



seit 1558

Friedrich-Schiller-Universität Jena

Chemisch-Geowissenschaftliche Fakultät
Institut für Anorganische und Analytische Chemie

**Analyse der Zusammensetzung der mikrobiellen Bodengemeinschaft
eines Grasland-Biodiversitäts-Experiments basierend auf isoprenoiden
Chinonverbindungen als Biomarker**

**Masterarbeit zur Erlangung des akademischen Grades
Master of Science Umweltchemie**

vorgelegt von

Stefanie Albrecht

Geboren am 30.11.1989

Matrikel 121705

Jena, 01.03.2017

Erstgutachter: Professor Dr. Georg Pohnert

Zweitgutachter: apl. Professor Dr. Gerd Gleixner

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Motivation.....	1
1.2 Zielstellung	3
1.3 Grundlagen respiratorische Chinone	4
1.3.1 Vorkommen	4
1.3.2 Extraktion, Trennung und Detektion	8
2 Ergebnisse und Diskussion	10
2.1 Methodenentwicklung und Validierung	10
2.1.1 Linearer Arbeitsbereich	11
2.1.2 Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze.....	12
2.2 Stabilität der Peakflächen	13
2.3 Extraktionsmethode	14
2.4 Chromatographische Messungen und Massenspektrometrie.....	15
2.4.1 Bestimmung von Fragmentmustern und Retentionszeiten	15
2.4.2 Blindwertmessungen.....	18
2.4.3 Extraktionseffizienz	18
2.5 Bewertung der respiratorischen Chinone als Biomarker zur Bestimmung der mikrobiellen Gemeinschaft.....	18
2.5.1 Variabilität der Chinongehalte.....	18
2.5.2 Bestimmung von relativen Chinonanteilen.....	20
2.5.3 Varianz der Chionkompositionen	22
2.5.4 Beziehung zwischen Umweltparametern und der Chinonkomposition.....	24

2.5.5	Vergleich der Ergebnisse mit Phospholipid-Fettsäure-Markern	26
3	Zusammenfassung und Ausblick	30
4	Material und Methoden.....	33
4.1	Standardverbindungen	33
4.2	Testmessungen.....	33
4.3	Bodenprobennahme und Aufarbeitung.....	34
4.4	Analytische Messungen	36
4.4.1	Grundlagen HPLC	36
4.4.2	Chromatographische Trennung.....	36
4.4.3	Grundlagen MS.....	37
4.4.4	Massenspektrometrische Detektion	38
4.5	Versuche zur Methodvalidierung.....	39
4.5.1	Kalibrationskenndaten	39
4.5.2	Selektivität und Stabilität.....	39
4.5.3	Blindwertmessungen.....	39
4.5.4	Extraktionseffizienz	40
4.6	Statistische Auswertung.....	40
5	Literaturverzeichnis	44
6	Anhang.....	49

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformeln ausgewählter natürlicher isoprenoider Chinone	5
Abbildung 2: Zusammensetzung der Chinone in verschiedenen Umweltproben.....	6
Abbildung 3: Basispeak-Chromatogramm eines Standardgemisches	11
Abbildung 4: lineare Regression der Standardverbindungen	12
Abbildung 5: Abhängigkeit der Peakflächen.....	14
Abbildung 6: MS/MS-Spektren zur Bestimmung der Chinone.....	16
Abbildung 7: Mittel der Chinon-Profile mit Standardabweichung	21
Abbildung 8: Chinon-Profile verschiedener Bodenproben	21
Abbildung 9: Varianz der Proben in Abhängigkeit der Chinonzusammensetzung	23
Abbildung 10: Zusammenhang zwischen der Variation in der Chinonzusammensetzung und ausgewählten Umweltparametern.....	26
Abbildung 11: Hauptkomponentenanalyse der Unterschiede in den Proben anhand ihrer PLFA- und Chinonzusammensetzung	28
Abbildung 12: Übersicht des Untersuchungsfeldes „Jena Experiment“ in der Saaleaue, Jena	34
Abbildung 13: Probennahme mit Vorstecher	34

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verteilung der Chinone in verschiedenen phylogenetischen Gruppen der Bakterien.....	6
Tabelle 2: Respiratorische Chinone der Gram-negativen Bakterien, Gram-positiven Bakterien und Pilzen.....	7
Tabelle 3: Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen.....	12
Tabelle 4: Stabilität der Retentionszeiten und Peakflächen.....	13
Tabelle 5: Stabilität der Retentionszeiten der Chinonverbindungen mit Standardabweichung s.....	17
Tabelle 6: Chinongehalte der untersuchten Proben.....	19
Tabelle 7: Zusammensetzung des Bodengefüges der untersuchten Proben.....	22
Tabelle 8: Umweltparameter und Daten der Redundanzanalyse zur Erklärung der Unterschiede der Chinonzusammensetzung zwischen den Proben.....	25
Tabelle 9: Einteilung der Phospholipid-Fettsäure-Marker und Chinonmarker in phylogenetische Gruppen.....	27
Tabelle 10: Übersicht der HPLC-Methodenparameter.....	37

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen

APCI	chemische Ionisierung unter Atmosphärendruck, <i>atmospheric pressure chemical ionization</i>
BG	Bestimmungsgrenze
CID	Kollisions-induzierte Dissoziation, <i>collision induced dissoziation</i>
DMK	Demethylnachinon
DOC	gelöster organischer Kohlenstoff, <i>dissolved organic carbon</i>
EG	Erfassungsgrenze
ESI	Elektronen-Spray-Ionisierung
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatografie, <i>high performance liquid chromatography</i>
K1	Vitamin K1, Phyllochinon
MK	Menachinon
MMK	Methylmenachinon
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
N	Stickstoff
NG	Nachweisgrenze
NLFA	Neutrallipid-Fettsäuren
PAD	Photodiodenarray-Detektor
PQ	Plastochinon
PLFA	Phospholipid-Fettsäuren
QPM	Chinon-Profil-Methode, <i>quinone profile method</i>
RhQ	Rhodochinon
RP	Umkehrphasen-Chromatographie, <i>reversed phase</i>
RQ	Chinone der Atmungskette, <i>respiratory quinones</i>
SOC	organischer Bodenkohlenstoff, <i>soil organic carbon</i>
SPE	Festphasenextraktion, <i>solid phase extraktion</i>
SRM	Einzelreaktionsmodus, <i>single reaction mode</i>
UQ	Ubichinon

Symbole

a	Ordinatenabschnitt der Kalibriergeraden
α	Signifikanzniveau
b	Steigung der Kalibriergeraden
f	Anzahl der Freiheitsgrade
F	Verhältnis zweier Variablen

\hat{F}	Prüfwert des Mandel-Tests
k	relativer Fehler, $k = 3$ entspricht einem 33%-igen relativen Fehler
μ	Arithmetisches Mittel
m	Anzahl der Messungen an der Analysenprobe
n	Anzahl der Kalibrierproben
Q_x	Summe der Abweichungsquadrate von x bei der Kalibrierung
r	Korrelationskoeffizient
R^2	Bestimmtheitsmaß
s	Standardabweichung einer Probe
s_b	Standardabweichung des Anstiegs der Kalibriergeraden
s_a	Standardabweichung des Achsenabschnittes der Kalibriergeraden
s_{x0}	Verfahrensstandardabweichung
s_{y1}/s_{y2}	Reststandardabweichung linearer/quadratischer Ordnung
s_{yx}	Reststandardabweichung der Messwerte der Kalibrierung
$t_{f,\alpha}$	Quantil der t-Verteilung
x_i	x -Wert einer Wiederholbestimmung, Gehaltsgröße
\bar{x}	arithmetischer Mittelwert der Gehalt aller Proben
y_i	Messwert der Kalibrierprobe
\hat{y}	Geschätzter Funktionswert bei der Kalibrierung

