Große Fuchskuhle ist als Modellgewässer für Untersuchungen von mikrobieller Aktivität vor dem Hintergrund unterschiedlicher DOC Qualitäten aufgrund des relativ kleinen, geologisch differenten Einzugsgebietes und der Besonderheit der vor etwa 15 Jahren vorgenommenen Vierteilung (Koschel 1995) geeignet. In einer Reihe phänomenologischer Untersuchungen wurden die durch die Teilung entstandenen Unterschiede zwischen den Kompartimenten auf verschiedenen Ebenen im Ökosystem nachgewiesen (Bittl & Babenzien 1996, Simek et al. 1998, Hehmann et al. 2001). So zeigten diesbezüglich mikrobiologische Untersuchungen deutliche Unterschiede in der Intensität des Biopolymerabbaus durch extrazelluläre Enzyme, wie den Glucosidasen, Aminopeptidasen und Phosphatasen (Bittl 1999).

Als eine wesentliche Ursache für die unterschiedliche Entwicklung der Kompartimente sehen Sachse et al. (2001) den Einfluss des Einzugsgebietes auf dieses Gewässer, dass sowohl durch einen allochthon als auch authochthon geprägten Gewässerbereich gekennzeichnet ist. An die bisherigen Arbeiten anknüpfend, sind vertiefende hydrogeologische Untersuchungen erforderlich, um den Einfluss des Einzugsgebietes auf die unterschiedliche Entwicklung der Kompartimente spezifizieren zu können. Sinnvoll wäre hierbei die Bilanzierung des Wasserhaushaltes und die Ortung von Grundwasserströmen im Einzugsgebiet der Großen Fuchskuhle und im Gewässer.

Von den verschiedenen DOC Qualitäten und den unterschiedlichen Aktivitätsmustern der Mikroorganismen in den einzelnen Kompartimenten ausgehend, ergibt sich die Frage nach den Zusammenhängen zwischen DOC Pool, mikrobieller Aktivität und Struktur natürlicher Bakterienpopulationen in der Großen Fuchskuhle. Hierbei ist insbesondere der Einfluss von hochmolekularen Verbindungen wie von Huminstoffen auf die Mikroflora von Interesse.

2. Zielstellung

Der vorliegenden Arbeit liegen folgende Ziele zu Grunde:

- Hydrogeologische Untersuchungen in der Großen Fuchskuhle und im Einzugsgebiet sollten vorgenommen werden, um den Einfluss des Einzugsgebietes auf den See abschätzen zu können. Zwischen Einzugsgebiet und Gewässer sollten saisonale Ein – bzw. Austräge von DOC und dessen Fraktionen bilanziert werden, so dass die Bedeutung der allochthonen bzw. autochthonen Komponenten eingeschätzt werden kann.

- Der DOC-pool in zwei Kompartimenten und in den jeweils angrenzenden Einzugsgebieten sollte mit Hilfe der LC-OCD Technik charakterisiert werden. Dabei ist es von Interesse, die einzelnen detektierbaren DOC Fraktionen zu qualifizieren und quantifizieren und eventuell auftretende saisonale Unterschiede aufzuzeigen.

- In zwei Kompartimenten und in den jeweils angrenzenden Einzugsgebieten sollte die mikrobielle Aktivität insbesondere im Hinblick auf die Nutzung/Verwertung hochmolekularer aromatischer Verbindungen untersucht werden. Hierbei ist es von Interesse, ob sich Unterschiede in extrazellulären, lignolytischen Enzymmustern zwischen den Kompartimenten zeigen, und ob sich diese mit den unterschiedlichen DOC-pools verknüpfen lassen.

- Aus den oben genannten Zielstellungen ergibt sich die Frage nach Unterschieden in der Struktur der Bakterienpopulationen vor dem Hintergrund unterschiedlicher DOC-pools. Dabei sollten saisonale Veränderungen in der Zusammensetzung des Bakterioplanktons mittels moderner molekularbiologischer Techniken wie Klonierung und FISH aufgezeigt werden.

- Aus dem Vergleich der unterschiedlichen Kompartimente hinsichtlich ihrer mikrobiologisch/limnologischen Parameter sollte der Frage nachgegangen werden, ob die Intensität und Richtung der gewässerinternen Vorgänge mit den externen Einflüssen korrelieren.

3. Methoden

3.1. Das Untersuchungsgewässer Große Fuchskuhle

Die Große Fuchskuhle (53°10´ N, 13°02´ O geographische Breite bzw. Länge, 59 m ü. NN) befindet sich im Naturpark Stechlin –Ruppiner Land zwischen den Ortschaften Menz und Rheinsberg im Bundesland Brandenburg, etwa 100 km nördlich von Berlin (Abb.1).

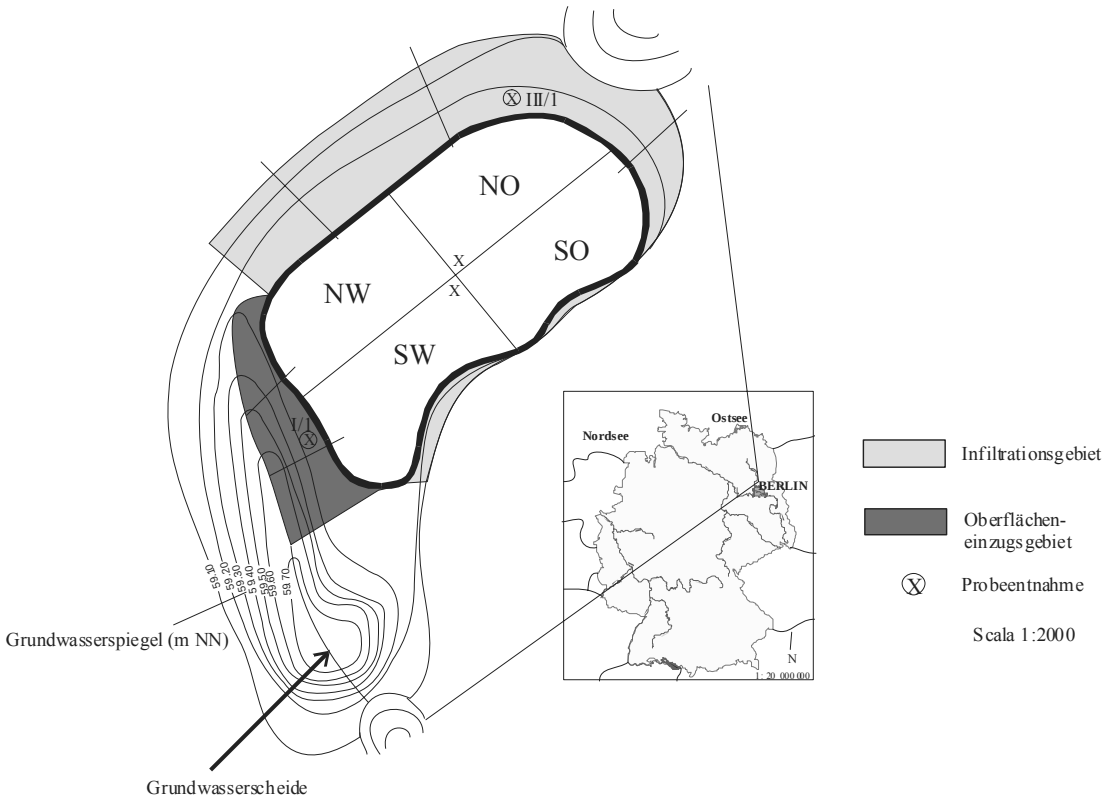

Abb.1. Die Große Fuchskuhle: Standort des Sees in der Mecklenburger-Brandenburger Seenplatte Nordostdeutschlands und Hydrologie des Einzugsgebietes und der Kompartimente (hydrologische Grafik von Sachse et al. 2001 wurde modifiziert)

Die Große Fuchskuhle und das angrenzende Moor sind in der letzten Eiszeit aus einer Resteisrinne durch Abschmelzen eines Toteisblockes entstanden. Der Moorkörper ist im Südwestbereich sehr mächtig, hingegen im Nordosten sehr schmal. Das Gewässer ist nicht direkt mit dem Grundwasserleiter verbunden, sondern wird durch Oberflächenwasser und Niederschläge gespeist.

Die Große Fuchskuhle ist mit einer Fläche von 0,02 Km^2 ein kleines Gewässer mit einem überschaubaren Einzugsgebiet (Tab.1).

Tab.1. Limnologische Parameter der Großen Fuchskuhle (nach Kasprzak 1993, Burkert et al. 2004)

	vor Teilung		nach Teilung			
	Große Fuchskuhle		**SW**	**NW**	**NO**	**SO**
Fläche [m^2]	14 930		4 430	3 680	3 360	3 460
Volumen [m^3]	53 000		9 700	10 630	11 300	9 940
Mittlere Tiefe [m]	3,3		2,2	2,8	3,3	2,8
Max. Tiefe [m]	5,5		4,5	5,0	5,5	4,9
Trophie	eutroph und dystroph		eutroph und dystroph	eutroph und dystroph	eutroph	eutroph
Einzugsgebiet [m^2]	5 000		3 000	2 000	0	0

Für Biomanipulationsexperimente wurde der See mittels Kunststofffolien im Jahre 1989 in die vier Kompartimente (Südwest (SW), Nordwest (NW), Südost (SO), Nordost (NO)) geteilt (KASPRZAK 1993, Koschel 1995) (Abb.1).

Aufgrund eines hydrogeologischen Fließgefälles von SW nach NO fließt Oberflächenwasser aus dem Moorkörper in die SW und NW Kompartimente (Sachse et al. 2001). Die NO und SO Kompartimente hingegen werden nicht vom Moorkörper gespeist. Aus diesen Kompartimenten fließt das Wasser in den angrenzenden Moorkörper (Sachse et al. 2001).

Abb.2. Die Große Fuchskuhle und ihre Kompartimente (Blick vom Nordost Becken, Foto U. Burkert)

Wegen der Vierteilung und der damit verbundenen geringeren Durchmischungstiefe bildet sich in der Fuchskuhle während der Vegetationszeit ein Metalimnion zwischen 2 und 3

Metern Tiefe aus. Meta – und Hypolimnion des Sees sind im Gegensatz zum früheren ungeteilten Zustand des Gewässers zu dieser Zeit überwiegend anoxisch.

Neben diesen gravierenden Veränderungen zeigen sich die Auswirkungen der Teilung auch auf anderen Ebenen des Ökosystems. Schon die anhand von entnommenen Wasserproben aus den jeweiligen Kompartimenten sichtbare Färbung deutet auf unterschiedliche Stoffhaushalte und Prozesse hin (Abb.3).

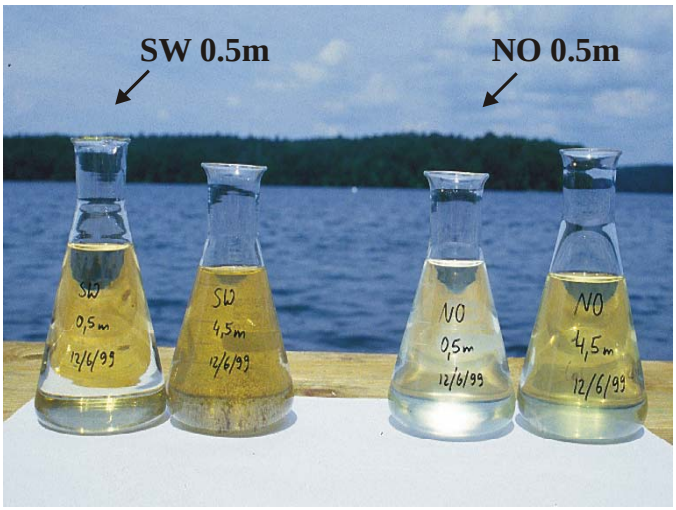

Abb.3. Wasserproben aus den Kompartimenten der Großen Fuchskuhle

So entwickelte sich der pH Wert im Oberflächenwasser der Fuchskuhle in den einzelnen Becken sehr unterschiedlich und weicht teilweise 1- 2 Stufen voneinander ab (Koschel 1995, Bittl 1999). Im ungeteilten See lag der pH Wert zwischen 4,2 – 4,6 (Kasprzak et al. 1988). Jetzt nach der Teilung befinden sich die westlichen Teile des Gewässers in einem sauren Zustand (pH 4 – 5), hingegen die östlichen Teile in einem Zustand von leicht sauer bis neutral (pH 5 – 7) (Abb.4).

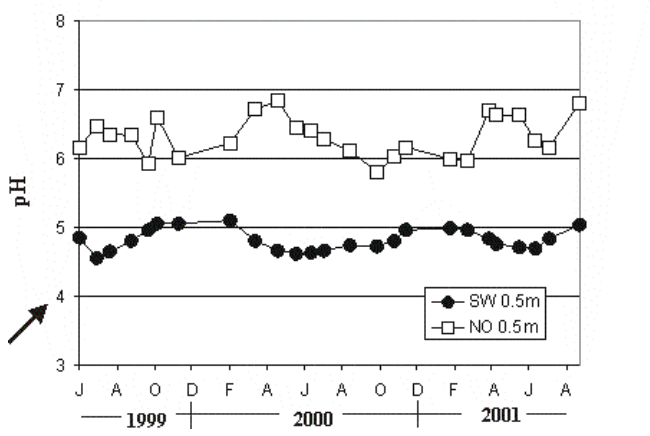

Abb.4. pH-Wert Entwicklungen in den SW und NO Kompartimenten der Großen Fuchskuhle zwischen 1999 und 2001 in 0,5m Tiefe. Der Pfeil deutet auf den pH Bereich (pH 4,2 – pH 4,6 in 0 – 2,5 m Tiefe) der Großen Fuchskuhle vor der Teilung hin

Die Charakterisierung des Kohlenstoffpools zeigt, dass in den östlichen Teilen der DOC durch einen geringeren Anteil an Huminstoffen und einen deutlich höheren Anteil von Polysacchariden gekennzeichnet ist (Bittl 1999, Sachse et al. 2001) (Abb.5). Die westlichen Kompartimente hingegen sind durch einen höheren Anteil an Huminstoffen und einen geringeren Anteil von Polysacchariden gekennzeichnet. Die östlichen Teile sind somit huminstoffärmer und die westlichen huminstoffreicher.

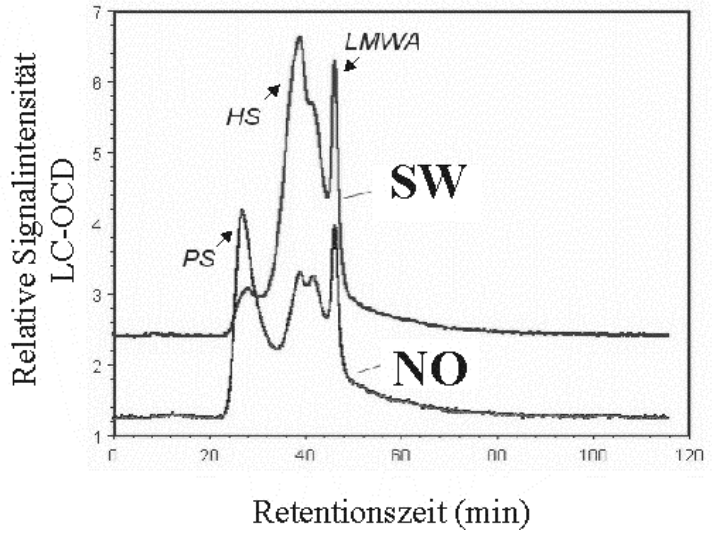

Abb.5. DOC Fraktionen per LC-OCD Messungen im SW und NO Kompartiment. HS – Huminstoffe, PS – Polysaccharide, LMWA – niedrigmolekulare Säuren

Diese Erkenntnisse weisen darauf hin, dass der DOC in den huminstoffärmeren Kompartimenten durch die Aktivität des Phytoplanktons bestimmt wird und die Entstehung des DOC daher auf autochthone Prozesse zurückzuführen ist. Dies wird durch höhere Chlorophyll a Konzentrationen bestätigt, die mit höheren bakteriellen Zell – und Biomassebildungen sowie höheren mikrobielle Aktivitäten (hoher Turnover von Glucose) einhergehen (Simek et al. 1998, Bittl & Babenzien 1996). Im Gegensatz dazu werden die huminstoffreicheren Kompartimente aus dem angrenzenden Moor gespeist und können daher als allochthon charakterisiert werden.

Extrazelluläre Enzymaktivitäten der L-Leucinaminopeptidasen, α-D-Glucosidasen und ß-D-Glucosidasen zeigten signifikant höhere Aktivitäten im huminstoffreicheren SW Kompartiment als im huminstoffärmeren NO Kompartiment, ein Indiz dafür, dass beispielsweise Proteine, Stärke und Cellulose intensiv mikrobiell umgesetzt werden (Bittl 1999).

Weiterhin unterscheiden sich die einzelnen Kompartimente auch auf höheren trophischen Ebenen sowie in der Zusammensetzung des Nahrungsnetzes (HEHMANN & KRIENITZ 1996, Hehmann et al. 2001, Simek et al. 1998).

Die beschriebenen Unterschiede sind zwischen den Kompartimenten SW und NO am stärksten, sie wurden daher für diese Untersuchung ausgewählt (Abb.1).

3.2. Probenahme

Die Probenahme aus beiden Kompartimenten erfolgte über eine in der Gewässermitte vorhandene Plattform (Abb.2), von der aus die Wasserproben aus einer Tiefe von 0,5 m entnommen wurden. Im angrenzenden Gebiet an die Große Fuchskuhle wurden zwei Standorte für Probenahmen ausgewählt. Standort I/1 befindet sich im Einzugsgebiet des SW Kompartimentes, Standort III/1 befindet sich im Austrittsgebiet des NO Kompartimentes (Abb.1). Die Proben wurden aus in unterschiedlichen Tiefen (zirkulierendes Oberflächenwasser und Tiefenwasser) gesetzten Brunnen (Brunnen I/1 und Brunnen III/1) im Einzugsgebiet gezogen.

3.3. Untersuchungen zur Kennzeichnung des Standortes

3.3.1. Hydrogeologische Untersuchungen (Artikel II)

Die Grundwasserstände im Einzugsgebiet und der Wasserstand im Gewässer wurden im zweiwöchigen Intervall gemessen. Da es im Einzugsgebiet der Fuchskuhle keinen oberirdischen Abfluss gibt und der unterirdische Abfluss nicht messbar ist, werden diese beiden Größen nach einer Formel berechnet, die aus dem Darcy-Gesetz (Dyck & Peschke) hergeleitet wird:

$$Q = B \times M \times G \times K_f$$

Q – Wassermenge [m^3]
B – Durchflussbreite [m]
M – Mächtigkeit der wasserführenden Schicht [m]
G – Gefälle [$^o/_{oo}$]
K_f – Permeabilitätskoeffizient [m/s]

Die Bilanzierung des Wasserhaushaltes erfolgte nach der vereinfachten, allgemeinen Wasserhaushaltsgleichung:

0 = Niederschlag + Verdunstung + Abfluss ± Grundwasservorratsänderung

Die Niederschlagsmengen, die für die Große Fuchskuhle herangezogen wurden, stammen vom Deutschen Wetterdienst, Messstelle Neuglobsow oder wurden aus den durchschnittlichen Niederschlagsmengen der letzten 40 Jahre (1962-2001) (Richter 1997) berechnet.

Die geologischen Untersuchungen des Torfkörpers wurden durch eine Kernbohrung an 25 Probenahmepunkten im Einzugsgebiet und anschließender Bestimmung der botanischen Zusammensetzung und des Zersetzungsgrades anhand morphologischer Kriterien durchgeführt (Präcker 2001).

3.3.2. Charakterisierung des DOC (Artikel IV)

Die Quantifizierung und Qualifizierung des DOC erfolgte mittels eines Größenausschluss-chromatographen, kombiniert mit einer UV - und einer organischen Kohlenstoffdetektion (LC-OCD) nach Huber & Frimmel (1991, 1996) und Sachse et al. (2001). Dadurch konnten die folgenden vier unterschiedlichen chromatographierbaren DOC (CDOC) Fraktionen unterschieden und quantifiziert werden: Huminstoffe (HS), Polysaccharide (PS), niedrig molekulare Säuren (LMWA) und „andere" (Proteine und Aminosäuren). In der Poly-saccharid- Fraktion wurden alle UV inaktiven Anteile zusammengefasst. Als Nachweis-grenzen hinsichtlich der Quantifizierung der einzelnen Fraktionen wurden ermittelt: 0,3 mg l^{-1}C für CDOC, 0,2 mg l^{-1}C für HS, 0,02 mg l^{-1} C für PS, 0,15 mg l^{-1}C für LMWA und 0,1 mg l^{-1} C für die Fraktion "andere".

3.3.3. Physikalische und chemische Untersuchungen (Artikel II)

Temperatur, Leitfähigkeit, Sauerstoffkonzentrationen und pH-Wert wurden am Standort mit Messsonden (WTW wissenschaftlich technische Werkstätten, Weilheim) gemessen. Die Sichttiefe wurde mittels einer Secchi-Scheibe mit einem Durchmesser von 28 cm unter Verwendung eines Sichtrohres ermittelt. Der Gesamtphosphor und Gesamtstickstoff wurden mit einem Perstop Injektions-Analyse-System (TECA FIA STAR 5010/5030) gemessen. Die Nachweisgrenzen liegen für Gesamtphosphor bei 0,005 mg l^{-1} und für Gesamtstickstoff bei 0,01 mg l^{-1}. Die Wasserfarbe (SAK 436) wurde gemäß des europäischen Standards (EN ISO 7887:1994) ermittelt. Die Bestimmung der Färbung des Wassers und des Anteils ungesättigter, aromatischer Strukturen (beispielsweise Huminstoffe) erfolgte durch Absorptionsmessungen bei λ=436nm bzw. λ=254nm an einem Beckman Spektralphotometer DU 650. Die Phosphor - und Stickstoffmessungen wurden durch das Labor Chemische Analytik & Primärproduktion (Prof. Koschel) durchgeführt.

3.3.4. Chlorophyll a und Primärproduktion (Artikel IV)

Die Konzentration von Chlorophyll a wurde spektrophotometrisch (LAMDA 2 Perkin-Elmer Spektrophotometer) nach der Acetonextraktion bestimmt und nach Strickland & Parsons (1968) berechnet. Die Primärproduktion wurde mit der ^{14}C - Methode und einer Exposition von 30 min zwischen 10.00 und 11.00 Uhr vormittags nach Köhler et al. 1999 durchgeführt. Die Chlorophyll a Bestimmung und die Primärproduktionsmessung erfolgte durch das Labor Chemische Analytik & Primärproduktion (Prof. Koschel).

3.4. Mikrobiologische Untersuchungen

3.4.1. Messung von extrazellulären Peroxidasen und Laccasen (Artikel IV)

Die Aktivitätsbestimmung extrazellulärer Peroxidasen (EC 1.11.1.7) und Laccasen (EC 1.10.3.2) erfolgte photometrisch mit dem Chromogen ABTS (Abb.6) (Wolfenden & Willson 1982, Childs & Bardsley 1975, Heinzkill 1995). Die Oxidation des ABTS wurde bei 405 nm (ε_{405} = 3.68 x 10^4 M^{-1} cm^{-1}) mit einem Rainbow Reader (Tecan, Crailsheim) gemessen. Für die Bestimmung der extrazellulären Peroxidasen wurde das Reaktionsgemisch mit Wasserstoffperoxid versetzt, für die Bestimmung extrazellulärer Laccasen wurde das Reaktionsgemisch hingegen mit autoklaviertem H_2O_{dest} versetzt. Die Aktivität der Peroxidasen wurde dann anschließend gegen die Laccase Aktivität korrigiert.

Zur Charakterisierung extrazellulärer Peroxidasen wurde die pH Abhängigkeit untersucht und die Molekülgrößen abgeschätzt. Für die Bestimmung des pH Optimums kam im sauren Bereich Phthalsäure und im basischen Bereich Boratpuffer zum Einsatz.

Für die Abschätzung der Molekülgrößen wurde Standortwasser mittels Ultrafiltration (Pro Vario-3, Filtron) in vier Größenklassen fraktioniert: < 1.2µm, 0.2µm – 10kDa, 10 –1 kDa, < 1kDa. Die anschließende Messung extrazellulärer Peroxidaseaktivitäten erfolgte wie bereits oben beschrieben per ABTS Messung.

$$2ABTS + H_2O_2 \xrightleftharpoons[2\,H+]{\text{Peroxidase}} 2\,H_2O + 2ABTS^{+}$$

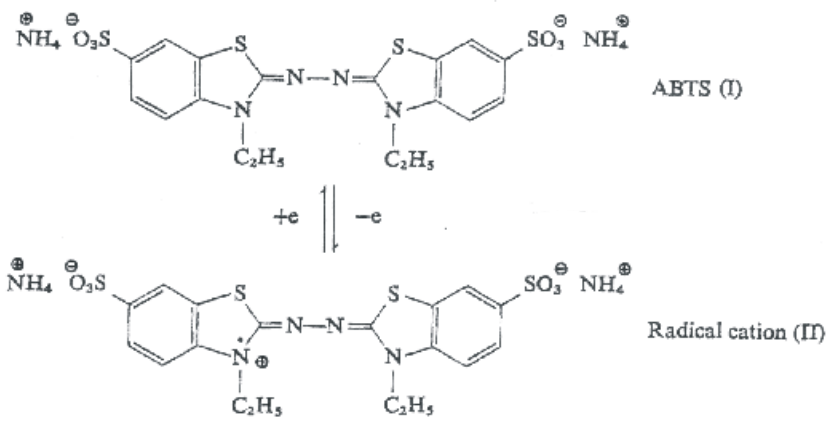

Abb.6. Reaktionsschema von extrazellulären Peroxidasen anhand des Chromogens ABTS (Childs & Bardsley 1975)

Die photometrische Bestimmung der extrazellulären Peroxidaseaktivitäten mittels ABTS als Chromogen stellte sich als einfach durchführbar, zuverlässig und damit für den Nachweis von Peroxidasen im Gewässer als geeignet heraus.

3.4.2. Bakterielle Zellzahl und bakterielle Biomasseproduktion (Artikel IV)

Die bakterielle Zellzahl wurde durch das Anfärben der Zellen mit 4´,6´-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) nach Porter & Feig (1980) bestimmt. Die anschließende Zählung und Auswertung erfolgte mit einem Epifluoreszenzmikroskop (Leica DMRB) kombiniert mit einem Bildanalysesystem (IMAGE P2, Kamera KAPPA, H&K Berlin).

Die Bestimmung der bakterielle Biomasseproduktion erfolgte durch die Messung (Szintilationsmessgerät, Canberra-Packard 1900 TR) von aufgenommenen [^{3}H]Leucin (Amersham), welches in bakterielles Protein eingebaut wurde (Kirchman et al. 1985, Simon & Azam 1989).

3.4.3. Heterotrophes Potential (Artikel IV)

Die Abschätzung des Umsatzes leicht, aufnehmbarer, gelöster organischer Verbindungen erfolgte durch die kinetische Aufnahme von [U-^{14}C] Glucose (Amersham) in heterotrophe Bakterien nach Wright & Hobbie (1966) und Babenzien & Babenzien (1985). Die Inkubation wurde für 1- 2 Stunden bei in situ Temperaturen vorgenommen und die Messung erfolgte mit dem Szintilationsmessgerät (Canberra-Packard 1900 TR) .

3.5. Strukturanalyse planktischer Bakterienpopulationen (Artikel III)

In einem Anreicherungsexperiment (batch-Versuch) wird geprüft, ob sich die Bakterienflora unter definierten Laborbedingungen in der Struktur und Aktivität verändert. Dazu wurde Standortwasser des SW Kompartimentes mit einem Inokulum vom SW bzw. NO Kompartiment versetzt und verschiedene physikalische und chemische Parameter wie pH, Temperatur, Leitfähigkeit und DOC Quantität / Qualität und mikrobiologische Parameter wie BZZ und BBP während einer zweiwöchigen Inkubationsdauer aufgenommen und verfolgt. Die Veränderung in der Struktur der Bakterienpopulationen wurde mit Hilfe der Klonierung (Erstellung von Genbanken), Sondendesign und anschließender Auswertung durch die Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH) bzw. Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung mit Tyramid-Signalverstärkung (CARD-FISH) nach Kirchman et al. (2001), Pernthaler et al.

(2001, 2002) und nach Sekar et al. (2003) verfolgt. Zusätzlich wurden mittels spezifischer Sonden zwei Bakterienpopulationen, die β-Proteobakterien und die Aktinobakterien im Jahresgang im SW und NO Kompartiment der Großen Fuchskuhle untersucht (Glöckner et al. 2000).

3.6. Statistische Analyse

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Softwareprogramm SPSS 9 für Windows. Der Vergleich beider Kompartimente hinsichtlich eines Parameters bzw. die Bestimmung der Korrelation zweier Parameter innerhalb eines Kompartimentes erfolgte mit dem parametrischen t-Test. Für die Berechnung der Korrelation zwischen Primärproduktion und bakterieller Produktion im Untersuchungsjahr 2000 wurde das Bestimmtheitsmaß (Quadrat des Pearsonschen Korrelationskoeffizienten) ermittelt.

4. Ergebnisse

4.1. Untersuchungsgewässer

4.1.1. Hydrogeologie

Die hydrogeologischen Untersuchungen ergaben einen Einblick in die Genese von Gewässer und Einzugsgebiet (Artikel II):

- Während der eiszeitlichen Formung bildeten sich zwei Grundwasserleiter: ein lokaler Torfgrundwasserleiter und ein regionaler Sandgrundwassserleiter (Abb.7). Beide Grundwasserleiter verlaufen unabhängig voneinander; ein Austausch findet somit zwischen ihnen nahezu nicht statt. Aufgrund eines hydrologischen Südost-Gefälles werden nur die beiden westlichen Kompartimente der Großen Fuchskuhle vom Torfgrundwasserleiter gespeist. Die beiden östlichen Kompartimente hingegen entwässern in den angrenzenden Torfkörper und haben somit keinen Kontakt zum lokalen Torfgrundwasserleiter.
- Während des Untersuchungszeitraumes 2000 und 2001 flossen 715 m^3 /Jahr Grundwasser vom Mooraquifer in die Große Fuchskuhle. Davon erreichten 429 m^3 /Jahr das SW Kompartiment und 286 m^3 /Jahr das NW Kompartiment (Tab.2). Aus dem SW und NW Kompartiment flossen 250 m^3 /Jahr bzw. 228 m^3 /Jahr in den angrenzenden Moorkörper. Die NO und SO Kompartimente wurden nicht vom

Mooraquifer gespeist, aber entwässerten 260 m^3 /Jahr bzw. 352 m^3 /Jahr in das angrenzende Moor (Tab.2).

Tab. 2. Wasserbilanz von den Kompartimenten der Großen Fuchskuhle und dem Einzugsgebiet

	Große Fuchskuhle	SW Kompartiment	NW Kompartiment	NO Kompartiment	SO Kompartiment
Einzugsgebiet (Mooraquifer) (m^2)	5.000	3.000	2.000	0	0
Grundwasser aus Mooraquifer (m^3/Jahr) **	715	429	286	0	0
Grundwasseraustritt aus See bzw. Kompartiment in Mooraquifer (m^3/Jahr)**	1.090	250	228	260	352
Oberflächenwasser-eintrag (m^3/Jahr) *	1.229	-	-	-	-
Leakage Effekt (Zufluss durch Hauptaquifer, m^3/Jahr)	854 ***	-	-	-	-

* Kalkulation auf durchschnittliche Niederschlagsmengen der letzten 40 Jahre basierend (1962-2001)

** Kalkulation durch Darcy Gesetz, Messungen 2000/2001

*** inklusive Einzugsgebiet

- Es zeigte sich, dass der an die Fuchskuhle angrenzende Boden in zwei unterschiedliche geologische Gebiete unterteilt werden kann: den meso - bis eutrophen Torfkörper im Nordwesten und den meso - bis oligotroph-sauren Torfkörper im Südosten. Dementsprechend war die Vegetation im Nordwesten durch einen tendenziell eutroph geprägten Bewuchs (u.a. *Carex* sp., *Phragmites* sp.) und der Südosten durch einen oligotroph sauren (u.a. *Sphagnum* sp.) Charakter geprägt.
- DOC – , Phosphor – und Stickstoffuntersuchungen im Gewässer und im Einzugsgebiet zeigten, dass während hoher Grundwassereinträge in das SW Kompartiment entsprechend höhere DOC - und Nährstoffkonzentrationen in diesem Gewässerteil vorlagen (Abb.8).

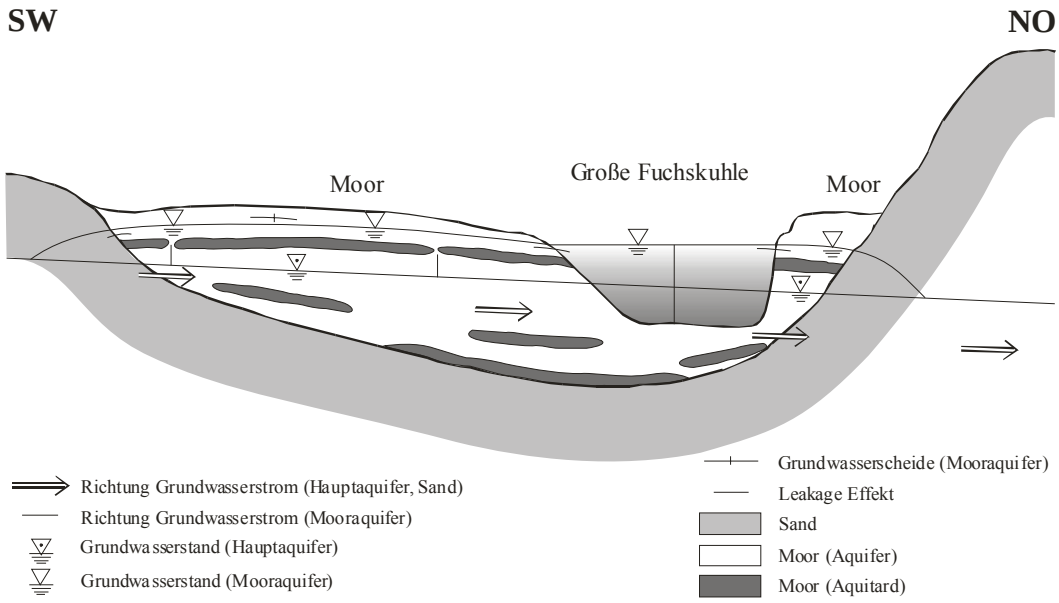

Abb.7. Querschnitt durch die Große Fuchskuhle und dem angrenzenden Torfkörper mit Darstellung der Grundwasserleiter (Schema)

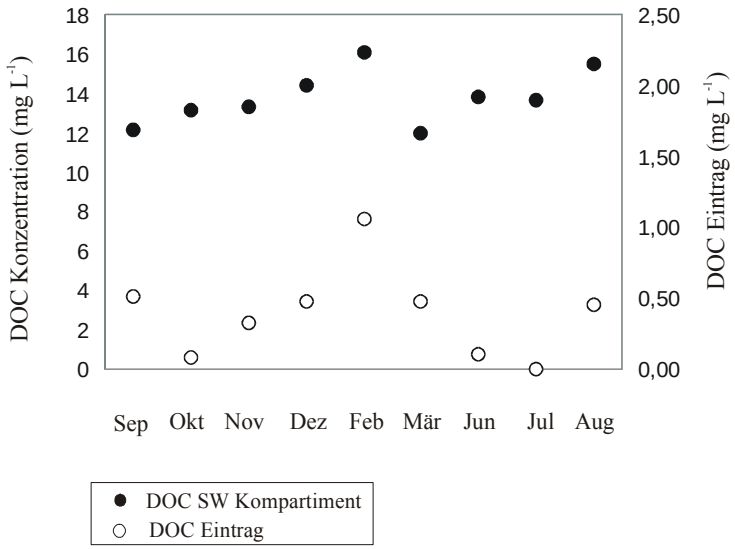

Abb.8. DOC Konzentrationen im SW Kompartiment und Eintrag von DOC durch das Einzugsgebiet in das SW Kompartiment

4.1.2. DOC

Die DOC-Untersuchungen ergaben folgendes (Artikel IV):

- Die detektierten DOC Konzentrationen im SW Kompartiment lagen zwischen 12,0 und 16,2 mg l^{-1} und im NO Kompartiment zwischen 10,0 und 11,9 mg l^{-1}. Im Brunnen I/1 (im Einzuggebiet des SW Kompartiments) lagen die DOC Konzentrationen zwischen 56,3 und 64,2 mg l^{-1} und im Brunnen III/1 (Infiltrationsgebiet des NO Kompartimentes) zwischen 24,6 und 27,6 mg l^{-1}. Somit sind in beiden Fällen korrespondierende Verhältnisse zwischen Einzugsgebiet bzw. Infiltrationsgebiet und Kompartiment gegeben.
- In beiden Kompartimenten nahm die Fraktion der Huminstoffe den größten Anteil am DOC ein, gefolgt von den Fraktionen der Polysaccharide und „andere“ (Proteine und Aminosäuren) (Abb.9). Das SW Kompartiment zeichnete sich im Vergleich zum NO Kompartiment durch höhere Huminstoffkonzentrationen und niedrigere Polysaccharidkonzentrationen aus. Die Fraktion der niedrigmolekularen Säuren erschien in beiden Kompartimenten in sehr niedrigen Konzentration und konnte daher vernachlässigt werden.
- In den jeweiligen an die Kompartimente angrenzenden Gebieten erschienen die Huminstoffe ebenfalls als stärkste Fraktion, gefolgt von der Fraktion „andere“. Im Brunnen I/1 (Einzugsgebiet des SW Kompartimentes) war der Anteil der Huminstoffe am DOC deutlich höher als im Brunnen III/1 (Infiltrationsgebiet des NO Kompartimentes). Die Fraktionen der Polysaccharide und der niedrigmolekularen Säuren erschienen in beiden Brunnen in sehr niedrigen Konzentrationen.
- Saisonale Veränderungen im DOC-pool deuteten sich tendenziell an, konnten aber den einzelnen DOC Fraktionen aufgrund zu hoher Nachweisgrenzen der LC-OCD Technik nicht eindeutig zugeordnet werden.

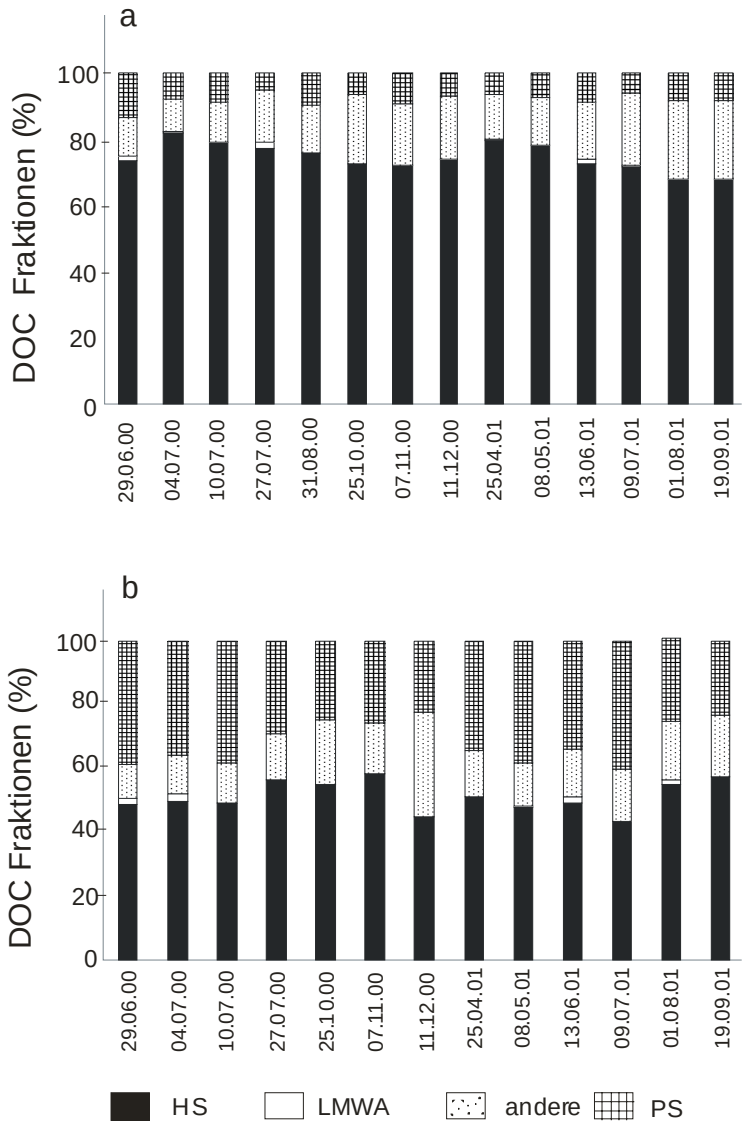

Abb.9. Zusammensetzung des DOC im a) SW Kompartiment und b) NO Kompartiment der Großen Fuchskuhle zwischen Juni 2000 und September 2001

4.1.3. Physikalische und chemische Untersuchungen

Anhand der physikalischen und chemischen Untersuchungen in der Großen Fuchskuhle können folgende Aussagen gemacht werden (Artikel II):

- Signifikante Unterschiede in pH und Leitfähigkeit zwischen dem SW und dem NO Kompartiment und den angrenzenden Torfkörpern untermauern die gewonnenen hydrogeologischen Erkenntnisse und die Abhängigkeit des SW Kompartiments vom Einzugsgebiet. Das SW Kompartiment war im Vergleich zum NO Kompartiment

durch niedrigere Temperaturen aufgrund längerer Beschattung durch angrenzende Bäume, niedrigere pH Werte und höhere Leitfähigkeiten gekennzeichnet.

- Die Entwicklung der Sichttiefen verlief in beiden Kompartimenten sehr unterschiedlich und war teilweise gegenläufig (Abb.10).

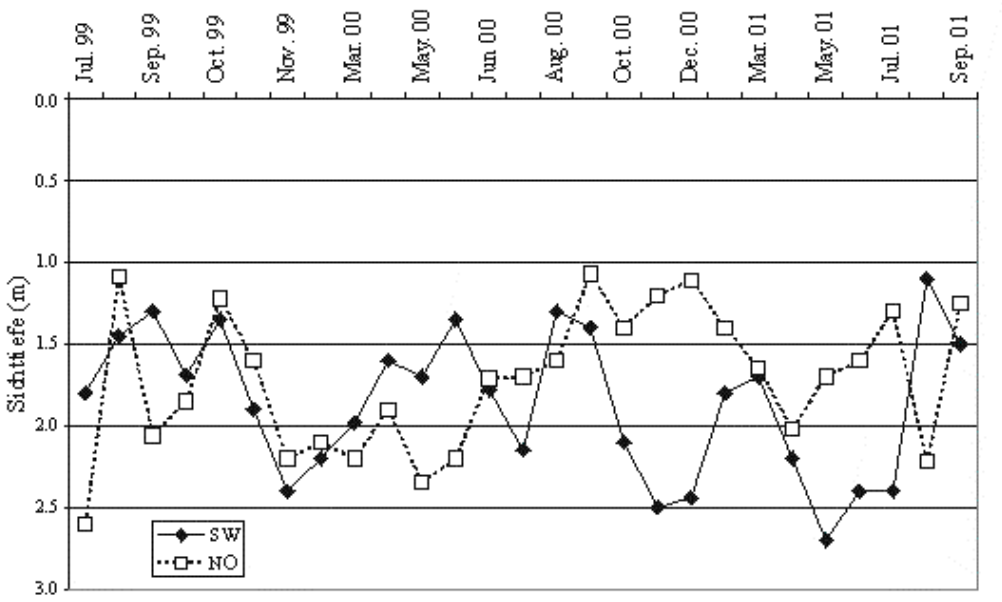

Abb.10. Entwicklung der Sichttiefen im SW und NO Kompartiment der Großen Fuchskuhle zwischen 1999 und 2001

- Die photometrischen Bestimmungen (SAK 436) ergaben im SW Kompartiment eine intensivere Färbung und einen höheren Anteil ungesättigter, aromatischer Strukturen am DOC als im NO Kompartiment.
- Die Nährstoffsituation unterschied sich ebenfalls zwischen beiden Kompartimenten. Das NO Kompartiment war durch höhere Gesamtphosphor - und Gesamtstickstoff-konzentrationen gekennzeichnet.

4.1.4. Chlorophyll a und Primärproduktion

- Die Konzentration von Chlorophyll a lag im Untersuchungszeitraum Juni 2000 bis September 2001 im SW Kompartiment zwischen 2 µg l^{-1} und 258 µg l^{-1} (49 µg l^{-1} im Mittel) und im NO Kompartiment zwischen 8 µg l^{-1} und 247 µg l^{-1} (50 µg l^{-1} im Mittel) (Artikel IV).

- Die ermittelte Primärproduktion lag im Jahr 2000 im SW Kompartiment, abgesehen von einem sehr hohen Wert im September (7570 µg C l^{-1} d^{-1}), zwischen 14 und 2100 µg C l^{-1} d^{-1}. Im NO Kompartiment lag die Primärproduktion zwischen 430 und 1678 µg C l^{-1} d^{-1}.
- Im Vergleich zur bakteriellen Produktion war die planktische Primärproduktion zu jedem gemessenen Zeitpunkt um ein Vielfaches höher. Es konnten keine Korrelationen zwischen Primärproduktion und bakterieller Produktion festgestellt werden.

4.2. Mikrobiologische Untersuchungen

4.2.1. Extrazelluläre Enzymaktivität

Die Untersuchungen von extrazellulären Enzymaktivitäten (Peroxidasen und Laccasen) ergaben (Artikel IV):

- Die Aktivität der extrazellulären Peroxidasen lag im SW Kompartiment zwischen 3,28 und 47,10 x 10^{-7} mol ml^{-1} h^{-1} und war mit einer Ausnahme (Juli 2000) höher als im NO Kompartiment (Abb.11). Im NO Kompartiment wurden Peroxidaseaktivitäten zwischen 1,56 und 13,55 x 10^{-7} mol ml^{-1} h^{-1} gefunden. Im Herbst und Winter wurden im SW Kompartiment die höchsten Aktivitäten gemessen.

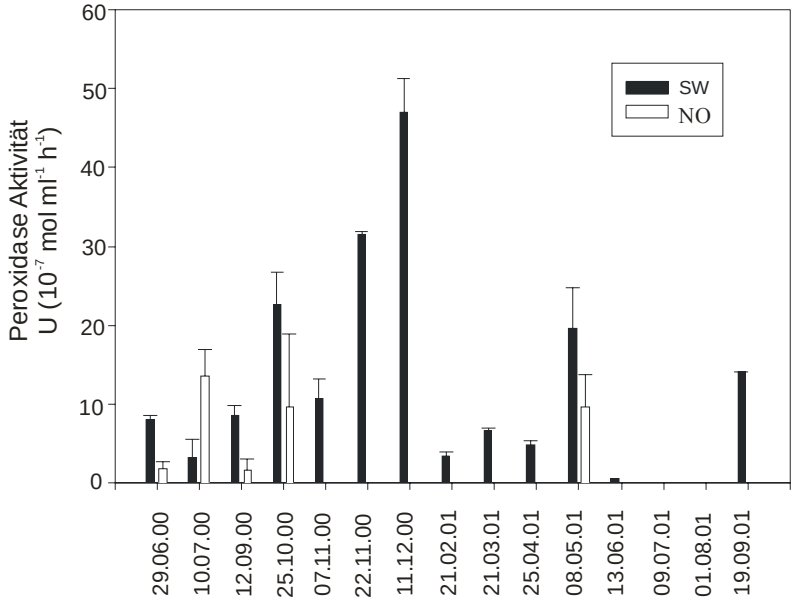

Abb.11. Aktivität extrazellulärer Peroxidasen im SW und NO Kompartiment der Großen Fuchskuhle

- Es konnte keine Laccase Aktivität nachgewiesen werden.
- Das ermittelte pH Optimum für extrazelluläre Peroxidasen im SW Kompartiment lag bei pH 3. Die Molekülgrößen der Peroxidasen lagen in dem Bereich zwischen 10kDa – 0,2µm.

4.2.2. Bakterielle Zellzahl, bakterielle Biomasseproduktion und heterotrophes Potential

Die mikrobiologischen Untersuchungen zur bakteriellen Zellzahl, bakteriellen Biomasseproduktion und dem heterotrophen Potential ergaben folgendes (Artikel IV):

- Die Gesamtzellzahlen waren im NO Kompartiment signifikant höher als im huminstoffreichen SW Kompartiment (Tab.3). Die Gesamtzellzahlen in den Brunnen in dem angrenzenden Einzugsgebiet bzw. Infiltrationsgebiet lagen im Jahr 2000 über den Gesamtzellzahlen beider Kompartimente. Im Jahr 2001 war die Gesamtzellzahl nur im Brunnen III/1 deutlich höher als in den Kompartimenten.
- Sowohl im SW als auch im NO Kompartiment wurden keine parallelen Entwicklungen zwischen der bakteriellen Zellzahl und Chlorophyll a Konzentration festgestellt (Abb.12,13).

Tab.3. Jahresmittelwerte, Minima und Maxima der bakteriellen Zellzahl [10^6 Zellen ml^{-1}] von 1999-2001 im SW und NO Kompartiment und in den Brunnen I/1 und III/1.

	2000				2001			
	SW	NO	I/1	III/1	SW	NO	I/1	III/1
Minimum	1,15	1,74	3,54	1,70	0,81	1,26	0,50	3,58
Maximum	4,50	5,36	14,08	9,98	2,08	4,30	2,46	6,72
Mittelwert	1,86	2,89	6,62	5,75	1,32	2,37	1,22	4,65

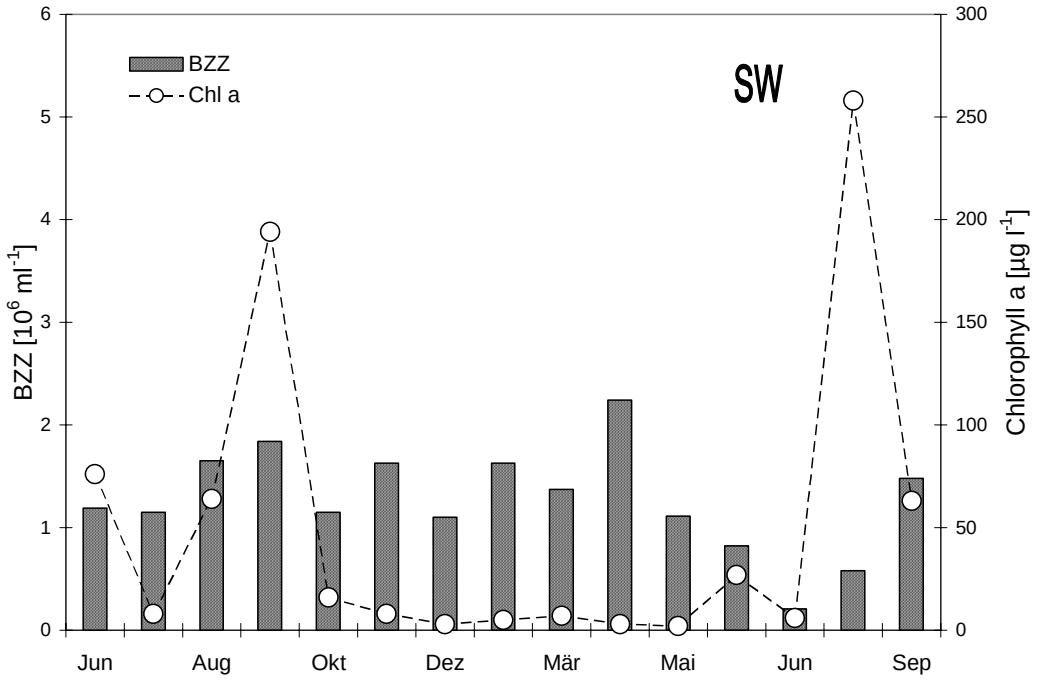

Abb.12. Entwicklung von bakterieller Zellzahl (BZZ) und Chlorophyll a-Konzentration im SW Kompartiment der Großen Fuchskuhle 2000/2001.

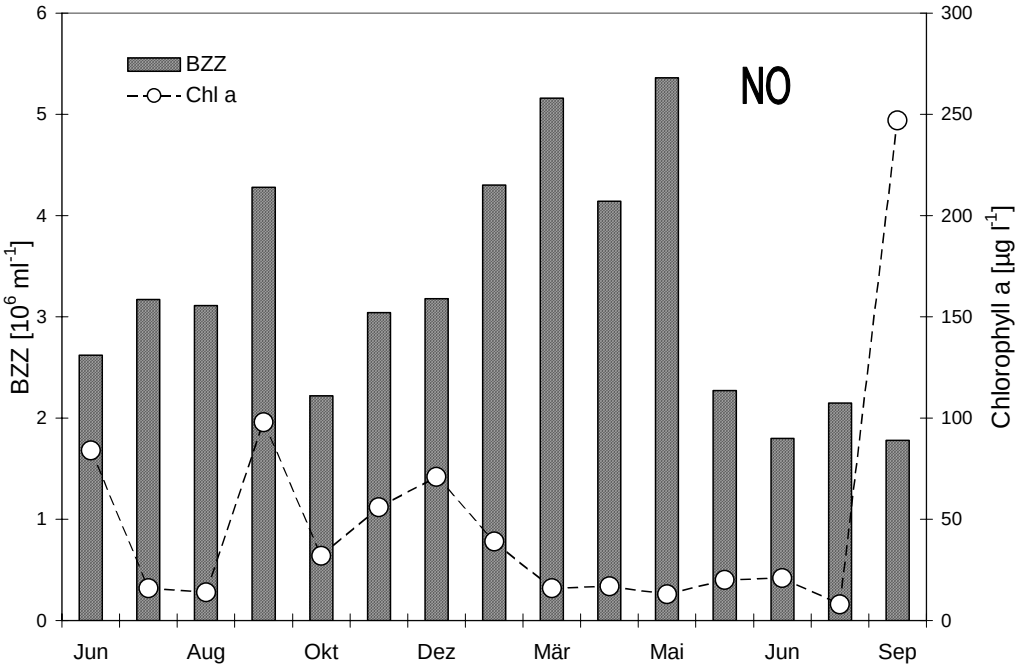

Abb.13. Entwicklung von bakterieller Zellzahl (BZZ) und Chlorophyll a-Konzentration im NO Kompartiment der Großen Fuchskuhle 2000/2001.

- Die bakterielle Produktion unterschied sich zwischen den Kompartimenten in den Jahren 1999 und 2001 nur geringfügig (Tab.4). Im NO Kompartiment zeigte sich im Jahr 1999 im Vergleich zum SW Kompartiment eine niedrigere bakterielle Produktion, hingegen in den Jahren 2000 und 2001 höhere Produktionen.

Tab.4. Jahresmittelwerte, Minima und Maxima der bakteriellen Biomasseproduktion (BBP) [µg C l^{-1} d^{-1}] von 1999-2001 im SW und NO Kompartiment

	1999		2000		2001	
	SW	NO	SW	NO	SW	NO
Minimum	4,86	3,68	0,01	0,18	1,45	1,76
Maximum	32,89	34,38	20,45	62,43	62,82	41,06
Mittelwert	16,16	11,10	8,65	15,96	14,39	16,09

- Aus der Gesamtzellzahl und der bakteriellen Produktion wurde unter der Annahme, dass alle Zellen aktiv sind, die zellspezifische bakterielle Produktion kalkuliert. Im huminstoffreichen SW Kompartiment war die zellspezifische, bakterielle Produktion im Durchschnitt mehr als das Doppelte höher als die des NO Kompartiments. Im Einzugsgebiet bzw. Infiltrationsgebiet lagen die zellspezifischen bakteriellen Produktionsdaten auf dem Niveau des NO Kompartiments.
- Die maximale Aufnahmegeschwindigkeit V_{max} von [U-^{14}C]Glucose schwankte 1999 - 2001 zwischen 0,04 µg C l^{-1} h^{-1} und 0,34 µg C l^{-1} h^{-1} im SW und NO Kompartiment (Tab.5). Im Untersuchungszeitraum zeigten sich im NO Kompartiment höhere V_{max} Werte als im SW Kompartiment. Die Affinität der Glucoseaufnahme war im Untersuchungszeitraum im SW Kompartiment nur unwesentlich höher als im NO Kompartiment (Tab.6).

Tab.5. Jahresmittelwerte, Minima und Maxima der V_{max}-Werte der Glucoseaufnahme [µg C l^{-1} h^{-1}] von 1999-2001 (Michaelis-Menten–Kinetik)

	1999		2000		2001	
	SW	NO	SW	NO	SW	NO
Minimum	0,02	0,06	0,01	0,09	0,05	0,16
Maximum	0,23	0,37	0,09	0,71	0,13	0,77
Mittelwert	0,10	0,17	0,04	0,26	0,08	0,34

Tab.6. Jahresmittelwerte, Minima und Maxima der Substrataffinität KM [µg C l^{-1}] der Glucoseaufnahme von 1999-2001

	1999		2000		2001	
	SW	NO	SW	NO	SW	NO
Minimum	2,4	3,4	3,2	3,8	3,7	4,2
Maximum	47,0	60,8	15,6	49,3	42,4	57,3
Mittelwert	15,2	19,3	7,4	10,1	12,4	14,5

4.3. Strukturanalyse planktischer Bakterienpopulationen

Um Aussagen über die Zusammensetzung mikrobieller Lebensgemeinschaften und über saisonale Sukzessionen in dem SW und NO Kompartiment zu machen, wurde ein Anreicherungsexperiment (batch-Versuch) kombiniert mit Freilanduntersuchungen durchgeführt (Artikel III):

- Während des Versuches trat ein massives, bakterielles Wachstum auf, welches zwischen Tag 2 und 4 besonders stark war. Dieses Wachstum ging einher mit einer 40-fachen Zunahme der bakteriellen Produktion.
- Es wurden 62 Teilsequenzen und 32 Vollsequenzen aus insgesamt 179 Klonen gewonnen. Von den Teilsequenzen konnten 33 den α-, β-, und γ-Proteobakterien, 11 den *Bacteroidetes*, 6 den *Actinobacteria* und 12 den *Verrucomicrobiae* zugeordnet werden.Von den Vollsequenzen wurden 18 den β-Proteobakterien, 5 den *Bacteroidetes*, 6 den *Actinobacteria* und 3 den *Verrucomicrobiae* zugeordnet.
- In beiden Ansätzen (SW – und NO Ansatz) vermehrten sich insbesondere Bakterien des beta II clusters (bis zu 30 und 38 % im SW bzw. im NO Kompartiment). Die Gruppe der Aktinobakterien sank hingegen in der Abundanz bis unter die Nachweisgrenze.
- Im DOC-pool konnten keine signifikanten Änderungen festgestellt werden.
- Die Auswertung der Freilandproben ergab eine hohe Abundanz der β-Proteobakterien in beiden Kompartimenten, und zwar mit einem Anteil an der Gesamtabundanz von 42% im SW Kompartiment und 29% im NO Kompartiment (signifikante Unterschiede). In beiden Kompartimenten bildete das Beta II Cluster sowohl den Großteil der β-Proteobakterien als auch der gesamten mikrobiellen Gemeinschaft.
- Die Aktinobakterien erschienen neben den β-Proteobakterien in beiden Kompartimenten in hoher Abundanz. Im SW Kompartiment waren sie mit einem

durchschnittlichen Anteil von 23 % etwas höher als im NO Kompartiment, wo sie 20 % der Gesamtzellzahl erreichten.

- Das Verhältnis der Aktinobakterien zu dem beta II Cluster verdeutlicht gegenläufige, saisonale Fluktuationen in den beiden Gewässerbereichen (Abb.14).

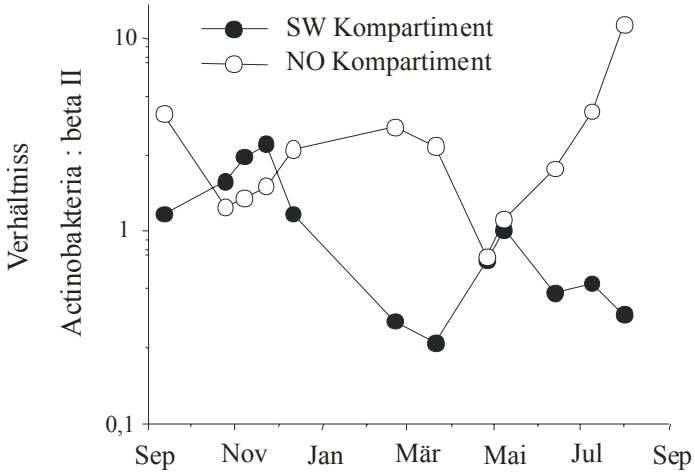

Abb.14.Verhältnis von Vertretern der Aktinobakterien zu Vertretern des beta II clusters im SW und NO Kompartiment der Großen Fuchskuhle von September 2000 bis September 2001

5. Diskussion

Aufgrund des im Gebiet der Großen Fuchskuhle ausgebildeten hydrogeologischen Fließgefälles von SW nach NO werden nur die an den Moorkörper angrenzenden Kompartimente SW und NW aus dem Oberflächenwasser des Torfkörpers gespeist (Sachse et al. 2001). Im Unterschied zu der relativ ausgeglichenen Wasserbilanz des NW Kompartimentes, war im Untersuchungszeitraum der Wassereintrag aus dem Einzugsgebiet in das SW Kompartiment höher als der Wasseraustrag (Tab.2). Da mit dem Oberflächenwasser auch DOC und Nährstoffe befördert werden, könnte dies insbesondere im SW Kompartiment zu einer Akkumulation dieser Stoffe führen, wie dies auch durch die hydrologischen Untersuchungen bestätigt wurde. So konnten z.B. im Februar 2001 bei hohem Wassereintrag in das SW Kompartiment gleichzeitig eine hohe DOC Konzentration in Verbindung mit einer stärkeren Färbung festgestellt werden (Abb.8, Burkert et al. 2004).

Während des Untersuchungszeitraumes lag die DOC Konzentration im SW Kompartiment im Jahresmittel 2000 und 2001 bei 14,34 mg l^{-1} bzw. bei 12,51 mg l^{-1} respektive im NO Kompartiment bei 10,73 und 10,91 mg l^{-1}. Im Vergleich mit früheren Untersuchungen seit dem Jahr 1991 ist tendenziell ein Anstieg der DOC Konzentration in beiden Kompartimenten festzustellen (Abb.15).

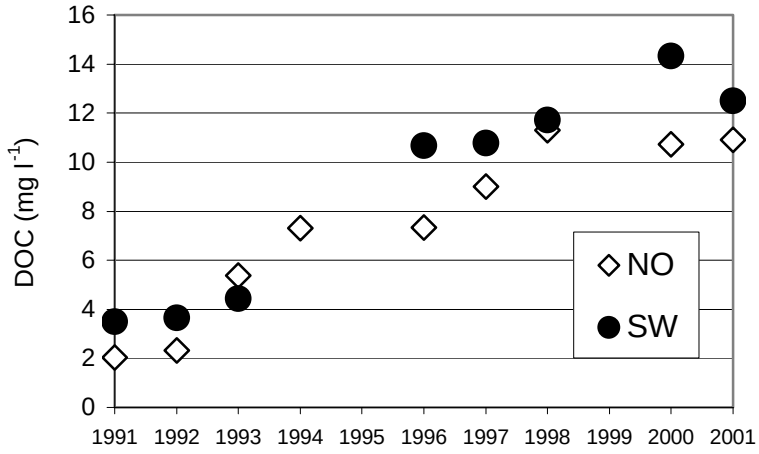

Abb.15. DOC Jahresmittel-Konzentration im SW und NO Kompartiment von 1991 bis 2001 (nach Hehmann et al. 2001, Artikel IV)

Neben der Zunahme der DOC Konzentration kam es im Laufe der letzten 15 Jahre auch zu einer Veränderung der DOC Qualität in der Großen Fuchskuhle. Während 1998 (Untersuchungszeitraum Februar bis August) eine mittlere Huminstoffkonzentration von 58 % und 33 % im SW und im NO Kompartiment für den chromatographierbaren DOC (CDOC) festgestellt wurde (Sachse et al. 2001), lag diese im Untersuchungszeitraum von Juni 2000 bis September 2001 bei 74 % und 51 % (Anhang IV). Stichprobenartige Messungen im Jahr 2004 ergaben im SW Kompartiment sogar eine Huminstoffkonzentration um ca. 80 % des CDOC (E. Zwirnmann persönl. Mitteilung).

Ähnliche Tendenzen wurden in anderen Gewässern Europas beobachtet. So zeigte sich in Trinkwasserreservoirs Südostdeutschlands beispielsweise seit 1990 eine deutliche Zunahme aromatischer Verbindungen (Grunewald et al. 2002). In Großbritannien wurde in einer Langzeitstudie über 12 Jahre eine Erhöhung der DOC Konzentration in Gewässern um 65 % und eine Zunahme der Aktivität von Phenoloxidasen um 36 % festgestellt (Freeman et al. 2001). Auch in norwegischen Oberflächengewässern wurde in den letzten Jahrzehnten eine deutlicher Anstieg der Färbung teilweise um das Doppelte bis Vierfache beobachtet (Gjessing

et al. 2001). Es stellt sich unter Berücksichtigung möglicher Gewässerunterschiede die Frage, nach den Ursachen für steigende DOC Werte und veränderter DOC Qualität.
So sind die Veränderungen nach Freeman et al. (2001) auf Klimaschwankungen wie den globalen Temperaturanstieg zurückzuführen und im Zusammenhang von erhöhter Aktivität von Phenoloxidasen und einer Erwärmung von Moorböden und einem damit verbundenen Anstieg des DOC Exportes aus Torfakkumulationen zu sehen. In diesem Zusammenhang waren die hohen bakteriellen Produktionsdaten im Einzugsgebiet der Großen Fuchskuhle auffällig, das überwiegend aus einem Torfkörper besteht. Die dort ermittelte Aktivität lag im Bereich eutropher Gewässer (Bell et al. 1983).
Forsberg und Petersen (1990) und Forsberg (1992) halten anhand skandinavischer Langzeitstudien als auslösende Faktoren für die Zunahme von DOC in Gewässern neben der Temperaturerhöhung verstärkte Niederschläge, erhöhte atmosphärische Stickstoffeinträge und eine Zunahme von Treibhausgasen wie CO_2, NH_3, NO_2 und FCKW für möglich. Freeman et al. (2001) führten für Moore und Sümpfe den Nachweis über die Stimulierung der Primärproduktion durch erhöhte CO_2 Konzentrationen und eine damit verbundene erhöhte pflanzliche DOC Exsudation. Hieraus ist abzuleiten, dass für den DOC Anstieg in Gewässern eine Reihe synergistisch wirkender Faktoren eine Rolle spielen. So zeigte sich am Beispiel eines Trinkwasserspeichers, dass die Entwicklung des spektralen Adsorptionskoeffizienten SAK_{254} in Abhängigkeit von pH-Wertes und Temperatur verläuft (Grunewald et al. 2002). Die höchsten SAK_{254} - Koeffizienten wurden demnach sowohl bei höheren pH-Werten als auch bei höheren Temperaturen gemessen.

Die eigenen DOC Messungen an Proben aus unserem Untersuchungsgewässer wurden mit der LC-OCD Technik (siehe unter 3.3.2.) durchgeführt. Für die grobe Qualifizierung und Quantifizierung des DOC in der Großen Fuchskuhle und dem angrenzenden Einzugsgebiet erschien die LC-OCD Technik als geeignet. Allerdings zeigten sich bei der Quantifizierung der jeweiligen Fraktionen erhebliche Abweichungen zwischen Parallelmessungen. Bei Huminstoffen betrugen die Abweichungen des Gerätes bis zu 0,2 mg l^{-1} und bei Polysacchariden nur bis zu 0,02 mg l^{-1}. Aufgrund dieser Abweichungen in der Detektion gestaltete es sich schwierig, Korrelationen zwischen DOC Pool und mikrobiellen Aktivitäten hinsichtlich saisonaler Schwankungen aufzuzeigen.
Wie sich in der Großen Fuchskuhle zeigte, wurden in dem Kompartiment mit höherem Huminstoffgehalt auch höhere Peroxidaseaktivität gefunden. Da Peroxidasen hochmolekulare Verbindungen wie Huminstoffe sowohl in die Radikalform überführen, als auch an ihrer

Entstehung beteiligt sein können (Saccomandi et al. 1998, Piccolo et al. 2000), ist ein enger Zusammenhang zwischen höherem Huminstoffgehalt und höherer Aktivität dieser ligninolytischen Enzyme anzunehmen. Im Jahresverlauf traten verstärkt im Herbst und Winter 2000 höhere Peroxidaseaktivitäten auf. Zu dieser Jahreszeit ist die Exsudation von leicht zugänglichen Substraten durch das Phytoplankton weitgehend zu vernachlässigen.
Münster et al. (1998 a) detektierten höhere Peroxidaseaktivitäten im März, Juli und Oktober in einem finnischen huminstoffreichen Gewässer. Die niedrigsten Peroxidaseaktivitäten wurden wie auch in der Großen Fuchskuhle während des Sommers gemessen, zu einer Jahreszeit mit generell höherer autochthoner Produktion (Tulonen 1993), höherem Wasserverdunstungsgrad (Richter 1997) und einem daraus resultierenden geringeren allochthonem Eintrag aus dem Einzugsgebiet.

Für den Nachweis von extrazellulären Peroxidasen wurde der ABTS Test im Gewässer als geeignet gesehen. Im Einzugsgebiet mit intensiv braun gefärbten Proben gestaltete sich der Nachweis von Peroxidasen mittels ABTS Test jedoch als schwierig, beziehungsweise als nicht durchführbar, weil die extrem hohe spektrophotometrische Beeinträchtigung durch den hohen Huminstoffgehalt (hohe Hintergrundabsorption) keine vertretbaren Messungen ermöglichte. Daher ist sowohl im Einzugsgebiet der Großen Fuchskuhle als auch in anderen huminstoffreichen Umweltproben der Nachweis von Peroxidasen mittels anderer Techniken notwendig. An dieser Stelle sei generell auf weiterführende Testverfahren für die Bestimmung von extrazellulären Peroxidasen hingewiesen. So wäre es möglich, die Expression von Peroxidase-Genen mittels PCR etc. nachzuweisen, wie dies u.a. von Broda et al. (1995) und Chambers et al. (1999) für Fragmente von Ligninperoxidasen und Manganperoxidasen in *Phanerochaete chrysosporium* gezeigt wurde. Des weiteren wurden in bodenbesiedelnden *Streptomyceten* Chitinase-Gene festgestellt (Williamson et al. 2000). Es gelang außerdem, Oxigenase-Gene in belasteten Umweltproben wie Abwassersystemen nachzuweisen (Brzostowicz et al. 2003 und Baldwin et al. 2003).
Diese Beispiele vermitteln, dass durch den Einsatz molekulargenetischer Techniken verschiedene Enzyme wie Peroxidasen, Oxidasen etc. gut nachweisbar sind. Im nächsten Schritt könnten extrazelluläre Peroxidasen aus dem Gewässer isoliert und weitere Testversuche zur Wechselwirkung von hochmolekularen Verbindungen wie Huminstoffen mit extrazellulären Peroxidasen vorgenommen werden, auch unter dem Aspekt der Klimaänderung und der Auswirkung von UV-Strahlung auf gewässerspezifische Prozesse.

Neben der Detektion und Isolierung von extrazellulären Enzymen ist es wichtig, die enzymbildenden Organismen zu identifizieren. Neben den schon erwähnten Pilzen aus der Gruppe der Basidiomyceten (z.B. *Phanerochaete chrysosporium*) bilden bodenbesiedelnde Aktinobakterien extrazelluläre Peroxidasen (Mercer et al. 1996, Ramachandra et al. 1987, 1988). So wurde für das bodenbesiedelnde Aktinobakterium *Streptomyces viridosporus* T7A extrazelluläre Peroxidasen nachgewiesen (Yee et al. 1996). In der Großen Fuchskuhle konnten im SW und NO Kompartiment Aktinobakterien mit einem Anteil von 23 bzw. 20 % an der Bakterien-Gesamtzellzahl nachgewiesen werden (Burkert et al. 2003). Auffallend hoch war in diesem Zusammenhang die Abundanz der Aktinobakterien bei gleichzeitig hoher Peroxidaseaktivität im November und Dezember 2000 (Burkert et al. 2003, Artikel IV). Unter der Voraussetzung, dass die aquatischen Aktinobakterien ebenso wie die bodenbesiedelnden in der Lage sind, extrazelluläre Peroxidasen zu bilden, wären hier einige weitere, grundlegende Arbeitsansätze sinnvoll und weiterführend.

Dabei könnten die Peroxidase-bildenden Organismen mittels geeigneter Medien bzw. über Anreicherungsversuche isolieren werden. Außerdem ließen physiologische Untersuchungen unter definierten Bedingungen, z.B. der Substrattest Rückschlüsse auf Stoffwechselprozesse hinsichtlich der Verwertung hochmolekularer Verbindungen durch diese Organismen zu.

Als weitere Aufgabenstellung für die durch das Einzugsgebiet stärker geprägten Gewässer wie der Großen Fuchskuhle wären Untersuchungen über die autochthone oder allochthone Herkunft extrazellulärer Enzyme aufzunehmen. Dazu sei bemerkt, dass im Einzugsgebiet der Großen Fuchskuhle, insbesondere im unmittelbar angrenzenden Einzugsgebiet des huminstoffreichen Kompartimentes, während des Untersuchungszeitraumes eine Vielzahl von Peroxidase bildenden Organismen (Heinzkill 1995, Jönsson et al. 1998) aus der Gruppe der Weißfäulepilze wie *Trametes versicolor*, *Fomes* sp., *Trichaptum* sp. und *Stereum* sp. wuchsen. Die Frage bleibt offen, ob und inwieweit extrazelluläre Peroxidasen aus diesem Teil des Einzugsgebietes aufgrund des hydrologischen Gefälles (Burkert et al. 2004) in das huminstoffreiche Kompartiment befördert werden, denn gerade dieser Gewässerteil zeichnet sich gegenüber den anderen Kompartimenten durch höhere Peroxidaseaktivitäten aus. Mit beispielsweise markierten, extrazellulären Peroxidasen ließen sich Transportwege aufzeigen. Dazu könnten zuvor isolierte extrazelluläre Enzyme markiert werden.

In der Großen Fuchskuhle zeigten sich im Vergleich zwischen dem SW und NO Kompartiment sowohl bei abiotischen Parametern (Temperatur, pH, Leitfähigkeit, Gesamtphosphor, Gesamtstickstoff, DOC, SAK 436, SAK 254) als auch bei den Organismen (z.B. mikrobielle Aktivitäten, Phytoplanktongemeinschaft, Nahrungsnetze) deutliche

Unterschiede (Koschel 1995, Bittl & Babenzien 1996, Hehmann & Krienitz 1996) . Wie Untersuchungen zur Zusammensetzung der Bakterienpopulationen am Beispiel der Aktinobakterien und β-Proteobakterien zeigten, erschienen beide Gruppen in hohen Abundanzen (Burkert et al. 2003) aber mit deutlichen jahreszeitlichen Fluktuationen, die sich zwischen SW und NO Kompartiment unterschieden. So wurden beispielsweise wie o.g. die Aktinobakterien im Frühjahr und Sommer 2001 in niedrigeren Abundanzen als im NO Kompartiment detektiert (Abb. 12). Dies lässt auf unterschiedliche Funktionen beider Gruppen im Ökosystem schließen.

Inwieweit chemische Parameter, wie beispielsweise die DOC Qualität, aber auch Interaktionen zwischen Mikroorganismen, die Zusammensetzung und Sukzession einzelner Bakteriengruppen beeinflussen, könnte künftig unter den dafür vorhandenen Bedingungen und Voraussetzungen der Großen Fuchskuhle eine wesentliche, grundlagenorientierte Arbeitsrichtung sein. Die Fuchskuhle ist aufgrund ihrer Besonderheiten für mikrobiologische Untersuchungen zur unterschiedlichen DOC Qualität sehr gut geeignet. Komplexe mikrobielle Zusammenhänge könnten hier auf der Basis relativ einfacher Nahrungsnetze (Simek et al.1998) analysiert werden. Damit könnte sowohl zur weiteren Klärung von mikrobiellen Stoffwechselprozessen beigetragen, als auch die Funktion verschiedener Bakterienpopulationen tiefergehend aufgezeigt werden .

6. Zusammenfassung

In dem Moorgewässer Große Fuchskuhle sind durch Vierteilung in huminstoffreiche und huminstoffärmere Kompartimente Voraussetzungen und Bedingungen geschaffen worden für Untersuchungen zur Beziehung von insbesondere DOC Qualität und mikrobieller Aktivität sowie zur Hydrogeologie im Einzugsgebiet. Unter diesen Bedingungen hat sich folgendes gezeigt:

Während der eiszeitlichen Formung bildeten sich zwei nahezu unabhängig voneinander verlaufende Grundwasserleiter: der regionale Sand – und der lokale Torfgrundwassserleiter, der nur die huminstoffreicheren Kompartimente speist. Hingegen entwässern die huminstoffärmeren Teile aufgrund des hydrologischen Gefälles in den angrenzenden Torfkörper.

Die DOC Konzentration war in beiden Kompartimenten zueinander direkt proportional: Im huminstoffreicheren Kompartiment lagen die Werte zwischen 12,0 und 16,2 mg l^{-1}, im angrenzenden Einzugsgebiet zwischen 56,3 und 64,2 mg l^{-1}; hingegen im huminstoffärmeren Kompartiment zwischen 10,0 und 11,9 mg l^{-1} bzw. 24,6 und 27,6 mg l^{-1}. Sowohl in den Kompartimenten als auch in den Einzugsgebieten nahm die Fraktion der Huminstoffe den größten Anteil am DOC ein. Das huminstoffreichere Kompartiment zeichnete sich im Vergleich zum huminstoffärmeren Kompartiment durch eine höhere Huminstoffkonzentration, aber eine niedrigere Polysaccharidkonzentration aus.

Im huminstoffreicheren Kompartiment wurde eine höhere extrazelluläre Peroxidaseaktivität als im huminstoffärmeren von 3,28 bis 47,10 x10^{-7} mol ml^{-1} h^{-1} bzw. von 1,56 bis 13,55 x10^{-7} mol ml^{-1} h^{-1} festgestellt. Die mittlere zellspezifische bakterielle Produktion des huminstoffreicheren Kompartiments lag mit 12,42 fg $Zelle^{-1}$ d^{-1} um mehr als Doppelte höher als die des huminstoffärmeren mit 4,94 fg $Zelle^{-1}$ d^{-1}. Im Einzugsgebiet lagen die zellspezifischen bakteriellen Produktionsdaten auf dem Niveau des huminstoffärmeren Kompartiments.

Die Strukturanalyse von Bakterienpopulationen ergab eine signifikant unterschiedlich hohe Abundanz der β-Proteobakterien in beiden Kompartimenten, und zwar mit einem Anteil an

der Gesamtabundanz von 42 % im huminstoffreicheren Kompartiment und 29 % im huminstoffärmeren Kompartiment. Die Aktinobakterien erschienen neben den β-Proteobakterien in beiden Kompartimenten in hoher Abundanz, waren jedoch im huminstoffreicheren Kompartiment mit einem durchschnittlichen Anteil von 23 % etwas höher als im huminstoffärmeren Kompartiment, in dem 20 % der Gesamtzellzahl erreicht wurden. Das Verhältnis der Aktinobakterien zu dem beta II Cluster verdeutlicht gegenläufige, saisonale Fluktuationen in den beiden Gewässerbereichen.

Abschließend ist festzustellen, dass der Abbau von Huminstoffen klarer definiert werden könnte, wenn es gelänge, die Entstehung und Struktur dieser Stoffe gezielter zu untersuchen und wenn Isolate verfügbar wären, um diesbezügliche Stoffwechselprozesse aufhellen zu können.

7. Literaturverzeichnis

Argyropoulos D, Sun Y (1996) Photochemically induced solid-state degradation, condensation, and rearrangement reactions in lignin model compounds and milled wood lignin. Photochem.Photobiol. 64:510-517

Arvola L, Salonen K, Rask M (1990) Chemical budgets for a small dystrophic lake in southern Finland, Limnologica 20:243-251

Babenzien D, Babenzien C (1985) Microbial activities at Lake Stechlin. In: Casper J (ed) Lake Stechlin - A temperate oligotrophic lake. Monogr. Biol Vol 58. Cr. Junk b.v. Publ, Dordrecht-Boston-Lancaster

Baldwin B, Nakatsu C, Nies L (2003) Detection and enumeration of aromatic oxygenase genes by multiplex and real-time PCR. Appl Environ Microbiol 69:3350-3358

Beer A, Lukanov J, Sargorchev P (2000) The influence of fulvic and humic acids from peat on the spontaneous contractile activity of smooth muscles. Phytomedicine 7:407-415

Bell R, Ahlgren G, Ahlgren I (1983) Estimating bacterioplankton production by measuring [^{3}H] thymidine incorporation in a eutrophic Swedish lake. Appl Environ Microbiol 45:1709-1721

Bittl T, Babenzien D (1996) Microbial activity in an artificially divided acidic lake. Arch Hydrobiol Spec Issues Advanc Limnol 48:113-121

Bittl T (1999) Bakterieller Stoffumsatz und mikrobielles Nahrungsnetz im Pelagial eines Moorsees (Experimentalgewässer Grosse Fuchskuhle) Dissertation, Humboldt Universität Berlin

Broda P, Birch P, Brooks P, Sims P (1995) PCR-mediated analysis of lignocellulolytic gene transcription by *Phanerochaete chrysosporium*: substrate-dependent differential expression within gene families. Appl Environ Microbiol 61:2358-2364.