1 Einleitung

1.1 Motivation

Bei der Betrachtung von Stoffkreisläufen bilden Mikroorganismen eine Brücke zwischen Pflanzen und ihrer abiotischen Umgebung. Sie nehmen Stoffe der Pflanzen auf, metabolisieren diese und geben sie wieder an die Umwelt ab. Je nachdem welche chemischen Stoffe und Umweltbedingungen für die Mikroorganismen zur Verfügung stehen wird ihr Wachstum gehemmt oder gefördert. So entstehen lokal unterschiedliche mikrobielle Gemeinschaften. Durch die Kenntnis der Zusammensetzung dieser Gemeinschaften können Rückschlüsse unter anderem auf Boden- oder Wasserqualität und Redox-Zustände gezogen werden. Eine Charakterisierung der Bakterien und Pilze kann mit Hilfe von Biomarkern erfolgen, welche die mikrobielle Biomasse, taxonomische Unterschiede oder funktionelle Aktivitäten beschreiben können [1].

Die Beschaffenheit der mikrobiellen Gemeinschaft kann von abiotischen und biotischen Faktoren beeinflusst werden, wie zum Beispiel von der Bodenart und Bodenbeschaffenheit, dem Boden-pH-Wert, aeroben und anaeroben Bedingungen, Düngung und Pestizid-Einsatz, der geografischen Lage, den vorherrschenden Klimabedingungen (Temperatur, Sonneneinstrahlung, Niederschlag), den Pflanzenspezies und Pflanzenentwicklungsstadien, Tieren oder verschiedenen Pflanzen-Mikroorganismen-Interaktionen [2–4].

So nimmt zum Beispiel die Diversität der Bakteriengemeinschaft mit dem pH-Wert ab [4]. Weiterhin ist die mikrobielle Gemeinschaft im Gegensatz zu Pflanzen- und Tierdiversität weniger von der Temperatur und dem Breitengrad abhängig, sondern vielmehr von dem umgebenden Ökosystem, was meist auf die unterschiedlichen pH-Werte zurückgeführt werden kann [5]. Diese pH-Abhängigkeit trifft besonders auf die Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft zu, wohingegen die der Pilz-Gemeinschaft eher vom Nährstoffangebot beeinflusst wird [6–8].

Ein limitierender Faktor des mikrobiellen Wachstums ist die Menge des vorhandenen Kohlenstoffs bzw. des organischen Materials [2]. Es wird vermutet, dass jede Pflanzenspezies eine bestimmte mikrobielle Gemeinschaft indirekt forciert. Dabei spielen Ausscheidungen chemischer Verbindungen über die Wurzeln eine wichtige Rolle, welche der mikrobiellen Gemeinschaft Nährstoffe zur Verfügung stellen können oder durch pathogene Wirkungen spezifische Bakterien unterdrücken. [3]

Zudem konnten Forschungen zeigen, dass die Pflanzendiversität die Zusammensetzung und Funktion der mikrobiellen Gemeinschaft beeinflusst [2, 9, 10].

Bestimmte chemische Merkmale können Verwandtschaften von Prokaryoten über klassische Merkmale, wie Morphologie und Physiologie, hinaus erklären. Zu diesen chemotaxonomischen Charakteristika gehören [7]:

- DNA-Eigenschaften, wie Genomgröße, DNA-Sequenz, DNA-DNA-Hybridisierung
- Charakteristische Aminosäurezusammensetzung
- Zusammensetzung der Membranlipide, wie Fettsäuren, Glycolipide, Ergosterol, Hopanoide, und Isoprenoidalkohole
- Art der Cytochrome
- Chinone wie Ubi-, Mena-, Rhodo- und Plastochinone
- Vorkommen von Carotinoiden und Bacteriochlorophyllen
- Zusammensetzung von Polyaminen.

Die Betrachtung des Einflusses der Pflanzendiversität erfolgt seit dem Jahre 2002 im Rahmen des „Jena Experiment“. Das „Jena Experiment“ ist ein Langzeit-Grasland-Biodiversitäts-Experiment, welches in der Saaleaue bei Jena lokalisiert ist. Hier wurden 82 Versuchsfelder zur Bestimmung des Einflusses der Pflanzenvielfalt auf Elementkreisläufe, die Biodiversität, die Biomasseproduktion, das Pflanzenwachstum und die Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft angelegt. In Teilversuchen werden Wechselwirkungen zwischen Pflanzen und Bodenfauna sowie Bodenmikroorganismen, in Abhängigkeit der funktionellen Gruppen der Pflanzen untersucht. Insgesamt wurden 60 Pflanzenarten ausgewählt und auf Teilfeldern kultiviert. Die Diversität auf den Teilflächen variiert von 1 bis 60 Pflanzenarten und von 1 bis 4 funktionellen Gruppen, dabei handelt es sich um Gräser, Leguminosen, kleine und große Kräuter (siehe auch 4.3). [11, 12]

Einen Teil der Forschungsarbeit übernimmt die Arbeitsgruppe „molekulare Biogeochemie“ des Max-Planck-Institutes für Biogeochemie, Jena. Hier werden die Zusammensetzung und die Änderungen der mikrobiellen Gemeinschaftsstruktur bereits mit verschiedenen Parametern, wie zum Beispiel gelöster organischer Kohlenstoff (DOC), Bodenfeuchte, pH-Wert, organischer Bodenkohlenstoff (SOC), Stickstoffgehalt und Biomarkern, wie zum Beispiel Neutrallipid- und Phospholipid-Fettsäuren

(NLFA/PLFA), n-Alkanen oder DNA/RNA untersucht. Im Gesamten betrachtet sollen die verschiedenen Analysen zu einem besseren Verständnis der biologischen bzw. mikrobiologischen Prozesse zwischen Pflanzen und Bodenlebewesen führen, sowie die Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft genauer beschreiben.

Um ein besseres Verständnis der mikrobiellen Prozesse im Boden zu erhalten, können neue Biomarker, wie die respiratorischen Chinonen (RQ, *respiratory quinones*), etabliert werden. Diese sollen bestehende Marker nicht ersetzen sondern vielmehr zusätzliche Informationen liefern, welche mit bestehenden Ergebnissen verglichen werden können und diese entweder bestätigen oder weiterführende Erkenntnisse liefern. Von Vorteil für die Nutzung von Chinonverbindungen als Biomarker sind die Prädominanz einer chinonhomologen Verbindung in einer mikrobiellen Spezies und der direkte Zusammenhang zwischen mikrobieller Taxonomie und den verschiedenen Chinontypen [13]. Zudem variiert in einer einzelnen Spezies nur die Kettenlänge der Isoprenseitenkette, nicht aber der dominante Chinontyp [13]. Mit der RQ-Methode ist eine direkte chemische Analyse der mikrobiellen Lipide aus Umweltproben möglich. Dadurch sind, vor allem im Vergleich zu Kultivierungsmethoden oder Nukleinsäure-Bestimmungen, die Ergebnisse der RQ-Methode vertrauenswürdiger [13].