Brzostowicz P, Walters D, Thomas S, Nagarajan V, Rouviere P (2003) mRNA differential display in a microbial enrichment culture: simultaneous identification of three cyclohexanone monooxygenases from three species. Appl Environ Microbiol 69:334-342

Burdon J (2001) Are the traditional concepts of the structures of humic substances realistic? Soil Science 166:752-769

Burkert U, Warnecke F, Babenzien D, Zwirnmann E, Pernthaler J (2003) Members of a readily enriched β-proteobacterial clade are common in the surface of a humic lake. Appl Environ Microbiol 69:6550-6559

Burkert U, Ginzel G, Babenzien D, Koschel R (2004) The hydrogeology of a catchment area and an artificially divided dystrophic lake – consequences for the limnology of Lake Fuchskuhle. Biogeochemistry 71:225-246

Chambers S, Burke R, Brooks P, Cairney J (1999) Molecular and biochemical evidence for manganese-dependent peroxidase activity in *Tylospora fibrillosa*. Mycological Research 103: 1098-1102

Chamuris G, Koziol-Kotch S, Brouse T (2000) Screening fungi isolated from woody compost for lignin-degrading potential. Compost science & utilization 5:6-11

Childs R, Bardsley W (1975) The Steady-State Kinetics of Peroxidase with 2,2′-Azino-di-(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid) as chromogen. Biochem J 145:93-103

Claus H, Gleixner G, Filip Z (1999) Formation of humic-like substances in mixed and pure cultures of aquatic microorganisms. Acta hydrochim Hydrobiol 27:200-207

Dagley S, Evans W, Ribbons D (1960) New pathways in the oxidative metabolism of aromatic compounds by micro-organisms. Nature 12:560-566

Decad G, Nikaido H (1976) Outer membrane of gram-negative bacteria XII. Molecular-sieving function of cell wall. Journal of Bacteriology 128:325-336

Dudley R, Churchill P (1995) Effect and potential ecological significance of the interaction of humic acids with two aquatic extracellular proteases. Freshwater Biol 34:485-494

Dyck S, Peschke G (1989) Grundlagen der Hydrologie, Berlin. S. 263- 265

Forsberg C (1992) Will an increased greenhouse impact in Fennoscandia give rise to more humic and coloured lakes? Hydrobiologia 229:51-58

Forsberg C & Petersen R (1990) A darkening of Swedish lakes due to increased humus inputs during the last 15 years. Verh Internat Verein Limnol 24:289-292

Freeman C, Evans C, Monteith D (2001) Export of organic carbon from peat soils. Nature 412:785

Frimmel F, Christman R (1988) Humic substances and their role in the environment. Wiley & Sons

Gjessing E, Liltved H, Wright R, Becher G (2001) Increasing colour in norvegian surface waters – causes and consequences. Symposium on recent developments in hydrochemistry and hydrobiology, 23.11.01, TU Karlsruhe,"Recent developments in hydrochemistry and hydrobiology"

Glöckner F, Zaichikov E, Belkova N, Denissova L, Pernthaler J, Pernthaler A, Amann A (2000) Comparative 16S rRNA analysis of lake bacterioplankton reveals globally distributed phylogenetic clusters including an abundant group of actinobacteria. Appl. Environ. Microbiol. 66:5053-5065

Grunewald K, Korth A, Scheithauer J, Schmidt W (2002) Increase of DOM in Germany drinking water reservoirs. Wasser Boden 55:47-51
HEHMANN A, KRIENITZ L (1996) The succession and vertical distribution of phytoplankton of the experimentally divided naturally acidic lake „Große Fuchskuhle“ (Brandenburg, Germany). Limnologica 26:301 - 309

Hehmann A, Krienitz L, Koschel R (2001) Long-term phytoplankton changes in an artificially divided, top-down manipulated humic lake. Hydrobiologia 448:83-96

Heinzkill M (1995) Isolierung und Charakterisierung von Laccasen und Peroxidasen aus Basidiomyceten der Ordnung *Agaricales*. Dissertation (D 386) Fachbereich Biologie Universität Kaiserslautern

Hemond H (1990) Wetlands as the source of dissolved organic carbon to surface waters. In: Perdue E & Gjessing E (Eds) Organic acids in aquatic ecosystems: report of the Dahlem workshop on organic acids in aquatic ecosystems (pp 301 – 313). John Wiley & Sons, Chichester

Hessen D (1985) The relation between bacterial carbon and dissolved humic compounds in oligotrophic lakes. FEMS Microbiol Ecol 31:215-223

Hessen D, Andersen T, Lyche A (1990) Carbon metabolism in a humic lake: Pool sizes and cycling through zooplankton. Limnol Oceanogr 35:84-99

Hofrichter M, Vares K, Scheibner K, Galkin S, Sipilä J, Hatakka A (1999) Mineralization and solubilization of synthetic lignin by manganese peroxidase from *Nematoloma frowardii* and *Phlebia radiata*. J Biotechnol 67:217-228

Huber S, Frimmel F (1991) Flow injection analysis of organic carbon in the low-ppb range. Anal Chem 63:2123-2130

Huber S, Frimmel F (1996) Size-exclusion-chromatography with organic carbon detection (LC-OCD): A fast and reliable method for the characterization of hydrophilic organic matter in natural waters. Vom Wasser 86:277-290

Jönsson L, Palmqvist E, Nilyebrant N, Hahn-Hägerdal B (1998) Detoxification of wood hydrolysates with laccase and peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. Applied Microbiologie and Biotechnology 49:691-697

Kasprzak P, Koschel R, Steiner U, Metzdorf K (1988) “Enclosure” – Experiments in Food-web Manipulation: First Step – Dividing the experimental lake. Limnologica 19:161-165

Kasprzak P (1993) The use of an artificially divided bog lake in food web studies. Verh Internat Verein Limnol 25:652-656

Keskitalo J, Eloranta P (1999) Limnology of humic waters. Backhuys Publishers Leiden

Kirchman D, K´nees E, Hodson R (1985) Leucin incorporation and its potential as a measure of protein synthesis by bacteria in natural aquatic systems. Appl Environ Microbial 49:599-607

Kirchman D, Yu L, Fuchs B, Amann R (2001) Structure of bacterial communities in aquatic systems as revealed by filter PCR. Aquat Microb Ecol 26:13-22

Köhler J, Koschel R, Roßberg R (1999) Primärproduktionsmessungen mit der Radiokohlenstoffmethode. - In: V. TÜMPLING, W. & FRIEDRICH, G. (Eds.) Methoden der Biologischen Gewässeruntersuchung Band 2: 450-458. Gustav Fischer, Jena

Koschel R (1995) Manipulation of whole lake ecosystems and long-term limnological observations in the Brandenburg-Mecklenburg lake district, Germany. Int Revue ges Hydrobiol 80:507-518

Ladd J, Butler J (1975) Humus-enzyme systems and synthetic organic polymer-enzyme analogs. In: Paul E, McLaren A (eds) Soil Biochemistry. Dekker, New York

Maillard L (1912) in Compt. vend. Bd. 154,66

Mercer D, Iqbal M, Miller P, McCarthy A (1996) Screening *Actinomycetes* for extracellular peroxidase activity. Appl Environ Microbiol 62:2186-2190

Mishustin E, Nikitin D (1961) Susceptibility of humic acids to the soil microflora (in Russian). Mikrobiologija 30:841-848

Mulholland P & Kuenzler E (1979) Organic carbon export from upland and forested wetland watersheds. Limnol Oceanogr 24:960-966

Mulholland P, Dahm C, David M, Di Toro D, Fisher T, Hemond H, Kögel-Knabner I, Meybeck M, Meyer J, Sedell J (1990) Group report: What are the temporal and spatial variations of organic acids at the ecosystem level? In: Perdue E & Gjessing E (eds) Organic acids in aquatic ecosystems: report of the Dahlem workshop on organic acids in aquatic ecosystems (pp 315-329). John Wiley & Sons, Chichester

Mulholland P, Hill W (1997) Seasonal patterns in streamwater nutrient and dissolved organic carbon concentrations: Separating catchment flow path and in-stream effects. Water Resources Research 33:1297-1306

Münster U, Heikkinen E, Salonen K, De Haan H (1998 a) Tracing of peroxidase activity in humic lake water. Acta hydrochim hydrobiol 26:158-166

Münster U, de Haan H (1998 b) The role of microbial extracellular enzymes (MEE) in the transformation of dissolved organic matter (DOM) in humic waters. In: Hessen, D. O.; Tranvik, L. J. (eds): Aquatic Humic Substances – Ecology and Biogeochemistry. Ecological Studies 133:199–257

MÜNSTER U (1985) Investigations about structure, distribution and dynamics of different organic substrates in the DOM of lake Plußsee. - Arch Hydrobiol Suppl 70:429 - 480

Payne, J., Gilvarg, C. (1968): Size restriction on peptide utilization in *Escherichia coli*. J Biol Chem 10:6291–6299

Pernthaler J, Pernthaler A, Amann R (2002) Fluorescence in situ hybridisation and catalysed reporter deposition for the identification of marine bacteria. Appl Environ Microbial 68: 3094-3101

Pernthaler J, Glöckner F, Schönhuber W, Amann R (2001) Fluorescence in situ hybridisation (FISH) with rRNA-targeted oligonucleotide probes. Methods Microbiol 30:207-226

Piccolo A, Nardi S, Concheri G (1996) Micelle –like conformation of humic substances as revealed by size exclusion chromatography. Chemosphere 33:595-602

Piccolo A, Conte P, Cozzolino A (1999) Effects of mineral and monocarboxylic acids on the molecular association of dissolved humic substances. Eur J Soil Sci 50:687-694

Piccolo A, Cozzolino A, Conte P, Spaccini R (2000) Polymerization of humic substances by an enzyme-catalyzed oxidative coupling. Naturwissenschaften 87:391-394

Pflug W (1980) Effect of humic acids on the activity of two peroxidases. Z Plfanzenernaehr Bodenkd 143:432-440

Porter K, Feig Y (1980) The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. Limnol Oceanogr 25:943-948

Präcker A (2001) Moorgeologisches Gutachten für die Fuchskuhle. Im Auftrag des Leibniz Institutes für Gewässeroekologie und Binnenfischerei Berlin.

Ramachandra M, Crawford D, Hertel G (1987) Extracellular enzyme activities during lignocellulose degradation by *Streptomyces* spp.: a comparative study of wild type and genetically manipulated strains. Appl Environ Microbiol 53**:**2754-2760

Ramachandra M, Crawford D, Hertel G (1988) Characterization of an extracellular lignin peroxidase of the lignocellulolytic actinomycete *Streptomyces viridosporus*. Appl Environ Microbiol 54**:**3057-3063

Richter D (1997) Das Langzeitverhalten von Niederschlag und Verdunstung und dessen Auswirkung auf den Wasserhaushalt des Stechlinseegebietes. Berichte des Deutschen Wetterdienstes 291, Offenbach am Main

Saccomandi F, Conte P, Piccolo A (1998) Use of oxidase enzyme to increase polymerization of soil organic matter. Fresenius Environ Bull 7

Sachse A, Babenzien D, Ginzel G, Gelbrecht J, Steinberg CE (2001) Characterization of dissolved organic carbon (DOC) in a dystrophic lake and an adjacent fen. Biogeochemistry 54:279-296

Sarvala J, Ilmavirta V, Paasivirta L, Salonen K (1981) The ecosystem of the oligotrophic Lake Pääjärvi 3. Secondary production and an ecological energy budget of the lake. Verh internat Verein Limnol. 21:422-427

Schulten H, Schnitzer M (1993) A state of the art structural concept for humic substances. Naturwissenschaften 80:29-30

Sekar R, Pernthaler A, Pernthaler J, Warnecke F, Posch T, Amann R (2003) An improved protocol for the quantification of freshwater actinobacteria by fluorescence in situ hybridization. Appl Environ Microbiol 69:2928-2935

Serban A, Nissenbaum A (1986) Humic acid association with peroxidase and catalase. Soil Biol Biochem 18:41- 44

Simek K., Babenzien D., Bittl T., Koschel R., Macek M., Nedoma J. and Vrba J.(1998): Microbial food webs in an artificially divided acidic bog lake. Internat Rev Hydrobiol 83:3-18

Simon M, Azam F (1989) Protein content and protein synthesis rates of planktonic marine bacteria. Mar Ecol Prog Ser 51:201-213

Simpson A, Kingery W, Hayes M, Spraul M, Humpfer E, Dvortsak P, Kerssebaum R, Godejohann M, Hofmann M (2002): Molecular structures and associations of humic substances in the terrestrial environment. Naturwissenschaften 89:84-88

Sinsabaugh R, Weiland T, Linkins A (1992) Enzymatic and molecular analysis of microbial communities associated with lotic particulate organic matter. Freshwater biology 28:393-404

Soulsby C, Gibbins C, Wade A, Smart R, Helliwell R (2002) Water quality in the uplands: a hydrological perspective on catchment hydrochemistry. Sci Total Environ 294:73-94

Steinberg C, Münster U (1985) Geochemistry and ecological role of humic substances in lakewater. In: Aiken GWiley & Sons, McKnight G Wershaw D, MacCarthy R (eds): Humic Substances in Soil, Sediment and Water. Geochemstry, Isolation and Charakterisation. J. Wiley & Sons. 105-145

Steinberg C (2003) Ecology of Humic Substances in Freshwater – Determinants from geochemistry to ecological niches. Springer Press, Heidelberg

Steinberg C, Paul A, Pflugmacher S, Meinelt, T, Klöcking R, Wiegand C (2003): Pure humic substances have the potential to act as xenobiotic chemicals – A review. Fresenius Environmental Bulletin 12:391-401

Stevenson F (1982) Humus Chemistry; genesis, composition, reactions. Wiley, New York

Stewart, A. J.; Wetzel, R. (1982) Influence of dissolved humic material on carbon assimilation and alkaline phosphatase activity in natural algal-bacterial assemblages. Freshwat Biol 12:369–380

Strickland J, Parsons T (1968) A practical handbook of seawater analysis. Bull Fish Res Bd Canada 167

Succow M, Jeschke L (1986) Moore in der Landschaft. Urania Verlag Leipzig, Jena, Berlin

Swift R (1989) Molecular weight, size, shape, and charge characteristics of humic substances: some basic considerations. In: Hayes M, MacCarthy P, Malcolm R, Swift R (eds) Humic substances. II. In search of structure. Wiley, Chichester, pp 449-466

Tranvik L (1988) Availability of dissolved organic carbon for planktonic bacteria in oligotrophic lakes of differing humic content. Microb Ecol 16:311-322

Tranvik L & Kokalj S (1998) Decreased biodegradability of algal DOC due to interactive effects of UV radiation and humic matter. Aquatic Microbial Ecology 14:301-307

Thurman E (1985) Organic geochemistry of natural waters. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht

Tulonen T (1993) Bacterial production in a mesohumic lake estimated from [^{14}C] leucine incorporation rate. Microb Ecol 26:201-217

Vähätalo A, Salonen K, Salkinoja-Salonen M, Hatakka A (1999) Photochemical mineralization of synthetic lignin in lake water indicates enhanced turnover of aromatic organic matter under solar radiation. Biodegradation 10:415-420

Visser S (1985) Physiological action of humic substances on microbial cells. Soil Boil Biochem 17:457-462

Wershaw R (1999) Molecular aggregation of humic substances. Soil Sci 164:803-813

Wetzel R (1983) Limnology. Second edition. W.B. Saunders Company, Philadelphia, U.S.A. 743pp

Williamson N, Brian P, Welligton E (2000) Molecular detection of bacterial and streptomycete chitinases in the environment. Antonie van Leeuwenhoek 78:315-321

Wolfenden B, Willson R (1982) Radical-cations as Reference Chromogens in Kinetic Studies of One-electron Transfer Reactions: Pulse radiolysis Studies of 2,2´-Azinobis-(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonate). J Chem Soc Perkin Trans II:805-812

Woo H, Sanseverino J, Cox C, Robinson K, Sayler G (2000) The measurement of toluene

dioxygenase activity in biofilm culture of *Pseudomonas putida* F1. Journal of microbiol Methods 40:181-191

Wright R, Hobbie J (1966) Use of glucose and acetate by bacteria and algae in aquatic ecosystems. Ecoloy 47:447-464

Yee D, Jahng D, Wood T (1996) Enhanced expression and hydrogen peroxide dependence of lignin peroxidase from *Streptomyces viridosporus* T7A. Biotechnol Prog 12:40-46

Ziechmann W (1994) Humic substances.- Spektrum Akademischer Verl., Heidelberg

8. Anhang

8.1 Daten - Chlorophyll a

Tab.1 Chlorophyll a Konzentration (µg l^{-1}) im SW und NO Kompartiment der Großen Fuchskuhle.

Datum	SW 0,5m	NO 0,5m
29.06.2000	76	84
10.07.2000	8	16
01.08.2000	64	14
12.09.2000	194	98
25.10.2000	16	32
07.11.2000	8	56
11.12.2000	3	71
21.02.2001	5	39
22.03.2001	7	16
25.04.2001	3	17
08.05.2001	2	13
13.06.2001	27	20
09.07.2001	6	21
01.08.2001	258	8
19.09.2001	63	247

8.2 Daten – Primärprodukion

Tab.2 Primärproduktion (µg C l^{-1} d^{-1}) im SW und NO Kompartiment der Großen Fuchskuhle.

Datum	SW 0,5m	NO 0,5 m
17.05.2000	670	430
15.06.2000	2100	926
10.07.2000	804	511
01.08.2000	384	444
07.09.2000	7570	1678
05.10.2000	739	574
07.11.2000	156	1596
11.12.2000	14	492

8.3 Daten - extrazelluläre Enzymaktivität

Tab.3 Extrazelluläre Peroxidaseaktivität (Pero) in U x 10^7 (mol $ml^{-1}h^{-1}$) im SW und NO Kompartiment der Großen Fuchskuhle.

Datum	SW 0,5m		NO 0,5m	
	Pero	STABW	Pero	STABW
29.06.2000	7,97	0,67	1,79	1,00
10.07.2000	3,28	2,21	13,55	3,36
12.09.2000	8,66	1,20	1,56	1,44
25.10.2000	22,60	4,14	9,69	9,22
07.11.2000	10,80	2,41	< 0,1	
22.11.2000	31,51	0,40	< 0,1	
11.12.2000	47,10	4,18	< 0,1	
21.02.2001	3,45	0,50	< 0,1	
22.03.2001	6,56	0,40	< 0,1	
25.04.2001	4,81	0,60	< 0,1	
08.05.2001	19,70	5,00	9,68	4,10
13.06.2001	0,60	< 0,1	< 0,1	
09.07.2001	< 0,1		< 0,1	
01.08.2001	< 0,1		< 0,1	
19.09.2001	14,10	< 0,1	< 0,1	

8.4 Daten – bakterielle Zellzahlen

Tab.4 Bakterielle Zellzahlen (BZZ) (10^6 ml^{-1}) im SW und NO Kompartiment der Großen Fuchskuhle. n.g. = nicht gemessen

Datum	SW 0,5m		NO 0,5m		SW 4,5m		NO 4,5m	
	BZZ	STABW	BZZ	STABW	BZZ	STABW	BZZ	STABW
19.10.1999	2,08	1,13	3,18	0,76	2,98	1,14	3,15	1,13
02.11.1999	1,51	0,84	1,92	0,32	2,78	1,07	3,40	0,94
07.12.1999	2,89	0,44	4,12	0,34	4,25	0,63	4,28	0,48
10.04.2000	4,50	0,63	5,36	1,86	1,13	0,36	3,46	1,12
15.06.2000	1,71	0,59	1,74	0,88	2,14	0,52	8,40	3,77
29.06.2000	1,19	0,27	2,62	0,53	3,04	0,87	19,05	2,88
10.07.2000	1,15	0,43	3,17	0,14	5,64	2,01	25,33	2,70
01.08.2000	1,65	0,32	3,11	0,72	7,43	1,72	17,77	5,14
12.09.2000	3,04	0,21	4,08	0,82	8,63	4,47	9,19	0,74
25.10.2000	1,15	0,08	2,02	0,42	n.g.		n.g.	
07.11.2000	1,53	0,10	2,54	0,05	n.g.		n.g.	
22.11.2000	1,40	0,10	2,22	0,33	n.g.		n.g.	
11.12.2000	1,30	0,31	2,04	0,40	n.g.		n.g.	
21.02.2001	0,93	0,31	4,30	0,56	n.g.		n.g.	
22.03.2001	0,87	0,05	2,26	0,31	n.g.		n.g.	
25.04.2001	1,54	0,26	1,54	0,28	n.g.		n.g.	
08.05.2001	1,61	0,26	1,76	0,66	n.g.		n.g.	
13.06.2001	1,42	0,08	2,17	0,04	n.g.		n.g.	
09.07.2001	0,81	0,07	2,40	0,42	n.g.		n.g.	
01.08.2001	1,28	0,07	1,26	0,09	n.g.		n.g.	
19.09.2001	2,08	0,24	3,28	0,31	n.g.		n.g.	

Tab.5 Bakterielle Zellzahlen (BZZ) (10^6 ml^{-1}) in den Brunnen I/1 und III/1 im Einzugsgebiet Großen Fuchskuhle.

Datum	I/1		III/1	
	BZZ	STABW	BZZ	STABW
28.01.2000	14,08	4,31	9,98	3,70
05.02.2000	10,53	3,37	5,06	3,35
10.04.2000	7,15	1,33	n.g.	
15.06.2000	3,79	1,77	7,82	1,81
29.06.2000	3,54	1,55	1,70	0,80
10.07.2000	4,82	0,88	7,53	1,71
12.09.2000	9,42	1,83	6,92	0,95
25.10.2000	2,85	1,58	3,95	1,35
22.11.2000	4,61	3,43	4,22	1,48
11.12.2000	5,45	1,19	4,60	1,39
21.03.2001	2,46	1,37	6,72	1,37
25.04.2001	1,17	0,77	4,11	1,40
08.05.2001	0,72	0,49	4,17	0,58
13.06.2001	1,43	0,93	3,58	0,43
09.07.2001	0,50	0,18	3,74	0,87
01.08.2001	1,25	0,63	4,95	1,02
19.09.2001	1,04	0,36	5,25	1,16

8.5 Daten - bakterielle Biomasseproduktion

Tab.6 Bakterielle Biomasseproduktion (BBP) (µg C l^{-1} d^{-1}) im SW und NO Kompartiment der Großen Fuchskuhle.

Datum	SW 0,5m		NO 0,5m	
	BBP	STABW	BBP	STABW
30.06.1999	14,94	5,83	3,68	0,90
14.07.1999	29,35	2,19	34,38	0,71
30.07.1999	32,89	8,15	18,09	1,64
20.08.1999	20,17	1,46	10,99	0,47
07.09.1999	5,81	0,19	4,13	1,77
21.09.1999	21,43	1,18	8,15	2,67
05.10.1999	11,51	6,24	17,90	4,80
19.10.1999	17,01	4,80	7,01	1,63
02.11.1999	11,04	2,79	3,87	0,33
16.11.1999	8,73	0,39	8,69	0,87
07.12.1999	4,86	0,91	5,22	0,45
01.03.2000	4,36	0,10	6,48	0,62
10.04.2000	14,46	3,66	23,39	4,86
17.05.2000	19,54	1,76	62,43	7,61
15.06.2000	19,79	5,14	22,90	1,97
29.06.2000	20,45	2,67	20,24	2,27
10.07.2000	15,29	1,74	17,29	1,52
01.08.2000	7,21	0,49	21,79	2,17
12.09.2000	0,01	<0,01	0,18	<0,01
25.10.2000	0,44	0,04	0,97	0,08
07.11.2000	0,63	0,24	1,97	0,28
22.11.2000	0,69	0,38	8,19	2,97
11.12.2000	0,94	<0,01	5,65	0,92
21.02.2001	1,45	0,17	4,76	1,32
22.03.2001	2,79	0,87	4,76	1,58
02.04.2001	21,38	0,52	19,07	2,27
10.04.2001	8,65	1,14	1,76	0,06
25.04.2001	5,95	1,13	7,06	0,41
08.05.2001	62,82	0,16	41,06	0,25
10.05.2001	8,58	0,61	13,21	0,46
22.05.2001	11,01	0,72	12,21	<0,01
23.05.2001	14,15	1,20	23,75	5,77
13.06.2001	6,47	0,74	11,89	0,95
09.07.2001	10,37	2,53	39,72	0,96
20.08.2001	18,33	0,40	26,11	1,95
19.09.2001	15,08	1,14	3,87	1,03

Tab.7 Bakterielle Biomasseproduktion (BBP) (µg C l^{-1} d^{-1}) in den Brunnen I/1 und III/1 im Einzugsgebiet der Großen Fuchskuhle.

Datum	I/1		III/1	
	BBP	STABW	BBP	STABW
28.01.2000	15,27	1,69	5,75	3,55
09.02.2000	14,16	7,96	1,96	0,04
23.02.2000	16,60	1,83	4,78	0,05
10.04.2000	26,02	1,45	11,33	0,83
15.06.2000	43,72	2,34	15,40	1,04
29.06.2000	53,05	12,04	21,02	4,44
10.07.2000	45,41	2,24	6,66	0,74
12.09.2000	0,01	<0,01	0,35	0,03
25.10.2000	1,03	<0,01	0,64	0,07
07.11.2000	0,30	0,20	1,32	0,13
22.11.2000	0,57	0,19	4,47	0,13
11.12.2000	38,62	0,98	61,00	4,87
21.02.2001	4,92	1,34	5,95	0,72
22.03.2001	15,49	1,48	4,25	0,38
02.04.2001	40,64	1,04	22,68	0,54
10.04.2001	8,98	0,05	9,71	0,80
08.05.2001	6,64	2,21	107,69	0,98
13.06.2001	5,34	0,40	10,98	0,48
09.07.2001	5,31	0,08	12,90	0,93
20.08.2001	4,44	0,25	8,06	0,85
19.09.2001	1,78	0,29	11,23	0,61

8.6 Daten - heterotrophes Potential

Tab.8 Heterotrophes Potential (Vmax), Substrataffinität (KM) und Umsatzzeiten (Tt) im SW und NO Kompartiment der Großen Fuchskuhle. n.g.= nicht gemessen

Datum	**SW 0,5m**			**NO 0,5m**		
	Vmax	**KM**	**Tt**	**Vmax**	**KM**	**Tt**
30.06.1999	0,09	5,79	65	0,37	38,43	105
07.07.1999	0,23	3,3	14	0,25	8,3	34
14.07.1999	0,09	5,1	55	0,16	3,4	21
28.07.1999	0,02	2,4	136	0,08	3,7	48
20.08.1999	0,08	6	75	0,33	60,8	182
07.09.1999	0,05	47	978	0,16	43	270
21.09.1999	0,19	45,4	239	0,13	16,6	125
05.10.1999	0,03	33,8	1351	0,24	199	819
19.10.1999	0,12	13,6	116	0,04	28,7	667
02.11.1999	0,18	7,7	43	0,18	17,6	97
16.11.1999	0,08	6	75	0,06	6,6	106
07.12.1999	0,04	6,32	150	0,09	4,5	52
01.03.2000	0,05	6,55	129	0,09	6,79	77
10.04.2000	0,05	6,46	141	0,17	7,94	47
17.05.2000	0,02	3,24	188	0,25	4,9	19
29.06.2000	0,03	4,13	136	0,09	5,44	63
10.07.2000	0,01	3,28	237	0,44	49,3	111
17.07.2000	0,01	8,74	653	0,11	3,9	34
26.07.2000	0,04	14,19	330	0,40	13,1	32
01.08.2000	0,09	15,59	173	0,71	6,84	9
25.10.2000	0,05	6	111	0,18	4,4	24
07.11.2000	0,05	3,82	74	0,10	3,8	38
22.11.2000	0,06	11,65	194	0,30	9,4	31
11.12.2000	0,03	4,86	143	0,23	5,5	23
21.02.2001	0,09	12,91	144	0,19	18,9	99
22.03.2001	0,06	8,53	142	0,16	8,4	52
25.04.2001	0,05	42,37	941	0,23	57,3	245
08.05.2001	0,13	6,58	50	0,77	11,6	14
21.05.2001	0,04	6,32	436	0,25	4,9	73
20.06.2001	0,05	6,55	134	0,21	4,3	94
09.07.2001	0,05	3,67	81	0,68	6,26	9
05.09.2001	n.g.			0,18	4,2	62

8.7 Daten – zellspezifische bakterielle Produktion

Tab.9 Zellspezifische bakterielle Produktion [fg Zelle^{-1}d^{-1}] im SW und NO Kompartiment der Großen Fuchskuhle und in den Brunnen I/1 und III/1.

Datum	NO 0,5m	SW 0,5m	I/1	III/1
29.06.2000	7,73	17,18	14,99	12,36
10.07.2000	5,45	13,30	9,42	0,88
01.08.2000	7,01	4,37		
12.09.2000	0,04	0,01		0,05
25.10.2000	0,44	0,38	0,36	0,16
07.11.2000	0,65	0,39		
22.11.2000	2,90	0,99	0,12	1,06
11.12.2000	1,78	0,85	7,09	13,26
21.02.2001	1,11	0,89		
22.03.2001	0,92	2,04	6,30	0,63
25.04.2001	1,71	2,66	7,68	2,36
08.05.2001	7,66	56,59	9,22	25,82
13.06.2001	5,24	7,89	3,73	3,07
09.07.2001	22,07	49,38	10,62	3,45
01.08.2001	12,14	31,60	3,55	1,63
19.09.2001	2,17	10,19	1,71	2,14

9. Artikel

I Burkert U & Steinberg C (2002) Gelöste Huminstoffe – Teil IV: Energie für das aquatische Nahrungsnetz ohne Einwirkung von Licht. Wasser & Boden 54:36-42

II Burkert U, Ginzel G, Babenzien D, Koschel R (2004) The hydrogeology of a catchment area and an artificially divided dystrophic lake - consequences for the limnology of Lake Fuchskuhle. Biogeochemistry 71:225-246

III Burkert U, Warnecke F, Babenzien D, Zwirnmann E, Pernthaler J (2003) Members of a readily enriched - Proteobacterial clade are common in surface waters of a humic lake. Appl Environ Microbiology 69:6550-6559

IV Burkert U, Babenzien D, Zwirnmann E (2006) Extracellular peroxidase activity in a divided humic lake (Große Fuchskuhle). Manuskript

Artikel I

Christian Steinberg, Ulrike Burkert

Gelöste Huminstoffe – Teil IV: Energie für das aquatische Nahrungsnetz ohne Einwirkung von Licht

Dissolved humic material – Part IV: Light-independent fuel for the aquatic food web

Zusammenfassung

Gelöster organischer Kohlenstoff (DOC) und Huminstoffe (DHM) sind Energie- und Nährstoffquellen. Seit langem weiß man, dass Bakterien Huminstoffe über Cometabolismus verwerten können. Es mehren sich die Berichte, dass an der Verwertung durch Mikroorganismen nicht nur solche Exo-Enzyme beteiligt sind, die die Seitenketten abspalten, sondern auch solche, die das Huminstoffskelett selbst angreifen, wie Phenoloxidasen oder Phenolperoxidasen. Auch solche aus den verschiedenen Phasen der Transformation sind wahrscheinlich am ökosystemaren Huminstoffwechsel beteiligt. Insgesamt werden aus dem DOC als erste die hochmolekularen, gut verfügbaren Exudate verwertet, sodass niedermolekulare, schwerverfügbare Transformationsprodukte übrig bleiben.

Trotz der scheinbaren unüberschaubaren Komplexität des DOC und der Huminstoffe lässt sich eine einfache Struktur-Wirkungs-Beziehung zwischen Mikrowachstum und DOC-Zusammensetzung aufstellen: Oxidierte Strukturen hemmen das Mikrobenwachstum, während Proteinabkömmlinge stark fördernd wirken.

Auch höhere Organismen oder Konsortien sind in der Lage, DOC und DHM zu verwerten. So wird gelegentlich eine Förderung des Wachstums von autotrophen Organismen verzeichnet, wenn Bakterien und DHM im System anwesend sind. Am wenigsten erwartet wurde, dass auch Zooplankton direkt vom DOC/TOC lebt: So nehmen einige Zooplankter mehr als 50 % ihres Körper-Kohlenstoffs aus dem Detritus auf – ohne Umweg über die Bakterien.

Summary

Dissolved organic carbon (DOC) and dissolved humic material (DHM) are sources of energy and nutrients. For instance, it well known that DHM may be utilized via co-metabolism. However, evidence is increasing that microbial utilization is not only mediated by those exo-enzymes that cleave side chains, but also by enyzmes that attack the humic backbone itself, such as phenoloxidases and phenolperoxidases. Furthermore, enzymes of the transformation systems appear to be involved in the degradation of humic substances as well. In general, high molecular weight substances, freshly released from organisms, seem to be highly bioavailable and biodegradable, leaving smaller and less bioavailable molecules behind.

Despite their obvious molecular heterogeneity, a quantitative structure effect relationship between DOC/DHM and microbial growth can be established in which oxygen-rich structures inhibit microbial growth while nitrogen-rich structures support it.

Higher organisms and consortia are also able to utilize DOC and DHM. For instance, several reports show that autotrophic growth can be enhanced if bacteria and DHM are present in the water. Most astonishing, zooplankton meet more than 50% of their carbon requirements through consumption of detritus, in addition to the uptake of bacteria as a source of food and energy.

1 Einleitung

Gelöste organische Materie (DOM) ist eine wichtige potenzielle Energiequelle für Mikroorganismen. Wegen ihrer „widerspenstigen" (refraktär, *recalcitrant*) Natur ist bisher die biologische Bedeutung von gelösten Huminstoffen (DHM) nicht vollständig geklärt – weder als Nährstoff – noch als Energiequelle. Dies führte in der Vergangenheit zu widersprüchlichen Lehrmeinungen. Eine dieser Lehrmeinungen besagte zum Beispiel, dass humose Seen als unproduktiv, als „verhungert" (= dystroph) zu gelten haben. Diese Ansicht ist nach heutigem Wissen überholt.

Obwohl die Huminstoffverbindungen sehr komplex und zum Teil hochmolekular sind, können sie durch biotische und abiotische Prozesse in Struktur und Funktion im Gewässer verändert werden. Diese Prozesse können einerseits durch Mikroorganismen und andererseits durch Licht vollzogen werden. Mikroorganismen können über die Bildung von extrazellulären Enzymen DHM als Substrat verwerten oder als „Elektronenshuttle"[1] nutzen. Diese Prozesse werden wegen ihrer Komplexität erst allmählich entdeckt und in ihrer ökologischen Bedeutung begriffen. Die Kenntnis darüber gibt gegenwärtig noch kein vollständiges Bild – es wird langsam komplettiert.

In diesem Beitrag steht die Verwertung von Huminstoffen unter Ausschluss von Licht im Mittelpunkt der Betrachtungen.

[1] Lovley et al. (1996) verwenden den Begriff „Katalysator" nicht, obwohl es sich um katalysierte Reaktionen handelt, da der betreffende Stoff in hohen Konzentrationen anwesend ist, und damit der klassischen Definition von Katalysator („in niedrigen Konzentrationen wirksam") widerspricht.

2 Verwertung durch Mikroorganismen

In den letzten Jahren sind zahlreiche Ergebnisse bekannt geworden, die zeigen, dass die als refraktär bewerteten hochmolekularen Verbindungen, die Huminstoffe, in Gewässern von wesentlicher Bedeutung sind. Hierbei sind aus mikrobiologischer Sicht unterschiedliche Ansatzpunkte zu berücksichtigen:

- Huminstoffe dienen als Substrat und Stickstoffquelle für Mikroorganismen. Sie können zumindest partiell und/oder in einer cometabolischen Reaktion als C-Quelle genutzt werden (de Haan 1976, Tranvik 1988, Tulonen et al. 1992, Amon und Benner 1996, Thomas 1997). Die Assimilation von Stickstoff aus Huminstoffen ist ebenfalls möglich, da Aminosäureanteile durch enzymatische Hydrolyse verfügbar sind (Jahnel et al. 1993).
- Huminstoffe können als „Elektronenshuttle" (Redox-Katalysator im weiteren Sinne) dienen, d. h. das Huminstoffe von bestimmten Bakterien z. B. *Geobacter* spec. als Elektronenakzeptoren bzw. als Elektronenüberträger (Reduzierung von Fe III) genutzt werden (Lovley et al. 1996, Scott et. al 1998).
- Huminstoffe können zur Aktivierung (Sinsabaugh et al. 1991; Jackson et al. 1995; Münster et al. 1998, 1999) oder zur Hemmung extrazellulärer Enzyme (Stewart und Wetzel 1982, Wetzel 1992) führen.

Huminstoffe werden zum größten Teil aus dem Boden des Einzugsgebietes in Gewässer (allochthon) eingetragen. Dort sind neben abiotischen Prozessen Mikroorganismen an ihrer Bildung beteiligt. Nach Beck (1968) oder Hatcher und Spiker (1988) werden zwei Wege der Humusbildung unterschieden:

1. Humusbildung aus Stoffwechselprodukten des Abbaus und der Kondensation leicht verwertbarer C- Verbindungen (Bild 1),

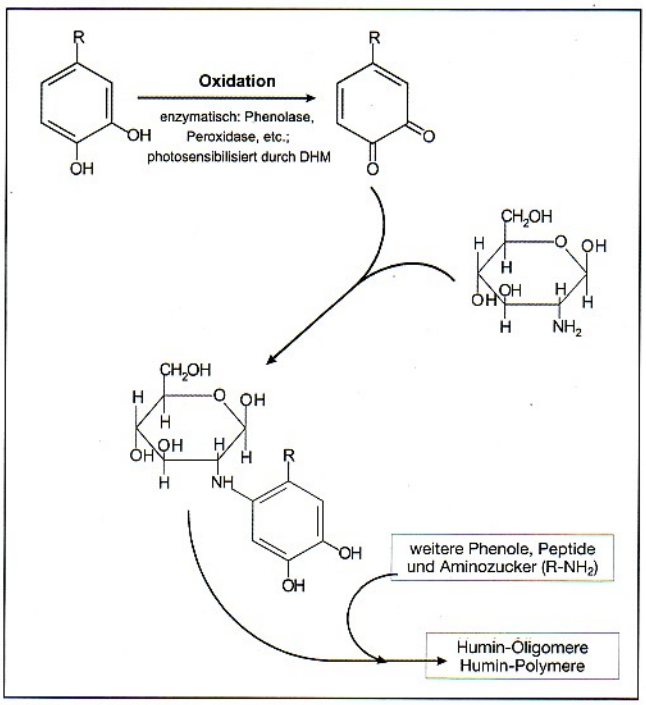

Bild 1 Oxidative Bildung von C-N-Bindungen zwischen labileren organischen Molekülen innerhalb des autochthonen Humifizierungsprozesses (aus Steinberg 2000).
Figure 1 *Oxidative formation of C-N-bindings between weak organic molecules in the autochthon humification process (from Steinberg 2000).*

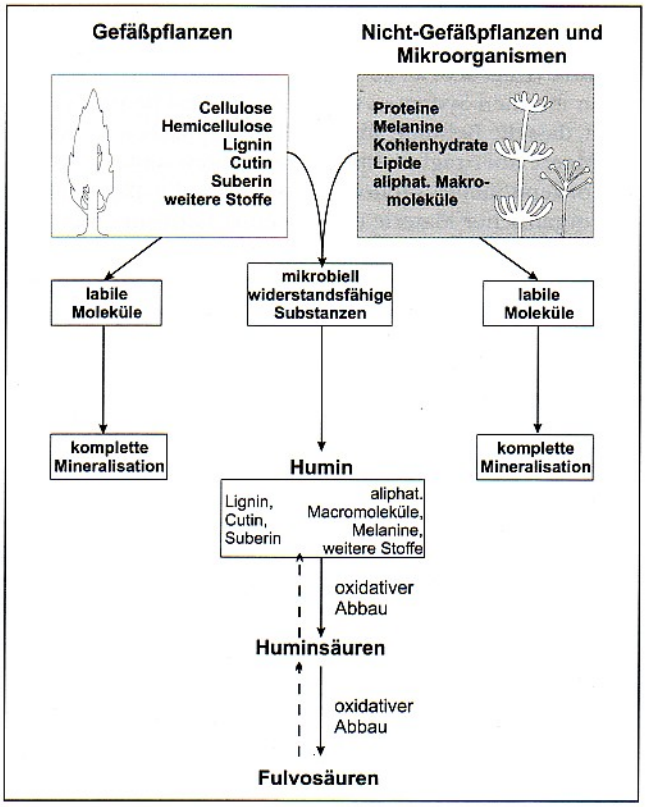

Bild 2 Degradativer Stoffwechselweg bei der Bildung von Huminstoffen. Dieser Weg läuft – von Binnengewässern aus gesehen – auf dem Boden des Einzugsgebietes ab, ist also mehr oder weniger allochthon. Gestrichelte Linien zeigen an, dass die Transformation zwar möglich, aber von untergeordneter Bedeutung ist (nach Hatcher und Spiker 1988, aus Steinberg 2000).
Figure 2 *The formation of humic substances by mineralization of organic matter in the catchment area of lakes (allochthon). The dashed lines demonstrate that the transformation is of lesser significance (after Hatcher and Spiker 1988, from Steinberg 2000).*

2. Humusbildungen aus Lignin über Phenylpropanderivaten und anderen Polymeren (Bild 2). Dieser Weg wird vielfach als der quantitativ bedeutendere angesehen.

Somit stehen den Mikroorganismen in Gewässern hoch- und niedermolekulare Moleküle aus dem DOC aus der Primärproduktion (autochton) und DOC von Land (allochthon) zur Verfügung. Von einfachen organischen Molekülen wird eine direkte mikrobielle Verwertung, angenommen. Daraus ergibt sich die Frage, ob allochthoner DOC für die hohe bakterielle Biomasse in humosen Seen verantwortlich sein kann. Tranvik und Höfle (1987) gehörten zu den ersten Autoren, die diese Hypothese überprüften. In den Versuchen wuchsen mehr Bakterien pro Einheit organischen Kohlenstoffs (Bakterien – *carrying capacity*) auf den hochmolekularen als auf den niedermolekularen Stoffen. Wenn allerdings der Huminstoffgehalt stieg, nahm die Verfügbarkeit dieses hochmolekularen DOC für Bakterien ab. Ein allgemeines Ergebnis von Tranviks Arbeiten war, dass braune, humose Seen in Südschweden eine höhere *carrying capacity* hatten als klare Seen. Dies konnte auch von Tulonen et al. (1992) an kleinen humosen finnischen Seen bestätigt werden.

Tulonen et al. (1994) konnten in einer weiteren Arbeit zeigen, dass die bakterielle Produktion im Herbst und Winter nicht allein durch die Primärproduktion erklärt werden kann. Nach weiteren Befunden gilt dies auch für andere Gewässer, wie für viele so genannte nicht-eutrophe Klarwas-

serseen, wie etwa den großen Laurentischen Seen (Cotner et al. 2000, Biddanda et al. 2001) oder sogar den tropischen Atlantik (Duarte et al. 2001).

An marinen Systemen wiesen Amon und Benner (1996) nach, dass die Befunde aus den Skandinavischen Seen auch auf Meere übertragbar waren. Die Autoren stellten ein neues konzeptionelles Modell vor, wonach die Bioreaktivität von organischer Materie entlang eines Größenkontinuums von großen zu kleinen Molekülen hin abnimmt. Allerdings wurde in diesem Modell die Molekülstruktur, als eine ganz wesentliche Größe, nicht berücksichtigt. Das Modell zum Größe-Reaktivitäts-Kontinuum ist in Bild 3 skizziert. Es besagt, dass der Abbau labiler, hochmolekularer organischer Substanzen in der aquatischen Umwelt zur Bildung von widerstandsfähigen niedermolekularen Komponenten führen kann.

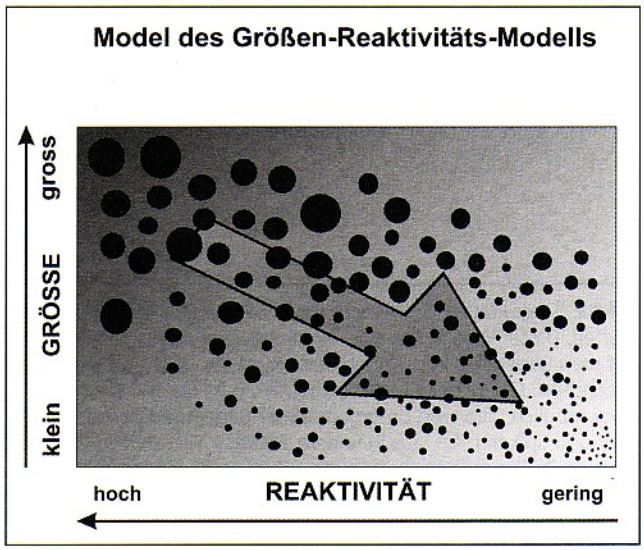

Bild 3 Schematische Darstellung des Size-Reactivity Continuum-Models für den Abbau organischer Materie in aquatischen Systemen. Der Pfeil zeigt den Hauptweg des Abbaus von bioreaktiven organischen Partikeln und Makromolekülen zu refraktären niedermolekularen Komponenten an. Die Größe der Punkte und Flecken gibt die Größe des organischen Materials wieder: große Flecken stehen für partikuläres organisches Material, mittelgroße für hochmolekulares DOM und kleine für niedermolekulares DOM. Die Verteilung der Flecken zeigt an, dass das meiste größere organische Material reaktiver als die meisten kleineren organischen Materialien sind (nach Amon und Benner 1996).

Figure 3 *The size-reactivity continuum model for the degradation of organic matter in aquatic systems. The arrow indicates the mean pathway of degradation of reactive organic particles and macromolecules to refractory low molecular weight compounds. The size of the dots indicates the type of organic matter: large dots particular organic matter, medium-sized dots high molecular weight DOM and small dots low molecular weight DOM. Dot distribution points to the higher reactivity of larger organic matter as compared to smaller organic matter (after Amon and Benner 1996).*

Hatcher und Spiker (1988) präsentierten ein allgemeines Schema für den Humifizierungsprozess, das mit dem Größe-Reaktivitäts-Kontinuum-Modell übereinstimmt (vgl. Bild 2). In diesem Schema werden die labilen Makromoleküle während der frühen diagenetischen Phase schnell verwertet. Schwer abbaubare Makromoleküle werden jedoch selektiv konserviert und später humifiziert. Bei weiterer Oxidation von Huminen können lösliche Huminsäuren und Fulvosäuren gebildet werden. Die Humifizierung führt insgesamt zu stärker oxidierten Substraten von geringerem Molekulargewicht und größerer Löslichkeit. Dies legt die Vermutung nahe, dass die widerstandsfähigen niedrigmolekularen Komponenten im Freiwasser kaum noch Ähnlichkeit mit Biomolekülen haben und deshalb der mikrobiellen Verwertung entzogen werden (Amon und Benner 1996).

2.1 Enzymatischer Abbau

Wie bereits 1969 in einer Pionierarbeit von Payne und Gilvarg gezeigt wurde, können Peptide mit Molmassen größer als 600–650 D nicht in *Escherichia coli* gelangen. Sie postulierten das Vorhandensein einer Barriere, die extern zu den Transportsystemen für Peptide den Stoffaustausch in *E. coli* kontrollieren. Da die meisten Huminstoffe ebenfalls aufgrund ihrer Molekülgröße Zellwand und/oder Cytoplasmamembran von Mikroorganismen nicht passieren können, ist ein extrazellulärer, enzymatischer Abbau zu kleineren Molekülen notwendig. In vielen DHM-reichen Binnengewässern können prinzipiell zwei Hauptwege des Abbaus über mikrobielle extrazelluläre Enzyme definiert werden (nach Münster und de Haan 1998):

1. Hydrolytische Spaltung an den Seitenketten des Kohlenstoffskeletts, die über Ester- oder Aminobindungen mit dem Kohlenstoffskelett verbunden sind, z. B. saure und/oder alkalische Phosphatase, Aminopeptidase, Lipase/Esterase und Glycosidase, die beispielsweise Phosphorester-, Peptid-, Lipidester- und Glycosid-Bindungen spalten, und
2. Oxidative Spaltung am Kohlenstoffskelett selbst. Dies kann zum Beispiel über Phenoloxidasen oder Phenolperoxidasen ablaufen, die besonders aliphatische Kohlenstoffbindungen und aromatische Ringstrukturen spalten können. Diese oxidierenden Enzymsysteme können allerdings auch die Rückreaktion beschleunigen, nämlich die Polymerisation.

Während die enzymatische Abspaltung von Seitenketten durch Hydrolasen, Proteasen, oder Aminopeptidasen vergleichsweise oft untersucht wurde (z. B. Münster et al. 1992, Jahnel et al. 1993), sind Untersuchungen zum enzymatischen Angriff auf das Kohlenstoffskelett selbst sehr selten (de Haan 1976, Münster et al. 1998), was sicherlich mit methodischen Schwierigkeiten zusammenhängt. Es ist daher nicht abwegig anzunehmen, dass diese Enzyme am Umsatz des DOC-Vorrats stärker beteiligt sind als bisher vermutet. Münster et al. (1998) testeten wohl als erste eine unspezifische Peroxidase in einem humosen Gewässer. Im Epilim-

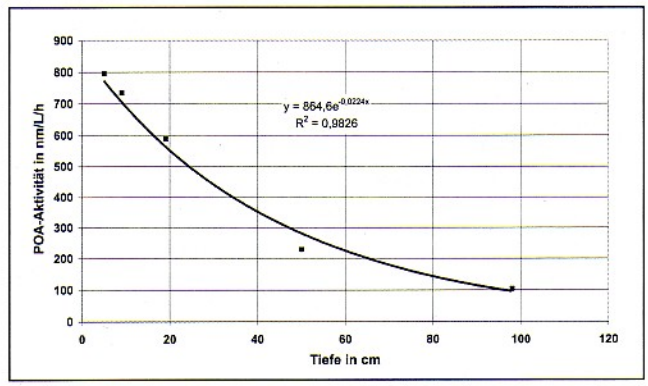

Bild 4 Tiefenverteilung der Peroxidaseaktivität (POA) im Freiwasser des polyhumosen Mekkojärvi in der Partikelgrößenfration < 2 µm im Sommer 1994 (verändert nach Münster et al. 1998).

Figure 4 Depth distribution of peroxidase (POA) activity in nm $l^{-1}h^{-1}$ in the water column of the polyhumic Lake Mekkojärvi in the fraction < 2 µm in summer 1994 (modified after Münster et al. 1998).

nion des polyhumosen Mekkojärvi variierte die Peroxidaseaktivität im Jahreszyklus und innerhalb der Wassersäule zwischen (Bild 4). Das für die Reaktion benötigte H_2O_2 könnte durch die Belichtung der Huminstoffe geliefert werden, da die Dunkelaktivität der Peroxidase im Mekkojärvi sehr gering ist. Enzyme, die direkt das Kohlenstoffskelett der Huminstoffe angreifen und nicht nur Seitenketten abspalten, spielen offensichtlich eine wichtige Rolle.

Eine andere, noch unspezifischere Peroxidase untersuchten Burkert und Babenzien (in Vorb.) in dem kleinen nordbrandenburgischen Waldsee Große Fuchskuhle. Die Fuchskuhle wurde vor geraumer Zeit viergeteilt. In dem Einzugsgebiet eines Viertels befindet sich ein saures oligotrophes Moor, das den Chemismus dieses Wasserkörpers (SW-Becken) nachhaltig veränderte (vgl. Steinberg et al. 2002). Die Unterschiede zwischen den Becken spiegeln sich auch in der Aktivität der untersuchten Peroxidase wider: Die Aktivität in dem huminstoff-beeinflussten Seeteil (SW-Becken) ist auffallend hoch und liegt – von einer Ausnahme abgesehen – über der des Referenzbeckens (NO-Becken) (Bild 5). An dieser Stelle muss allerdings offen bleiben, welchen Anteil diese Versorgung mit chemisch gebundener Energie ausmacht im Vergleich zur Primärproduktion und zur photolytischen cDOC-Spaltung (vgl. Steinberg in Vorb.) ausmacht.

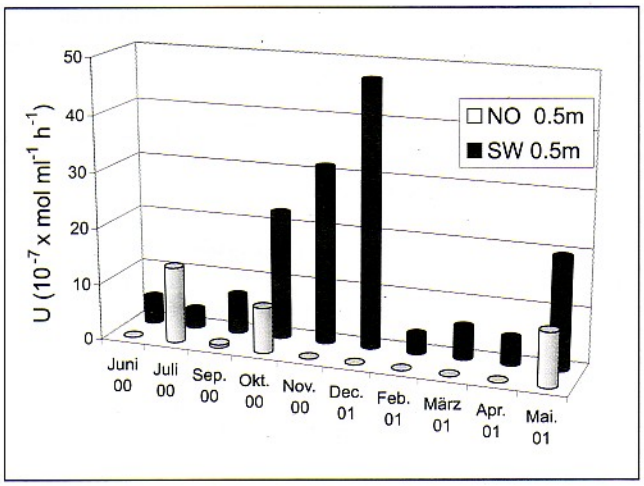

Bild 5 Extrazelluläre Peroxidase-Aktivität in zwei Kompartimenten (Nordost Becken, Südwest Becken, durch ein nährstoffarmes Moor beeinflusst) der Großen Fuchskuhle (Nordbrandenburg) zwischen Juni 2000 und Mai 2001 (nach Burkert und Babenzien, Publ. in Vorb.).

Figure 5 *Activity of peroxidase in in two compartments (north-east basin; southwest basin) of Lake Große Fuchskuhle between June 2000 and May 2001 (after Burkert and Babenzien in prep.).*

Neue Studien aus England (Freman et al. 2001), Skandinavien (Becher, Univ. Oslo pers. Mitteilung) und Deutschland (Pütz, Sächsischer Landestalsperren-Verband Pirna, Grünewald TU Dresden, pers. Mitteilung) zeigen, dass seit Anfang der 90er die Huminstoffgehalte in verschiedenen Regionen deutlich zunehmen. Als Ursache werden Vorgänge der globalen Klimaveränderungen angenommen. Die Autoren der englischen Studie vermuteten insbesondere den Temperaturanstieg und zeigten zudem auf, dass es vornehmlich phenolhaltigen Komponenten sind, die aus moorigen Böden vermehrt ausgetragen werden. Diese Komponenten wären dann das Substrat der Phenoloxidasen und Peroxidasen.

Eine weitere Gruppe von Enzymen ist potentiell in der Lage, ebenfalls an den Kohlenstoffskeletten der Huminstoffe anzugreifen: die Transformations-Enzymsysteme. Untersuchungen über die Rolle dieser Enzyme im Kohlenstoffkreislauf sind ebenfalls sehr rar. Seit geraumer Zeit ist gut bekannt, dass diese Enzymsysteme, die xenobiotische Chemikalien – wie polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe, Dioxine oder Furane und Biphenyle – abbauen können, im allgemeinen naturgemäß keine hohe Substratspezifität besitzen (dürfen). Diese Enzymsysteme werden im Wesentlichen in zwei Phasen zusammengefasst (vgl. z. B. Pflugmacher et al. 1999):

Phase I – oxidierende oder reduzierende Enzyme, die das hydrophobe Substrat mit einer reaktiven Gruppe versehen und damit hydrophiler machen, und

Phase II – konjugierende Enzyme, die einen gut wasserlöslichen Rest an das bereits veränderte Substrat applizieren, damit letzteres selbst gut wasserlöslich wird.

Da Huminstoffe eine Reihe von funktionellen Gruppen besitzen, ist besonders die Aktivität der Phase II-Enzyme von großem Interesse. So weisen erste Befunde aus Seesedimenten daraufhin, dass derartige Enzyme nicht nur in den Organismen, sondern sogar extrazellulär vorkommen können (Bild 6). Es ist deshalb naheliegend, allerdings noch nicht

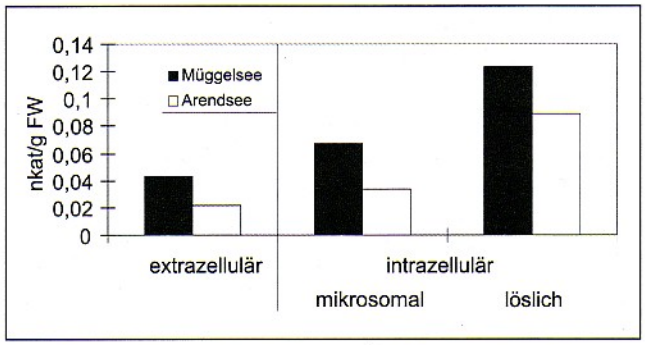

Bild 6 Aktivitäten der Glutathion-S-Transferase (n kat/g FW) in Sedimenten von zwei Seen, und zwar intra- sowie extrazellulär, gemessen gegenüber dem Standardsubstrat CDNB (Pflugmacher et al. 1997).

Figure 6 *The activity of Glutathion-S-Transferase in nkat g^{-1} FW^{-1} in sediments of two lakes. Intra- and extracellular activity is measured in relation to the standard substrate CDNB (Pflugmacher et al. 1997).*

nachgewiesen, dass diese Enzymsysteme ebenfalls für den Abbau der Huminstoffe verantwortlich sein können.

1.2 Quantitative Struktur-Wirkungs-Beziehung für die mikrobielle Verwertung

Betrachtet man die Variabilität der Huminstoffe hinsichtlich ihrer chemischen Zusammensetzung oder Struktur stellt sich unwillkürlich die Frage, ob sich überhaupt Gesetzmäßigkeiten ableiten lassen, wonach welche Huminstoffe durch aquatische Mikroorganismen abgebaut werden können. Oder: Lassen sich bestimmte Strukturmerkmale oder chemische Zusammensetzungen für den mikrobiellen oder enzymatischen „Angriff" verantwortlich machen? Dieses Problem untersuchten Sun et al. (1997) am DOC des Ogeechee River in Georgia, USA. Als Molekülдeskriptoren des DOC dienten die Elementarzusammensetzungen. Erstaunlicherweise ergab sich über multiple Regression eine einfache Beziehung zwischen gebildeter bakterieller Bio-

masse pro DOC- Einheiten nach 3 Tagen[2] und der Elementarzusammensetzung:

$$\text{Biomassezunahme in 3 Tagen} = 38{,}4 + 10{,}6(H/C) + -70{,}9(O/C) + 183{,}2(N/C)$$
$$r^2 = 0{,}933$$

Diese Regression sagt aus, dass die gebildete Biomasse positiv mit dem H/C-Verhältnis korreliert, das seinerseits die relativen Anteile von aliphatischen und aromatischen Strukturen des DOC anzeigt. Die negative Korrelation mit dem O/C-Verhältnis verdeutlicht, dass stärker verwitterter DOC, der generell einen höheren Gehalt an Carboxyl-Gruppen enthält, schlechter bioverfügbar als frischer DOC ist. Am stärksten beeinflusst das N/C-Verhältnis die Bildung von Biomasse, und zwar in positiver Weise. Dieser Quotient gibt den Anteil an Proteinabkömmlingen im DOC an. Proteinhaltiges Material wird demnach bevorzugt verwertet.

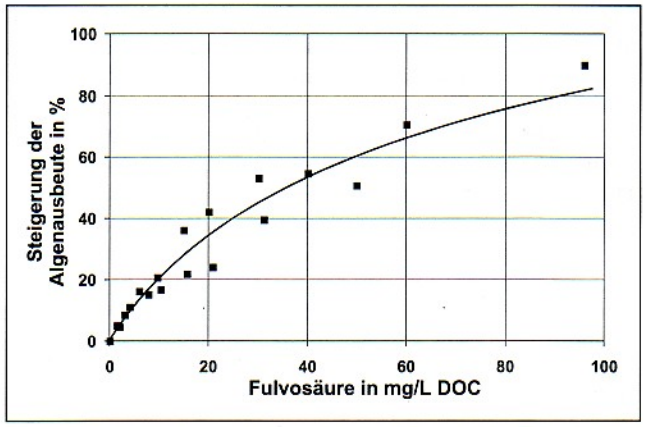

Bild 7 Zunahme der Algenausbeute als Funktion der Fulvosäurenkonzentration in bakterienhaltigen Kulturen (nach Steinberg und Bach 1996).
Figure 7 *Increase of algae yield as a function of the concentration of fulvic acids in bacteria cultures (after Steinberg and Bach 1996).*

2 Verwertung von DHM durch höhere Organismen

Durch jüngste Arbeiten scheint sich bei diesem Thema ein Paradigmenwechsel abzuzeichnen. So konnte Sherr bereits 1988 zeigen, dass marine heterotrophe Flagellaten hochmolekulare Polysaccharide besser als Bakterien zum Wachstum als Kohlenstoffquelle verwerten konnten. Ferner fanden Ciborowski et al. (1997), dass Simuliiden-(Kriebelmücken)-Larven sogar in einem Medium wachsen konnten, das nur allochthonen DOC enthielt, woraus geschlossen wurde, dass DOC eine direkte und bedeutende Nahrungsquelle für diese Larven sein kann. Neben der direkten Verwertung von DHM sind auch sekundär entwickelte Mechanismen wahrscheinlich. Innerhalb der mikrobiellen Gemeinschaft können einige Arten so genannte Cofaktoren, wie Vitamine produzieren, die nicht durch andere Organismen synthetisiert werden können, aber für die primären Verwerter der „Schwerbrennstoffe" notwendig sind.

Ein Beispiel, in dem sehr wahrscheinlich die Algen von bakteriellen Cofaktoren profitierten, wurde von Steinberg und Bach (1996) vorgestellt. Es wurden die DHM-Effekte in einem Algen-Bakterien-System mit denen in einem axenischen Algensystem verglichen. Es wurden Fulvosäuren aus dem Norddeutschen Wasserwerk Fuhrberg (Lüneburger Heide) getestet. Die kokkale Grünalge *Scenedesmus subspicatus* war allein nicht in der Lage, aus den Fuhrberger Fulvosäuren irgendeinen Nutzen zu ziehen: Steigende Konzentrationen an DHM verminderten auffällig die Algenausbeute. Dies verwundert nicht, denn aus Feldstudien ist es ein Gemeinplatz, dass humoses Wasser die Primärproduktion durch Lichtabschwächung (Absorption) vermindert (z. B. Jackson und Hecky 1980). Huminstoffe konkurrieren mit den Pflanzenpigmenten um die eingestrahlten Photonen.

Wenn die *Scenedesmus*-Kultur jedoch Bakterien enthielt, zeigten die Kulturen eine unerwartete Stimulierung des Algenwachstums, wie es Bild 7 verdeutlicht. Offensichtlich folgt die DHM-vermittelte Wachstumsförderung einer Sättigungsfunktion. Das heißt, dass steigende Algenausbeuten durch Lichtmangel begrenzt werden, der über Lichtlöschung durch Fulvosäuren und durch Selbstbeschattung der Algen bewirkt wird. Die Ergebnisse zeigen also, dass eine Wachstumsförderung von Algen auftreten kann. Allgemein ist eine derartige Stimulation von Phytoplanktonwachstum aus Kulturen wie auch aus Freilanduntersuchungen wohl bekannt. Die meisten Autoren führen dies auf eine bessere Bioverfügbarkeit von anorganischen Nährstoffen zurück, insbesondere Spurenmetalle (u. a. Giesy 1976, Jones 1998). Dies kann jedoch nur eine von mehreren möglichen Erklärungen sein. Denn in dem Ansatz von Steinberg und Bach (1996) waren anorganische Nährstoffe weit oberhalb des Algenbedarfs vorhanden – selbst am Ende des Versuchs. Ferner trat der wachstumsfördernde Effekt gegenüber *Scenedesmus* nur in den bakterienhaltigen Kulturen auf, nicht jedoch in den bakterienfreien. Daraus muss geschlussfolgert werden, dass der fördernde Effekt der Fulvo-

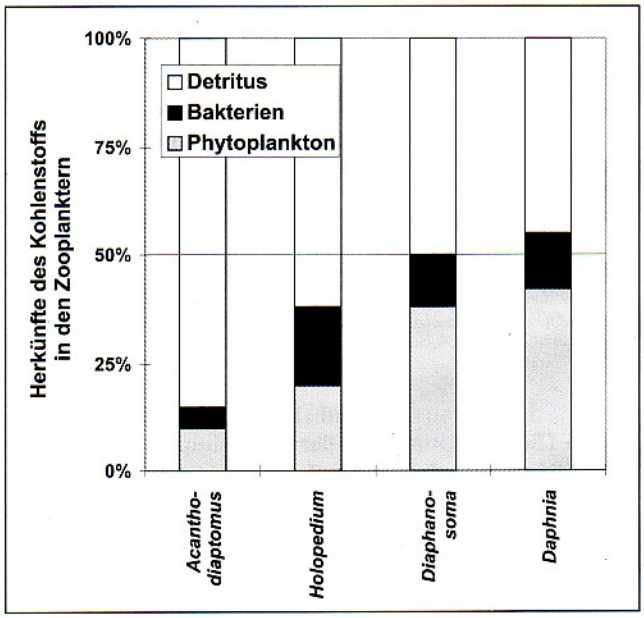

Bild 8 Anteile von Detritus, Bakterien und Phytoplankton in der Nahrung dominierender Crustaceen im See Kjesåsputten (Isotopen-Gleichgewicht, nach Hessen et al. 1990).
Figure 8 *Percentage of detritus, bacteria and phytoplankton in the food of the dominant crustaceans in Lake Kjesåsputten (isotopic equilibrium, after Hessen et al. 1990).*

[2] Diese Beziehung sollte nicht als Mikrobenwachstum bezeichnet werden, da nach der gängigen mathematischen Beschreibung von Wachstumsprozessen ($dx/dt = \mu x$) die Zeit berücksichtigt wird, die hier in dieser Beziehung fehlt.

säuren der mikrobiellen Aktivität zugeschrieben werden muss. Dies kann durch – noch nicht identifizierte – Wachstumsfaktoren geschehen sein. Dies scheint eine allgemeine, wenn auch nicht sehr häufig auftretende Eigenschaft von Huminstoffen zu sein, da vergleichsweise Effekte mit einem NOM auch gegenüber Makrophyten gefunden wurden (Steinberg et al. in Vorb.).

Gleichsam eine noch größere Überraschung erlebten Zooplanktonforscher, als sie die Herkunft des Kohlenstoffs in Zooplanktern über stabile Kohlenstoffisotope analysierten. Man nahm bisher an, dass Zooplankton nur dann Detritus verwerten kann, wenn er durch Bakterien oder niedere Pilze besiedelt ist, so stellte sich sowohl im norwegischen See Kjesåsputten als auch im Loch Ness heraus, dass um 50 % des gesamten organischen Kohlenstoffs in den Zooplanktern direkt aus dem Detritus stammte, ohne von den Bakterien verwertet worden zu sein. Im Kjesåsputten kamen ferner zwischen 5 und 20 % von Bakterien und bis zu 40 % aus dem Phytoplankton (Hessen et al. 1990), wenn man die Situation des Isotopen-Gleichgewichts (Bild 8) betrachtete. Besonders unerwartet war die Bedeutung des Detrituskohlenstoffs im Falle des *Acanthodiaptomus denticornis*, der offensichtlich mehr als 80 % seines Körper-Kohlenstoffs aus Detritus bezog – unerwartet deshalb, weil Copepoden zu den selektiv und nicht filtrierend fressenden Crustaceen gehören.

Vergleichbare Zahlen konnten inzwischen auch für das relativ große, mäßig humose Loch Ness (Schottland) über Untersuchungen von stabilen Isotopen von Jones et al. (1998) bestätigt werden. Hier waren es fast 50 % des Körperkohlenstoffes, der direkt oder indirekt über Bakterien aus detritischen Quellen stammte.

Diese wenigen Beispiele zeigen, dass sich das Zooplankton selbst großer Seen überwiegend von allochthonen Quellen ernährt. Es ist zwar noch nicht nachgewiesen, doch steht zu erwarten, dass sich die Signaturen an stabilen Isotopen bis hin zu den Fischen fortsetzen. Da die Fische jedoch nicht nur von einer oder wenigen Zooplankton- oder Zoobenthosarten ernähren, dürfte sich der Isotopen-Effekt stark abschleifen.

Literatur

Amon, R. M. W.; Benner, R. (1996): Bacterial utilisation of different size classes of dissolved organic matter. Limnol. Oceanogr. 41, 41–51.

Beck, T. (1968): Mikrobiologie des Bodens. Bayerischer Landwirtschaftsverlag München Basel Wien.

Biddanda, B.; Ogdahl, M.; Cotner, J. (2001): Dominance of bacterial metabolism in oligotrophic relative to eutrophic waters. Limnol. Oceanogr. 46, 730–739.

Ciborowski, J. J. H.; Craig, D. A.; Fray, K. M. (1997): Dissolved organic matter as a food for black fly larvae (Diptera: Simuliidae). J. N. Am. Benthol. Soc. 16, 771–780.

Cotner, J. B.; Johengen, T. H.; Biddanda, B. A. (2000): Intense winter heterotrophic production stimulated by benthic resuspension. Limnol. Oceanogr. 45, 1672–1676.

de Haan, H. (1976): Evidence for the induction of catechol-1,2-oxygenase by fulvic acid. Plant Soil 45, 129–136.

Duarte, C. M.; Agustí, S.; Arístegui, J.; Gonzáles, N.; Anadón, R. (2001): Evidence for a heterotrophic subtropical northeast Altantic. Limnol. Oceanogr. 46, 425–428.

Freeman, C.; Evans, C. D.; Montheit, D. T.; Reynolds, B.; Fenner, N. (2001): Export of organic carbon from peat soils. Nature 412, 785.

Giesy, J. P. Jr. (1976): Stimulation of growth in *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae) by humic acids under iron limited conditions. J. Phycol. 12, 172–179.

Hatcher, P. G.; Spiker, E. C. (1988): Selective degradation of plant biomolecules. In: Frimmel, F. H.; Christman, R. F. (Hrsg.): Humic Substances and Their Role in the Environment, 59–74. John Wiley, Sons, Chichester.

Hessen, D. O.; Andersen, T.; Lyche, A. (1990): Carbon metabolism in a humic lake: pool sizes and cycling through zooplankton. Limnol. Oceanogr. 35, 84–99.

Jackson, C. R.; Foreman, C. M.; Sinsabaugh, R. L. (1995): Microbial enzyme activities as indicators of organic matter processing rates in a Lake Erie coastal wetland. Freshwat. Biol. 34, 329–342.

Jackson, T. A.; Hecky, R. E. (1980): Depression of primary productivity by humic matter in lake and reservoir waters of the boreal forest zone. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 37, 2300–2317.

Jahnel, J.; Ilieva, P.; Frimmel, F. H. (1993): Enzymatic characterization of humic substances. Acta Hydrochim. Hydrobiol. 21, 43–50.

Jones, R. I. (1998): Phytoplankton, primary production and nutrient cycling. In: Hessen, D. O.; Tranvik, L. J. (Hrsg.): Aquatic Humic Substances – Ecology and Biogeochemistry. Ecological Studies 133, 145–175.

Jones, R. I.; Gey, K.; Sleep, D.; Quarmly, C. (1998): An assessment, using stable isotopes, of the importance of allochthonous organic carbon sources to the pelagic food web in Loch Ness. Proc. R. Soc. Lond. B. 265, 105–111.

Lovley, D. R.; Coates, J. D.; Blunt-Harris, E. L.; Phillips, E. J. P.; Woodward, J. C. (1996): Humic substances as electron acceptors for microbial respiration. Nature 382, 445–448.

Münster, U.; Einiö, P.; Nurminen, J.; Overbeck, J. (1992): Extracellular enzymes in a polyhumic lake: Important regulators in detritus processing. Hydrobiologia 229, 225–238.

Münster, U.; Heikkinen, E.; Salonen, K.; de Haan, H. (1998): Tracing of peroxidase activity in humic lake water. Acta hydrochim. hydrobiol. 26, 158–166.

Münster, U.; Salonen, K.; Tulonen, T. (1999): Decomposition. In: Keskitalo, J.; Eloranta, P. (Hrsg.): Limnology of Humic Waters, 225–264. Backhuys Publishers, Leiden.

Münster, U.; de Haan, H. (1998): The role of microbial extracellular enzymes (MEE) in the transformation of dissolved organic matter (DOM) in humic waters. In: Hessen, D. O.; Tranvik, L. J. (Hrsg.): Aquatic Humic Substances – Ecology and Biogeochemistry. Ecological Studies 133, 199–257.

Payne, J.; Gilvarg, C. (1968): Size restriction on peptide utilization in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 10, 6291–6299.

Pflugmacher, S.; Geissler, K.; Steinberg, C. (1999): Activity of phase I and phase II detoxication enzymes in different cormus parts of *Phragmites australis*. Ecotoxicol. Environ. Safe. 42, 62–66.

Pflugmacher, S.; Hupfer, M.; Steinberg, C. (1997): Detoxifizierende Enzymsysteme im Sediment – Erste Ansätze zur Isolation und Akvitätsbestimmung von Endo- und Ectoenzymen aus limnischen Sedimente. SETAC-Deutschland, Tagung 1997 in Aachen, Poster.

Scott, D. T.; McKnight, D. M.; Blunt-Harris, E. L.; Kolesar, S. E.; Lovley, D. R. (1998): Quinone moieties act as electron acceptors in the reduction of humic substances by humics-reducing microorganisms. Environ. Sci. Technol. 32, 2984–2989.

Sherr, E. B. (1988): Direct use of high molecular weight polysaccharides by heterotrophic flagellates. Nature, 335, 348–351.

Sinsabaugh, R. L.; Antibus, R. K.; Linkins, A. E. (1991): An enzymatic approach to the analysis of microbial activity during litter decomposition. Agricult. Ecosyst. Environ. 34, 43–54.

Steinberg, C. E. W. (2000): Biogeochemische Regulierung in limnischen Ökosystemen: Zur ökologischen Bedeutung von Huminstoffen. Teil 1. Kap. IV–4.1., In: Steinberg, C.; Calmano, W.; Klapper, H.; Wilken, R.-D. (Hrsg.): Handbuch Angewandte Limnologie, 11. Erg. Lfg. 12/2000, 64, ecomed, Landsberg/Lech.

Steinberg, C. E. W.; Pflugmacher, S.; Paul, A.: Die lange vernachlässigte ökologische Regulation in Binnengewässern: Gelöste Huminstoffe – VII: Direkte Wirkung auf aquatische Pflanzen. WASSER & BODEN (in Vorb.).

Steinberg, C. E. W.: Die lange vernachlässigte ökologische Regulation in Binnengewässern: Gelöste Huminstoffe – V: Energie für das aquatische Nahrungsnetz unter Einwirkung von Licht. WASSER & BODEN (in Vorb.).

Steinberg, C. E. W.; Bach, S. (1996): Growth promotion by a groundwater fulvic acid in a bacteria/algae system. Acta hydrochim. hydrobiol. 24, 98–100.

Steinberg, C. E. W.; Sachse, A.; Gelbrecht, J. (2002): Gelöste Huminstoffe – Teil III: Geochemische Verbindung von Land und Gewässern. WASSER & BODEN, 54:1+2, 71–76.

Stewart, A. J.; Wetzel, R. (1982): Influence of dissolved humic material on carbon assimilation and alkaline phosphatase activity in natural algal-bacterial assemblages. Freshwat. Biol. 12, 369–380.

Sun, L.; Perdue, E. M.; Meyer, J. L.; Weis, J. (1997): Use of elemental composition to predict beioavailability of dissolved organic matter in a Georgia river. Limnol. Oceanogr. 42, 714–721.

Thomas, J. D. (1997): The role of dissolved organic matter, particular free amino acids and humic substances, in freshwater ecosystems. Freshwat. Biol. 38, 1–36.

Thurman, E. M. (1985): Organic geochemistry of natural waters. Martinus Nijhoff / Dr. W. Junk Publishers, 497, Dordrecht.

Tranvik, L. J. (1988): Availability of dissolved organic carbon for planktonic bacteria in oligotrophic lakes of differing humic content. Microb. Ecol. 16, 311–322.

Tranvik, L. J.; Höfle, M. G. (1987): Bacterial growth in mixed cultures on dissolved or-ganic carbon from humic and clear waters. Appl. Environ. Microbiol. 53, 482–488.

Tulonen, T.; Kankaala, P.; Ojala, A.; Arvola, L. (1994): Factors controlling production of phy-toplankton and bacteria under ice in a humic boreal lake. J. Plankton Res. 16, 1411–1432.

Tulonen, T.; Salonen, K.; Arvola, L. (1992): Effects of different molecular weight fractions of dissolved organic matter on the growth of bacteria, algae, and protozoa from a highly humic lake. Hydrobiologia 229, 239–252.

Wetzel, R. (1992): Gradient-ominated ecosystem: sources and regulatory functions of dissolved organic matter in freshwater ecosystems. Hydrobiologia 229, 181–198.

Anschriften der Verfasser

Christian Steinberg, Leibniz-Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei, Müggelseedamm 310, 12587 Berlin; Ulrike Burkert, Leibniz-Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei, Abteilung Limnologie Geschichteter Seen, Alte Fischerhütte 2, 16775 Stechlin OT Neuglobsow

Artikel II

Biogeochemistry **71:** 225–246, 2004.
© 2004 *Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.*

The hydrogeology of a catchment area and an artificially divided dystrophic lake – consequences for the limnology of Lake Fuchskuhle

U. BURKERT[1,*], G. GINZEL[2], H. D. BABENZIEN[1] & R. KOSCHEL[1]
[1]*Department of Limnology of Stratified Lakes, Leibniz-Institute of Freshwater Ecology and Inland Fisheries, Alte Fischerhuette 2, 16775 Stechlin-Neuglobsow, Germany;*
[2]*Department of Ecohydrology, Leibniz-Institute of Freshwater Ecology and Inland Fisheries, Mueggelseedamm 310, 12587 Berlin, Germany (*Author for correspondence: Alte Fischerhuette 2, 16775 Stechlin-Neuglobsow, Germany; e-mail: ulrike.burkert@igb-berlin.de; phone: +49-33082-69920; fax: +49-33082-69917)*

Received 30 June 2003; accepted in revised form 20 January 2004

Key words: Catchment area, Fen, Humic substances, Land–water interface, Peat-aquifer, Water balance

Abstract. The hydrogeology between the catchment area and the divided dystrophic Lake Fuchskuhle with respect to the genesis and the land–water interactions were investigated. Water levels at numerous locations in the catchment area were measured in order to characterize the hydrology. The water balance of the area was calculated based on long term climatic investigations. The geology of the peat was documented at 25 sampling points by cores collected with a peat drill. Chemical parameters including pH, total phosphorus and total nitrogen concentrations, DOC concentration, colour (SAK 436 m^{-1}) and the UV_{254}/DOC ratio in the catchment area and in two compartments (NE and SW compartment) were determined. The chemical fluxes of DOC, nitrogen and phosphorus from the catchment area into one compartment (SW compartment) were determined. During the genesis of the Lake Fuchskuhle area two aquifer systems (local peat aquifer, regional sandy main aquifer) developed. Both aquifers are largely independently with almost no lateral interactions. Two compartments are supplied with water from the local peat aquifer. From the other two compartments, however, water is flowing out into the peat body. During high groundwater inflow into the SW compartment higher concentration of DOC, nitrogen and phosphorus in the SW compartment were detected. The fen can be divided in two parts: in the meso – to eutrophic fen northwest and the mainly meso – to oligotrophic – acid fen in the southeast. The significant differences in parameters such as pH, conductivity and DOC concentration gave a clear picture of the heterogeneity of the two compartments and their dependence on the catchment area with the two aquifers.

Introduction

Lakes are integrated into the global water cycle and are, therefore, influenced by precipitation, evaporation and water fluxes by groundwater or surface water. In addition to biotic and abiotic activities within the lakes; organic

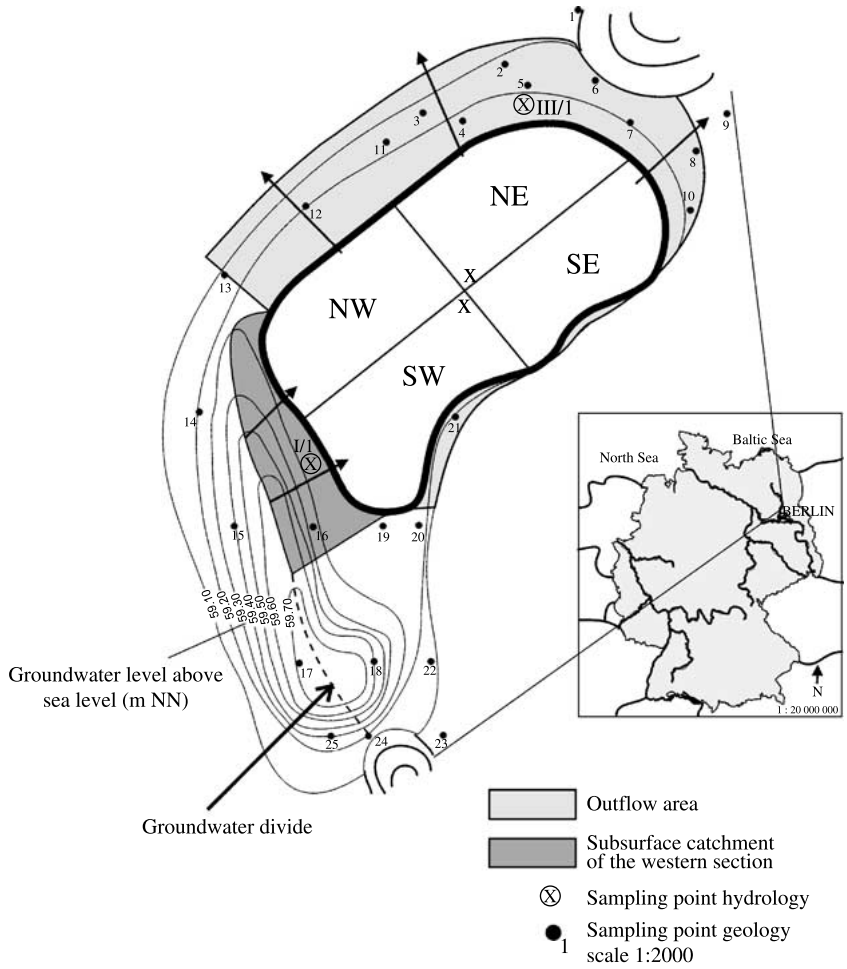

Fig. 1. Lake Fuchskuhle: location of the lake in the Mecklenburg–Brandenburg Lake District in north east Germany and the hydrogeology of the catchment area and the compartments (main map). The figure originates partly from Sachse et al. (2001).

material, nutrients, and elements from the surroundings will be transferred via the water flow into the system. Terrestrial ecosystems are proposed as the dominant organic carbon source for surface waters (Wetzel 1975; Thurman 1985; Hemond 1990; Mulholland et al. 1990). Mulholland and Hill (1997) found in their investigations a strong impact of the catchment area on seasonal patterns of nutrients and DOC concentrations in stream water.

Other investigations have shown that organic carbon concentrations in runoff waters from wetlands are much higher than in runoff waters from well drained mineral soils (Mulholland & Kuenzler 1979; Hemond 1990; David

& Vance 1991). The leaching of organic carbon, however, may depend on soil structure and porosity, particularly peat, on sorption processes occurring along the water gradient, and on biological degradation (Dickinson 1983; Wetzel 1992; Succow & Joosten 2001).

Wetlands are effective in delaying storm run-off by retention the surface water, by preventing soil erosion and by retention and storage of nutrients and DOC (Soulsby et al. 1998, 2002). Investigations in the Scottish uplands on hydrological control of water chemistry showed the essential role of peat in regulating the quantity and quality of surface waters (Soulsby et al. 2002).

This study focuses on the hydrogeology of a small lake and the catchment area with respect to the genesis. The water balance between lake and catchment area and chemical fluxes were of main interest. Lake Fuchskuhle was chosen for this investigation because it was artificially subdivided into four compartments (Kasprzak et al. 1988; Kasprzak 1993) (Fig. 1). The four compartments have subsequently developed divergent chemical and biological characteristics (Kasprzak 1993; Koschel 1995; Bittl 1999; Hehmann et al. 2001; Sachse et al. 2001; Chan et al. 2002). Investigations on the composition of the DOC pool indicated remarkably differences between the compartments of Lake Fuchskuhle (Bittl 1999). Sachse et al. (2001) stated the impact of the catchment area on these differences in DOC composition. Based on the results of Bittl (1999) and Sachse et al. (2001) further detailed investigations on the hydrogeological system (including the genesis) within the peat body were needed in order to quantify the monthly inflow of the groundwater and the transport of DOC and nutrients from the catchment area into the compartments of Lake Fuchskuhle. The following questions are addressed in this paper: (i) the detailed hydrogeological system that developed in the Fuchskuhle area (ii) the water balance between the catchment area and the lake (iii) chemical fluxes of DOC and nutrients.

Material and methods

Study site

The dystrophic Lake Fuchskuhle is situated in the Mecklenburg–Brandenburg Lake District in northeast Germany (Fig. 1). The area forms part of the large outwash plain in the southwest foreland of the Fürstenberger end moraine from the Weichsel glacial period. End moraine, ground moraine, outwash plain and glacial spillways such as Lake Fuchskuhle typify this landscape. The surface area of the lake is 14,930 m^2, the median depth is 3.3 m and its catchment is 5000 m^2 (Table 1). This constitutes a rather small area, which is easily comprehensible. The climate of the area is characterized by a transition

Table 1. Volume, surface, depth and water balance of the catchment area and the compartments of Lake Fuchskuhle.

	Lake Fuchskuhle	SW compartment	NW compartment	NE compartment	SE compartment
Volume (m^3)[a]	41570	9700	10630	11300	9940
Surface (m^2)[a]	14930	4430	3680	3360	3460
Maximum depth (m)[a]	5.5	4.5	5.0	5.5	4.9
Catchment area (peat aquifer) (m^2)	5000	3000	2000	0	0
Groundwater recharge (peat aquifer) (m^3/year)[b]	694	416	278	0	0
Groundwater flow from peat aquifer to lake (m^3/year)[c]	715	429	286	0	0
Groundwater flow from lake to peat aquifer (m^3/year)[c]	1090	250	228	260	352
Surface water recharge (m^3/year)[b]	1229	–	–	–	–
Leakage effects (partial supply of the main aquifer, m^3/year)	854[d]	–	–	–	–

[a]From Kasprzak (1993).
[b]Calculation based on mean precipitation over 40 years (1962–2001).
[c]Calculation by Darcy's Law, measurements 2000/2001.
[d]Including catchment area.

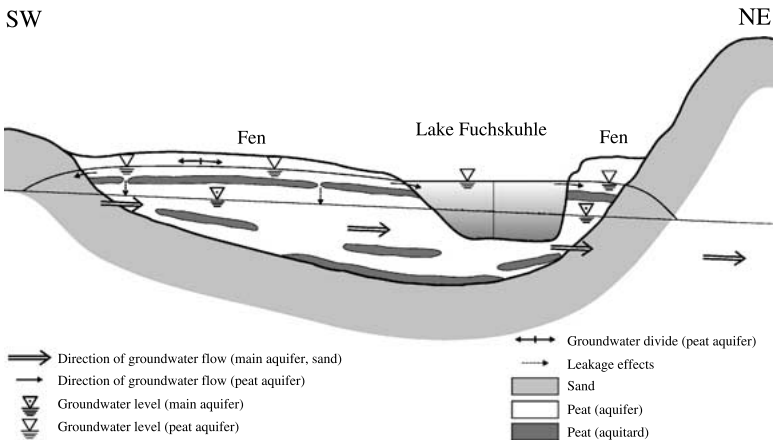

Fig. 2. Cross-section of Lake Fuchskuhle and the adjacent fen showing directions of groundwater flows and levels (scheme).

from maritime to continental influence with a dominant maritime character and a median precipitation of 659 mm per year (Richter 1997). Lake Fuchskuhle is connected to a fen of *Ledo-Pinetum* vegetation (Succow & Jeschke 1986) on two sides, which is extensive in the southwest and rather small in the northeast (Fig. 2). Forest of *Myrtillo-Pinetum* vegetation surrounds the lake and fen. The lake has no inlet or outlet, but is fed by rain and groundwater. In 1986 the naturally acidic lake was subdivided into two and in 1989 into four compartments by plastic curtains: southwest (SW), northwest (NW), northeast (NE) and southeast (SE) (Kasprzak et al. 1988; Kasprzak 1993) (Fig. 1). The volume of the compartments lay between 9700 m^3 in the SW and 11,300 m^3 in the NE (Table 1). The surface of the compartments range between 3360 m^2 in the NE and 4430 m^2 in the SW (Table 1). Investigations on the water balance of the area have been carried out since 1957 (Richter 1997), based on a dense network of measuring points for precipitation, levels of groundwater, and lake levels. The hydrogeological investigations in the Stechlin area, which includes the catchment area of Lake Fuchskuhle, began in 1995 (Ginzel & Handke 1995; Ginzel 1999, 2000). A groundwater divide developed in the peat adjacent to the SW compartment of Lake Fuchskuhle, which makes it possible to differentiate an individual subsurface catchment area for both western compartments of the lake (Sachse et al. 2001). From this part of the peat body, the groundwater of the fen is flowing into the SW and NW compartments (Sachse et al. 2001). In contrast, the NE and SE compartments have no influx from the peat, water from both compartments is flowing out into the peat body (Sachse et al. 2001).

Due to the division and a moderately wind-induced mixing of the water in the compartments, the lake has been stratified from spring to autumn, with a metalimnion between 2 and 3 m deep and with an anoxic zone near the sediment which can reach the metalimnion during summer. Since the division, the compartments developed divergent physical and chemical parameters (Kasprzak 1993; Koschel 1995; Bittl 1999; Sachse et al. 2001), microbial activity (Bittl & Babenzien 1996; Bittl 1999; Chan et al. 2002), abundance and structure of phytoplankton communities (Hehmann & Krienitz 1996; Hehmann et al. 2001), and structure of the food web (Simek et al. 1998).

Hydrogeological investigations

Measurements of the water level were made between 18 April 2000 and 31 December 2001 at 2 week intervals at:

- 14 wells in the peat aquifer (groundwater level),
- 17 wells in the main aquifer (groundwater level),
- 1 measuring point in the NE compartment of Lake Fuchskuhle (surface water).