1.2 Zielstellung

Ziel dieser Arbeit ist die Bestimmung der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft und die Untersuchung von Unterschieden zwischen verschiedenen Bodenproben. Als Untersuchungsumfeld dient das Grasland-Biodiversitäts-Projekt „Jena Experiment“. Die Durchführung der Arbeit erfolgt am Max-Planck-Institut für Biogeochemie in Jena in der Arbeitsgruppe „molekulare Biogeochemie“. Hier werden schon seit mehreren Jahren Veränderungen der mikrobiellen Gemeinschaft bei unterschiedlichem Pflanzenbewuchs untersucht. Der bisherige Fokus lag dabei auf der Verwendung von Neutrallipid-Fettsäuren (*neutral lipid fatty acids*, NLFA), Phospholipid-Fettsäuren (*phospho lipid fatty acids*, PLFA), n-Alkanen und DNS-Sequenzierung als Biomarker. Mit dieser Arbeit soll untersucht werden, ob eine Erweiterung des Biomarker-Pools um respiratorische Chinone praktikabel und sinnvoll ist. Da es sich hierbei um Biomarker handelt, welche bisher noch nicht in der Arbeitsgruppe etabliert wurden, liegt der Schwerpunkt dieser Masterarbeit in der Entwicklung einer Methode zur Bestimmung der RQs. Begonnen wird mit der Suche von Standards sowie der Untersuchung von Hochleistungs – Flüssigchromatographie

(HPLC) – Messmethoden und massenspektrometrischer Detektionsmethoden mit Chemischer Ionisierung unter Atmosphärendruck (APCI-MS/MS). Darüber hinaus wird eine geeignete Extraktionsmethode für Bodenproben gesucht. Es erfolgt eine Validierung der erstellten Methode über Kalibrationskenndaten. Abschließend werden Bodenproben des „Jena Experiment“ auf ihren RQ-Gehalt und damit auf Unterschiede in der Zusammensetzung ihrer mikrobiellen Gemeinschaften hin untersucht. Diese Ergebnisse können mit den Ergebnissen der PLFA-Marker verglichen werden und gegebenenfalls Gemeinsamkeiten und Unterschiede diskutiert werden.

1.3 Grundlagen respiratorische Chinone

1.3.1 Vorkommen

Chinonverbindungen kommen in Pflanzen, Mikroorganismen und niederen Tieren vor und dienen als Farbstoffe oder physiologische Wirkstoffe. Wichtig ist die Beteiligung am tierischen, pflanzlichen und mikrobiologischen Stoffwechsel. So werden Chinone mit Isoprenseitenketten in Bakterien, Algen, Hefen und Pflanzen bei der Photosynthese oder der Atmung genutzt um Elektronen und Protonen zu übertragen. Lokalisiert sind diese Chinonverbindungen der Atmungskette, auch respiratorische Chinone genannt, in den Zellmembranen der Mitochondrien und des Zytoplasmas. [14–16]

Besonders wichtig für Boden-Bakterien sind die Ubichinone, auch 1-Methyl-2-isoprenyl-3,4-dimethoxyparabenzochinone mit einer Isoprenkette zwischen 1-14 Isopreneinheiten in 2-Position, und die Menachinone bzw. 1-Isoprenyl-2-methylnaphthochinone (siehe Abbildung 1). [15–17]

Der polare Kern der Verbindung überträgt Protonen und Elektronen aus dem Zellinneren in den Zellmembranzwischenraum. Die unpolare Seitenkette hingegen sorgt für die Verankerung des Moleküls in der Lipid-Doppelschicht der Membran und ermöglicht gleichzeitig die Beweglichkeit des Moleküls in der Schicht. [18]

Die Benennung der Chinonverbindungen erfolgt in Ubichinone (UQ), Menachinone (MK), Plastochinone (PQ), Phyllochinone (PhQ), Demethylmenachinone (DMK) bzw. Methylmenachinone (MMK). Die Chinonart wird gefolgt von einem Trennstrich, der Anzahl der Isopreneinheiten der Seitenkette und der Anzahl addierter Wasserstoff-Atome in Klammern. Somit beschreibt zum Beispiel die Abkürzung MK-7(H2) ein Menachinon mit sieben Isopreneinheiten, von den Isopreneinheiten wurde eine Einheit mit zwei Wasserstoffatomen gesättigt.

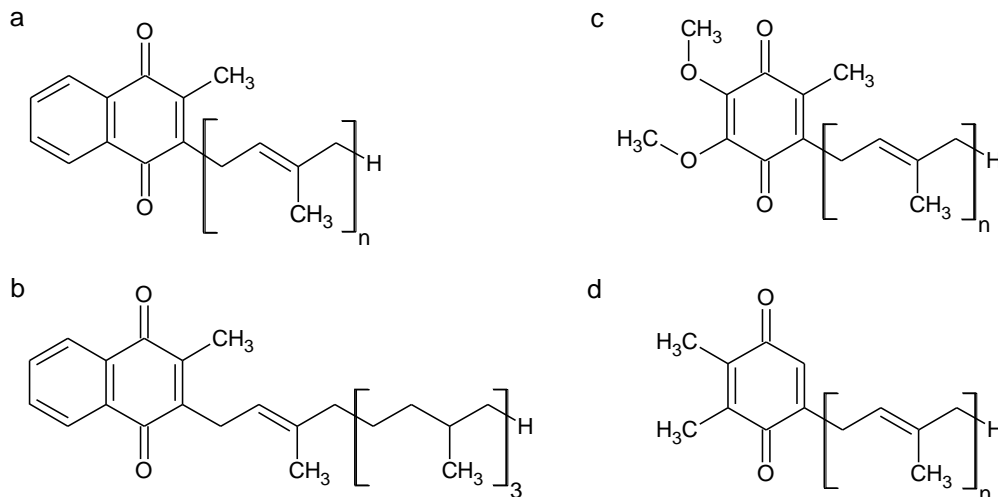


Abbildung 1: Strukturformeln ausgewählter natürlicher isoprenoider Chinone.

(a) Menachinone (MK, MK-n); (b) Phyllochinon (PhQ)/ Vitamin K1 (K1); (c) Ubichinone (UQ, UQ-n); (d) Plastochinone (PQ, PQ-n). Mit n als Anzahl der Isopreneinheiten der Seitenkette. Nach [14].

Von Vorteil für die Anwendung als Biomarker ist die spezifische Bildung bestimmter respiratorischer Chinone in Abhängigkeit von der Bakterienart und den vorherrschenden Umweltbedingungen (vgl. Tabelle 1 und Tabelle 2).