The groundwater flow from the peat aquifer to the lake (SW and NW compartment) and the groundwater flow from the lake (SE and NE compartment) out to the peat aquifer, is calculated per year and also monthly by Darcy's Law: rate of groundwater flow $(Q) = B \times M \times G \times k_f$, where B is the width of flow (m), M the thickness of the aquifer (m), G the falling gradient of groundwater (parts per mille) and k_f the permeability coefficient (m/s). The calculation per year is based on the mean precipitation determined over 40 years (1962–2001) (Richter 1997). The calculation per month is based on the precipitation determined by the Deutscher Wetterdienst (German weather service) in Neuglobsow. The chemical fluxes of DOC, phosphorus and nitrogen from the catchment area into the SW compartment are calculated multiplying the nutrient and DOC concentrations (measured in the well I/1 peat) by the determined groundwater flow.

The wells were made of polyvinylchloride-KT and had openings of 0.3 mm in diameter through which to collect the interstitial water of the fen.

From 10 April 2001 to 12 April 2001 the geology of the peat body was documented at 25 sampling points (Fig. 1) by cores collected with a peat drill. The cores were 50 cm long and had a diameter of 5 cm. The botanical structure and the rate of decomposition of the peat body were analysed per common field methods by squeezing of the sample and using magnifying glass for analyses.

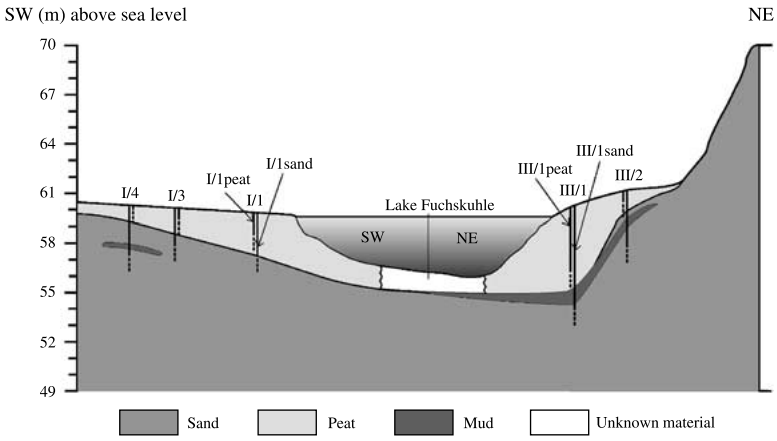

Fig. 3. Morphology of Lake Fuchskuhle and the catchment areas with sampling points: well I/1-peat, well I/1-sand, well III/1-peat and well III/1-sand (scheme).

Sampling and measurements of physical and chemical parameters

The investigation was carried out monthly from September 2000 until September 2001 in two compartments (SW and NE) of the lake and in two wells (I/1 and III/1) of the catchment area. The SW and NE compartments were chosen for the study because differences in water chemistry were most pronounced. The water samples of both compartments were taken in the morning at a depth of 0.5 m with a Limnos-sampler.

The two wells chosen were: I/1-peat, which is located in the fen adjacent to the SW compartment, and III/1-peat, which is located in the fen adjacent to the NE compartment (Fig. 3). The groundwater chemistry of the wells are representative of the entire catchment area. Both wells are closest located to the adjacent compartments and were therefore chosen. For comparison of the physical–chemical parameters between the peat aquifer and the main (sand) aquifer in the catchment areas of the SW and NE compartments, well I/1-peat and I/1-sand, and at the other side of the lake, well III/1-peat and III/1-sand, were investigated (Fig. 3). The wells were emptied with a boat pump, samples were collected after the wells refilled with interstitial water. The sampling flasks were filled, avoiding air bubbles, to minimize oxygen contact. All samples were immediately taken to the laboratory.

In the SW and NE compartment, and in the I/1-peat and III/1-peat wells, the following physical and chemical parameters were recorded: pH, temperature, conductivity, concentration of dissolved organic carbon (DOC), water colour (SAK 436) and content of unsaturated aromatic structures on DOC (SAK 254/ DOC), concentrations of total phosphorus and total nitrogen. The samples were frozen at $-20\,^{\circ}C$ until total phosphorus and total nitrogen

concentrations were determined. The spectrophotometric measurements (SAK 436, SAK 254) were done within 2 h after sampling. The samples for analyses of DOC were kept frozen at −30 °C (measured as non-purgeable organic carbon, NPOC). Measurements were made with a Shimadzu total organic carbon analyser TOC-5050 (Zwirnmann & Dietrich 1999a) within 2 months. The water colour was defined according to the European standard (EN ISO 7887:1994). The determination of the portion of unsaturated, aromatic structures of the DOC was made with a Beckman spectrophotometer DU 650 measuring the absorbance at $\lambda = 436$ nm and at $\lambda = 254$ nm respectively, using 1 cm quartz cells and purified water as the reference. The relationship between SAK (λ)/DOC served as the specific absorption coefficient, and is expressed in $1\,mg^{-1}\,m^{-1}$ (Sontheimer et al. 1995). The specific spectral absorbance at $\lambda = 254$ nm (SAK (254 nm/DOC)) reflects the valence electrons and unsaturated, aromatic character of the structure of humic substances (Korshin et al. 1998, 1999a). Prior to measurements of absorbance, the samples were filtered with a membrane filter of 0.45 µm pore size. With each determination, the pH and temperature of the filtered sample were recorded. The measurements of total phosphorus and total nitrogen were made with the Perstop flow injection analysis system TECA FIA STAR 5010/5030 (Tecator Application Notes (ASN) 60-03/83 for TP – detection limit $0.005\,mg\,l^{-1}$; ASN 110-03/92 for TN – detection limit $0.01\,mg\,l^{-1}$). In September 2000 and August 2001 mixed samples taken at 0 and 2 m depth were analysed for total phosphorus. Temperature, pH and conductivity were measured in the field by using probes (OXI 196 resp. pH 196 T, WTW Weilheim).

In June 2002 the peat aquifer with the main aquifer were compared by determining: pH, conductivity, magnesium, calcium, DOC, total phosphorus and total nitrogen. Total phosphorus and total nitrogen were determined by the flow injection analysis system Foss-5012 Analyser (Zwirnmann et al. 1999b). Samples for calcium and magnesium analysis were stored at room temperature at pH 2 and analysed within 48 h by atomic absorption spectroscopy (AAS 3300 of Perkin Elmer) (Zwirnmann et al. 1999b).

Results

Hydrogeology

The results of the hydrogeological investigations are presented in Fig. 2 and Table 2. The outwash plain is an uncovered aquifer, up to 50 m thick, and is composed of complex sediment and other underlying glacial fluviatile deposits; this is the main aquifer of the area. Lake Fuchskuhle and the adjacent fen occupy a hollow above the field of groundwater flow of the main aquifer

Table 2. Geological investigation of the peat body at 25 sampling points at different depths.

Sampling point	Depth (m)	Type of peat
1	0.20	Peat[a]
2	0.50	Peat[a]
	1.05	Forest-swamp peat
	1.40	Peat mud
	1.70	*Sphagnum–Scheuchzeria* peat
	2.00	*Sphagnum* peat
3	0.50	*Sphagnum* peat
4	0.10	Peat[a]
	0.75	*Carex* peat
	1.90	Peat mud
	2.00	Forest-swamp peat
	2.25	*Carex* peat
	2.50	*Scheuchzeria* peat
5	0.25	*Sphagnum* peat
	0.50	*Carex* peat
6	0.50	Forest-swamp peat
7	0.40	*Sphagnum* peat
	0.50	*Carex-Sphagnum* peat
8	0.25	*Sphagnum* peat
	0.60	*Carex-Sphagnum* peat
	1.30	*Sphagnum* peat
	1.40	Peat mud
	2.00	*Sphagnum-Carex* peat
	2.55	*Sphagnum* peat
	2.80	Peat mud
	2.90	*Sphagnum* peat
	4.90	Peat mud
	5.00	*Scheuchzeria* peat
9	0.80	Forest-swamp peat
10	0.20	*Sphagnum* peat
	0.50	Forest-swamp peat
	1.70	Peat mud
	2.05	*Phragmitis-Carex* peat
	2.35	Medium sand
	2.55	*Phragmitis* peat
11	0.40	Forest-swamp peat
	0.50	*Carex* peat

Table 2. (continued)

Sampling point	Depth (m)	Type of peat
	1.40	Forest-swamp peat
12	0.60	Forest-swamp peat
	1.25	*Carex* peat
	1.30	Forest-swamp peat
	1.50	*Scheuchzeria* peat
	2.25	Peat mud
	2.50	*Sphagnum* peat
	2.65	Peat mud
	2.90	*Scheuchzeria* peat
13	0.50	Forest-swamp peat
	0.85	*Carex* peat
	1.00	*Scheuchzeria* peat
	1.80	*Carex* peat
	2.90	Peat mud
	3.85	*Scheuchzeria* peat
14	1.80	Peat[a]
	2.00	*Carex* peat
	2.50	*Scheuchzeria* peat
	2.95	Forest-swamp peat
15	1.00	Peat[a]
16	1.70	Peat[a]
	2.00	*Scheuchzeria* peat
	2.25	*Carex* peat
17	0.50	Peat[a]
18	1.60	*Sphagnum* peat
	2.00	*Carex-Scheuchzeria* peat
19	0.25	*Sphagnum* peat
	0.80	*Sphagnum* peat
	1.00	*Sphagnum* peat
	3.00	*Sphagnum* peat
		Weakly decomposed
	3.50	*Sphagnum–Scheuchzeria* peat
	4.00	*Scheuchzeria-Sphagnum* peat
	4.30	*Scheuchzeria* peat
20	1.00	Forest-swamp peat
21	0.50	*Sphagnum* peat
	1.10	Peat[a]
22	0.20	*Sphagnum* peat

Table 2. (continued)

Sampling point	Depth (m)	Type of peat
	1.30	*Sphagnum* peat
		Strongly decomposed
	1.40	*Scheuchzeria* peat
23	0.50	Peat[a]
	1.00	Forest-swamp peat
24	0.40	Peat[a]
25	0.50	Peat[a]
	1.00	Forest-swamp peat

[a]Undefined peat.

(Fig. 2). In the first stage of genesis, the hollow was an integrated part of the main aquifer and filled with water as a late glacial-early holocene lake. The surface and the groundwater were integrated into a hydraulic system. Initial sedimentation in the deeper parts of the lake was organogenic algal mud (limnic sequence) with an elastic consistency. The low permeability of the algal mud hydraulically sealed the water body from the main aquifer. In the NW part of the fen after sedimentation of the algal mud the lake was partially overgrown indicated by well conserved *Scheuchzeria* peat (telmatic sequence) (Table 2). Before overgrowth was completed, a significant increase of groundwater of the peat aquifer and the lake water level occurred, which is indicated by extended peat mud. Then, at a second stage of sedimentation (limnic sequence) predominantly eutrophic peat developed (*Carex* peat, *Phragmites* peat and forest-swamp peat) (Table 2). The result was a new stage of limnic sedimentation and of overgrowth, with new limnic and telmatic sequences in lithostratigraphy. Later during the development of the area a change from eutrophic to meso- or oligotrophic peat occurred, which is indicated by *Sphagnum* peat (Table 2). In the NE and SE part of the fen the telmatic sequence is characterized by a more meso- to oligotrophic vegetation (*Sphagnum* peat). In the NW part of the fen, highly degraded peat dominates; mud occurs here only in thin layers. However, in the NE and SE part of the fen, slightly degraded peat dominates. The fen can be divided in two parts: in the meso- to eutrophic fen northwest and the mainly meso- to oligotrophic – acid fen in the southeast (following the ecological system of mires developed by Succow (1988)).

With the first stage of sedimentation (algal mud), a second upper aquifer developed as a groundwater lens over the main aquifer. The second upper aquifer exists without lateral influx from the main aquifer (Fig. 2), normally

Table 3. Groundwater flow from the catchment area into the SW compartment and chemical fluxes of DOC, P and N into the SW compartment of Lake Fuchskuhle between September 2000 and August 2001.

Month	Groundwater flow (m^3 $month^{-1}$)	DOC input ($kg\ month^{-1}$)	($mg\ l^{-1}$)	P input ($g\ month^{-1}$)	($\mu g\ l^{-1}$)	N input ($kg\ month^{-1}$)	($mg\ l^{-1}$)
September 00	75.6	4.91	0.51	12.62	1.30	0.42	0.04
October 00	12.0	0.83	0.09	3.40	0.35	0.10	0.01
November 00	47.1	3.17	0.33	12.27	1.27	0.39	0.04
December 00	63.6	4.59	0.47	9.28	0.96	0.47	0.05
February 01	131.4	10.23	1.05	51.05	5.26	1.12	0.12
March 01	64.2	4.57	0.47	6.49	0.67	0.42	0.04
May 01	0[a]	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
June 01	14.4	1.02	0.11	1.82	0.19	0.09	0.01
July 01	0[a]	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
August 01	67.5	4.44	0.46	8.36	0.86	0.51	0.05

[a]Groundwater depletion.

water influx is exclusively by precipitation, but during intensive precipitation the influx of surface water from the slopes is added. In marginal parts of the hollow, the peat body ends and the water of the peat aquifer flows into the groundwater of the outwash plain and supplies the main aquifer.

Water balance and chemical fluxes

The water balance of the catchment area and Lake Fuchskuhle is summarized in Table 1. During the investigated period 715 m^3 $year^{-1}$ groundwater entered Lake Fuchskuhle via the peat aquifer. The SW compartment received 429 m^3 $year^{-1}$ and the NW compartment 286 m^3 $year^{-1}$. The groundwater flow from the SW compartment out to the peat aquifer was 250 m^3 $year^{-1}$ and from the NW compartment 228 m^3 $year^{-1}$. The NE and SE compartments received no groundwater from the peat aquifer but water from both compartments entered the peat aquifer, 260 m^3 $year^{-1}$ from the NE and 352 m^3 $year^{-1}$ from the SE.

The monthly groundwater flow from the peat aquifer into the SW compartment and the calculated chemical fluxes of DOC, phosphorus and nitrogen between September 2000 and August 2001 are listed in Table 3. The groundwater flow ranged from 12.0 m^3 in October 2000 to 131.4 m^3 in February 2001. In May and July 2001 groundwater depletion occurred.

The DOC input from the peat aquifer into the SW compartment ranged from 0.83 kg in October 2000 to 10.23 kg in February 2001. The input of phosphorus ranged from 1.82 g in June 2001 to 51.05 g in February 2001. The nitrogen input ranged from 0.09 kg in June 2001 to 1.12 kg in February

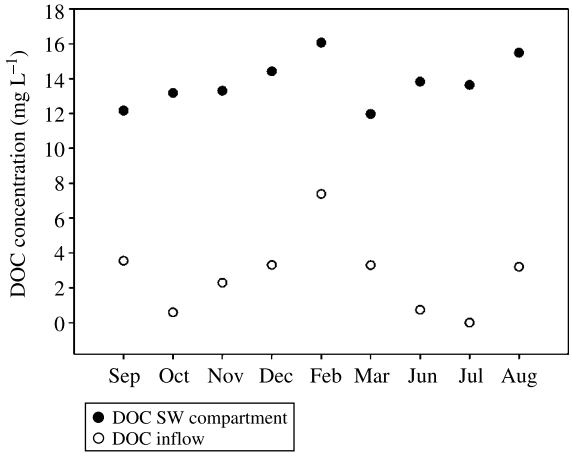

Fig. 4. DOC concentration in the SW compartment and additional supply (inflow) of DOC through the catchment area into the SW compartment. *Data multiplied by factor seven.

2001. The input of DOC, phosphorus and nitrogen were highest in February 2001. The connection between the DOC inflow into the SW compartment and the DOC concentration in the SW compartment is illustrated in Fig. 4. The DOC concentration in the SW compartment increased from September 2000 until February 2001. Simultaneously, the inflow of DOC from the catchment area increased from October 2000 until February 2001. From March 2001 until July 2001 the inflow of DOC decreased followed by an increase in August 2001. In comparison, the DOC concentration in the SW compartment decreased in March 2001 but increased afterwards until August 2001.

Physical and chemical parameters of the lake and the catchment area of the peat aquifer

The surface water of the SW and NE compartments of the lake and the catchment areas (well I/1 peat and well III/1 peat) differed significantly (*t*-test, $p < 0.05$) in three measured physical parameters: temperature, pH, and conductivity (Fig. 5(A–F)).

The temperature in the NE was usually higher than in the SW, because of differences in the intensity of solar radiation (Fig. 5(A)). The NE compartment is exposed to solar radiation nearly the whole day, whereas forest shades the SW compartment. The same effect can be seen for the catchment areas, with higher temperature in well III/1 which is adjacent to the NE compartment (Fig. 5(A and B)). The pH in the NE compartment ranged from 5.79 to 6.79 and in the SW compartment from 4.69 to 5.03 (Fig. 5(C)). In well III/1, adjacent to the NE compartment, the pH was between 5.65 and 6.08, and well I/1, adjacent to the SW compartment, the pH ranged from 4.16 to 4.56 (Fig. 5(D)). The conductivity throughout the year was higher in the SW compartment, 38–52 $\mu S\,cm^{-1}$, than in the NE compartment, 31–45 $\mu S\,cm^{-1}$ (Fig. 5(E)). The conductivity was higher in well III/1 (166–211 $\mu S\,cm^{-1}$) than in well I/1 (103–111 $\mu S\,cm^{-1}$) (Fig. 5(F)).

Total nitrogen and DOC differed significantly (*t*-test, $p < 0.05$, Figs. 6(C) and 7(A)) in the SW and NE compartments. The catchment areas (well I/1 peat and well III/1 peat) differed significantly in total phosphorus, total nitrogen and DOC (Figs. 6(B and D) and 7(B)) (*t*-test, $p < 0.05$). Furthermore, in the adjacent wells, the concentrations of total phosphorus, total nitrogen, and DOC were higher than in the compartments. The DOC concentrations in the SW compartment (12.2–16.1 $mg\,l^{-1}$, median $13.8 \pm 1.2\,mg\,l^{-1}$) were higher than in the NE compartment (8.2–13.2 $mg\,l^{-1}$, median $11.7 \pm 1.6\,mg\,l^{-1}$). Well I/1 (62.3–77.9 $mg\,l^{-1}$, median $69.5 \pm 4.9\,mg\,l^{-1}$) showed higher DOC concentrations than well III/1 (33.5–42.6 $mg\,l^{-1}$, median 36 ± 3.1) (Fig. 7(A and B)). The characterisation of the DOC per measurement of the water colour (SAK 436) and the portion of UV-absorbing, aromatic structures of the

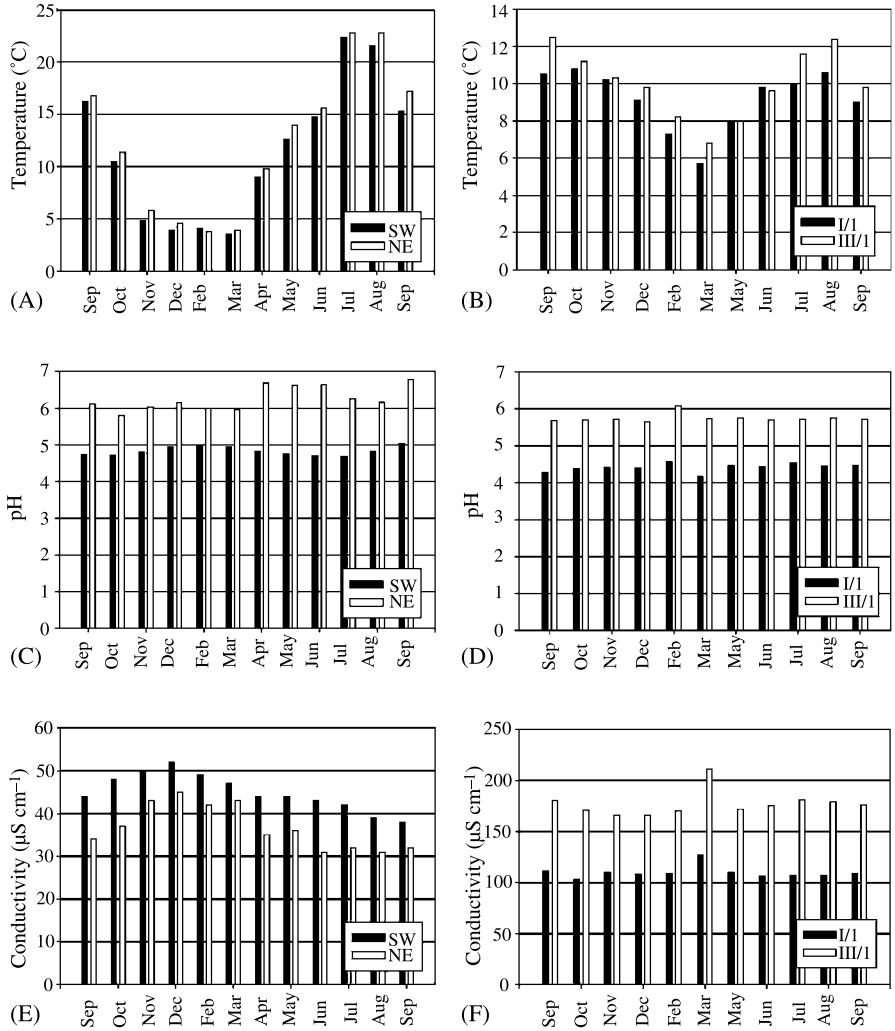

Fig. 5. Temperature – T (A + B), pH (C + D) and conductivity (E + F) of the SW and NE compartments and of the wells I/1-peat and III/1-peat from September 2000 until September 2001.

DOC (SAK (254)/DOC) gave an indifferent picture (Fig. 7(C–F)). The SW compartment showed higher values of the SAK 436 (0.5–1.5 m^{-1}) throughout the year than the NE compartment (SAK of 0.1–1.1 m^{-1}). The SAK 436 of well I/1 and well III/1 showed higher values (SAK of 2.0–5.14 m^{-1} and 4.0–11.9 m^{-1} respectively) than in both compartments. The highest values were determined in the adjacent well III/1 of the NE compartment. Hence, the SW compartment had more coloured water than the NE compartment. The waters

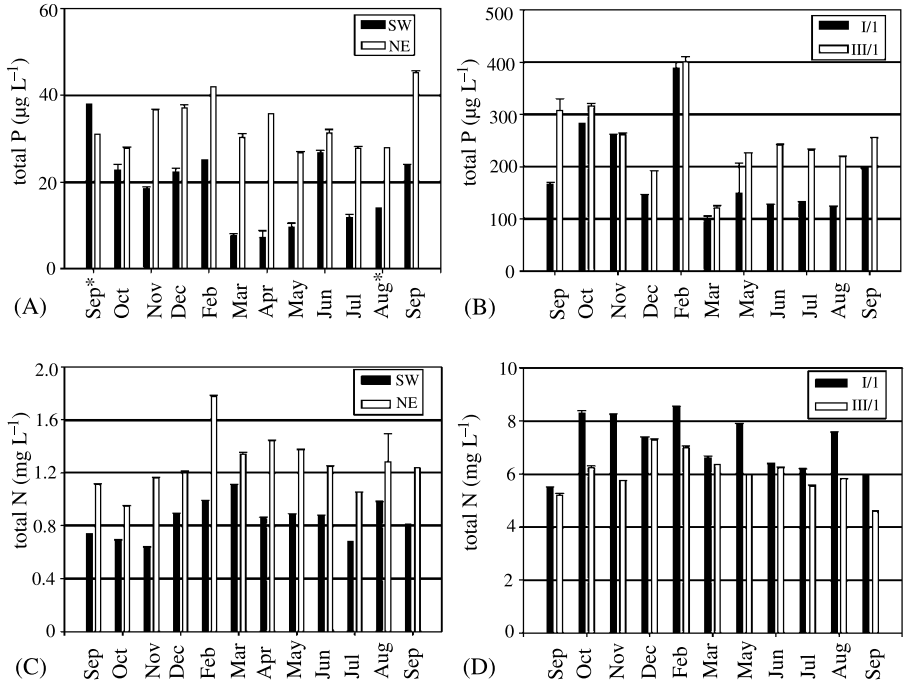

Fig. 6. Total phosphorus and total nitrogen concentrations of the SW and NE compartment (A + C) and of the wells I/1-peat and III/1-peat (B + D) from September 2000 until September 2001. *September 2000 and August 2001 mixture of samples from 0 and 2 m depth.

in the catchments were more coloured than the water in the compartments, but in contrast, the well in the SW catchment area had less coloured water than the well in the NE catchment area (Fig. 7(C and D)). The same pattern can be observed for the portion of UV-absorbing, unsaturated, aromatic structures of the DOC (Fig. 7(E and F)). The SW compartment showed higher ratios of the SAK 254/DOC quotient (2–2.8 l mg^{-1} m^{-1}, median 2.5 ± 0.3) than the NE compartment (1.1–2.7 l mg^{-1} m^{-1}, median 1.6 ± 0.5). The ratio of the SAK 254/DOC quotient in the adjacent well I/1 of the SW compartment, however, was 1.8–2.3 l mg^{-1} m^{-1}, median 1.9 ± 0.2, and in well III/1 2.2–3.8 l mg^{-1} m^{-1}, median 2.9 ± 0.5. Hence, the portion of UV-absorbing aromatic structure, such as humic substances, is higher in the SW compartment and in the catchments of the SW and NE than in the NE compartment.

The total phosphorus and total nitrogen concentrations in the NE compartment were higher than in the SW compartment except for two deviations in September 2000 and August 2001 for the nitrogen concentration (Fig. 6(A and C)). The total phosphorus concentration ranged from 25.6 to 45.3 µg l^{-1} in the NE, and from 7.3 to 38.0 µg l^{-1} in the SW. The total nitrogen concen-

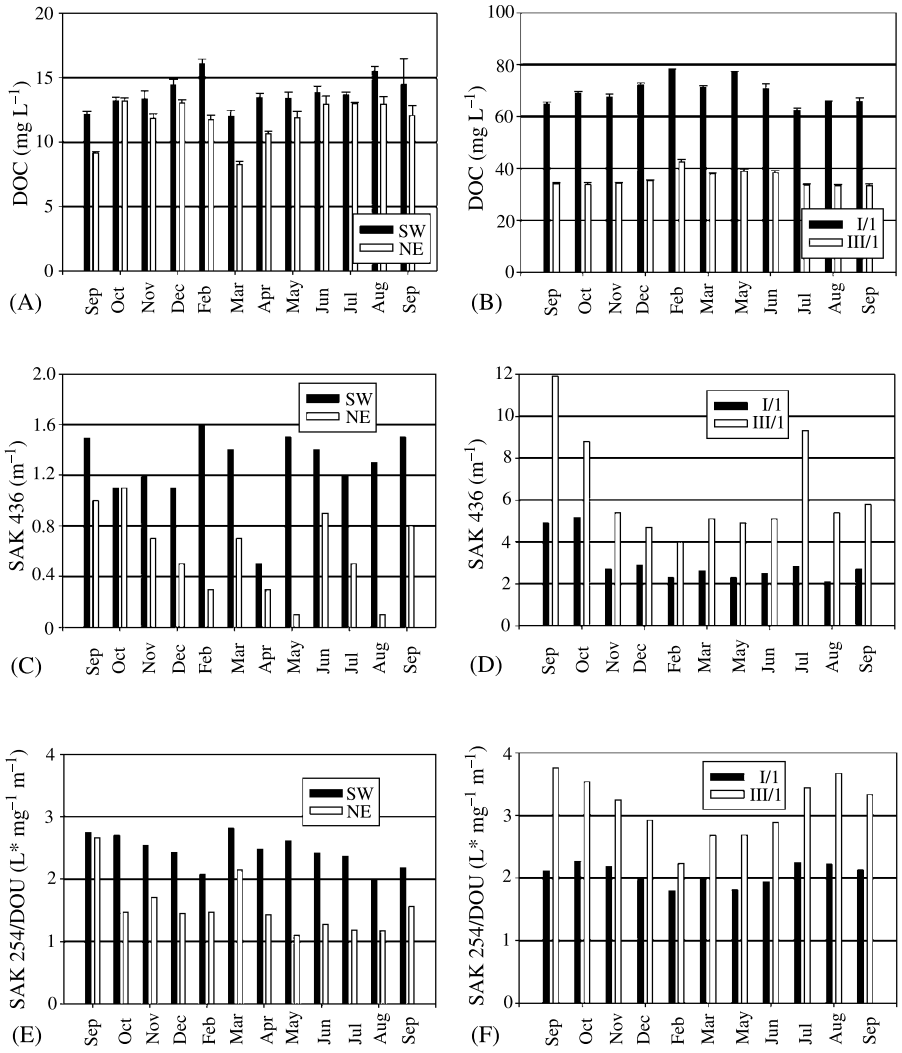

Fig. 7. DOC concentration (A + B) and spectral absorption coefficient (SAK) of the SW and NE compartments and the wells I/1-peat and III/1-peat measured at A 436 nm (C + D) and at A 254 nm (E + F) from September 2000 until September 2001.

tration ranged from 1 to 1.8 mg l^{-1} in the NE, and from 0.6 to 1.1 mg l^{-1} in the SW. However, in comparison, well III/1 (adjacent to the NE compartment) had higher total phosphorus concentration (120.9 to 400.8 µg l^{-1}) but lower total nitrogen concentration (4.6 to 7.3 mg l^{-1}) than well I/1 (adjacent to the SW compartment) with 101.1 to 388.5 µg l^{-1} total phosphorus concentration, and 5.5 to 8.5 mg l^{-1} total nitrogen concentration (Fig. 6(B and D)).

Table 4. Physical and chemical parameters : pH, conductivity, Ca, Mg, total P, total N and DOC of the wells I/1 peat, I/1 sand, III/1 peat and III/1 sand in June 2002.

Well	pH	Conductivity ($\mu S\,cm^{-1}$)	Ca ($mg\,l^{-1}$)	Mg ($mg\,l^{-1}$)	Total P ($\mu g\,l^{-1}$)	Total N ($mg\,l^{-1}$)	DOC ($mg\,l^{-1}$)
I/1 peat	4.36	105	2.80	0.35	159	6.00	64.30
I/1 sand	6.74	436	95.50	0.90	238	3.70	22.40
III/1 peat	5.66	177	20.00	0.40	322	6.50	31.10
III/1 sand	7.15	518	109	4.40	234	4.10	9.70

Comparison between the peat aquifer and the main aquifer in the catchment area

All physical and chemical parameters that were measured differed between the peat aquifer (well I/1-peat and III/1-peat) and the main (sand) aquifer (well I/1-sand and III/1-sand) (Table 4).

The pH of the wells in the peat aquifer was lower than in the wells of the main aquifer: well I/1-peat pH 4.36 and III/1-peat pH 5.66, and in contrast well I/1-sand pH 6.74 and III/1-sand pH 7.15. The conductivity of the wells in the peat aquifer was much lower than in the wells of the main aquifer: well I/1-peat 105 $\mu S\,cm^{-1}$ and well III/1-peat 177 $\mu S\,cm^{-1}$, and in contrast, well I/1-sand 436 $\mu S\,cm^{-1}$ and well III/1-sand 518 $\mu S\,cm^{-1}$. Corresponding to the differences in conductivity concentrations of calcium and magnesium were higher in the main aquifer than in the peat aquifer: well I/1-peat and III/1-peat with calcium concentrations of 2.8 and 20 $mg\,l^{-1}$, respectively and well I/1-sand and III/1-sand with calcium concentrations of 95.5 and 109 $mg\,l^{-1}$ respectively. The magnesium concentrations were much lower than the calcium concentrations; I/1-peat 0.35 $mg\,l^{-1}$ and in III/1-peat 0.4 $mg\,l^{-1}$, and for the main aquifer ^{I}/1-sand 0.9 $mg\,l^{-1}$ and III/1-sand 4.4 $mg\,l^{-1}$.

In contrast to the preceding parameters, the total phosphorus concentration did not show clear differences between the peat and the main aquifer of the catchment area. For the total nitrogen concentrations, similarities between the peat and main aquifer were found. The concentrations of nitrogen in the peat aquifer in well I/1-peat with 6.0 $mg\,l^{-1}$ and in well III/1-peat with 6.5 $mg\,l^{-1}$, were higher than in the main aquifer: well I/1-sand 3.7 $mg\,l^{-1}$ and well III/1-sand 4.1 $mg\,l^{-1}$.

The DOC concentrations in both wells of the peat aquifer were higher than in the main aquifer with significantly high concentration in well I/1-peat compared to well III/1-peat: well I/1-peat 64.3 $mg\,l^{-1}$ and well III/1-peat 31.1 $mg\,l^{-1}$; and in comparison well I/1-sand 22.4 $mg\,l^{-1}$ and well III/1-sand 9.7 $mg\,l^{-1}$.

Discussion

During the genesis of the Lake Fuchskuhle area, the peat aquifer and the main (sand) aquifer developed largely independently. Almost no lateral interactions seemed to have occurred as is evident by their sharply contrasting water chemistry. In the main aquifer, high calcium concentration was consistent with high conductivity (Fig. 5(F), Table 4), an indication of a groundwater flow in Pleistocene sand. The higher calcium concentration in the well III/1 peat than in the well I/1 peat can be explained by the morphology of the area. The catchment of the NE and SE compartment is in contrast to the western compartments directly surrounded by hills, which contain gravel and sandy soil. During high precipitation well III/1 peat might be influenced by water from this sandy soil, whereas well I/1 is not.

Due to the water gradient in the area (Sachse et al. 2001) the groundwater is flowing into the NW and SW compartments (Table 1). In the NW compartment the water balance is nearly balanced. However, the SW compartment received more groundwater than water is flowing out (Table 1). As the groundwater flow transported also DOC and nutrients into the compartments an accumulation of these compounds might occur. For example, in February 2001 coincided with a high groundwater inflow a high input of DOC could be detected (Table 3). At this time the SW compartment had also a higher DOC concentration (Fig. 4), which might correlate to the high groundwater inflow and to the high water colour (Fig. 7(C)). This gives evidence for the influence of the peat aquifer on the chemical conditions of the SW compartments of Lake Fuchskuhle. After February 2001 the inflow and concentration of DOC differed from each other (Fig. 4). The increase of the DOC concentration after March 2001 might be due to enhanced biological activity during spring and summer. Another aspect might be an inhomogeneous peat body with divergent permeability coefficients, which might be responsible for spatial differences in chemical fluxes of DOC and nutrients.

As the NE compartment was not influenced by the peat aquifer (Table 1) the physical and chemical conditions differed to the SW compartment. The significant differences in parameters such as pH, conductivity and DOC characterization gave a clear picture of the heterogeneity of both compartments and their dependence on the catchment area (Figs. 5 and 7). These results support and broad the findings of Sachse et al. (2001) and show very clear, that the water gradient, with its separation into two different ground water aquifers, is responsible for the oligotroph dystrophic character of the SW compartment but not for the mesotrophic character of the NE compartment.

According to the geological investigations in the catchment area of Lake Fuchskuhle, the structure of the peat body developed heterogenously with a meso- to eutrophic fen in the northwest part and a meso- to oligotrophic – acid

fen in the southeast part. When investigating flow pathways between land–water interfaces, the interactions between geology and hydrology should be noted.

In the peat aquifer, nitrogen, the most important nutrient for plants (Larcher 1994), was in higher concentration than in the main aquifer. The differences in nitrogen concentration between the peat aquifer and main aquifer could be explained by humification processes, in which nitrogen in the form of oligosaccharides, peptides and amino acids is bound to the high molecular weight structures such as humic substances (Müller-Wegener 1984; Anderson et al. 1989; Schulten & Schnitzer 1995). Since the DOC of the peat aquifer contains high concentration of humic substances (Sachse et al. 2001), nitrogen may be more retained than in the main aquifer. Nitrogen and phosphorus appear in the catchment areas in significantly higher concentrations than in the compartments of the lake, again explainable by stronger humification processes in the peat aquifer. Another aspect is the anoxic conditions in the reduced deeper zones of fens, where anaerobic bacteria might not take part in the nitrogen mineralisation, which, therefore, can result in low mineralisation rates (Koerselman & Verhoeven 1992).

Acknowledgements

We thank Axel Precker for geological investigations of the peat body in the catchment area. For the chemical analyses at the Leibniz-Institute of Freshwater Ecology and Inlands Fisheries we thank Uta Mallok, Elke Mach and Johanna Dalchow from the Chemistry Laboratory in Neuglobsow, and Hans Jürgen Exner, L. Dollan and Elke Zwirnmann from the Central Chemical Laboratory in Berlin. We wish to express our gratitude to Linde Adams of Plattsburgh and Sarah Poynton for linguistic revision and valuable comments of the manuscript. Financial support was received from the German Research Foundation (DFG-project Ba 1288/5-2).

References

Anderson H, Bick W, Hepborn A & Stewart M (1989) Nitrogen in humic substances. In: Hayes M, MacCarthy P, Malcolm R & Swift R (Eds) Humic Substances II (pp 223–253). John Wiley & Sons, New York

Bittl T (1999) Bakterieller Stoffumsatz und mikrobielles Nahrungsnetz im Pelagial eines Moorsees (Experimentalgewässer Große Fuchskuhle). PhD thesis. Humboldt University, Mathematical – Biological Faculty Berlin

Bittl T & Babenzien D (1996) Microbial activity in an artificially divided acidic lake. Arch. Hydrobiol. Spec. Issues Advanc. Limnol. 48: 113–121

Chan O, Wolf M, Hepperle D & Casper P (2002) Methanogenic archaeal community in the sediment of an artificially partitioned acidic bog lake. FEMS 42: 119–129

David M & Vance G (1991) Chemical character and origin of organic acids in streams and seepage lakes of central Maine. Biogeochemistry 12: 17–41

Dickinson C (1983) Micro-organisms in peatland. In: Gore A (Ed) Mires: Swamp, Bog, Fen and Moor. Ecosystems of the World 4A (pp 225–245). Elsevier, Amsterdam

Ginzel G (1999) Hydrogeological investigations in the catchment area of Lake Stechlin and Lake Nehmitz. IGB-Report 9 (pp 43–60). ISSN-Nr. 1432-508X, Berlin

Ginzel G (2000) Veränderungen des Landschaftswasserhaushaltes und ihre Auswirkungen auf das Naturschutzgebiet Stechlin. In: 2. Stechlin-Forum: Einzugsgebiet – Wald – Wasser: Ein globales und regionales Beziehungsgeflecht, Rheinsberg–Linowsee 13–15 October 2000 (pp 46–52). Leibniz-Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei (IGB), Berlin

Ginzel G & Handke H (1995) Hydrogeologische Studie zur Abgrenzung des unterirdischen Einzugsgebietes des Stechlin-und Nehmitzsees, IGB, Berlin

Hehmann A & Krienitz L (1996) The succession and vertical distribution of phytoplankton of the experimental divided naturally acidic lake 'Große Fuchskuhle' (Brandenburg, Germany). Limnologica 26: 301-309

Hehmann A, Krienitz L & Koschel R (2001) Long-term phytoplankton changes in an artificially divided, top-down manipulated humic lake. Hydrobiologia 448: 83–96

Hemond H (1990) Wetlands as the source of dissolved organic carbon to surface waters. In: Perdue E & Gjessing E (Eds) Organic Acids in Aquatic Ecosystems: Report of the Dahlem Workshop on Organic Acids in Aquatic Ecosystems (pp 301–313). John Wiley & Sons, Chichester

Kasprzak P (1993) The use of an artificially divided bog lake in food-web studies. Verh. Internat. Verein. Limnol. 25: 652–656

Kasprzak P, Koschel R, Steiner U & Metzdorf K (1988) 'Enclosure' – Experiments in food-web manipulation: first step – dividing the experimental lake. Limnologica 19: 161–165

Koerselman W & Verhoeven J (1992) Nutrient dynamics in mires of various trophic status: nutrient inputs and outputs and the internal nutrient cycle. In: Verhoeven J (Ed) Fens and Bogs in the Netherlands: Vegetation, History, Nutrient Dynamics and Conservation (pp 397–432). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht

Korshin G, Li C & Benjamin M (1998) Principles and applications of differential UV spectroscopy for monitoring and predicting the formation of disinfection by products. J. Am. Water. Works Assoc. 90: 88–100

Korshin G, Benjamin M & Li C (1999a) Use differential spectroscopy to evaluate the structure and reactivity of humic. Water Sci. Technol. 40: 9–16

Koschel R (1995) Manipulation of whole-lake ecosystems and long-term limnological observations in the Brandenburg–Mecklenburg Lake District, Germany. Int. Revue Ges. Hydrobiol. 80: 507–518

Larcher W (1994) Ökophysiologie der Pflanzen. Ulmer Verlag, Stuttgart

Mulholland P & Hill W (1997) Seasonal patterns in streamwater nutrient and dissolved organic carbon concentrations: separating catchment flow path and in-stream effects. Water Resour. Res. 33(6): 1297–1306

Mulholland P & Kuenzler E (1979) Organic carbon export from upland and forested wetland watersheds. Limnol. Oceanogr. 24: 960–966

Mulholland P, Dahm C, David M, Di Toro D, Fisher T, Hemond H, Kögel-Knabner I, Meybeck M, Meyer J & Sedell J (1990) Group report: what are the temporal and spatial variations of organic acids at the ecosystem level? In: Perdue E & Gjessing E (Eds) Organic

acids in aquatic ecosystems: report of the Dahlem workshop on organic acids in aquatic ecosystems (pp 315–329). John Wiley & Sons, Chichester

Müller-Wegener (1984) Wechselwirkungen von Huminstoffen mit Peptiden. Z. Pflanzenernaehr. Bodenk. 147: 110–124

Richter D (1997) Das Langzeitverhalten von Niederschlag und Verdunstung und dessen Auswirkung auf den Wasserhaushalt des Stechlinseegebietes. Berichte des Deutschen Wetterdienstes 291, Offenbach am Main

Sachse A, Babenzien D, Ginzel G, Gelbrecht J & Steinberg CEW (2001) Characterization of dissolved organic carbon (DOC) in a dystrophic lake and an adjacent fen. Biogeochemistry 54: 279–296

Schulten H & Schnitzer M (1995) Three-dimensional models for humic acids and soil organic matter. Naturwissenschaften 82: 487–498

Simek K, Babenzien D, Bittl T, Koschel R, Macek M, Nedoma J & Vrba J (1998) Microbial food webs in an artificially divided acidic bog lake. Internat. Rev. Hydrobiol. 83: 3–18

Sontheimer H, Frick B, Fettig J, Hörner G, Hubele C & Zimmer G (1995) Adsorptionsverfahren zur Wasserreinigung. DVGW-Forschungsstelle am Engler-Bunte-Institut der Universität Karlsruhe, Karlsruhe

Soulsby C, Chen M, Ferrier R, Helliwell R, Jenkins A & Harriman R (1998) Hydrogeochemistry of shallow groundwater in an upland Scottish catchment. Hydrol. Process 12: 1111–1118

Soulsby C, Gibbins C, Wade A, Smart R & Helliwell R (2002) Water quality in the uplands: a hydrological perspective on catchment hydrochemistry. Sci. Total Environ. 294: 73–94

Succow M (1988) Landschaftsökologische Moorkunde. G. Fischer Verlag, Jena

Succow M & Jeschke (1986) Moore in der Landschaft. Urania Verlag Leipzig, Jena, Berlin

Succow M & Joosten H (2001) Landschaftsökologische Moorkunde. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart

Thurman E (1985) Organic Geochemistry of Natural Waters. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht

Wetzel R (1975) Limnology. Saunders College Publishing, Philadelphia

Wetzel R (1992) Wetlands as metabolic gates. J. Great Lakes Res. 18: 529–532

Zwirnmann E & Dietrich P (1999a) Organischer Kohlenstoff. In: Friedrich G & Tümpling W (Eds) Methoden der biologischen Gewässeruntersuchung (pp 398–401). Gustav Fischer Verlag, Jena

Zwirnmann E, Krüger A & Gelbrecht J (1999b) Analytik im Zentralen Chemielabor des IGB. In: Berichte des IGB. Heft 9. ISSN-No.: 1432–508X

Artikel III

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Nov. 2003, p. 6550–6559 Vol. 69, No. 11
0099-2240/03/$08.00+0 DOI: 10.1128/AEM.69.11.6550–6559.2003
Copyright © 2003, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Members of a Readily Enriched β-Proteobacterial Clade Are Common in Surface Waters of a Humic Lake

Ulrike Burkert,[1] Falk Warnecke,[2] Dieter Babenzien,[1] Elke Zwirnmann,[1] and Jakob Pernthaler[2]*

Leibniz Institute of Freshwater Ecology and Inland Fisheries, Berlin,[1] and Max Planck Institute for Marine Microbiology, Bremen,[2] Germany

Received 12 May 2003/Accepted 18 August 2003

Humic lakes are systems often characterized by irregular high input of dissolved organic carbon (DOC) from the catchment. We hypothesized that specific bacterial groups which rapidly respond to changes in DOC availability might form large populations in such habitats. Seasonal changes of microbial community composition were studied in two compartments of an artificially divided bog lake with contrasting DOC inputs. These changes were compared to community shifts induced during short-term enrichment experiments. Inocula from the two compartments were diluted 1:10 into water from the more DOC-rich compartment, and inorganic nutrients were added to avoid microbial N and P limitation. The dilutions were incubated for a period of 2 weeks. The microbial assemblages were analyzed by cloning and sequencing of 16S rRNA genes and by fluorescence in situ hybridization with specific oligonucleotide probes. β-Proteobacteria from a cosmopolitan freshwater lineage related to *Polynucleobacter necessarius* (beta II) were rapidly enriched in all treatments. In contrast, members of the class *Actinobacteria* did not respond to the enhanced availability of DOC by an immediate increase in growth rate, and their relative abundances declined during the incubations. In lake water members of the beta II clade seasonally constituted up to 50% of all microbes in the water column. Bacteria from this lineage annually formed a significantly higher fraction of the microbial community in the lake compartment with a higher allochthonous influx than in the other compartment. *Actinobacteria* represented a second numerically important bacterioplankton group, but without clear differences between the compartments. We suggest that the pelagic microbial community of the studied system harbors two major components with fundamentally different growth strategies.