Unter aeroben Wachstumsbedingungen bilden gramnegative Bakterien, wie zum Beispiel Proteobakterien der α -, β - und γ -Gruppen und Eukarioten Ubichinone mit Isoprenketten mit 1 bis 14 Isopreneinheiten. Unter anaeroben Wachstumsbedingungen bilden gramnegative Bakterien, Proteobakterien, Archaeen und andere Bakterien hingegen Menachinone. Weiterhin kommt es bei einigen Organismen zur Bildung von Demethylmenachinonen unter anaeroben Wachstumsbedingungen. [15, 17, 19]

Die Chinonzusammensetzung und somit auch die mikrobielle Gemeinschaft variiert stark zwischen einzelnen Umweltkompartimenten (Abbildung 2) [20]. In aquatischen Kompartimenten, wie Flüssen, Seen, Meeren, sind $\sim 30\%$ Ubichinone, $\sim 50\%$ Plastochinone, $\sim 15\%$ Phyllochinone und $\sim 5\%$ ungesättigte Menachinone vorherrschend. In Flusswasser und Seesedimenten liegt der Gehalt an Plastochinonen nur bei $\sim 40\%$, dafür sind hier $\sim 10\%$ ungesättigte Menachinone und ebenfalls $\sim 5\%$ partiell gesättigte Menachinone enthalten. Im Kompartiment Boden hingegen liegen keine Plasto- und Phyllochinone vor, da diese Verbindungen typisch für Photosynthese treibende Organismen sind und diese nicht im Boden vorhanden sind. Der Ubichinonanteil im Boden ist mit $\sim 30\%$ vergleichbar mit dem Anteil in Wasser- und Sedimentproben, die Anteile an ungesättigten ($\sim 30\%$) und partiell gesättigten ($\sim 40\%$) Menachinonen können deutlich höher sein. [20]

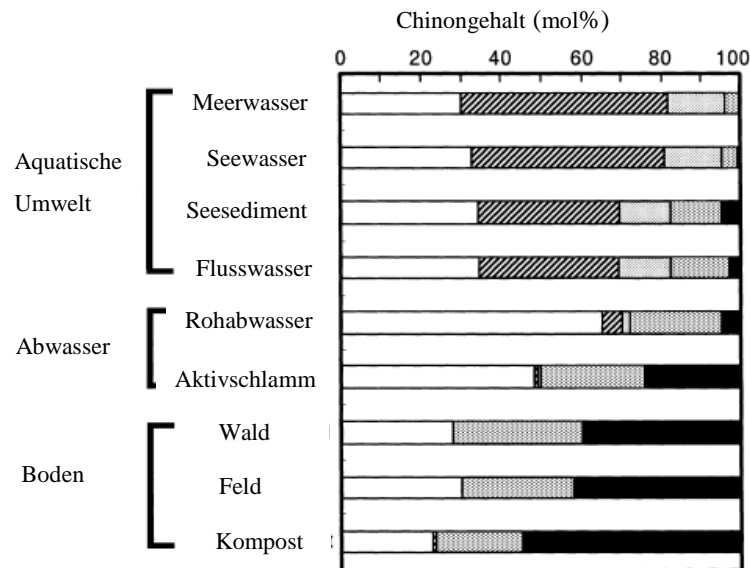


Abbildung 2: Zusammensetzung der Chinone in verschiedenen Umweltproben. Weiß, Ubichinone; grau, Phyllochinone; gestreift, Plastochinone; gepunktet, ungesättigte Menachinone; schwarz, partiell gesättigte Menachinone. Nach [20]

Tabelle 1: Verteilung der Chinone in verschiedenen phylogenetischen Gruppen der Bakterien. Nach [14].

Phylogenetische Gruppe	MTK	MK-n		MK-n(H _x)	PQ + K1	UQ-n			RQ
		n ≤ 8	n ≥ 9			n = 8	n = 9	n = 10	
grüne Bakterien ohne Schwefel	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Thermus-Deinococcus Gruppe	-	++	-	-	-	-	-	-	-
Cytophaga-Flavobacterium	-	++	*	-	-	-	-	-	-
grüne Schwefelbakterien	-	++	-	-	-	-	-	-	-
Planctomycetales	-	++	-	-	-	-	-	-	-
Acidobakterium Gruppe	-	++	-	-	-	-	-	-	-
Gram-positive Bakterien	-	++	*	-	-	-	-	-	-
Actinobakterien	-	*	+	+	-	-	-	-	-
Cyanobakterien	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Proteobakterien									
α Unterklasse	-	-	*	-	-	*	*	+	*
β Unterklasse	-	*	-	-	-	+	-	-	*
γ Unterklasse		*	-		-	+	+	-	-
δ/ε Unterklasse	-	+	-	*	-	-	-	-	-

Abkürzungen und Symbole: Methionachinone (MTK); Menachinone (MK-n); hydrogenierte Menachinone (MK-n(H_x)); Plastochinone (PQ); Phyllochinone (K1); Ubichinone (UQ-n); Rhodochinone (RQ); ++, in allen Spezies vorhanden (>90%); +, in 10-90% der Spezies vorhanden; *, in wenigen Spezies vorhanden (<10%); -, abwesend.

Tabelle 2: Respiratorische Chinone der Gram-negativen Bakterien, Gram-positiven Bakterien und Pilzen. Nach [21].

Chinone	Organismen	
Gram-negative Bakterien	UQ-8	<i>Burkholderia, Comamonas, Thiobacillus, Alcaigenes, Xanthomonas, Acinetobacter, Azotobacter, Aeromonas, Proteus, Enterobacter</i>
	UQ-9	<i>Pseudomonas, Hyphomicrobium, Actinetobacter</i>
	UQ-10	<i>Acidiphilium, Agrobacterium, Ochrobactrum, Sphingomonas</i>
	MK-6	<i>Cytophaga</i>
	MK-7	<i>Cytophaga, Flavobacterium, Flexibacter</i>
	MK-8	<i>Aeromonas, Proteus, Enterobacter</i>
Gram-positive Bakterien	MK-7	<i>Bacillus, Thermoactinomyces</i>
	MK-7(H2)	<i>Brevibacterium</i>
	MK-8	<i>Lactobacillus, Micrococcus</i>
	MK-8(H2)	<i>Brevibacterium, Corynebacterium, Micrococcus, Rhodococcus</i>
	MK-8(H4)	<i>Janibacter, Nocardia, Terrabacter</i>
	MK-9	<i>Arthrobacter, Clavibacter, Curtobacterium, Thermoactinomycetes</i>
	MK-9(H2)	<i>Arthrobacter, Corynebacterium, Gordona, Mycobacterium, Amycolatopsis, Microtetraspora, Streptosporangium</i>
	MK-9(H4)	<i>Actinoplanes, Amycolatopsis, Cellulomonas, Micromonospora, Microtetraspora, Pseudomocardia, Saccharopolyspora, Saccharothrix, Streptosporangium</i>
	MK-9(H6)	<i>Streptomyces, Actinomadura</i>
	MK-10	<i>Rathayibacter</i>
	MK-10(H2)	<i>Glycomyces</i>
	MK-10(H4)	<i>Actionoplanes, Glycomyces, Micromonospora, Nacardiopsis</i>
	MK-10(H6)	<i>Nocardopsis, Thermomonospora</i>
	MK-10(H8)	<i>Thermomonospora, Catenuloplanes</i>
MK-11	<i>Agrococcus, Aureobacterium, Microbacterium</i>	
MK-12	<i>Agrococcus, Agromyces, Aureobacterium, Microbacterium</i>	
Pilze	UQ-9	<i>Arthroderma, Ascobolus, Aspergillus (Chaetosartorya, Eurotium), Ctenomyces, Eladia, Microsporon (Nannizzia), Oidiodendron, Paecilomyces (Byssochlamys), Penicillium (Eupenicillium)</i>
	UQ-10	<i>Aspergillus (Neosartorya), Paecilomyces, Penicillium (Talaromyces)</i>
	UQ-10(H2)	<i>Acremonium, Amauroascus, Arachniotus, Aspergillus (Emericella), Botryoreichum (Chaetomium), Botrytis (Sclerotinia), Chloridium, Chrysosporium (Gymnaosus), Cladorrhinum (Apiosordaria), Dothichiza, Fusarium (Gibbrella, Nacteria), Geomyces (Pseudogymnoascus), Gliocladium, Mycrothecium, Paecilomyces, Penicillium (Talaromyces), Phialophora (Coniochaeta), Poma (Westerdykella), Preussia, Scopulariopsis, Sporothrix, Trichoderma (Hypocrea), Verticillium (Pseudeurotium)</i>
	UQ-10(H4)	<i>Botryotrichum (Chaetomium), Penicillium (Talaromyces)</i>