Humic lakes are naturally acidic freshwater systems with a large pool of dissolved organic carbon (DOC) that originates mainly from the catchment area (18, 35). Due to the bad-light climate and other factors, the biomass of primary producers in humic lakes is often lower than what might be predicted by nutrient levels (19), and mixotrophy is a common strategy of many phytoplankton species in such systems (21). The ratio of bacteria to phytoplankton is typically high in this type of lake (54). Bacterial secondary production is often nutrient (P and N) rather than carbon limited (22), and it may significantly exceed primary production (46, 54). Little is known about the bacterial community structure of humic lakes. High abundances of uncultured members of the class *Actinobacteria* have been found in the plankton of the acidic bog lake Groβe Fuchskuhle by 16S rRNA gene sequence analysis and subsequent fluorescence in situ hybridization (FISH) with oligonucleotide probes (13, 47). With samples from several Scandinavian bog lakes, an analysis of bands from denaturing gradient gel electrophoresis revealed sequence types that were also related to this lineage (30).

Organic substrates are doubtlessly an important factor determining the success of particular bacterial species in the environment. The main fraction of the DOC in bog lakes is recalcitrant high-molecular-weight humic acids (53). These substances may be partially transformed into more bioavailable forms by photochemical processes prior to microbial degradation (55). An exact determination of the composition of such DOC usually is beyond analytical capacities. It is thus difficult to relate a specific DOC component to the growth of individual bacterial groups in situ. In addition, heterotrophic aquatic bacteria are probably rather versatile in their choice of carbon source, and there might be a great overlap in the types of substrates consumed by many planktonic bacteria. For example, radiolabeled amino acids are readily consumed by the majority of pelagic marine bacteria (23).

In contrast, another aspect of bottom-up interactions between water column microbes can be studied more readily. Individual phylogenetic lineages within the bacterioplankton may differ in their abilities to succeed in habitats with steep or flat substrate gradients (39), and some bacterioplankton genera exhibit a more rapid growth response under batch culture "feast-and-famine" conditions (8, 50). There are indications that this growth strategy might be widespread among bacterial groups that successfully utilize small-scale nutrient patches or colonize microaggregates (14). In contrast, the growth of some typical free-living freshwater bacteria may even be negatively affected by enhanced substrate levels (15). A different growth response to changing substrate availability (39) thus might determine the relative abundances of individual bacterial groups in situations of high resource variability.

We investigated the identities of bacteria that rapidly respond to enhanced DOC availability in a naturally acidified bog lake, the Groβe Fuchskuhle. This lake is divided into artificial compartments with contrasting limnological properties and plankton community structure (17, 24, 49). Enrich-

* Corresponding author. Mailing address: Max-Planck-Institut für Marine Mikrobiologie, Celsiusstraβe 1, D-28359 Bremen, Germany. Phone: 49-421-2028 940. Fax: 49-421-2028 580. E-mail: jperntha@mpi-bremen.de.

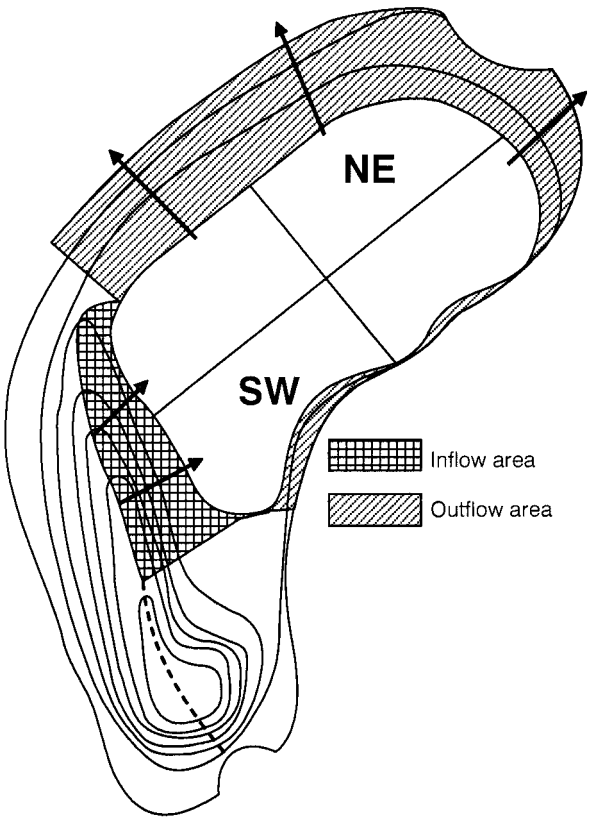

FIG. 1. Schematic depiction of the compartments of Lake Groβe Fuchskuhle in relationship to the area of water in- and outflow of the catchment. The inflow area is largely formed by a *Sphagnum* bog. Contour lines indicate a 0.1-m change in altitude.

ment experiments with inocula from two of these compartments were performed with dilutions of ambient water from the more acidic, humic-rich compartment. The experiments were carried out during the winter season when the growth of lake bacteria was most likely controlled by factors other than grazing mortality (temperature and resources). Because of the high allochthonous DOC input into humic lakes, we hypothesized that some bacterial groups which rapidly respond to changes in available substrate levels might also be of importance to the plankton of the lake. This hypothesis was tested with samples collected from the studied compartments over a period of 1 year.

MATERIALS AND METHODS

Study site. Lake Groβe Fuchskuhle is situated in the Mecklenburg-Brandenburg Lake District in northeastern Germany, 59 m above mean sea level. In 1990 the naturally acidic bog lake was divided into four compartments: southwest (SW), northwest (NW), northeast (NE), and southeast (SE) (24, 27) (Fig. 1). Since the division, the compartments have diverged in their physical and chemical parameters, in microbial activity (2, 4), and in the structure of the microbial food web (17, 49). For this study two of the compartments were selected: the SW compartment, which has an acidotrophic humic character and a higher influx of allochthonous DOC, and the NE compartment, which has a more mesotrophic character. Between September 2000 and September 2001, lake water from the two compartments was collected from a 0.5-m depth at approximately monthly intervals for total microbial counts and community analysis.

Experimental design, sampling, and fixation. An enrichment experiment was conducted as a competition batch culture in 1:10 dilutions. Lake water from the SW compartment was collected in January 2002 from a 0.5-m depth and filtered twice through 0.1-μm-pore-size polycarbonate filters (diameter, 50 mm; Sartorius, Göttingen, Germany). The filtrate was supplemented with inorganic nutrients (final concentrations, 0.3 μM KH_2PO_4, 4.55 μM $(NH_4)_2SO_4$, and 1.23 mM $NaHCO_3$) to avoid bacterial N and P limitation (22) and used as incubation medium. Acid-prewashed and sterilized round flasks of the Duran type were filled with 1,800 ml of the medium and inoculated with 200 ml of prefiltered water (filter diameter, 47 mm; pore size, 0.8 μm; Osmonics) taken at a 0.5-m depth from either the SW or the NE compartment (termed SW and NE treatments). The experiment was performed in triplicate for inocula from each compartment, and changes were monitored for 14 days. For controls, 200-ml aliquots of inocula from the two compartments were diluted into 1,800 ml of an 1.23 mM $NaHCO_3$ solution (final concentration) that was supplemented with the same inorganic nutrients as were in the lake water medium. The pH conditions in the treatments were set to reflect the pHs of the respective compartments (SW compartment, pH 5.0; NE compartment, pH 6.0). The flasks were placed in a dark room on magnetic stirrers. The treatment flasks were moderately aerated with filtered (pore size, 0.22 μm) air in order to maintain oxygenated conditions observed at the sampling location and time point (in situ oxygen saturation, 89%). During the experiment the temperature ranged between 11 and 12°C. Subsamples of ca. 150 ml were taken at day 0 and every second day thereafter for a period of 2 weeks.

Samples for total bacterial numbers were fixed with formaldehyde (1% [wt/vol] final concentration) and stored at 4°C until processed further. Samples for community analysis (10 to 20 ml) were fixed with formaldehyde (1% [wt/vol] final concentration) and stored for 24 h at 6°C. Then the samples were filtered onto a 0.2-μm-pore-size filter (type GTTC, 47 mm; Whatman), rinsed two times with 5 ml of sterile water, dried at room temperature, and stored at −20°C.

Total cell counts and bacterial production. Total bacterial numbers were determined after filtration of subsamples (2 ml) onto black membrane filters (pore size, 0.2 μm; diameter, 25 mm; Osmonics) and staining with 4′,6′-diamidino-2′-phenylindole (DAPI; final concentration, 0.1 μg ml^{-1}) (42). The enumeration was performed by epifluorescence microscopy (model DM RB microscope; Leica, Bensheim, Germany) coupled with a camera (model CF 8/1 RCC Air; KAPPA Technologies, Gleichen, Germany) connected to an image analysis system (IMAGE P2; resolution, 736 by 556 pixels; 256 grey levels; H&K, Berlin, Germany).

For the enumeration of protists, 50-ml subsamples were fixed with 20 to 25 μl of alkaline Lugol's solution, followed by immediate treatment with 1 to 1.25 ml of formaldehyde (1% [wt/vol] final concentration) and 40 to 50 μl of 3% sodium thiosulfate (48). The samples were filtered on black membrane filters (pore size, 0.8 μm; diameter, 25 mm; Osmonics Corp.) and stained with DAPI (final concentration, 0.1 μg ml^{-1}), and cells were counted by epifluorescence microscopy (Axioplan microscope; Carl Zeiss, Jena, Germany).

Bacterial bulk growth activity during the enrichments was estimated from the incorporation rate of tritiated leucine modified as described by Kirchman et al. (25). Subsamples of 10 ml were incubated with 50 μl of [^{3}H]leucine (final concentration, 0.1 μM; Amersham) and an equal amount of nonlabeled leucine. After 1 to 2 h of incubation at in situ temperature, the samples were preserved with formaldehyde (1% [wt/vol] final concentration) and filtered through polycarbonate filters (pore size, 0.2 μm; diameter, 25 mm; Corning Costar, Cambridge, Mass.). The filters were then treated four times with 1 ml of ice-cold 5% trichloroacetic acid. In the controls, formaldehyde was added before the addition of [^{3}H]leucine. The dried filters were covered with 9 ml of scintillation cocktail (emulsifier safe; Canberra-Packard, Rodgau-Juegesheim, Germany), and cells were quantified in a liquid scintillation counter (TRI-CARD 1600; Canberra-Packard). A control parameter that indicated changes in quenching was obtained for each sample. The total incorporation of [^{3}H]leucine into bacterial biomass was corrected by subtraction of counts of cells from those of prefixed controls.

Carbon analyses. At the beginning of the experiment and at three subsequent time points (days 6, 8, and 14), the quality and quantity of the DOC pool (chromatographied DOC portion [cDOC]) were analyzed with a custom-designed automated size exclusion chromatograph connected to UV and organic carbon detection systems (45). Four different cDOC fractions were distinguished and quantified: polysaccharides, humic substances, low-molecular-weight acids, and other fractions (proteins and amino acids).

16S rRNA gene clone libraries. For construction of 16S rRNA gene clone libraries, samples (500 to 600 ml) were taken from both compartments in February 2001 at a depth of 0.5 m. After prefiltration through polycarbonate filters (pore size, 1.2 μm; Schleicher & Schuell, Dueren, Germany) the samples were filtered on membrane filters (pore size, 0.2 μm; diameter, 47 mm; Durapore; Millipore Corp., Bedford, Mass.) and stored at −80°C until they were processed further. Unfixed samples from the beginning (1,000 ml) and from the end (620

TABLE 1. 16S rRNA gene sequences of clones from Lake Groβe Fuchskuhle and from the enrichments that were not affiliated with the β-proteobacteria

Clone	Sample	nt[a]	Affiliation	Closest hit in GenBank (accession no.)	Similarity (%)
32	Lake (SW)	1,402	α-*Proteobacteria*	Uncultured bacterium FukuS56 (AJ290014)	99
22	Lake (NE)	1,420	α-*Proteobacteria*	Uncultured bacterium FukuS56 (AJ290014)	99
65	Enrichment (SW)	747	α-*Proteobacteria*	Uncultured bacterium FukuS56 (AJ290014)	99
41	Enrichment (NE)	1,450	α-*Proteobacteria*	Uncultured bacterium FukuS56 (AJ290014)	99
46	Enrichment (NE)	1,465	α-*Proteobacteria*	Uncultured bacterium FukuN22 (AJ289994)	99
69	Enrichment (NE)	1,441	α-*Proteobacteria*	Uncultured bacterium FukuS56 (AJ290014)	97
73	Enrichment (NE)	1,430	α-*Proteobacteria*	α-Proteobacterium F06021 (AF235996)	99
77	Lake (SW)	1,479	γ-*Proteobacteria*	Unidentified γ-proteobacterium (AB015575)	99
17	Lake (NE)	753	γ-*Proteobacteria*	*Pseudomonas chlororaphis* DSM 50083T (Z76673)	99
23	Lake (NE)	654	γ-*Proteobacteria*	*Pseudomonas aureofaciens* (Z76656)	99
26	Enrichment (SW)	717	γ-*Proteobacteria*	*Pseudomonas chlororaphis* DSM 50083T (Z76673)	99
28	Enrichment (SW)	1,519	γ-*Proteobacteria*	*Pseudomonas graminis* (Y11150)	98
67	Enrichment (SW)	1,463	γ-*Proteobacteria*	*Pseudomonas putida* ATCC 17527 (AF094743)	98
4	Enrichment (NE)	711	γ-*Proteobacteria*	*Pseudomonas* sp. strain NZ017 (AY014805)	99
79	Enrichment (NE)	950	γ-*Proteobacteria*	*Pseudomonas chlororaphis* (AJ550465)	99
11	Lake (SW)	1,505	*Bacteroidetes*	Uncultured bacterium FukuS59 (AJ290042)	98
30	Lake (SW)	1,523	*Bacteroidetes*	*Cytophagales* strain MBIC4147 (AB022889)	95
35	Lake (SW)	721	*Bacteroidetes*	*Cytophagales* strain MBIC4147 (AB022889)	96
36	Lake (SW)	1,482	*Bacteroidetes*	Uncultured bacterium GKS2-106 (AJ290025)	94
56	Lake (SW)	1,471	*Bacteroidetes*	Uncultured bacterium FukuN23 (AJ290011)	99
63	Lake (SW)	699	*Bacteroidetes*	*Cytophagales* strain MBIC4147 (AB022889)	96
66	Lake (SW)	699	*Bacteroidetes*	*Cytophagales* strain MBIC4147 (AB022889)	97
2	Enrichment (NE)	1,454	*Bacteroidetes*	Uncultured bacterium FukuN24 (AJ289995)	98
3	Enrichment (NE)	702	*Bacteroidetes*	Uncultured bacterium FukuN24 (AJ289995)	97
60	Enrichment (NE)	894	*Bacteroidetes*	Uncultured *Cytophagales* clone PRD01a001B (AF289149)	99
61	Enrichment (NE)	578	*Bacteroidetes*	Uncultured bacterium FukuN24 (AJ289995)	97
31	Lake (SW)	1,492	*Actinobacteria*	Uncultured actinobacterium ML316M-7 (AF447767)	95
33	Lake (SW)	1,489	*Actinobacteria*	Uncultured bacterium FukuS5 (AJ290022)	99
94	Lake (SW)	1,473	*Actinobacteria*	Uncultured bacterium clone HT2E3 (AF418967)	96
7	Lake (NE)	1,483	*Actinobacteria*	Uncultured bacterium FukuN30 (AJ289996)	98
51	Lake (NE)	1,453	*Actinobacteria*	Uncultured bacterium FukuN30 (AJ289996)	99
84	Enrichment (NE)	1,472	*Actinobacteria*	Uncultured Crater Lake bacterium CL500-29 (AF316678)	98
59	Lake (SW)	926	*Verrucomicrobiae*	Uncultured bacterium FukuN111 (AJ289985)	98
6	Lake (NE)	1,520	*Verrucomicrobiae*	Uncultured bacterium FukuN18 (AJ289992)	98
9	Lake (NE)	1,520	*Verrucomicrobiae*	Uncultured bacterium FukuN18 (AJ289992)	98
10	Lake (NE)	662	*Verrucomicrobiae*	Uncultured bacterium FukuN18 (AJ289992)	98
12	Lake (NE)	698	*Verrucomicrobiae*	Uncultured bacterium FukuN18 (AJ289992)	98
37	Lake (NE)	720	*Verrucomicrobiae*	Uncultured Crater Lake bacterium CL120-10 (AF316720)	96
53	Lake (NE)	658	*Verrucomicrobiae*	Uncultured Crater Lake bacterium CL120-10 (AF316720)	97
54	Lake (NE)	700	*Verrucomicrobiae*	Uncultured Crater Lake bacterium CL120-10 (AF316720)	96
55	Lake (NE)	1,479	*Verrucomicrobiae*	Uncultured Crater Lake bacterium CL120-10 (AF316720)	96
80	Lake (NE)	749	*Verrucomicrobiae*	Uncultured bacterium FukuN18 (AJ289992)	98
82	Lake (NE)	729	*Verrucomicrobiae*	Uncultured bacterium FukuN18 (AJ289992)	99
87	Lake (NE)	650	*Verrucomicrobiae*	Uncultured bacterium FukuN18 (AJ289992)	98

[a] nt, nucleotides.

to 720 ml) of the enrichment experiments were filtered directly onto membrane filters (pore size, 0.2 μm; diameter, 47 mm; Durapore; Millipore) and stored at −80°C. For the amplification of 16S rRNA genes by PCR, 5 μl of bovine serum albumin (stock concentration, 3 mg ml^{-1}), 5 μl of 10× PCR buffer, 2 μl of the deoxynucleoside triphosphates (stock concentration, 2.5 mM), 0.5 μl of the general bacterial primers GM3F and GM4R (37) (stock concentration, 15 μM), and 0.25 μl of TaKaRa-*Taq* DNA polymerase (TaKaRa BIO Inc., Shiga, Japan) (stock concentration, 5 U μl^{-1}) were adjusted to a final volume of 50 μl with sterile water. Small pieces (1 to 2 mm^2) of the above-described filters were directly added to the PCR tubes as templates as described previously (26). The PCRs were run on a Mastercycler (Eppendorf, Harmurg, Germany) with the following cycling conditions: 1 cycle at 94°C for 5 min and 35 cycles at 94°C for 30 s, 47°C for 45 s, 74°C for 1 min 30 s, and 74°C for 10 min. The amplified 16S rRNA gene fragments were purified with a QIAquick PCR purification kit (QIAGEN, Hilden, Germany), inserted into the TOPO vector (TOPO TA cloning kit; Invitrogen, Karlsruhe, Germany), and cloned into competent cells of *Escherichia coli* as described by the manufacturer. The transformed cells were plated on Luria-Bertani agar plates containing 50 μg of ampicillin ml^{-1} and incubated overnight at 37°C. The clones were screened for right-sized inserts, and plasmid preparations were made with a QIAprep Spin Miniprep kit (QIAGEN). For a first screening, the plasmid DNAs were sequenced with the primer M13F (5′-GTA AAA CGA CGG CCA G-3′), located on the vector pCR4-TOPO. Nearly full-length 16S rRNA sequences were obtained from selected inserts by additional sequencing with the primers GM1 (36) and M13R (5′-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3′).

Phylogenetic analysis and probe design. Partial sequences were assembled manually using the software Sequencher (Gene Codes Corp., Ann Arbor, Mich.) and tested for chimeras through the Ribosomal Database Project CHIMERA-_CHECK program. All sequences were subsequently analyzed by the BLAST queuing system (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi) to identify their closest relatives and their tentative phylogenetic positions. Those sequences that were related to the β-proteobacteria were then analyzed in more detail. Phylogenetic analyses were performed using the ARB software package (http:www.arb-home.de). The ARB database (release of June 2002) was complemented with other β-proteobacterial sequences from GenBank that were related to freshwater lineages (13, 56). For the reconstruction of a phylogenetic tree, only nearly complete (i.e., longer than 1,400 nucleotides) 16S rRNA sequences affiliated with this subphylum were considered. A 50% base frequency filter was used

FIG. 2. Phylogenetic relationship of β-proteobacterial 16S rRNA gene sequences from the study system and from enrichments of prefiltered (pore size, 0.1 μm) water from the SW compartment (1:10 dilutions). Sequences originating from Lake Groβe Fuchskuhle are depicted in boldface type, and sequences produced during this study are underlined. The scale bar indicates 10% estimated sequence divergence.

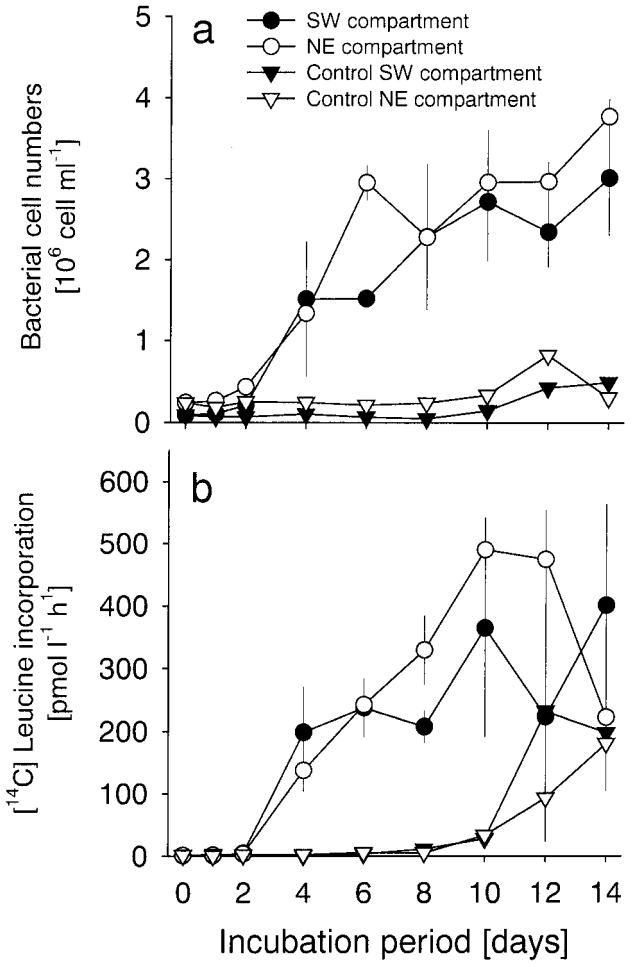

FIG. 3. Development of total bacterial abundances (a) and bacterial [^{3}H]leucine incorporation (b) during the enrichment experiments. For the SW and NE treatments, inocula from the SW and NE compartments, respectively, were diluted 1:10 into prefiltered (pore size, 0.1 μm) water from the SW compartment.

on these sequences to exclude highly variable positions. The respective ARB tools were used to perform maximum parsimony, neighbor joining, and maximum likelihood analyses. The resulting phylogenetic trees were compared manually. A consensus tree that shows bifurcations only if branchings were stable in the majority of analyses was constructed. Multifurcations were introduced if tree topologies could not be unambiguously resolved. Partial sequences were subsequently added to the consensus tree according to maximum parsimony criteria, without changes being allowed in the overall tree topology.

Specific oligonucleotide probes for the different β-proteobacterial clusters that contained sequence types from Lake Groβe Fuchskuhle were designed by using the ARB software package. Stringent conditions for FISH were established by analysis of the fluorescence intensities of the target cells from hybridizations at increasing concentrations of formamide in the hybridization buffer (40).

FISH. Whole-cell in situ hybridizations of sections from the polycarbonate filters were performed with the oligonucleotide probes BET42a (β-proteobacteria, 23S rRNA targeted), HGC69a (*Actinobacteria*, 23S rRNA targeted) (1), and the newly designed specific probes. All probes were obtained from ThermoHybaid (Interactiva Division, Ulm, Germany). Hybridizations with directly Cy3-monolabeled probes BET42a and BET2-870 (length, 18 nucleotides; *E. coli* positions 870 to 888 [5], 5′-CCC AGG CGG CTG ACT TCA-3′) were performed as described previously (40) with 35% of formamide in the hybridization buffer. For FISH with probe HGC69a, whose 5′ end was labeled the horseradish peroxidase (HRP), and subsequent signal amplification by catalyzed reporter deposition (CARD-FISH), filters were first embedded in low-gelling-point agarose (0.2% concentration of MetaPhor; FMC Bioproducts, Rockland, Maine). Next, the embedded cells were permeabilized with lysozyme and achromopeptidase (47). Hybridizations and signal amplification with Cy3-labeled tyramides were performed as described previously (38). After FISH or CARD-FISH, the filters were air dried and mounted on glass slides with a previously described mounting mix amended with DAPI (4′,6′diamidino-2-phenylindole; final concentration, 1 μg ml^{-1}) (38). The stained filter sections were evaluated on an Axioplan II microscope equipped with a 100× Plan Apochromat oil objective lens (Carl Zeiss, Jena, Germany) and an HBO 100-W Hg vapor lamp. We used a model HQ 41007 filter set (Chroma Technology Corp., Brattleboro, Vt.) for probe fluorescence and the Zeiss 01 filter set for DAPI. The counts were carried out by semiautomated image analysis.

To test the accuracy of FISH counts with the monolabeled probes, triplicate parallel hybridizations of samples from the SW treatment at day 0 with a monolabeled probe and HRP-labeled probe BET42a were performed. Statistical comparisons between the seasonal development of microbial communities in the two compartments were performed by the nonparametric Wilcoxon matched-pair test.

Nucleotide sequence accession numbers. The 16S rRNA gene sequences of the actinobacterial clones obtained during this study were deposited in GenBank with the following accession numbers: AJ575497 through AJ575556.

RESULTS

Phylogenetic analysis. All together 62 unique partial sequences (approximately 700 bp) were obtained from the screening of 179 clones from four libraries (SW and NE compartments, day 0; SW and NE enrichments, day 12). Of these, 33 sequences were affiliated with the α-, β-, and γ-proteobacteria, 11 with the *Bacteroidetes*, 6 with the *Actinobacteria*, and 12 with the *Verrucomicrobiae*. Of the subsequently produced almost complete rRNA gene sequences, 18 were affiliated with the β-proteobacteria, 5 with the *Bacteroidetes*, 6 with the *Actinobacteria*, and 3 with the *Verrucomicrobiae*. Table 1 lists the sizes and phylogenetic affiliations of all newly produced sequences except for those affiliated with the β-proteobacteria. The phylogenetic positions of the obtained β-proteobacterial sequence types are instead depicted in Fig. 2.

Two of the fully sequenced β-proteobacterial 16S rRNA sequence types were excluded as being chimeric. The remaining 16 sequences originated mainly from the enrichment libraries and fell into distinct clades of known freshwater bacteria (Fig. 2). Four sequences from the lake were affiliated with a cosmopolitan freshwater lineage (beta II) that includes the endosymbiont *Polynucleobacter necessarius* (13, 32, 56). Three sequences from the NE enrichment were related to the freshwater clone sequence GKS98, which was proposed to be a member of another freshwater clade (13, 56). Two sequences were affiliated with *Rhodoferax* sp. and thus with the so-called freshwater beta I/ACK2 lineage (13, 56), and one was affiliated with the drinking water biofilm isolate *Aquabacterium commune*. One set of sequences was affiliated with a phylotype obtained from a karstic aquifer in South Germany (GenBank accession number AF336360) within a broader lineage that also harbors *Zoogloea ramigera*.

Enrichment experiment. Bacterial total numbers in the enrichments increased from 0.1×10^6 to 3.0 ± 0.7 (mean ± standard deviation) $\times 10^6$ cells ml^{-1} in the NE treatment, and from 0.24×10^6 to $3.8 \pm 0.2 \times 10^6$ cells ml^{-1} in the SW treatment (Fig. 3a). A first doubling of bacterial abundances was observed after 48 h, and the most rapid growth occurred between days 2 and 4 in both sets of enrichments. This rapidity of growth was reflected in an approximately 40-fold increase in bacterial [^{3}H]leucine incorporation between these sampling

TABLE 2. Fractions of DOC during incubations of microbial inocula from the two compartments[a]

Inoculum	Day	Mean fraction (mg/liter of C) (SD)				
		cDOC	Humic acids	Polysaccharides	LMWA	Others
SW compartment	0	13.1 (0.6)	8.7 (0.1)	0.5 (0.1)	ND (ND)	3.9 (0.6)
	6	12.9 (0.5)	9.0 (0.5)	0.5 (0.1)	ND (ND)	3.5 (0.0)
	8	13.0 (0.2)	9.0 (0.2)	0.5 (0.0)	ND (ND)	3.6 (0.1)
	14	12.8 (0.1)	8.9 (0.1)	0.4 (0.1)	ND (ND)	3.7 (0.0)
Control		1.5 (0.2)	0.8 (0.1)	0.1 (0.0)	ND (ND)	0.5 (0.1)
NE compartment	0	12.5 (0.1)	8.1 (0.1)	0.6 (0.3)	0.4 (0.4)	3.3 (0.1)
	6	12.5 (0.4)	8.4 (0.2)	0.6 (0.3)	0.1 (0.1)	3.5 (0.2)
	8	13.0 (0.7)	8.8 (0.4)	0.3 (0.1)	0.1 (0.2)	4.0 (0.7)
	14	12.5 (0.1)	8.6 (0.3)	0.4 (0.2)	0.1 (0.1)	3.6 (0.1)
Control		1.3 (0.2)	0.7 (0.1)	0.1 (0.0)	ND (ND)	0.5 (0.1)

[a] Fractions are measured in prefiltered lake water from the SW compartment and in $NaHCO_3$ solution (control) by size exclusion liquid chromatography and UV and organic carbon detection. LMWA, low-molecular-weight organic acids; ND, not detectable.

points (Fig. 3b). Bacterial leucine incorporation increased from 1 to 401 ± 162 and 491 ± 52 pmol liter^{-1} h^{-1} in the SW and NE compartments, respectively. The variability of leucine incorporation between the replicate incubations was high after day 8, which coincided with the appearance of low concentrations of heterotrophic flagellates in some of the replicates at this stage of the experiment (<50 flagellates ml^{-1}) (data not shown). Bacterial abundances and productivity developed differently in the two treatments. In the SW treatment, a first plateau of total abundance on day 6 and of leucine incorporation on days 6 and 8 was discernible. In contrast, bacterial abundances and production continued to increase until days 8 and 10, respectively, in the NE treatment. No microbial growth was apparent in the control treatments until day 6 (Fig. 3a). Between days 8 and 14, bacterial abundances in these treatments increased to approximately 0.5×10^6 cells ml^{-1}. This increase was paralleled by a steep rise in bacterial leucine incorporation (Fig. 3b).

The largest fraction of the cDOC in the lake water medium was formed by humic acids (66% ± 2%, mean ± range) (Table 2). This proportion did not change significantly during the experiment. All together, there were no significant decreases in the concentrations of the measured cDOC fractions in either treatment during the course of the incubations.

No significant differences were found between the total counts of β-proteobacteria in the inoculum from the SW compartment after FISH with a monolabeled probe and after CARD-FISH with an HRP-labeled probe (31% ± 3% and 33% ± 3% [means ± ranges], respectively). Several of the newly designed specific FISH probes detected bacterial populations that formed <1% of the total DAPI cell counts (data not shown). In contrast, high numbers of hybridized cells were found after FISH with a probe targeted to the beta II (*P. necessarius*) cluster of the β-proteobacteria (BET2-870; length, 18 nucleotides; *E. coli* positions 870 to 888 [5]; 5′-CCC AGG CGG CTG ACT TCA-3′; hybridized with 35% formamide in the hybridization buffer). Bacteria affiliated with the beta II clade initially constituted 13 and 6% of the microbial assemblages in the lake water inocula from the SW and NE compartments, respectively (Fig. 4). These rod-shaped bacteria, which are approximately 1 to 2 μm in length, overproportionally increased in numbers during the first days of incubation. On day 4 cells detected by probe BET2-870 formed 30% ± 7% and 38% ± 9% of all bacteria in the SW and NE treatments, respectively. Between days 6 and 14, the fraction of bacteria from the beta II clade gradually decreased in both treatments, to approximately 20% (SW) and 25% (NE).

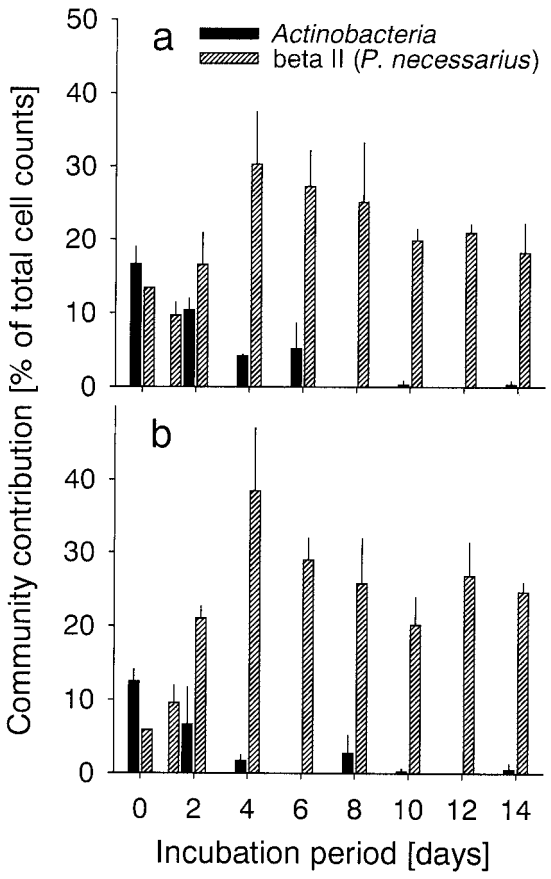

FIG. 4. Relative abundances of members of the class *Actinobacteria* and of the beta II clade (bacteria related to *P. necessarius*) during the enrichment on prefiltered (pore size, 0.1 μm) water from the SW compartment. (a and b) Inocula from the SW (a) and NE (b) compartments.

TABLE 3. Cell numbers of bacteria in the SW and NE compartments of Lake Fuchskuhle between September 2000 and September 2001[a]

Date of sampling	No. of cells ml^{-1} (10^6)			
	SW compartment		NE compartment	
	Mean	Range	Mean	Range
12 September 2000	3.0	0.2	4.1	0.8
25 October 2000	1.2	<0.1	2.0	0.4
7 November 2000	1.5	0.1	2.5	0.1
22 November 2000	1.4	0.1	2.2	0.3
11 December 2000	1.3	0.3	2.0	0.4
21 February 2001	0.9	0.3	4.3	0.6
22 March 2001	0.9	<0.1	2.3	0.3
26 April 2001	1.5	0.3	1.5	0.3
8 May 2001	1.6	0.3	1.8	0.7
13 June 2001	1.4	<0.1	2.2	0.1
9 July 2001	0.8	<0.1	2.4	0.4
1 August 2001	1.3	0.1	1.3	<0.1
19 September 2001	2.1	0.2	3.3	0.3

[a] Values are means and ranges of duplicate determinations.

In samples from day 0, the *Actinobacteria* made up 17% ± 2% and 12% ± 2% of organisms in the SW and NE treatments, respectively (Fig. 4). Their relative abundances declined to <5 and 2%, respectively, within the first 4 days of incubation. During the second half of the experiment, cells from this lineage were frequently below our lower limit for reliable FISH counts (<1% of total counts) in individual samples.

Field data. Between September 2000 and September 2001 bacterial total counts ranged between 0.8×10^6 and 3×10^6 cells ml^{-1} in the SW compartment of Lake Groβe Fuchskuhle, and from 1.5×10^6 to 4.3×10^6 cells ml^{-1} in the NE compartment (Table 3). Bacterial abundances were significantly higher in the NE compartment ($P < 0.001$), and distinct maxima were observed only in this compartment in September 2000 and 2001 and in February 2001. Annually, on average β-proteobacteria constituted 42% of all bacteria in the SW compartment and 29% in the NE compartment (Fig. 5). This difference was statistically significant ($P < 0.01$). Bacteria of the beta II lineage formed a significantly larger part of all β-proteobacteria (63%) and of the total microbial community (28%) in the SW compartment than in the NE compartment (33 and 10%, respectively) (Fig. 5). At three time points between July and September 2001, these bacteria made up >90% of the β-proteobacteria and approximately half of all bacteria in the SW compartment of Lake Groβe Fuchskuhle. *Actinobacteria* formed on average 23 and 20% of all cells in the SW and NE compartments, respectively, with no significant difference between the compartments (Fig. 6). Two distinct peaks in their relative community contributions could be distinguished in both compartments between November 2000 and January 2001 and from May to August 2001. The ratio between the community contributions of *Actinobacteria* and of members of the beta II lineage showed pronounced seasonal fluctuations (Fig. 7) in both compartments.

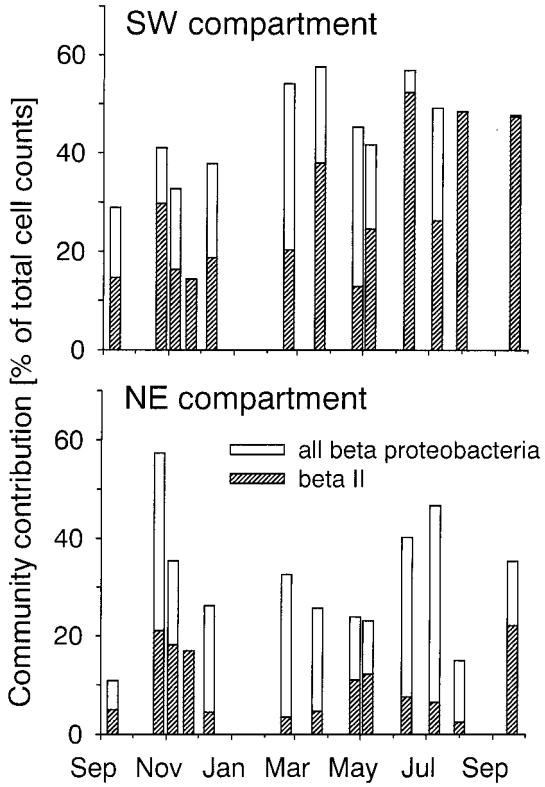

FIG. 5. Relative abundances of β-proteobacteria and of members of the beta II clade in surface waters of the SW and NE compartments of Lake Groβe Fuchskuhle between September 2000 and September 2001.

DISCUSSION

Members of the beta II clade are rapidly enriched. In incubations of water from Lake Groβe Fuchskuhle, microbes related to the freshwater beta II lineage were among the first bacteria that responded to the changed growth conditions (Fig. 4). In the dilution experiments on water from the SW basin, a first doubling of these bacteria was observed within 24 to 48 h, irrespective of the inoculum. Within 4 days of enrichment these bacteria increased in abundance by approximately 50-fold. *P. necessarius* (formerly known as omikron) is an obliga-

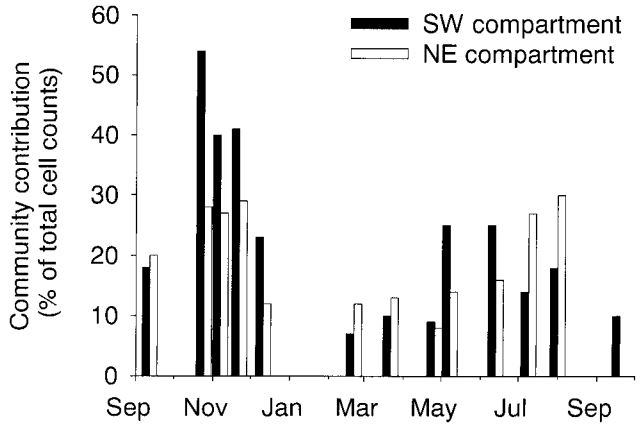

FIG. 6. Relative abundances of *Actinobacteria* in surface waters of the SW and NE compartments of Lake Groβe Fuchskuhle between September 2000 and September 2001.

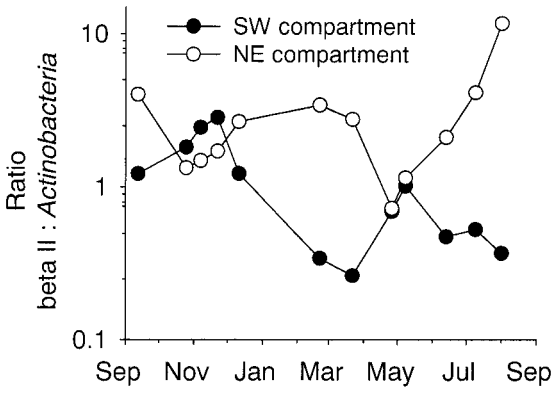

FIG. 7. Ratios of members of the beta II clade to *Actinobacteria* in surface waters of the SW and NE compartments of Lake Groβe Fuchskuhle between September 2000 and September 2001.

tory symbiont of the hypotrichous freshwater ciliate *Euplotes aediculatus* (16). Its phylogenetic position within the β-proteobacteria has been demonstrated by 16S rRNA gene sequencing and subsequent FISH detection inside the host cells (52). Sequences affiliated with *P. necessarius* have been obtained from various freshwater systems, e.g., the acidified Adirondack mountain lakes, the oligotrophic Crater Lake, the Columbia River estuary, Antarctic Toolic Lake, and eutrophic Lake Loosdrecht (Fig. 2). Currently, no other bacteria from this lineage except for *P. necessarius* are validly described, but that group harbors culturable representatives from freshwater plankton (6, 15a).

Role of opportunistic water column bacteria. The beta II clade represents a lineage of readily enriched pelagic bacteria that are important in the water column of Lake Groβe Fuchskuhle (Fig. 5). Members of this group seasonally constituted more than half of all bacterioplankton cells in the SW compartment. This suggests that the adaptation to rapid changes in substrate availability might be an important ecological feature of water column bacteria in this acidified bog lake. Bacteria related to beta II might, e.g., be specialized to respond to the sporadic high influx of allochthonous DOC from the catchment into the SW compartment of Lake Groβe Fuchskuhle (Fig. 1). Allochthonous carbon is a major substrate source for bacteria in humic lakes (54), and water influx has been proposed as an agent of bacterial community change in a boreal forest lake (28). Bottom-up factors have been shown to play a key role in controlling the composition of resource-limited microbial assemblages in other freshwater systems too (12, 50).

However, even though our data appear to support our hypothesis, it is too early for generalizations. First, it is currently unknown whether the high numbers of bacteria from the beta II clade are a typical feature of the studied humic lake or if these bacteria also form larger populations in other freshwaters with different limnological and hydrological characteristics. The answer cannot be deduced from isolates and the occurrence of 16S rRNA gene sequences from this clade in various other systems (13, 56) (Fig. 2), because there may be little relationship between the abundances of phylotypes or isolates in situ and their presence in clone libraries and culture collections (7, 8). Second, it is unclear whether the phylotypes of the beta II clade that were enriched during the incubation experiments were indeed identical with the dominant sequence types from this lineage that occur in the water column of Lake Groβe Fuchskuhle. The clade might harbor a high diversity of strains with contrasting ecological and ecophysiological features. For example, some members of the marine *Roseobacter* lineage from North Sea waters can be readily enriched and isolated, whereas the abundant *Roseobacter* phylotypes still resist cultivation (10).

Our results nevertheless point at a potential difference between the functioning of the bacterial assemblage in the studied lake and that of the microbial communities in other aquatic habitats, e.g., coastal North Sea waters. In the latter system, a 1:10 dilution with prefiltered ambient water and subsequent incubation typically leads to the rapid enrichment of culturable γ-proteobacteria related to the genera *Vibrio* and *Pseudoalteromonas* (8). These bacteria are often associated with biofilms, e.g., animal or plant surfaces (20, 34). They are apparently adapted to quickly respond to changes in environmental conditions (8, 11), and they are superior competitors when they are exposed to steep substrate gradients (39). Bacteria from such opportunistic genera are usually extremely rare in coastal North Sea plankton (9), likely because they are overproportionally reduced by size-selective protistan grazing (3). This rarity is in striking contrast to our present findings about the important role of the readily enriched beta II lineage in the surface waters of Lake Groβe Fuchskuhle (Fig. 5).

The relative abundances of bacteria related to the *Actinobacteria* clearly declined during the incubations (Fig. 4). This class of gram-positive bacteria with a high genomic G+C content are a ubiquitous component of the water column of many freshwater systems (13, 32, 56). High numbers of these bacteria were detected in lakes with different limnological characteristics only after substantial improvements of the original FISH technique (13, 47). Recently, members from one actinobacterial lineage have been isolated from various sites by Hahn and coworkers (15). In that study the actinobacterial cells had to be physically separated from other bacteria by filtration for successful cultivation. In addition, the inorganic media were gradually enriched with organic substrates over a period of several days in order to avoid substrate shock. These observations by Hahn et al. agree with our findings that *Actinobacteria* were outcompeted by more rapidly growing bacterial groups after sudden changes in substrate availability (Fig. 4).

DOC and bacterial production during the incubations. Interestingly, no change in the total cDOC pool or in the fractions determined by size exclusion chromatography with UV and organic carbon detection could be observed during the incubation experiment (Table 2). If we apply the frequently used factor of Simon and Azam (51) for a conversion of [3H]leucine incorporation into bacterial carbon production, a total production of approximately 1 to 1.5 mg of carbon can be estimated for the duration of the incubations. This value represents 10% of the measured carbon pool. Such consumption should be reflected in changes of total cDOC (Table 2). Apparently, size exclusion chromatography was not sensitive enough for analyzing the potential changes in the cDOC fractions. Moreover, the above-noted conversion factor most likely under- rather than overestimated bacterial carbon production in the studied assemblage. During the first 6 days of incubation

(i.e., before losses by heterotrophic flagellates need to be considered), the use of this factor results in estimates of per cell carbon bacterial content of only 5 to 10 fg. This is probably too low by a factor of 2 to 4 (43). Thus, either the enriched bacterial species exhibited unusually high growth efficiencies or these bacteria preferably utilized substrate sources other than the offered amino acid.

Field observations. Due to the artificial division, Lake Groβe Fuchskuhle is a rather unusual system. During the summer months the lake forms a steep oxycline, and the two studied compartments differ in several fundamental parameters, e.g., water chemistry, primary productivity, the structure of the phytoplankton community, and the structure of the microbial food web (4, 17, 45, 49). In a previous study, the more acidified, humic-acid-richer SW compartment was inhabited by large cladocerans, which effectively suppressed protistan bacterial predators (49). Bacterial mortality in the more productive NE compartment was caused mainly by a small oligotrich ciliate, *Cyclidium* sp., which is rather untypical for freshwater systems. These differences between the compartments were again reflected in the contrasting annual developments of the microbial communities in the SW and NE compartments (Fig. 5 and 6). On an annual scale, total bacterial abundances were lower in surface waters of the SW compartment, yet the proportions of bacteria from the beta II clade were significantly higher (Fig. 5). The latter finding is consistent with the rapid enrichment on prefiltered water of beta II clade organisms that originated from this compartment (Fig. 4).

Actinobacteria clearly formed a second important component of the microbial assemblages in both compartments of Lake Groβe Fuchskuhle (Fig. 6). Sequence types related to this lineage have also been reported from several Scandinavian bog lakes (30). The ecological role of these bacteria in freshwaters is unknown. Some aquatic *Actinobacteria* are apparently better protected from mortality by protistan grazing than the community average. The enrichment of such bacteria was repeatedly observed in continuous culture after the addition of a mixotrophic flagellate, *Ochromonas* sp. strain DS (41). This flagellate was completely unable to consume a freshwater actinobacterial isolate in batch culture experiments (15). The phytoplankton communities of humic lakes often harbor a higher share of such mixotrophic flagellate species than other lakes, including *Ochromonadaceae* (22). On the other hand, actinobacterial strains from terrestrial habitats have been shown to produce peroxidases that are able to cleave complex organic compounds such as humic substances (31, 44). *Actinobacteria* in Lake Groβe Fuchskuhle might thus be involved in the turnover of the more recalcitrant DOC fraction.

At this stage little is known about the functional role of *Actinobacteria* or members of the beta II lineage in Lake Groβe Fuchskuhle apart from their contrasting behavior during enrichment. Pronounced phytoplankton blooms occurred in the two compartments during the study period, but there was no significant relationship of chlorophyll a and the changes in absolute and relative numbers of the studied groups (data not shown). Together, the two lineages represented half of the bacteria in the surface waters of the SW compartment and a third of the bacteria in the more mesotrophic NE compartment. In October 2000 and June 2001 they constituted approximately 80% of all cells in the SW compartment. The high fluctuations in the ratio between bacteria of the beta II clade and the *Actinobacteria* hint at remarkable differences in their respective roles during the seasonal development (Fig. 7). The fluctuations furthermore indicate that there were pronounced differences also between the SW and NE compartments. Interestingly, this parameter appeared to be almost mirrored in the two compartments. Primary producers, microzooplankton, DOC content, and pH have all been suggested to affect microbial community composition in acidified or humic-acid-rich lakes (29, 33). However, more-detailed experimental and comparative investigations and high-resolution time course studies are required to understand the factors that determine the occurrence and the population sizes of the two lineages in humic lakes.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank R. Amann and H.-P. Grossart for inspiring discussions and M. Degebrodt for measurements of leucine incorporation.

This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Ba 1288/5-1-2), by the German Ministry of Education and Research (BIOLOG, BMBF 01 LC0021/TP4), and by the Max Planck Society.

REFERENCES

1. **Amann, R. I., W. Ludwig, and K. H. Schleifer.** 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol. Rev. **59:**143–169.
2. **Babenzien, D., and C. Babenzien.** 1990. Microbial activities in a naturally acidotrophic lake. Arch. Hydrobiol. Suppl. **34:**175–181.
3. **Beardsley, C., J. Pernthaler, W. Wosniok, and R. Amann.** 2003. Are readily cultured bacteria in coastal North Sea waters suppressed by selective grazing mortality? Appl. Environ. Microbiol. **69:**2624–2630.
4. **Bittl, T., and H.-D. Babenzien.** 1996. Microbial activities in an artificially divided acidic lake. Arch. Hydrobiol. Adv. Limnol. **48:**113–121.
5. **Brosius, J., T. J. Dull, D. D. Sleeter, and H. F. Noller.** 1981. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli.* J. Mol. Biol. **148:**107–127.
6. **Bruns, A., U. Nübel, H. Cypionka, and J. Overmann.** 2003. Effect of signal compounds and incubation conditions on the culturability of freshwater bacterioplankton. Appl. Environ. Microbiol. **69:**1980–1989.
7. **Cottrell, M. T., and D. L. Kirchman.** 2000. Community composition of marine bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and fluorescence in situ hybridization. Appl. Environ. Microbiol. **66:**5116–5122.
8. **Eilers, H., J. Pernthaler, and R. Amann.** 2000. Succession of pelagic marine bacteria during enrichment: a close look on cultivation-induced shifts. Appl. Environ. Microbiol. **66:**4634–4640.
9. **Eilers, H., J. Pernthaler, F. O. Glöckner, and R. Amann.** 2000. Culturability and in situ abundance of pelagic bacteria from the North Sea. Appl. Environ. Microbiol. **66:**3044–3051.
10. **Eilers, H., J. Pernthaler, J. Peplies, F. O. Glöckner, G. Gerdts, and R. Amann.** 2001. Isolation of novel pelagic bacteria from the German Bight and their seasonal contribution to surface picoplankton. Appl. Environ. Microbiol. **67:**5134–5142.
11. **Flärdh, K., P. S. Cohen, and S. Kjelleberg.** 1992. Ribosomes exist in large excess over the apparent demand for protein synthesis during carbon starvation in marine *Vibrio* sp. strain CCUG 15956. J. Bacteriol. **174:**6780–6788.
12. **Gasol, J. M., M. Comerma, J. C. Garcia, J. Armengol, E. O. Casamayor, P. Kojecka, and K. Simek.** 2002. A transplant experiment to identify the factors controlling bacterial abundance, activity, production, and community composition in a eutrophic canyon-shaped reservoir. Limnol. Oceanogr. **47:**62–77.
13. **Glöckner, F.-O., E. Zaichikov, N. Belkova, L. Denissova, J. Pernthaler, A. Pernthaler, and R. Amann.** 2000. Comparative 16S rRNA analysis of lake bacterioplankton reveals globally distributed phylogenetic clusters including an abundant group of actinobacteria. Appl. Environ. Microbiol. **66:**5053–5065.
14. **Grossart, H. P., and H. Ploug.** 2001. Microbial degradation of organic carbon and nitrogen on diatom aggregates. Limnol. Oceanogr. **46:**267–277.
15. **Hahn, M. W., H. Lünsdorf, Q. Wu, M. Schauer, M. G. Höfle, J. Boenigk, and P. Stadler.** 2003. Isolation of novel ultramicrobacteria classified as actinobacteria from five freshwater habitats in Europe and Asia. Appl. Environ. Microbiol. **69:**1442–1451.

15a. **Hahn, M. W.** 2003. Isolation of strains belonging to the cosmopolitan *Polynucleobacter necessarius* cluster from freshwater habitats located in three climate zones. Appl. Environ. Microbiol. **69:**5248–5254.

16. **Heckmann, K.** 1975. Omikron, essential endosymbiont of *Euplotes aediculatus.* J. Protozool. **22:**97–104.
17. **Hehmann, A., L. Krienitz, and R. Koschel.** 2001. Long-term phytoplankton changes in an artificially divided, top-down manipulated humic lake. Hydrobiologia **448:**83–96.
18. **Hemond, H.** 1990. Wetlands as the source of dissolved organic carbon to surface waters, p. 301–313. *In* E. Perdue and E. Gjessing (ed.), Organic acids in aquatic ecosystems: report of the Dahlem workshop on organic acids in aquatic ecosystems. John Wiley & Sons, Chichester, United Kingdom.
19. **Heyman, U.** 1983. Relationship between production and biomass of phytoplankton in four Swedish lakes of different trophic status and humic content. Hybrobiologia **101:**71–88.
20. **Holmström, C., and S. Kjelleberg.** 1999. Marine *Pseudoalteromonas* species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents. FEMS Microbiol. Ecol. **30:**285–293.
21. **Ilmavirta, V.** 1988. Phytoflagellates and their ecology in Finnish brown-water lakes. Hydrobiologia **161:**255–270.
22. **Jansson, M., P. Blomqvist, A. Jonsson, and A.-K. Bergström.** 1996. Nutrient limitation of bacterioplankton, autotrophic and mixotrophic phytoplankton, and heterotrophic nanoflagellates in Lake Örtäsket. Limnol. Oceanogr. **41:** 1552–1559.
23. **Karner, M., and J. A. Fuhrman.** 1997. Determination of active marine bacterioplankton: a comparison of universal 16S rRNA probes, autoradiography, and nucleoid staining. Appl. Environ. Microbiol. **63:**1208–1213.
24. **Kasprzak, P.** 1993. The use of an artificially divided bog lake in food web studies. Verh. Int. Verein. Limnol. **25:**652–656.
25. **Kirchman, D., E. Knees, and R. Hodson.** 1985. Leucine incorporation and its potential as a measure of protein-synthesis by bacteria in natural aquatic systems. Appl. Environ. Microbiol. **49:**599–607.
26. **Kirchman, D. L., L. Y. Yu, B. M. Fuchs, and R. Amann.** 2001. Structure of bacterial communities in aquatic systems as revealed by filter PCR. Aquat. Microb. Ecol. **26:** 13–22.
27. **Koschel, R.** 1995. Manipulation of whole lake ecosystems and long term limnological observations of the Brandenburg-Mecklenburg lake district. Int. Rev. Gesamten. Hydrobiol. **80:**1–12.
28. **Lindström, E. S.** 1998. Bacterioplankton community composition in a boreal forest lake. FEMS Microbiol. Ecol. **27:**163–174.
29. **Lindström, E. S.** 2000. Bacterioplankton community composition in five lakes differing in trophic status and humic content. Microb. Ecol. **40:**104–113.
30. **Lindström, E. S., and E. Leskinen.** 2002. Do neighboring lakes share common taxa of bacterioplankton? Comparison of 16S rDNA fingerprints and sequences from three geographic regions. Microb. Ecol. **44:**1–9.
31. **Mercer, D., M. Iqbal, P. Miller, and A. McCarthy.** 1996. Screening actinomycetes for extracellular peroxidase activity. Appl. Environ. Microbiol. **62:** 2186–2190.
32. **Methé, B. A., W. D. Hiorns, and J. P. Zehr.** 1998. Contrasts between marine and freshwater bacterial community composition: analyses of communities in Lake George and six other Adirondack lakes. Limnol. Oceanogr. **43:**368–374.
33. **Methé, B. A., and J. P. Zehr.** 1999. Diversity of bacterial communities in Adirondack lakes: do species assemblages reflect lake water chemistry? Hydrobiologia **401:**77–96.
34. **Montanari, M. P., C. Pruzzo, L. Pane, and R. R. Colwell.** 1999. Vibrios associated with plankton in a coastal zone of the Adriatic Sea (Italy). FEMS Microbiol. Ecol. **29:**241–247.
35. **Mulholland, P., C. Dahm, M. David, D. Di Toro, T. Fisher, H. Hemond, I. Kögel-Knabner, M. Meybeck, J. Meyer, and J. Sedell.** 1990. Group report: what are the temporal and spatial variations of organic acids at the ecosystem level?, p. 315–329. *In* E. Perdue and E. Gjessing (ed.), Organic acids in aquatic ecosystems: report of the Dahlem workshop on organic acids in aquatic ecosystems. John Wiley & Sons, Chichester, United Kingdom.
36. **Muyzer, G., E. C. de Waal, and A. G. Uitterlinden.** 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. **59:**695–700.
37. **Muyzer, G., A. Teske, C. O. Wirsen, and H. W. Jannasch.** 1995. Phylogenetic relationship of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. Arch. Microbiol. **164:**165–172.
38. **Pernthaler, A., J. Pernthaler, and R. Amann.** 2002. Fluorescence in situ hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. Appl. Environ. Microbiol. **68:**3094–3101.
39. **Pernthaler, A., J. Pernthaler, H. Eilers, and R. Amann.** 2001. Growth patterns of two marine isolates: adaptations to substrate patchiness? Appl. Environ. Microbiol. **67:**4077–4083.
40. **Pernthaler, J., F. O. Glöckner, W. Schönhuber, and R. Amann.** 2001. Fluorescence in situ hybridization (FISH) with rRNA-targeted oligonucleotide probes. Methods Microbiol. **30:**207–226.
41. **Pernthaler, J., T. Posch, K. Simek, J. Vrba, A. Pernthaler, F. O. Glöckner, U. Nübel, R. Psenner, and R. Amann.** 2001. Predator-specific enrichment of actinobacteria from a cosmopolitan freshwater clade in mixed continuous culture. Appl. Environ. Microbiol. **67:**2145–2155.
42. **Porter, K. G., and Y. S. Feig.** 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. Limnol. Oceanogr. **25:**943–948.
43. **Posch, T., M. Loferer-Krossbacher, G. Gao, A. Alfreider, J. Pernthaler, and R. Psenner.** 2001. Precision of bacterioplankton biomass determination: a comparison of two fluorescent dyes, and of allometric and linear volume-to-carbon conversion factors. Aquat. Microb. Ecol. **25:** 55–63.
44. **Ramachandra, M., D. Crawford, and G. Hertel.** 1988. Characterization of an extracellular lignin peroxidase of the lignocellulolytic actinomycete *Streptomyces viridosporus.* Appl. Environ. Microbiol. **54:**3057–3063.
45. **Sachse, A., D. Babenzien, G. Ginzel, J. Gelbrecht, and C. E. W. Steinberg.** 2001. Characterization of dissolved organic carbon (DOC) in a dystrophic lake and an adjacent fen. Biogeochemistry **54:**279–296.
46. **Salonen, K., P. Kankaala, T. Tulonen, T. Hammar, M. James, T. R. Metsala, and L. Arvola.** 1992. Planktonic food-chains of a highly humic lake. 2. A mesocosm experiment in summer during dominance of heterotrophic processes. Hydrobiologia **229:**143–157.
47. **Sekar, R., A. Pernthaler, J. Pernthaler, F. Warnecke, T. Posch, and R. Amann.** 2003. An improved protocol for the quantification of freshwater actinobacteria by fluorescence in situ hybridization. Appl. Environ. Microbiol. **69:**2928–2935.
48. **Sherr, E. B., and B. F. Sherr.** 1993. Protistan grazing rates via uptake of fluorescently labelled prey, p. 695–701. *In* P. Kemp, B. F. Sherr, E. B. Sherr, and J. Cole (ed.), Handbook of methods in aquatic microbial ecology. Lewis, Boca Raton, Fla.
49. **Simek, K., D. Babenzien, T. Bittl, R. Koschel, M. Macek, J. Nedoma, and J. Vrba.** 1998. Microbial food webs in an artificially divided acidic bog lake. Int. Rev. Hydrobiol. **83:**3–18.
50. **Simek, K., K. Hornak, M. Masin, U. Christaki, J. Nedoma, M. G. Weinbauer, and J. R. Dolan.** 2003. Comparing the effects of resource enrichment and grazing on a bacterioplankton community of a meso-eutrophic reservoir. Aquat. Microb. Ecol. **31:** 123–135.
51. **Simon, M., and F. Azam.** 1989. Protein content and protein synthesis rates of planktonic marine bacteria. Mar. Ecol. Prog. Ser. **51:**201–213.
52. **Springer, N., R. Amann, W. Ludwig, K. H. Schleifer, and H. Schmidt.** 1996. *Polynucleobacter necessarius*, an obligate bacterial endosymbiont of the hypotrichous ciliate *Euplotes aediculatus*, is a member of the beta-subclass of Proteobacteria. FEMS Microbiol. Lett. **135:**333–336.
53. **Thurman, E.** 1985. Organic geochemistry of natural waters. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
54. **Travnik, L. J.** 1989. Bacterioplankton growth, grazing mortality, and quantitative relationship to primary production. J. Plankton Res. **11:**985–1000.
55. **Vähätalo, A. V., K. Salonen, U. Münster, M. Jarvinen, and R. G. Wetzel.** 2003. Photochemical transformation of allochthonous organic matter provides bioavailable nutrients in a humic lake. Arch. Hydrobiol. **156:**287–314.
56. **Zwart, G., B. C. Crump, M. Agterveld, F. Hagen, and S. K. Han.** 2002. Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers. Aquat. Microb. Ecol. **28:** 141–155.

Artikel IV

Extracellular peroxidase activity in a divided humic lake (Große Fuchskuhle)

Ulrike Burkert[1]*, Hans-Dietrich Babenzien[1], Elke Zwirnmann[2]

Leibniz-Institute of Freshwater Ecology and Inland Fisheries [1]Department of Limnology of Stratified Lakes: Alte Fischerhuette 2, 16775 Stechlin; [2] Central Chemical Laboratory, Mueggelseedamm 310, 12587 Berlin; Germany.

ABSTRACT

Extracellular peroxidases act on aromatic compounds such as humic substances resulting in the formation of unstable radicals. Most organisms known for the production of extracellular peroxidases populate terrestrial environments; few studies focus on these enzymes in the aquatic environment. The extracellular peroxidase activity in the divided dystrophic Lake Große Fuchskuhle and in its catchment area was investigated monthly from June 2000 to September 2001. In a humic rich (SW) and a humic poor compartment (NE), extracellular peroxidase activity was determined and the enzymes characterized (pH and estimation of the molecular weight) by using 2,2´-azino-di-(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) as model substrate for peroxidase. In addition cell specific bacterial production was calculated. The activity of extracellular peroxidases was (except for one month) significantly higher in the humic rich compartment than in the humic poor compartment, with highest values during fall and winter. In the catchment area no peroxidase and laccase activity could be detected by using ABTS as substrate. The pH optimum was at pH 3, and highest activity detected in the molecular weight class of 10 kDa - 0.2 µm. In the humic rich compartment, a higher cell specific bacterial production than in the humic poor compartment was detected.

High concentration of humic substances, high peroxidase activity, and a high cell specific bacterial production in the SW compartment points to the utilisation of high molecular weight substrates by microorganisms.

INTRODUCTION

Extracellular peroxidases are enzymes that are mainly produced by micro-organisms such as basidiomycetous fungi or *Actinobacteria*, and by plants. In the presence of hydrogen peroxide, peroxidases act on aromatic compounds such as humic substances, resulting in the formation of unstable radicals. These radicals participate in chemical reactions that lead to bond cleavages and thus degradation of aromatic compounds. Most organisms known for the production of peroxidases have been isolated from the terrestrial habitats; few studies focus on extracellular peroxidase producing organisms in the aquatic environment (De Haan 1976, Münster et al. 1998, Münster et al. 1999, Sinsabaugh et al. 1992). In these investigations peroxidases have been approved as contributors to the breakdown of humic substances and its role in microbial biodegradation. In addition to the role of peroxidases in these degradation processes, these enzymes might also be involved in the polymerisation of aromatic compounds, as shown for humic substances (Saccomandi et al. 1998, Piccolo et al. 2000) and for phenols and anilines (Simmons et al. 2000, Dec and Bollag 1994, Kim et al. 1997).

The objective of the present work was to analyse extracellular peroxidase activity in a humic rich lake, Lake Große Fuchskuhle in Northern Germany. This lake have been subdivided into four compartments 16 years ago which resulted in the development of divergent physical and chemical parameters (Koschel 1995, Sachse et al. 2001, Burkert et al. 2004), microbial activities (Bittl & Babenzien 1996, Bittl 1999, Casper et al. 2003, Burkert et al. 2003), abundance and structure of phytoplankton communities (Hehmann & Krienitz 1996, Hehmann et al. 2001), and structure of the microbial food web (Simek et al. 1998). These characteristics are reflected in differences in the composition and the concentration of the dissolved organic carbon (DOC) with considerable deviations in concentration of humic substances (Bittl 1999, Sachse et al. 2001) which suggests that extracellular peroxidases might participate to a different extent on utilization of humic substances in the compartments of Lake Große Fuchskuhle.

In a comparative analysis differences in extracellular peroxidase activity between the compartments of Lake Große Fuchskuhle were analysed, and seasonal changes in peroxidase activity assessed. In addition, changes in DOC in time were analysed as a function of microbial activity.

MATERIAL AND METHODS

Study site. Lake Große Fuchskuhle, a naturally acidic lake is situated in the Mecklenburg-Brandenburg Lake District in northeast Germany (Figure 1), 59 m above mean sea level. The

surface area of the lake is 15,000 m^2, the median depth is 3.3 m and its catchment area is 5,000 m^2 . The lake is connected to a fen of *Ledo-Pinetum* vegetation (Succow & Jeschke 1986) on two sides, which is extensive in the southwest and is rather small in the northeast. The lake has no inlet or outlet, but is fed by rain and groundwater.

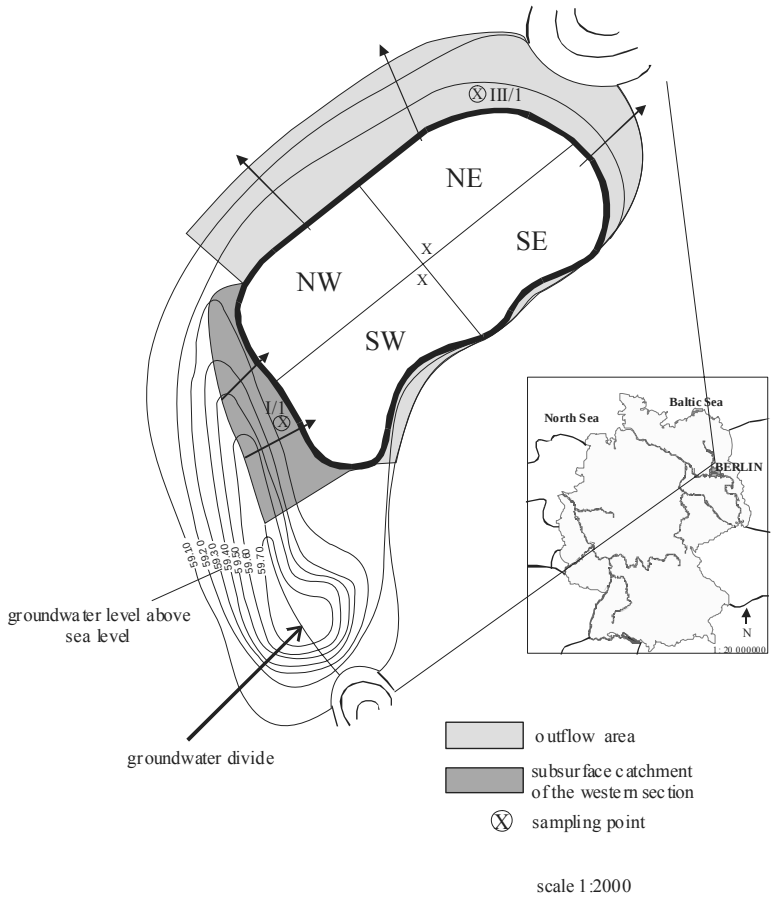

Figure 1: Lake Fuchskuhle: location of the lake in the Mecklenburg-Brandenburg Lake District in north east Germany and the hydrogeology of the catchment area and the compartments (main map). The figure originates partly from Sachse et al. (2001).

In 1986 the lake was divided into two permanent compartments which were again subdivided in 1989: a southwest (SW), a northwest (NW), a northeast (NE) and a southeast (SE) (Kasprzak et al. 1988, Kasprzak 1993).

For the present study, two compartments that developed very different were selected: the SW compartment with an acidotrophic humic character and a higher influx of allochtonous DOC, and the NE compartment with a more mesotrophic character (Sachse et al. 2001). In order to study the influence of the catchment area on the microbial activity in the compartments, one well (I/1-peat) located in the fen adjacent to the SW compartment, and a

second one (III/1-peat) located in the fen adjacent to the NE compartment, were selected (Figure 1).

Sampling, fixation. The investigation was done between June 2000 and September 2001 at approximately monthly intervals. Lake water from the two compartments was collected from a depth of 0.5 m. Before sampling 2 l water of well I/1-peat and well III/1-peat were rejected, samples were collected with a boat pump after the wells refilled with interstitial water. Measurements of extracellular enzyme activity were done within two hours. Bacterial production and heterotrophic activity were determined within two hours after sampling. Cooled subsamples for DOC analyses were analysed within 48 hours. Samples for total bacterial numbers were fixed with formaldehyde (1% wt/vol, final concentration) and stored at 4°C until further processing.

Peroxidase and laccase. Extracellular peroxidase (EC 1.11.1.7) and laccase (EC 1.10.3.2) were measured in the SW and NE compartments of Lake Große Fuchskuhle and in the two wells I/1-peat and III/1-peat of the catchment area. As substrate the chromogen 2,2´-azino-di-(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) was used (Becker 1974, Childs & Bardsley 1975, Wolfenden & Willson 1982). The rate of ABTS oxidation was measured at 405 nm (ε_{405} = 3.68 x 10^4 M^{-1} cm^{-1}) with the Rainbow reader (Tecan, Crailsheim, Germany). The collected water was filtered onto polycarbonate filters (pore size, 0.2 µm, diameter 25 mm, Schleicher & Schuell, Dueren, Germany). The assay mixture contained the prefiltered lake water or well water (240 µl), 1.2 mM ABTS (30 µl) and 1.5 mM hydrogen peroxide (30 µl) or autoclaved Milli Q respectively (30 µl). For the determination of peroxidase, the reaction started with addition of hydrogen peroxide. The laccase activity was determined when adding autoclaved Milli Q. The ABTS working solution was prepared in a buffer solution of 50 mM Na_2HPO_4 (pH 5). The samples for measurements (n = 3) were incubated for two hours in the dark at in situ temperatures. For the controls 0.2 µm autoclaved prefiltered lake water were used. The measured activity of extracellular peroxidase was corrected against the extracellular laccase activity in order to get the final activity of extracellular peroxidase. The determination of the pH optimum and an estimation of the molecular weight, was done on 21st May 2001. The effect of pH on the activity of the extracellular peroxidases was determined in the presence of appropriate buffers: 0.1 M phthalic acid (pH 3 – 6) and 0.1 M borate buffer (pH 7 –10). The estimation of the molecular weight was determined by using a tangential-flow ultrafiltration system (Pro Vario-3, Filtron) to separate the lake water into four fractions: < 1.2 µm, 0.2 µm – 10 kDa, 10 –1 kDa, < 1 kDa. Measurements of the activity of extracellular peroxidases in the fractions were done as described before.

Carbon analyses. The quality and quantity of the DOC pools were analysed with a custom-designed automated size exclusion chromatograph connected to an UV and organic carbon detection system (Huber & Frimmel 1991, Huber et al. 1994, Huber & Frimmel 1996, Sachse et al. (2001). Total DOC was obtained by injection of 0.45 µm surface water, respectively, water of the wells bypassing the chromatographic column. Four different chromatographied DOC (CDOC) fractions were distinguished and quantified: polysaccharides (PS), humic substances (HS), low molecular weight carboxylic acids (LMWA) and others (e.g. proteins, amino acids). The DOC fractions were characterized by UV-detection (254 nm) and quantified by a Liquid Chromatography – Organic Carbon Detection (LC-OCD). In contrast to the fraction of the UV active HS (humic and fulvic polyelectrolytic acids) show the fraction of PS (high molecular weight carbohydrates) no absorption in the UV range. LMWA accounts to the labile fraction of the carbon pool. The UV active part of this fraction is correlated to low molecular weight HS. The DOC fraction "other" were identified as low molecular weight substances such as proteins, peptides or amino acids. The DOC fractions were identified by using standards and simple compounds (Huber & Frimmel 1991, Huber et al. 1994). The limits of quantification for the various fractions were 0.3 mg l^{-1}C for CDOC, 0.02 mg l^{-1}C for PS, 0.2 mg l^{-1}C for HS, 0.15 mg l^{-1}C for LMWA and 0.1 mg l^{-1} C for others.

Bacterial cell numbers, bacterial production. The bacterial cell numbers were determined after filtration of lake water (2 ml) onto black membrane filters (pore size, 0.2 µm, diameter 25 mm, Osmonics) and staining with 4´,6´-diamidino-2´-phenylindole (DAPI) (final concentration 0.1 µg ml^{-1}) (Porter & Feig 1980). The enumeration was performed by epifluorescence microscopy (Leica DM RB microscope, Leica, Bensheim Germany, UV filter set, objective: PL APO 100 x 1.40 – 0.7 oil).

Bacterial production was estimated from the incorporation rate of tritiated leucine modified from Kirchman et al. (1985). Subsamples of lake water of 10 ml were incubated with 50 µl of [^{3}H] leucine (Amersham) (final concentration, 0.1 µM) and an equal amount of nonlabeled leucine. After 1 – 2 hours of incubation at in situ temperature, the samples were preserved with formaldehyde (1% wt/vol, final concentration) and immediately filtered through polycarbonate filters (pore size 0.2 µm, diameter 25 mm, Corning Costar, Cambridge, USA). Then the filters were treated 4 times with 1 ml of ice-cold 5 % trichloracetic acid. In the controls, formaldehyde was added before addition of [^{3}H] leucine. The dried filters were covered with 9 ml of scintillation cocktail (Emulsier Safe^{TM}, Canberra-Packard, Rodgau-Juegesheim, Germany) and the activity was then radioassayed in a liquid scintillation counter (TRI-CARB 1600, Canberra-Packard, Rodgau-Juegesheim, Germany). A control parameter

was obtained for each sample that indicated changes in quenching. The total incorporation of [^{3}H] leucine into bacterial biomass was corrected by subtraction of counts from prefixed controls.

Activity of heterotrophic organisms was determined by measuring the kinetics of incorporation of [U-^{14}C] glucose (Amersham) (Wright & Hobbie 1966), following the protocol described by Babenzien & Babenzien (1985). The final concentration of glucose in the water sample ranged from 1.25 to 25 µg C l^{-1}. The incubation lasted 1-2 hours and was done at in situ temperature.

Chlorophyll a content was detected spectrophotometrically after acetone extraction using a LAMDA 2 Perkin-Elmer spectrophotometer (detection limit < 1 µg l^{-1}) (Rodgau-Jügesheim, Germany). The calculation was done according to Strickland & Parsons (1968).

RESULTS

Extracellular peroxidase activity. In the SW compartment extracellular peroxidase activity was detected from June 2000 until June 2001 and in September 2001 (Fig. 2), but only from June 2000 until October 2000 and in May 2001 in the NE compartment (Fig. 2).

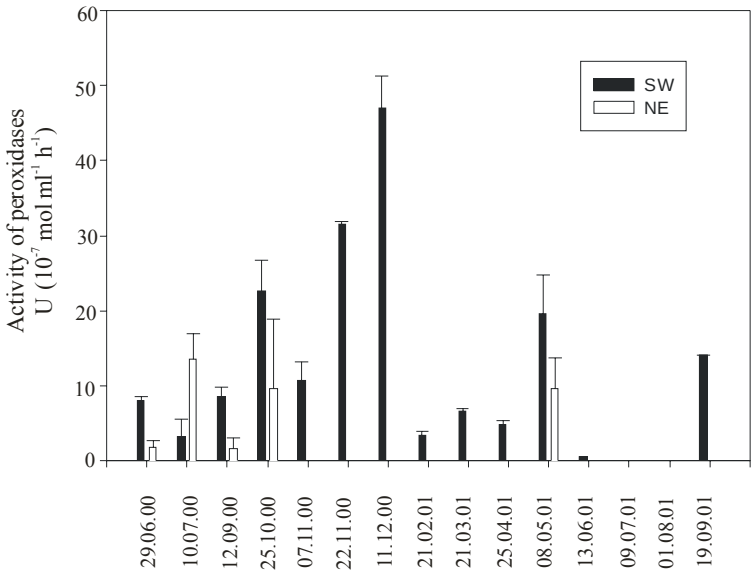

Figure 2: Extracellular peroxidase activity in the SW and NE compartment of Lake Große Fuchskuhle.

Except for July 2000, the activity of extracellular peroxidases was significantly higher in the SW compartment (0.6 x 10^{-7} mol ml^{-1} h^{-1} - 47.1 x 10^{-7} mol ml^{-1} h^{-1}, mean

13.9 x 10^{-7} mol ml^{-1} h^{-1}) than in the NE compartment (1.56 x 10^{-7} mol ml^{-1} h^{-1} - 13.5 x 10^{-7} mol ml^{-1} h^{-1}, mean 7.3 x 10^{-7} mol ml^{-1} h^{-1}) (t - test, $p < 0.05$). In the two compartments no laccase activity was detectable during the investigation period.

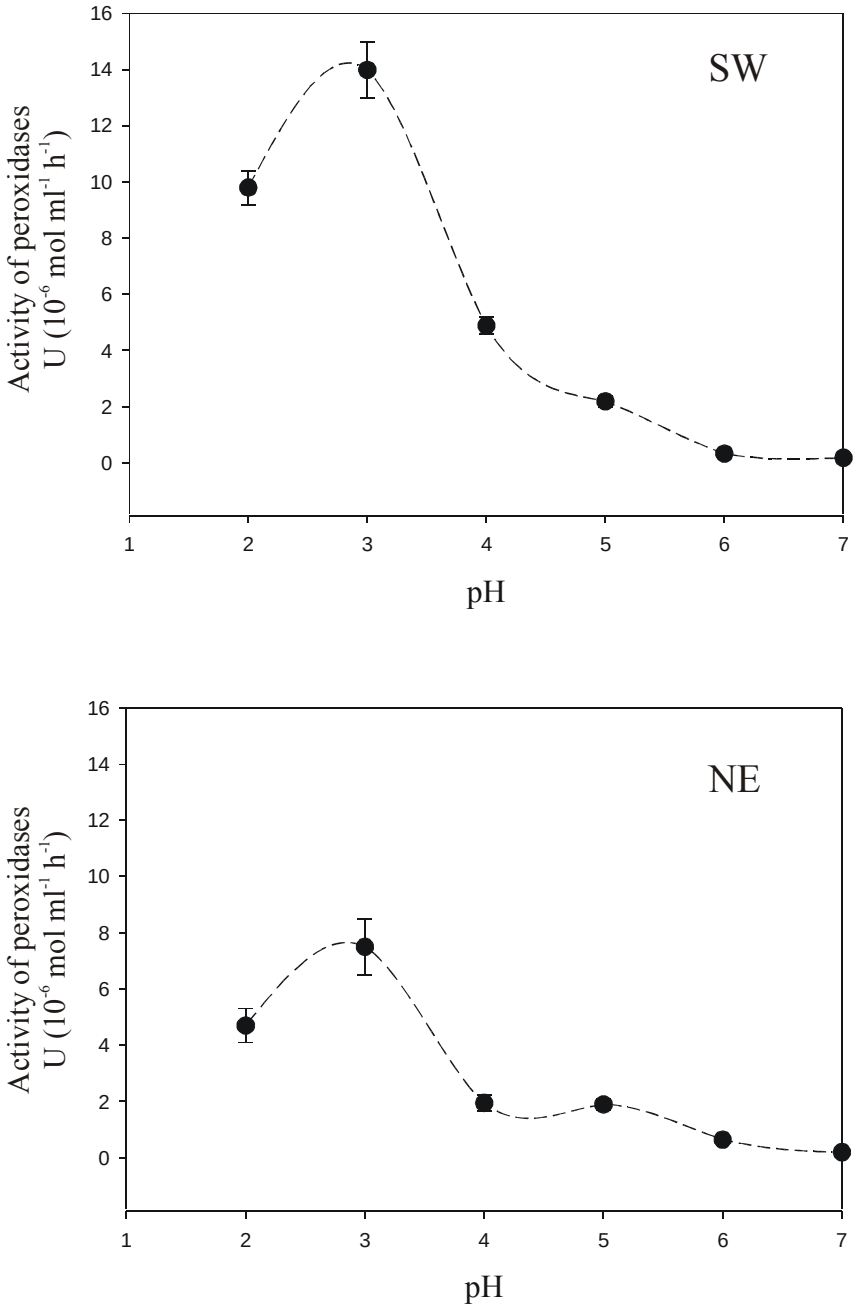

Figure 3: pH optimum of extracellular peroxidases in the SW and NE compartment of Lake Große Fuchskuhle.

The pH optimum of the activity of extracellular peroxidases was around pH 3 (Fig. 3). Below 10 kDa no peroxidase activity was detected (Table 1). In the size class 10 kDa – 0.2 µm, the highest activity of peroxidases was detected (4.4 x 10^{-7} mol ml^{-1} h^{-1}). The activity of peroxidases in the size class 1.2 µm – 0.2 µm was 2.7 x 10^{-7} mol ml^{-1} h^{-1}, an indication for peroxidases which might be attached to the organisms. In the catchment area, no peroxidase and laccase activity could be detected.