Der Gehalt der RQs in Zellen liegt bei $0,1 - 0,6 \mu\text{mol} \cdot (\text{g Trockenmasse (gTM)})^{-1}$ für Ubichinone und zwischen $0,02 - 0,1 \mu\text{mol} \cdot \text{gTM}^{-1}$ für Menachinone. Damit sind die Gehalte der Analyten viel geringer (Faktor 1000) als vergleichsweise der Gehalt an Phospholipiden mit $100 - 150 \mu\text{mol} \cdot \text{gTM}^{-1}$. [17]

Verschiedene Untersuchungen von Boden-, Sediment- und Wasserproben geben Hinweise auf die Totalchinongehalte in der Umwelt. So liegt der Totalchinongehalt von Japanischen Sedimenten zwischen $0,01$ und $28 \text{ nmol} \cdot \text{gTM}^{-1}$; in diesen Proben liegt der Total-PLFA-Gehalt hingegen zwischen $1,2$ und $834 \text{ nmol} \cdot \text{gTM}^{-1}$ [22]. Sedimente im Golf von Mexiko wiesen ebenso geringe RQ-Gehalte (UQ: $51 - 57 \text{ pmol} \cdot \text{gTM}^{-1}$; MK: $66 - 437 \text{ pmol} \cdot \text{gTM}^{-1}$) auf [19]. Der Totalchinongehalt eines japanischen Sees lag zwischen 20 und $80 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ [23]. In Bodenproben aus Japan konnten Ubichinon-Konzentrationen von $0,12 \text{ nmol} \cdot \text{gTM}^{-1}$ und Menachinon-Konzentrationen von $0,38 \text{ nmol} \cdot \text{gTM}^{-1}$ nachgewiesen werden [21].

1.3.2 Extraktion, Trennung und Detektion

Im Folgenden sollen kurz mögliche Aufarbeitungsmethoden für Bodenproben zur Bestimmung der RQ genannt werden.

Die Extraktion der RQs aus Umweltproben, wie Bodenproben, sollte aus dem feuchten Probenmaterial durchgeführt werden, da Gefriertrocknung oder Trocknung den Abbau der Chinone zur Folge haben kann. Daher sollten die frischen Proben bis zur Aufarbeitung bei mindestens $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt werden. [21]

Oft genutzte Lösungsmittel für eine Fest-Flüssig-Extraktion von Lipiden aus Bodenproben sind Chloroform und Methanol [21, 24] sowie teilweise Zusatz von Kaliumhydrogenphosphat-Puffer [17, 19]. Dabei handelt es sich um die sogenannte Bligh&Dyer-Methode. Das erhaltene Extrakt kann mittels Festphasenextraktion (*solid phase extraction*, SPE) an Kieselsäure und unter Verwendung von Chloroform, Aceton und Methanol in neutrale Lipide, Glycolipide und polare Lipide fraktioniert werden [17, 19]. Die Chloroformphase (Neutrallipid-Extrakt), enthält die gesuchten Chinonverbindungen [25], kann im Stickstoff-Strom getrocknet und bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert werden.

Für die Trennung und Detektion der Chinonverbindungen bildet die Veröffentlichung von Geyer *et al.* (2004) [17] eine gute Grundlage für diese Arbeit. Dabei wird das enthaltene Neutrallipid-Extrakt mit einem Gemisch aus Methanol und Isopropanol in

einer isokratischen HPLC-Methode getrennt, mit APCI ionisiert und die detektierten Fragmentationen der RQs anhand ihrer spezifischen Masse-zu-Ladungs-Verhältnissen analysiert. Von Vorteil scheinen die einfache Handhabung mit den Lösungsmitteln und die geringe Vorbereitungszeit der Proben zu sein. Im Vergleich dazu führen andere Trennmethode, bei denen neben Methanol auch Isopropylether, tert. Butylether oder 1-Chlorbutan verwendet werden [14, 21, 22, 26] oder eine weitere Auftrennung des Neutrallipid-Extraktes mit SPE und n-Hexan in Menachinon- und Ubichinon-Fraktion [14, 19] zu höheren Schutzmaßnahmen und einem höheren Zeitaufwand.

Analog zu *Geyer et al.* (2004) kann die Ionisierung der Proben chemisch bei Atmosphärendruck (*atmospheric pressure chemical ionisation, APCI*) im positiven Modus (*positive mode*) erfolgen. Die Anlagerung eines Protons führt zu $[M+H]^+$ -Ionen, welche detektiert werden und durch Variation der Kollisionsenergien (CE) in ihre Fragmente gespalten werden können [17]. Der Vorteil der APCI-Ionenquelle ist die schonende Ionisierung der Moleküle [27]. In Verbindung mit einer *Ion Trap* Ionenfalle können Massen sowohl der Mutterionen als auch der Fragmentationen bestimmt werden und so ebenfalls RQs für die keine Standardverbindung zur Verfügung stehen anhand spezifischer Ionen nachgewiesen werden [26].

Eine Detektion der Chinonverbindungen mittels UV-Spektroskopie oder NMR-Spektroskopie ist ebenfalls möglich [15], aber auf Grund der Leistungsfähigkeit der Massenspektrometrie und dem zur Verfügung stehenden HPLC-MS-Gerät werden diese Detektionsmethoden hier nicht berücksichtigt.

2 Ergebnisse und Diskussion

2.1 Methodenentwicklung und Validierung

Als Grundlage der in dieser Arbeit eingeführten Methode zur RQ-Bestimmung diente die Arbeit von *Geyer et al.* [17]. Dabei handelte es sich um eine modifizierte Bligh&Dyer-Extraktion mit Methanol, Chloroform und Phosphat-Puffer (siehe 1.3.2, 4.3). Zur Trennung der RQs im Extrakt wurde eine C18-RP-Silikatsäule sowie ein Isopropanol/Methanol-Gemisch genutzt und die Detektion erfolgte mittels APCI-MS (siehe 1.3.2, 4.4).

Die Löslichkeit der reinen Standardverbindungen mit Isopropanol/Methanol-Gemisch war für MK-4, K1 und UQ-0 gegeben. Auf Grund der Länge der Isopren-Seitenkette von UQ-10 und der daraus resultierenden niedrigen Polarität musste diese Substanz in reinem Isopropanol gelöst werden. Zur Erstellung der Verdünnungsreihe wurden Aliquote der vier Verbindungen in einer Lösung vereint und verschiedene Aliquote mit Isopropanol/Methanol (20:80, v/v) verdünnt. Dabei war die Löslichkeit aller Standards bei Raumtemperatur gegeben. Nach Lagerung bei -20 °C nahm diese jedoch stark ab, sodass die Lösungen vor der Weiterverwendung im Ultraschallbad (10 min) behandelt werden mussten. Eine Empfindlichkeit der Substanzen und eventueller Abbau konnte dabei nicht beobachtet werden.

Mit allen unter 4.4 genannten HPLC-Methoden konnte eine gute Separation der Standardverbindungen und der untersuchten RQs erreicht werden. Ein Chromatogramm eines Laufes mit den Parametern des Versuches 5 stellt dies beispielhaft dar (Abbildung 3). Die kurzkettigen Chinone (UQ-0, MK-4 und K1) eluieren in den ersten 4 Minuten des HPLC-Laufes, wohingegen das langkettige UQ-10 eine Retentionszeit von 16 Minuten aufweist. Die Intensitäten der Chinone MK-4 und K1 ist deutlich höher als die Intensitäten von UQ-0 und UQ-10. Ursache hierfür ist eine unterschiedliche Empfindlichkeit der Methode gegenüber den Verbindungen.

Die Länge des Laufes konnte durch Änderung der Laufmittelzusammensetzung in Kombination mit einem Gradientenprogramms in Versuch 3 und 4 verkürzt werden. Dies wird in dieser Arbeit jedoch zunächst nicht angestrebt, da Realproben weitere isoprenoide Chinone enthalten, von denen die genauen Retentionszeiten zunächst unbekannt waren und die Möglichkeit bestand, dass es zu Peaküberlappungen kommen könnte. Prinzipiell war eine Überlappung in dieser Arbeit weniger wichtig, da eine gezielte Suche nach spezifischen Massen sowie die Isolierung dieser Massen mit

anschließender Fragmentierung durchgeführt wurde. Jedoch wird sowohl die Auflösung als auch die Auswertbarkeit des Chromatogramms und der Spektren durch weitestgehende Peaktrennung verbessert, da die Aufnahmezeit (*scans/s*) pro Masse erhöht wird.

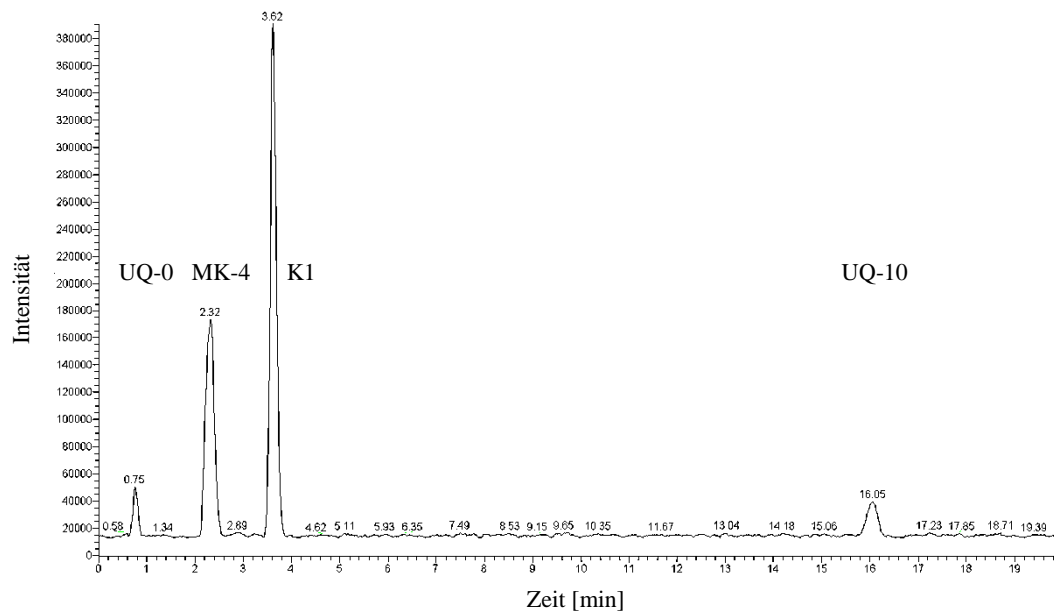


Abbildung 3: Basispeak-Chromatogramm eines Standardgemisches am Beispiel des Versuches 5, $c = 1 \text{ ng}/\mu\text{l}$.

2.1.1 Linearer Arbeitsbereich

Da die Konzentrationen der RQs in den Proben unbekannt waren wurde von Beginn an ein großer Arbeitsbereich gewählt. Die Linearität des Arbeitsbereiches von UQ-10, MK-4 und K1 konnte von $10 \text{ pg}/\mu\text{l}$ bis $3000 \text{ pg}/\mu\text{l}$ mittels Mandel-Tests bestätigt werden. Für die Untersuchungen der Proben wurden 6 Standardlösungen aus diesem Konzentrationsbereich ausgewählt, um die jeweiligen arbeitstäglichen Kalibrationen durchzuführen. Für das Ubichinon UQ-0 konnte ebenfalls ein linearer Zusammenhang festgestellt werden. Auf Grund des geringen Anstiegs und der ebenfalls kurzen Retentionszeit, wodurch das Chinon im Totvolumen der Säule eluiert, wird dieses Chinon für die Auswertung der untersuchten RQs als nichtrelevant angesehen und dementsprechend im Folgenden nicht weiter berücksichtigt.

Die Empfindlichkeit der Methode gegenüber den Chinonen spiegelt sich auch in den unterschiedlichen Anstiegen der Kalibriergeraden wieder (Abbildung 4). So weisen Vitamin K1 und MK-4 deutlich größere Anstiege der Regressionsgeraden auf, als die Ubichinone. Die Ursache dafür liegt in der Ionisierungseffizienz, welche stark von der

Art des Analyten abhängt. So scheinen Mena- und Phyllochinone leichter protonierbar zu sein als die Ubichinone.

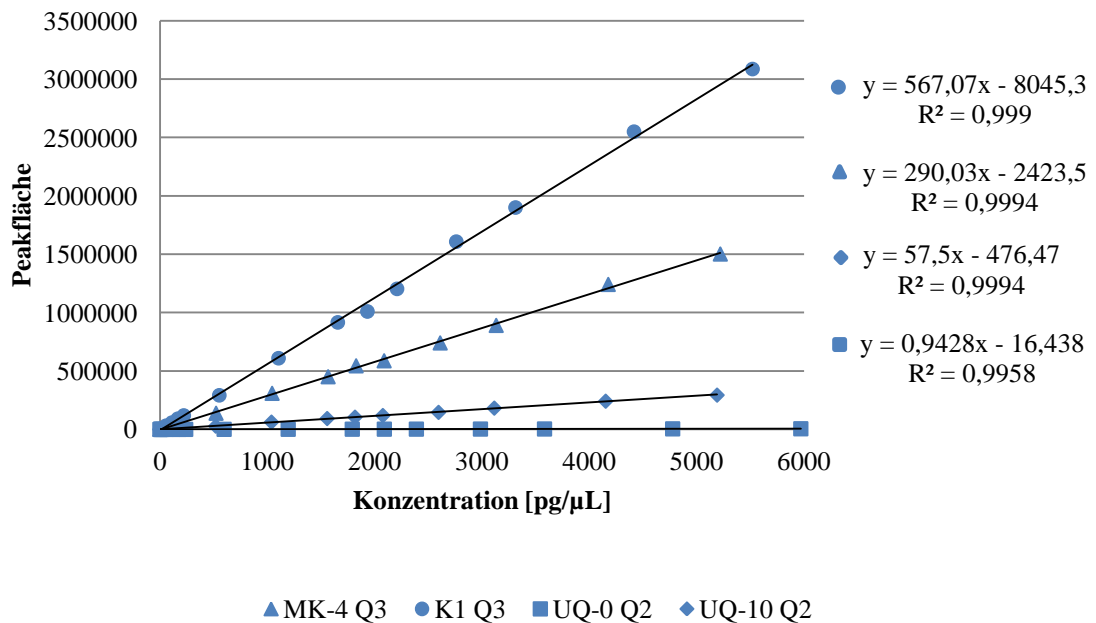


Abbildung 4: lineare Regression der Standardverbindungen

2.1.2 Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze

Die oben aufgeführten Kalibrationen dienen ebenfalls zur Bestimmung der Nachweis (NG)-, Erfassungs (EG)-, und Bestimmungsgrenze (BG) der relevanten Standardverbindungen (Tabelle 3).