Table 1: Activity of extracellular peroxidases in different fractions of lake water in the SW compartment of Lake Große Fuchskuhle, * U = Units

Fraction	Activity of peroxidases U* (10^{-7} mol ml^{-1} h^{-1})	SD (10^{-7} mol ml^{-1} h^{-1})
0.2 µm - 1.2 µm	2.7	0.15
10 kDa - 0.2 µm	4.4	0.24
1 - 10 kDa	0.0	-
< 1 kDa	0.0	-

DOC analyses. The CDOC concentration in the SW compartment ranged from 12.0 mg l^{-1}C to 16.2 mg l^{-1}C, and in the NE compartment from 10.0 mg l^{-1}C to 11.9 mg l^{-1}C (Table 2). The fraction of the humic substances (HS) occurred as the largest portion of the CDOC in all samples (Table 2, 3). In the SW compartment the concentration of HS ranged from 8.4 mg l^{-1}C to 12.5 mg l^{-1}C (68 % - 82 % of the CDOC), and in the NE compartment from 4.9 mg l^{-1}C to 6.3 mg l^{-1}C (47 % - 55 % of the CDOC). The concentration of the polysaccharides (PS) ranged from 0.7 mg l^{-1}C to 2.2 mg l^{-1}C (5.3 % - 13.5 % of the CDOC) in the SW compartment, and from 2.4 mg l^{-1}C to 4.4 mg l^{-1}C (22.7 % - 42.1 % of the CDOC) in the NE compartment. Consequently, in the SW compartment the concentration of the HS was higher, and the concentration of the PS was lower than in the NE compartment (Figure 4). The concentrations of the low molecular weight acids were negligible in both compartments. In the SW compartment, the concentration of the fraction "others" (e.g. proteins, amino acids) ranged from 1.5 mg l^{-1}C to 3.3 mg l^{-1}C (9.9 % - 23.5 % of the CDOC) and in the NE compartment from 1.1 mg l^{-1}C to 3.6 mg l^{-1}C (10.6 % - 32.4 % of the CDOC) (Table 2). The CDOC concentration ranged from 56.3 mg l^{-1}C to 64.2 mg l^{-1}C in well I/1, and from 24.6 mg l^{-1}C to 27.6 mg l^{-1}C in well III/1 (Table 3). In well I/1 and III/1 the concentration of low

molecular weight acids and the PS were negligible (Figure 5). In both wells, high concentrations of HS were detected: 50.5 mg l^{-1}C to 58.4 mg l^{-1}C in well I/1 (81.4 % – 90.9 % of the CDOC), and 17.4 mg l^{-1}C to 22.4 mg l^{-1}C in well III/1 (70.9 % – 81.2 % of the CDOC). In well I/1 the concentration of the fraction " others" ranged from 5.5 mg l^{-1}C to 10.9 mg l^{-1}C (8.5 % – 17.6 % of the CDOC) and from 4.3 mg l^{-1}C to 6.5 mg l^{-1}C (15.6 % – 24.4 % of the CDOC) in well III/1.

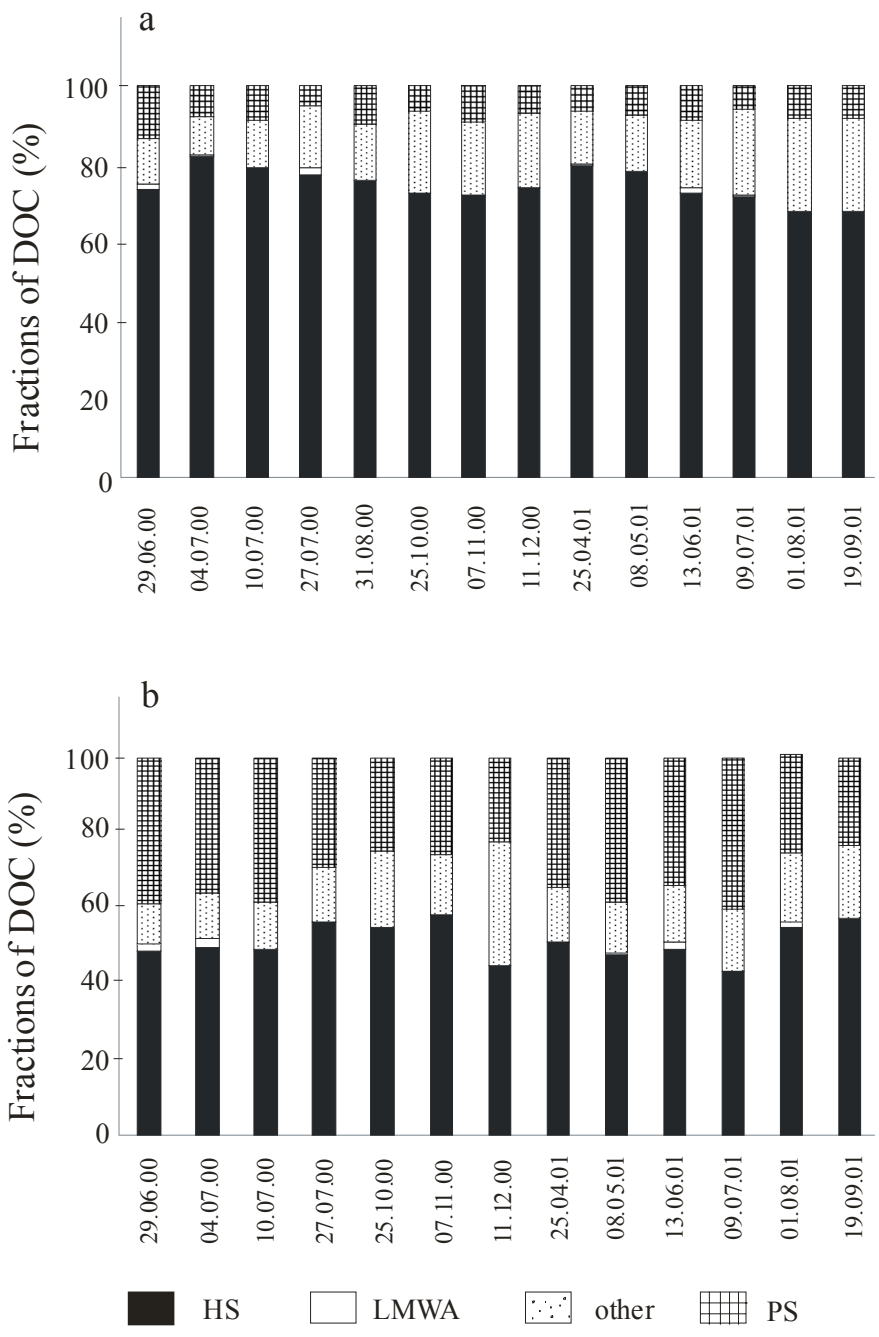

Figure 4: Composition of the chromatographied DOC (CDOC) in a) the SW and b) the NE compartment of Lake Große Fuchskuhle from June 2000 until September 2001.

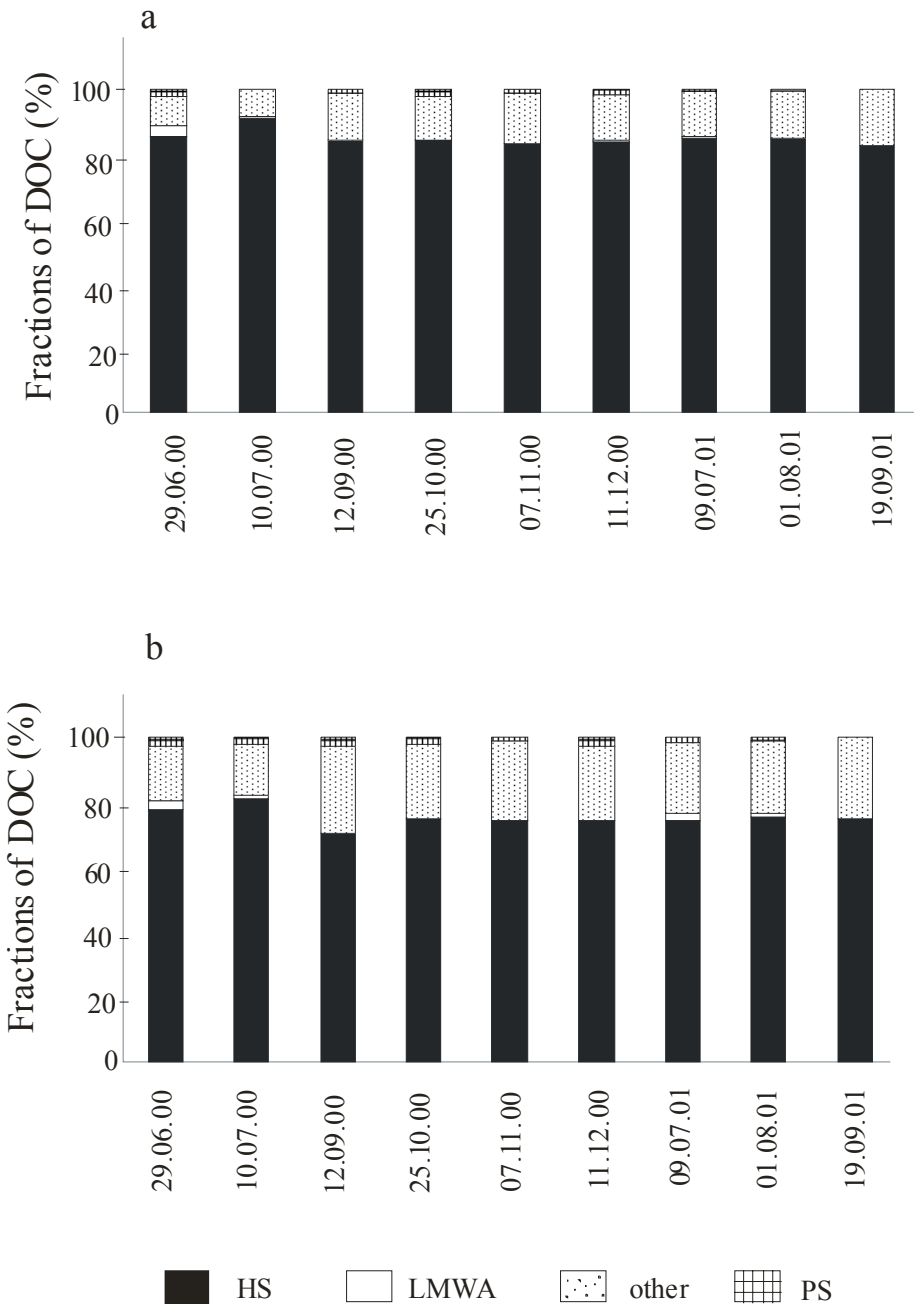

Figure 5: Composition of the chromatographied DOC (CDOC) in the wells a) I/1 and b) III/1 of the catchment area of Lake Große Fuchskuhle from June 2000 until September 2001.

Table 2: Fractions of chromatographied DOC (CDOC) in the SW and the NE compartment by size-exclusion liquid chromatography, organic carbon and UV detection. LMWA: Low molecular weight organic acids; * measured in duplicates; n.d. = not determined

Date		**CDOC** ($mg\ l^{-1}$)				**Humic acids** ($mg\ l^{-1}$)				**Polysaccharides** ($mg\ l^{-1}$)				**LMWA** ($mg\ l^{-1}$)				**others** ($mg\ l^{-1}$)			
		SW		NE		SW		NE		SW		NE		SW		NE		SW		NE	
		mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD
29.06.00	*	16.2	-	10.4	-	11.9	-	5.0	-	2.2	-	4.1	-	0.3	-	0.2	-	1.8	-	1.1	-
04.07.00	*	15.2	-	10.9	-	12.5	-	5.4	-	1.2	-	3.9	-	0.1	-	0.3	-	1.5	-	1.3	-
10.07.00	*	15.4	-	11.3	-	12.2	-	5.5	-	1.4	-	4.4	-	0.0	-	0.0	-	1.9	-	1.4	-
27.07.00	*	14.6	-	10.5	-	11.4	-	5.9	-	0.8	-	3.1	-	0.2	-	0.0	-	2.3	-	1.5	-
31.08.00	*	13.3	-	n.d.	-	10.1	-	n.d.	-	1.3	-	n.d.	-	0.0	-	n.d.	-	1.9	-	n.d.	-
25.10.00	*	15.5	-	10.3	-	11.2	-	5.6	-	1.0	-	2.6	-	0.0	-	0.0	-	3.3	-	2.1	-
07.11.00	*	12.5	-	10.4	-	9.0	-	6.1	-	1.1	-	2.7	-	0.0	-	0.0	-	2.4	-	1.6	-
11.12.00	*	12.0	-	11.2	-	8.9	-	5.0	-	0.8	-	2.6	-	0.0	-	0.0	-	2.3	-	3.6	-
25.04.01		12.8	0.1	10.4	0.4	10.2	0.0	5.3	0.2	0.8	0.1	3.6	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	1.8	0.2	1.5	0.2
08.05.01		12.4	0.1	10.5	0.3	9.6	0.1	4.9	0.2	0.9	0.1	4.0	0.3	0.1	0.0	0.0	0.0	1.8	0.1	1.5	0.1
13.06.01		12.6	0.3	11.9	0.3	9.1	0.1	5.8	0.2	1.1	0.1	4.0	0.1	0.2	0.1	0.2	0.0	2.2	0.2	1.8	0.1
09.07.01		12.3	0.1	11.4	1.2	8.8	0.1	6.1	1.1	0.7	0.0	4.1	0.8	0.0	0.0	0.0	0.0	2.7	0.1	1.3	0.9
01.08.01		12.4	0.1	11.5	0.2	8.4	0.0	6.3	0.1	1.0	0.2	2.9	0.2	0.1	0.1	0.2	0.1	2.9	0.1	2.1	0.2
19.09.01		12.7	1.8	10.0	0.2	8.5	1.5	5.7	0.3	1.1	0.2	2.4	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	2.8	0.3	1.9	0.2

Table 3: Fractions of chromatographied DOC (CDOC) in the wells I/1 and III/1 by size-exclusion liquid chromato - graphy, and UV and organic carbon detection. LMWA: Low molecular weight organic acids; measured in duplicates

Date	**CDOC** (mg l^{-1})		**Humic acids** (mg l^{-1})		**Polysaccharides** (mg l^{-1})		**LMWA** (mg l^{-1})		**others** (mg l^{-1})	
	I/1	III/1	I/1	III/1	I/1	III/1	I/1	III/1	I/1	III/1
29.06.00	61.42	26.9	52.29	20.88	1.63	0.65	1.95	0.73	5.55	4.60
10.07.00	64.22	27.6	58.36	22.41	0.00	0.58	0.39	0.33	5.47	4.31
12.09.00	56.30	24.6	47.34	17.45	0.80	0.61	0.00	0.00	8.16	6.55
25.10.00	59.43	25.8	50.06	19.35	1.56	0.51	0.00	0.00	7.81	5.89
07.11.00	59.87	25.7	49.84	19.14	0.94	0.28	0.00	0.02	9.09	6.26
11.12.00	59.82	25.9	50.20	19.35	1.03	0.64	0.03	0.00	8.56	5.88
09.07.01	57.60	25.4	48.91	19.15	0.56	0.44	0.10	0.40	8.02	5.61
01.08.01	58.89	26.1	49.86	19.81	0.26	0.18	0.10	0.37	8.85	5.87
19.09.01	62.01	25.3	50.45	19.01	0.00	0.00	0.05	0.02	10.94	6.31

Bacterial cell numbers, bacterial production and heterotrophic activity.

In the SW compartment significantly lower bacterial cell numbers (0.21 x 10^6 cell ml^{-1} – 2.24 x 10^6 cell ml^{-1}, mean 1.24 x 10^6 cell ml^{-1}) were detected than in the NE compartment (1.78 x 10^6 cell ml^{-1} – 5.36 x 10^6 cell ml^{-1}, mean 3.21 x 10^6 cell ml^{-1}) (t -test, $p < 0.05$). The bacterial abundance in the wells of the catchment area ranged from 0.5 x 10^6 cell ml^{-1} to 9.4 x 10^6 cell ml^{-1} with a mean value of 3.02 x 10^6 cell ml^{-1} in well I/1 and of 4.73 x 10^6 cell ml^{-1} in well III/1 (Table 4).

The bacterial production showed only slight differences between the two compartments and between the wells (Table 5). The values ranged from 0.01 µg C l^{-1} d^{-1} to 62.8 µg C l^{-1} d^{-1} in the SW (mean 11.08 µg C l^{-1} d^{-1}) and from 0.18 µg C l^{-1} d^{-1} to 41.06 µg C l^{-1} d^{-1} in the NE compartment (mean 13.60 µg C l^{-1} d^{-1}). In May 2001 in the SW compartment the highest bacterial production (62.8 µg C l^{-1} d^{-1}) was detected. In the wells the bacterial production ranged from 0.3 µg C l^{-1} d^{-}1 to 45.41 µg C l^{-1} d^{-1} in I/1 and from 0.35 µg C l^{-1} d^{-}1 to 107.69 µg C l^{-1} d^{-1} in III/1. The mean value in well I/1 was 14.50 µg C l^{-1} d^{-1} and in well III/1 18.10 µg C l^{-1} d^{-1}. The calculated cell specific bacterial production differed remarkably between both compartments (Table 5). In the SW compartment the mean cell specific bacterial production was 12.42 fg $cell^{-1}$ d^{-1}, and in contrast in the NE compartment only 4.94 fg $cell^{-1}d^{-1}$. In the wells I/1 and III/1 the mean values of the cell specific bacterial production were 5.75 fg $cell^{-1}d^{-1}$ and 5.15 fg $cell^{-1}d^{-1}$ respectively.

Table 4: Heterotrophic activity (V max) in the SW and NE compartment, and bacterial cell numbers in the SW and NE compartment of Lake Große Fuchskuhle and in the wells I/1 and III/1 from June 2000 until September 2001

	V max ($\mu g\ C\ l^{-1}\ h^{-1}$)		Bacterial cell number (10^6 cells ml^{-1})			
	SW	NE	SW	NE	I/1	III/1
Minimum	0.01	0.10	0.21	1.78	0.50	1.70
Maximum	0.13	0.82	2.24	5.36	9.42	7.53
Mean	0.05 ± 0.004	0.35 ± 0.003	1.24 ± 0.33	3.21 ± 0.67	3.02 ± 1.17	4.73 ± 1.12

Table 5: Bacterial production and cell specific bacterial production in the SW and NE compartment of Lake Große Fuchskuhle and in wells I/1 and III/1 from June 2000 until September 2001

	Bacterial production ($\mu g\ C\ l^{-1}\ d^{-1}$)								Cell specific bacterial production ($fg\ cell^{-1}\ d^{-1}$)							
	SW		NE		I/1		III/1		SW		NE		I/1		III/1	
Minimum	0.01		0.18		0.30		0.35		0.01		0.04		0.12		0.05	
Maximum	62.82		41.06		45.41		107.69		56.59		22.07		14.99		25.82	
Mean	11.08	± 0.81	13.60	± 1.30	14.50	± 1.42	18.10	± 1.04	12.42	± 1.21	4.94	± 0.38	5.75	± 0.61	5.15	± 0.56

The NE compartment consistently showed a higher heterotrophic activity than the SW compartment (Table 4). The activity ranged from 0.10 µg C l^{-1} h^{-1} to 0.82 µg C l^{-1} h^{-1}, and the mean value was 0.35 µg C l^{-1} h^{-1}. In comparison, in the SW compartment, the heterotrophic activity ranged from 0.01 µg C l^{-1} h^{-1} to 0.13 µg C l^{-1} h^{-1}, and the mean value was 0.05 µg C l^{-1} h^{-1}.

Chlorophyll a. The chlorophyll a content in the SW compartment ranged from 2 µg l^{-1} to 258 µg l^{-1}, and the mean value was 49 µg l^{-1} (Table 6). In the NE compartment the chlorophyll a content ranged from 8 µg l^{-1} to 247 µg l^{-1} (Table 6). The mean value of the chlorophyll content in the NE compartment was 50 µg l^{-1} and differed only slightly from the mean value detected in the SW compartment.

Table 6: Chlorophyll a concentration in the SW and NE compartment of Lake Große Fuchskuhle between June 2000 and September 2001; measured in duplicates

	Chl a (µg l^{-1})	
	SW	NE
29.06.00	76	84
10.07.00	8	16
01.08.00	64	14
12.09.00	194	98
25.10.00	16	32
07.11.00	8	56
11.12.00	3	71
21.02.01	5	39
21.03.01	7	16
25.04.01	3	17
08.05.01	2	13
13.06.01	27	20
09.07.01	6	21
01.08.01	258	8
19.09.01	63	247
mean	49	50

DISCUSSION

In Lake Große Fuchskuhle, differences between the compartments in the composition of DOC could be detected (Figure 4, Table 2). In the SW compartment, humic acids appeared in higher concentrations, and polysaccharides in lower concentrations, than in the NE compartment, which is in good agreement with earlier studies (Sachse et al. 2001, Burkert et al. 2004). During our study period (June 2000 – September 2001) the concentration of humic acids were on average 74 % in the SW and 51 % in the NE compartment. From February to

August 1998 in average humic acid concentrations of 58% in the SW and 33% in the NE compartment of the chromatographied DOC (CDOC) were detected (Sachse et al. 2001). In 2004, samples of the SW compartment, indicate humic acid concentrations of around 80 % of the CDOC (Zwirnmann personal communication). Whether the input from the catchment area, or internal lake processes, are responsible for this remarkable increase in humic acid concentration remains here as an open question.

In addition to differences in DOC in the compartments, the DOC composition also differed in the catchments. Higher concentrations of proteins and amino acids (fraction "other") in well III/1 (adjacent to the NE compartment) than in well I/1 (adjacent to the SW compartment) indicate deviations in peat structure and mineralisation processes, between both locations, which is in good agreement to previous studies (Burkert et al. 2004).

The mean cell specific bacterial production in both wells exceeded the cell specific bacterial production in the NE compartment, despite higher concentrations of humic substances and very low concentrations of polysaccharides (Figure 5; Table 5). The concentration of the fraction "others" (e.g. proteins, amino acids) was, however, in the wells distinct higher than in the compartments (Table 2, 3). This organic material might be favoured by the heterotrophic bacteria populating the peat.

During the study period, in the humic rich SW compartment, a higher activity of extracellular peroxidases was detected than in the NE compartment (Figure 2). The more acidic conditions in the SW compartment (range of pH 4.69 - 5.03 between September 2000 and September 2001; Burkert et al. 2004) favour the activity of extracellular peroxidases that showed the pH optimum at pH 3 (Fig. 3), in contrast to the NE compartment (range of pH 5.79 to 6.79 between September 2000 and September 2001; Burkert et al. 2004). This finding is similar to the reported pH optimum for extracellular lignin peroxidases of the fungi *Phanerochaete chrysosporium* (pH 2.5) (Tien et al. 1986, Gold 1989) and *Vaccinium myrtillus* (at pH 3.4) (Melo et al. 1995). Extracellular peroxidases have molecular masses of approximately 40 kDa (Hatakka 2001), a size comparable with our rough estimation of 10 kDa to 0.2 µm. The activity of extracellular peroxidases in the SW compartment ranged from 0.06 to 4.71 mM L^{-1} h^{-1} and in the NE compartment from 0.16 to 1.36 mM L^{-1} h^{-1}, which is rather high compared to activities reported by Sinsabaugh & Linkins 1990 and Münster et al. 1998, which varied between 0.001 – 0.5 µM L^{-1} h^{-1} for a river system and
0.08 – 0.28 µM L^{-1} h^{-1} for a polyhumic lake. In these investigations, however, other substrates than ABTS namely 3,4-dimethoxybenzyl alcohol (veratryl alcohol) (Münster et al. 1998) and L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) (Sinsabaugh & Linkins 1990) were used as tracer

substrates, which might be beside deviations in the water systems one explanation for differences in extracellular peroxidase activities in Lake Große Fuchskuhle.

Beside numerous species of basidiomycetes (specially white-rot fungi), actinobacterial strains from terrestrial habitats are able to produce extracellular peroxidases (Mercer et al. 1996, Ramachandra et al. 1987, 1988). For example, the Actinobacterium *Streptomyces viridosporus* T7A, produces a variety of extracellular enzymes such as peroxidases that play a role in lignin degradation (Yee et al. 1996). In Lake Fuchskuhle the group of the *Actinobacteria* occurred as an important component of the microbial community in the SW and NE compartment, which formed on average 23 and 20 % respectively of all cells (Burkert et al. 2003). These aquatic *Actinobacteria* might be able to produce extracellular peroxidases as do their relatives in the soil. Support for this hypothesis might be the high abundance of *Actinobacteria* in November and December 2000 in the SW compartment (Burkert et al. 2003), which coincided in this compartment with a higher extracellular peroxidase activity (Figure 2).

Although the NE compartment was characterised by a higher heterotrophic activity (but not by a higher chlorophyll a concentration) and higher concentrations of polysaccharide, compounds that are usually well utilised by heterotrophic bacteria, the cell specific bacterial production was on average two times higher in the humic rich SW compartment (Table 2, 4, 5, 6), an indication for the bacterial utilisation of humic substances.

In summary, the high concentration of humic substances, the high peroxidase activity, the high abundance of *Actinobacteria* as potential producers of the peroxidases, and the high cell specific bacterial production in the SW compartment, give strong indications for the utilisation of other substrates, (such as humic substances), than those produced through primary production. Beside the internal processes in the SW compartment, an external influence from the catchment area affecting the high activity of peroxidases in the compartment might be possible. Burkert et al. 2004 showed the impact of the catchment area on the water chemistry of Lake Fuchskuhle. In the SW compartment a high groundwater inflow coincided with a high input of DOC, an indication for a DOC transport from the catchment area into the Lake. As in soil, extracellular enzymes may bind reversibly to humic acids by a cation exchange mechanism (Ladd & Butler 1975, Pflug 1980, Serban & Nissenbaum 1986, Grieser & Ziechmann 1988), those enzyme - humic acids complexes might be transported from the catchment area into Lake Fuchskuhle (Wetzel 1991), thus explaining the higher detection rates of peroxidases in the humic rich SW compartment. In the catchment area of Lake Fuchskuhle, however, no peroxidase and laccase activity could be detected with

the ABTS assay, due to spectrophotometrically limitations of the measurements in the presence of high concentrations of humic substances. Further investigations using molecular genetic techniques which base on PCR amplification of peroxidase genes or aromatic oxygenase genes seem to be suitable to detect and quantify aromatic catabolic pathways (Broda et al. 1995, Chambers et al. 1999, Brzostowicz et al. 2003, Baldwin et al. 2003)

The hypothesis of the external impact of extracellular peroxidases is supported by the occurrence of white-rot fungi as *Trametes versicolor*, *Fomes* sp., *Trichaptum* sp. *Stereum* sp. in the catchment area of Lake Große Fuchskuhle; organisms that are known to potentially produce extracellular ligninolytic enzymes (Heinzkill 1995, Jönsson et al. 1998).

Whether internal, and, or external processes are responsible for the high extracellular peroxidase activity in the humic rich compartment of Lake Große Fuchskuhle remains here as an open question. Therefore, intensive studies concerning the role of aquatic *Actinobacteria*, and studies on transport mechanisms of organic material and organic complexes from the catchment area into lakes, are required to improve our knowledge about the origin of extracellular peroxidases in aquatic environments.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank M. Degebrodt for measurements of leucine and glucose incorporation and J. Dalchow for measurements of the Chlorophyll a concentration. We wish to express our gratitude to R. Koschel and H.-P. Grossart for valuable comments on the manuscript, and S. Poynton for linguistic revision. The authors wish to thank the Deutsche Forschungsgemeinschaft for supporting this study (DFG-project Ba 1288/5-2).

LITERATURE CITED

- Babenzien D, Babenzien C (1985) Microbial activities at Lake Stechlin. In: Casper J (ed) Lake Stechlin - A temperate oligotrophic lake. Monogr. Biol Vol 58. Cr. Junk b.v. Publ, Dordrecht-Boston-Lancaster
- Baldwin B, Nakatsu C, Nies L (2003) Detection and enumeration of aromatic oxygenase genes by multiplex and real-time PCR. Appl Environ Microbiol 69:3350-3358
- Becker R (1974) Die Bestimmung des Wasserstoffperoxids und der Peroxidase mit 2,2´-Azino-di- [3-äthyl-benzthiazolin-sulfonsäure-(6)]. PhD thesis, Justus Liebig-University, Gießen

- Bittl T (1999) Bakterieller Stoffumsatz und mikrobielles Nahrungsnetz im Pelagial eines Moorsees (Experimentalgewässer Große Fuchskuhle). PhD thesis, Humboldt University, Berlin
- Bittl T, Babenzien D (1996) Microbial activities in an artificially divided acidic lake. Arch Hydrobiol Advanc Limnol 48:113-121
- Broda P, Birch P, Brooks P, Sims P (1995) PCR-mediated analysis of lignocellulolytic gene transcription by *Phanerochaete chrysosporium*: substrate-dependent differential expression within gene families. Appl Environ Microbiol 61:2358-2364
- Brzostowicz P, Walters D, Thomas S, Nagarajan V, Rouviere P (2003) mRNA differential display in a microbial enrichment culture: simultaneous identification of three cyclohexanone monooxygenases from three species. Appl Environ Microbiol 69:334-342
- Burkert U, Warnecke F, Babenzien D, Pernthaler J (2003) Members of a readily enriched β–proteobacterial clade are common in surface waters of a humic lake. Appl Environ Microbiol 69:6550-6559
- Burkert U, Ginzel G, Babenzien D, Koschel R (2004) The hydrogeology of a catchment area and an artificially divided dystrophic lake - consequences for the limnology of Lake Fuchskuhle. Biogeochemistry 71: 225-246
- Casper P, Chan O, Furtado A, Adams D (2003) Methane in an acidic bog lake: The influence of peat in the catchment on the biogeochemistry of methane. Aquat Sci 65:36-46
- Chambers S, Burke R, Brooks P, Cairney J (1999) Molecular and biochemical evidence for manganese-dependent peroxidase activity in *Tylospora fibrillosa*. Mycological Research 103: 1098-1102
- Chan O, Wolf M, Hepperle D, Casper P (2002) Methanogenic archaeal community in the sediment of an artificially partitioned acidic bog lake. FEMS 42:119-129
- Childs R, Bardsley W (1975) The steady-state kinetics of peroxidase with 2,2´-azino-di-(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid) as chromogen. Biochem J 145:93-103
- Dec J, Bollag J (1994) Dehalogenation of chlorinated phenols by oxidative coupling. Environ Sci Technol 28:484
- De Haan H (1976) Evidence for the induction of catechol-1,2-oxygenase by fulvic acid. Plant Soil 45 :129-136

- Gold M, Wariishi H, Valli K (1989) Extracellular peroxidases involved in lignin degradation by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. ACS Symp. Scr. 389:127-140
- Grieser K, Ziechmann W (1988) Wechselwirkungen zwischen Huminstoffen und Peroxidase. Mitteilgn Dtsch Bodenkundl Gesellsch 56:153-159
- Hatakka A (2001) Biodegradation of lignin. In: Hofrichter M and Steinbuechel A (ed) Biopolymers. Wiley-VCH pp. 129
- Hehmann A, Krienitz L (1996) The succession and vertical distribution of phytoplankton of the experimental divided naturally acidic lake "Große Fuchskuhle" (Brandenburg, Germany). Limnologica 26:301-309
- Hehmann A, Krienitz L, Koschel R (2001) Long-term phytoplankton changes in an artificially divided, top-down manipulated humic lake. Hydrobiologia 448:83-96
- Heinzkill M (1995) Isolierung und Charakterisierung von Laccasen und Peroxidasen aus Basidiomyceten der Ordnung *Agaricales*. PhD thesis, Kaiserslautern University, Kaiserslautern
- Huber S, Frimmel F (1991) Flow injection analysis of organic and inorganic carbon in the low-ppb Range. Anal Chem 63: 2122-2130
- Huber S, Balz A, Frimmel F (1994) Characterization and quantification of marine dissolved organic carbon with a direct chromatographic method. Environ Sci Technol 28: 1194-1197
- Huber S, Frimmel F (1996) Gelchromatographie mit Kohlenstoffdetektion (LC-OCD): Ein rasches und aussagekräftiges Verfahren zur Charakterisierung hydrophiler organischer Wasserinhaltsstoffe. Vom Wasser 86:277-290
- Jönsson L, Palmqvist E, Nilyebrant N, Hahn-Hägerdal B (1998) Detoxification of wood hydrolysates with laccase and peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. Appl Microbiol Biotechnol 49:691-697
- Kasprzak P, Koschel R, Steiner U, Metzdorf K (1988) "Enclosure" – Experiments in Food-web Manipulation: First Step – Dividing the experimental lake. Limnologica 19:161-165
- Kasprzak P (1993) The use of an artificially divided bog lake in food web studies. Verh Internat Verein Limnol 25:652-656
- Kimm J, Fernandes E, Bollag J (1997) Enzymatic coupling of the herbicide bentazon with humus monomers and characterization of reaction products. Environ Sci Technol 31:2392-2398

- Kirchman D, Knees E, Hodson R (1985) Leucine incorporation and its potential as a measure of protein-synthesis by bacteria in natural aquatic systems. Appl Environ Microbiol 49:599-607
- Koschel R (1995) Manipulation of whole lake ecosystems and long term limnological observations of the Brandenburg-Mecklenburg lake district. Int Rev Ges Hydrobiol 80:1-12
- Ladd J, Butler J (1975) Humus-enzyme systems and synthetic organic polymer-enzyme analogs. In: Paul E, McLaren A (ed) Soil Biochemistry. Dekker, New York. pp. 143
- Melo N, Cabral J, Pedro Fevereiro M (1995) Extracellular peroxidase from cell suspension cultures of *Vaccinium myrtillus*. Purification and characterization of two cationic enzymes. Plant Sci 106:177-184
- Mercer D, Iqbal M, Miller P, McCarthy A (1996) Screening *Actinomycetes* for extracellular peroxidase activity. Appl Environ Microbiol 62:2186-2190
- Münster U, Heikkinen E, Salonen K, De Haan H (1998) Tracing of peroxidase activity in humic lake water. Acta hydrochim hydrobiol 26:158-166
- Münster U, Heikkinen E, Likolammi M, Järvinen M, Salonen K, De Haan H (1999) Utilisation of polymeric and monomeric aromatic and amino acid carbon in a humic boreal forest lake. Arch Hydrobiol Spec Issues Advanc Limnol 54: 105-134
- Pflug W (1980) Effect of humic acids on the activity of two peroxidases. Z Plfanzenernaehr Bodenkd 143:432-440
- Piccolo A, Cozzolino A, Conte P, Spaccini R (2000) Polymerization of humic substances by an enzyme-catalyzed oxidative coupling. Naturwissenschaften 87: 391-394
- Porter K, Feig Y (1980) The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. Limnol Oceanogr 25:943-948
- Ramachandra M, Crawford D, Hertel G (1987) Extracellular enzyme activities during lignocellulose degradation by *Streptomyces* spp.: a comparative study of wild type and genetically manipulated strains. Appl Environ Microbiol 53**:**2754-2760
- Ramachandra M, Crawford D, Hertel G (1988) Characterization of an extracellular lignin peroxidase of the lignocellulolytic actinomycete *Streptomyces viridosporus*. Appl Environ Microbiol 54**:**3057-3063
- Saccomandi F, Conte P, Piccolo A (1998) Use of oxidase enzyme to increase polymerization of soil organic matter. Fresenius Environ Bull 7:537-543

- Sachse A, Babenzien D, Ginzel G, Gelbrecht J, Steinberg C (2001) Characterization of dissolved organic carbon (DOC) in a dystrophic lake and an adjacent fen. Biogeochemistry 54:279-296
- Serban A, Nissenbaum A (1986) Humic acid association with peroxidase and catalase. Soil Biol Biochem 18: 41- 44
- Simek K, Babenzien D, Bittl T, Koschel R, Macek M, Nedoma J, Vrba J (1998) Microbial food webs in an artificially divided acidic bog lake. Intern. Rev. Hydrobiol. 83:3-18
- Simmons K, Minard R, Bollag J (2000) Oxidative co-oligomerization of guaiacol and 4-chloroaniline. Environ Sci Technol 23:115-120
- Sinsabaugh R and A Linkins (1990) Enzymic and chemical analysis of particulate organic matter from a boreal river. Freshwater Biology 23:301-309
- Sinsabaugh R, Weiland T and A Linkins (1992) Enzymatic and molecular analysis of microbial communities associated with lotic particulate organic matter. Freshwater Biology 28:393-404
- Strickland J, Parsons T (1968) A practical handbook of seawater analysis. Bull Fish Bd Can 167:311
- Succow M, Jeschke L (1986) Moore in der Landschaft. Urania Verlag Leipzig, Jena, Berlin
- Tien M, Kirk T, Bull C, Fee J (1986) Steady-state and transient-state kinetic studies on the oxidation of 3,4-dimethoxybenzyl alcohol catalyzed by the ligninase of *Phanerocheate chrysosporium*. J Biol Chem 261:1687-93
- Wright R, Hobbie J (1966) Use of glucose and acetate by bacteria and algae in aquatic ecosystems. Ecology 47:447-464
- Wolfenden B, Willson R (1982) Radical-cations as reference chromogens in kinetic studies of one-electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of 2,2´-azinobis-(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonate). J Chem Soc Perkin Trans II:805-812
- Yee D, Jahng D, Wood T (1996) Enhanced expression and hydrogen peroxide dependence of lignin peroxidase from *Streptomyces viridosporus* T7A. Biotechnol Prog 12:40-46

Danksagung

- Ohne die Unterstützung und Hilfe vieler Kollegen wäre diese Arbeit kaum zu Stande gekommen. Ich bedanke mich für die Hilfe bei allen, die hier namentlich nicht aufgeführt sind.

- Mein Dank gilt zuerst meinem Betreuer Dr. Hans-Dietrich Babenzien für die Themenstellung, Unterstützung bei Problemen und für die Ausdauer und Geduld bei der Erstellung der Dissertation.

- Meinen Dank möchte ich der Arbeitsgruppe von Prof. R. Amann am MPI für Marine Mikrobiologie in Bremen für die angenehme Arbeitsatmosphäre und für die Nutzung innovativer Untersuchungsmöglichkeiten aussprechen. Insbesondere danke ich Dr. Pernthaler, Dr. Falk Warnecke, Claudia Bergin und Silke Wetzel.

- Herrn Ginzel danke ich für die sehr gute Zusammenarbeit hinsichtlich der hydrologischen Untersuchungen an der Großen Fuchskuhle. Gerne erinnere ich mich an die interessanten Diskussionen. Dr. Präcker danke ich für die geologischen Untersuchungen des Torfkörpers im Einzugsgebiet der Großen Fuchskuhle und für die Erstellung des Gutachtens.

- Mein Dank gilt den Mitarbeitern des Chemielabors in Neuglobsow Elke Mach, Johanna Dalchow und Uta Mallok für die Begleitung bei den Probenahmen als auch für die Durchführung der Phosphor-, Stickstoff - und Kohlenstoffmessungen. Besonders danke ich Dr. Elke Zwirnmann für die LC-OCD Messungen, die Unterstützung bei der Auswertung der Messungen und für den intensiven Gedankenaustausch.

- Vielen Dank an Dr. Anke Sachse für die umfangreiche Einführung in die LC-OCD Messungen.

- Bei den Mitarbeitern des Leibniz-Institutes für Gewässerökologie und Binnenfischerei, Abteilung Limnologie geschichteter Seen in Neuglobsow bedanke ich mich für die gute Arbeitsatmosphäre. Gedankt sei allen Kollegen, die zur gleichen Zeit die Höhen und Tiefen einer Doktorarbeit durchlebten. Michael Sachtleben und Roman Degebrodt sei gedankt für die Hilfen bei der Probenahme an der Großen Fuchskuhle und für sonstige technische Unterstützungen.

- Bei Herrn Prof. Dr. Christian Steinberg und Herrn Prof. Dr. Rainer Koschel bedanke ich mich dafür, dass ich für Erstellung dieser Arbeit die Räumlichkeiten, Geräte und Materialien des Institutes für Gewässerökologie und Binnenfischerei nutzen durfte.

- Mein besonderer Dank gilt Monika Degebrodt für die Durchführung der radioaktiven Messungen und für die große Hilfe bei Laborarbeiten.

- Bei Dr. Andrea Paul bedanke ich mich für die interessanten Diskussionen über die Huminstoffforschung.

- Herrn Prof. Dr. Uwe Münster danke ich für den Aufenthalt in der Forschungsstation Lammi in Finnland, für die Einarbeitung in die Enzymmessungen und für die vielen interessanten Diskussionen.

- Bedanken möchte ich mich bei Frau Sievert und Frau Hentschel von der Bibliothek des Leibniz-Insitutes für Gewässerökologie und Binnenfischerei für die zügige und korrekte Bearbeitung meiner Literaturanfragen.

- Hiermit bedanke ich mich bei der DFG für die Finanzierung des Projektes und für die Möglichkeit zur Erstellung der Doktorarbeit.

- Meiner Familie danke ich für die Unterstützung und für die interessanten Diskussionen. Vielen Dank lieber Vati für die wertvollen Anmerkungen in angenehmer Arbeitszimmeratmosphäre. Mein herzlicher Dank gilt meinem Bruder Jens für die Unterstützung beim Druck dieser Arbeit.

- Meinen beiden Männern danke ich für die Geduld während der Promotionszeit und für die netten, liebevollen Ablenkungen in zu arbeitsintensiven Stunden.

Die vorliegende Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgesellschaft gefördert (AZ Ba 1288/5-1 und AZ Ba 1288/5-2).

Lebenslauf

03.08.1972	geboren in Rostock als Tochter von Brigitte (geb. Dahlenburg) und Dieter Burkert
1979 – 1991	Polytechnische Oberschule und Gymnasium in Rostock
1991 – 1994	kaufmännische Ausbildung zur Bankkauffrau, Stadtsparkasse Köln
01/1994 – 09/1994	Angestellte bei der Sparkasse Leverkusen
10/1994 – 11/1998	Studium der Biologie an den Universitäten Rostock und Uppsala (Schweden) – abgeschlossen mit Master of Science
1995-1996	wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Ostseeforschung Warnemünde
12/1998 – 02/1999	wissenschaftliche Mitarbeiterin am Limnologischen Institut der Universität Uppsala
05/1999 – 09/2002	Doktorandin am Leibniz-Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei Berlin, Abteilung Limnologie geschichteter Seen Berlin
10/2002	wissenschaftliche Mitarbeiterin am MPI für Marine Mikrobiologie Bremen
11/2002 – 09/2004	Elternzeit
seit 10/2004	Privatdozentin
seit 07/2005	wissenschaftliche Mitarbeiterin am Max-Planck-Institut für Marine Mikrobiologie

Publikationsliste

- Hyenstrand P, Burkert U, Pettersson A, Blomqvist P (2000) Competition between the green alga *Scenedesmus* and the cyanobacterium *Synechococcus* under different modes of inorganic nitrogen supply. Hydrobiologia 435(1):91-98

- Burkert U, Hyenstrand P, Drakare S, Blomqvist P (2001) Effects of the mixotrophic flagellate *Ochromonas* sp. on colony formation in *Microcystis aeruginosa*. Aquatic Ecology 35:9-17

- Steinberg C, Burkert U (2002) Gelöste Huminstoffe – Teil IV: Energie für das aquatische Nahrungsnetz ohne Einwirkung von Licht. Wasser & Boden. 54:36-42

- Burkert U, Warnecke F, Babenzien D, Zwirnmann E, Pernthaler J (2003) Members of a readily enriched β-proteobacterial clade are common in the surface of a humic lake. Appl Environ Microbiol 69:6550-6559

- Burkert U, Ginzel G, Babenzien D, Koschel R (2004) The hydrogeology of a catchment area and an artificially divided dystrophic lake – consequences for the limnology of Lake Fuchskuhle. Biogeochemistry 71:225-246