Tabelle 3: Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen

	NG [pg/µl]	EG [pg/µl]	BG [pg/µl]	NG _{Lit} [pg/µl]
UQ-10	29,84	59,26	73,84	20,10
MK-4	4,32	8,64	10,76	-
K1	2,74	5,48	6,83	4,00

Die NG von MK-4 und K1 sind mit 4,32 pg/µl bzw. 2,74 pg/µl sehr gering, wohingegen die NG von UQ-10 mit 29,84 pg/µl um das 8- bis 10-fache höher ist. Ursache hierfür ist die Ionisierungseffizienz sowie die niedrigere Detektorempfindlichkeit gegenüber unpolaren Verbindungen. Die bestimmten Nachweisgrenzen liegen im Vergleich zu Literaturangaben (NG_{Lit}) [1, 21] in der gleichen Größenordnung.

2.2 Stabilität der Peakflächen

Durch wiederholte Injektion eines Standardgemisches konnte die Stabilität der Retentionszeiten der Verbindungen überprüft werden. Die Standardabweichungen liegen dabei zwischen 0,006 und 0,050 min und sind somit sehr gering (Tabelle 4). Auffällig war die scheinbar starke Abnahme der Peakflächen nach Mehrfachinjektion mit der Zeit. Welche relativ gesehen jedoch nicht mehr als 12% innerhalb von 10 h beträgt und daher für diese explorative Studie mit Umweltproben annehmbar ist. Um den daraus resultierenden Fehler so gering wie möglich zu halten wurden die Kalibrationsstandards sowohl vor als auch nach den Proben gemessen und der Durchschnitt dieser Messungen zur Berechnung der Kalibriergeraden genutzt.

Tabelle 4: Stabilität der Retentionszeiten und Peakflächen

Chinon- Verbindung	Retentionszeit \pm s (n=10) [min]	Veränderung der Peakfläche nach 10 h [%]
UQ-0	0,756 \pm 0,006	-9,78
UQ-10	16,031 \pm 0,050	-11,12
MK-4	2,327 \pm 0,013	-5,85
K1	6,321 \pm 0,017	-4,14

Der während der Durchführung der Standardmessungen entstandene Verdacht, dass die Standzeit im Autosampler bei 10 °C abhängig von den Lagerungsbedingungen (-20 °C, +4 °C, +20 °C) einen Einfluss auf die Löslichkeit der Analyten und somit auf die gemessenen Peakflächen ausübt konnte nicht bestätigt werden (Abbildung 5). Jedoch scheint die Stabilität des Gerätes erst nach etwa 10 Messungen gewährleistet zu sein unabhängig von den vorherigen Lagerbedingungen. Daraus ergibt sich eine Standzeit von etwa 3 Stunden bevor die eigentlichen Messungen beginnen können.

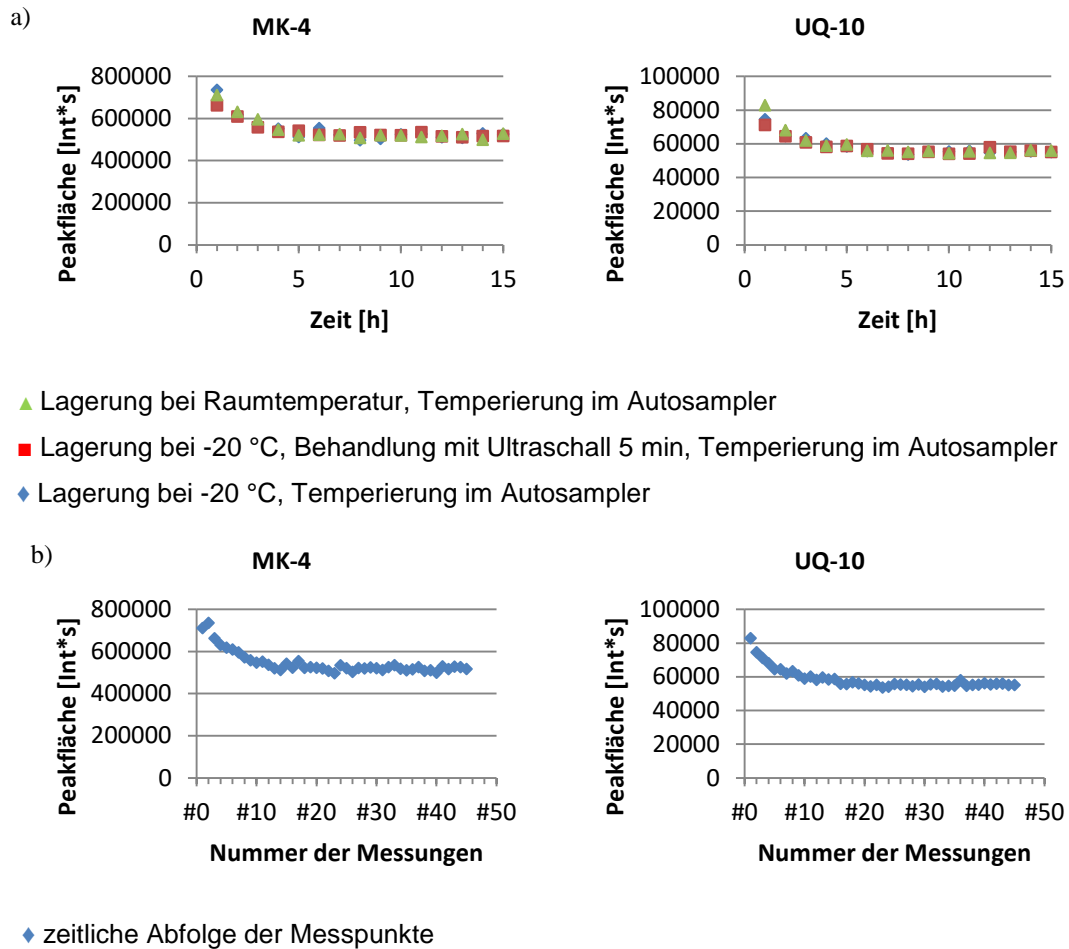


Abbildung 5: Abhängigkeit der Peakflächen von a) der Inkubationszeit und b) der Anzahl an Messungen

2.3 Extraktionsmethode

Mit Hilfe der modifizierten Bligh&Dyer-Extraktion konnte zunächst ein braunes Total-Lipid-Extrakt gewonnen werden, welches sich gut über eine Silikatsäule in Neutral-lipid-, Glycolipid- und polare Lipid-Fraktion trennen lies. Die in der gewonnenen Neutrallipid-Fraktion enthaltenen RQs konnten mittels HPLC-MS nachgewiesen werden. Nach einem Lösungsmittelwechsel von Chloroform zu Isopropanol/Methanol (siehe 2.4) vor der Injektion empfiehlt es sich die Extrakte zu filtrieren, um ungelöste Substanzen zu entfernen und die Säule zu schützen. Dabei kann es sich zum Beispiel um neutrale Fettsäuren, Steroide, Carotinoide oder Alkohole handeln, welche ebenfalls Bestandteil der Neutrallipid-Fraktion sind [28, 29].

2.4 Chromatographische Messungen und Massenspektrometrie

2.4.1 Bestimmung von Fragmentmustern und Retentionszeiten

Um die zukünftige Messmethode auswählen zu können wurden aus früheren Untersuchungen vorhandene Total-Lipid-Extrakte untersucht. Diese Lagen in Chloroform gelöst vor. Da als Laufmittel ein Gemisch aus Isopropanol und Methanol verwendet wird, wurde zunächst getestet, ob sich Chloroform störend auf die Chromatographie auswirkt. Untersuchungen mit den Standardverbindungen ergaben, dass mit Chloroform als Lösungsmittel in Kombination mit einem Gemisch aus Isopropanol und Methanol als mobile Phase in der HPLC erhebliches Fronttailing der Peaks auftrat. Im Gegensatz dazu wiesen Standardverbindungen gelöst in Isopropanol/Methanol kein Tailing auf. Daher wurden die alten Extrakte für weitere Untersuchungen im Stickstoff-Strom getrocknet und in Isopropanol/Methanol gelöst.

Die in Isopropanol und Methanol gelösten Total-Lipid-Extrakte wurden zunächst mit einer Chromatografie-Methode auf ihren RQ-Inhalt untersucht. Dabei erfolgte zunächst ein Lauf einer Probe, mit welchem die grundsätzlichen Elutionszeiten der RQs bestimmt werden sollten. Es wurden 32 Läufe a 70 Minuten durchgeführt (n=3). Während jedem Lauf wurde nur nach einem Mutterion gesucht. Das jeweilige Mutterion $[M+H]^+$ wurde zuvor über die Monoisotopenmassen der Atome berechnet. Zur Bestätigung der RQ-Verbindungen wurden die detektierten Mutterionen in der Ionenfalle isoliert und fragmentiert. Anhand der Fragmentspektren (MS/MS-Spektren, Abbildung 6) und spezifischen Masse-zu-Ladungs-(m/z)-Verhältnissen (zum Beispiel m/z 197 für Ubichinone, m/z 187 für Menachinone, siehe Anhang 2) konnten von den 32 Ausgangsverbindungen 20 Verbindungen sicher nachgewiesen werden. Mehrere Verbindungen konnten nicht detektiert werden und das Vorhandensein von MK-4 konnte nicht in allen Proben bestätigt werden. Aus den erhaltenen Fragmentspektren wurden zudem wichtige intensive Fragmentionenmassen zur späteren Quantifizierung der Analyten bestimmt (Anhang 2).

Die Elution der RQs von der C18-Säule erfolgte mit absteigender Polarität. Die kurzkettingen Verbindungen einer Chinonklasse sind polarer und weisen eine geringere Molmasse auf als ihre langkettingen Vertreter und eluieren daher früher. Die Elutionsstärke nimmt darüber hinaus mit dem Grad der Sättigung innerhalb einer Chinonklasse ab. Ubichinone weisen auf Grund ihrer höheren Polarität geringere Retentionszeiten auf als Menachinone mit vergleichbarer Kettenlänge.

2. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

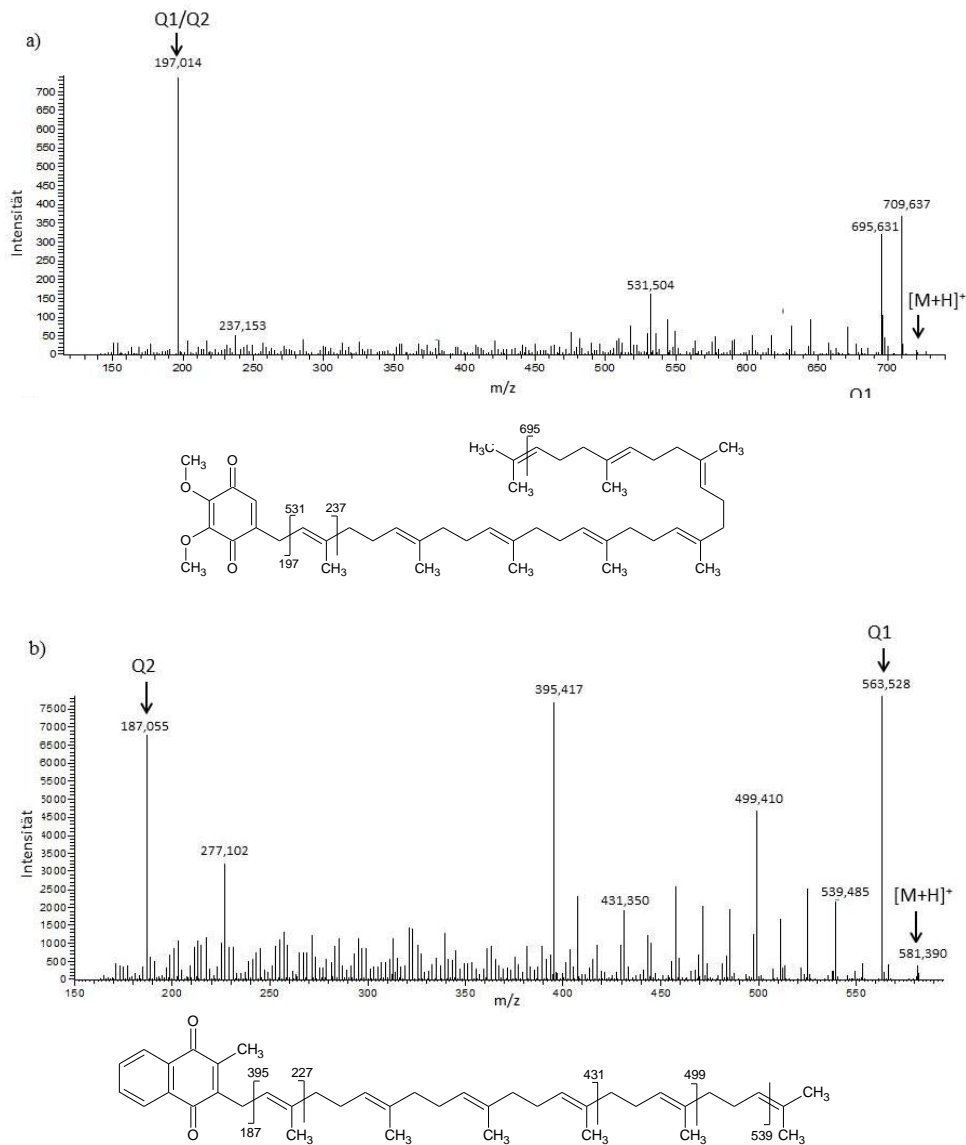


Abbildung 6: MS/MS-Spektren zur Bestimmung der Chinone. Beispielspektren von UQ-8 (a) und MK-6 (b).

Zur Optimierung der Messmethode wurden 5 Versuche mit unterschiedlichen HPLC-Bedingungen durchgeführt und die jeweiligen Auswirkungen auf die Retentionszeiten und Peakflächen der RQs analysiert (siehe auch 4.4). Dabei lag das Augenmerk sowohl auf der Länge des Laufes, auf dem Retentionsverhalten der Stoffe und der Behebung eines auftretenden starken Druckanstiegs bei der Analyse der extrahierten Proben.

Eine Peaktrennung ist in dieser Arbeit weniger von Belang, da gezielt nach spezifischen Ionenmassen gesucht wird. Sie erhöht jedoch die Sensitivität des Detektors durch Erhöhung der Messungen (*scans*) einer Masse pro Sekunde. Alle durchgeführten Versuche ermöglichten die Detektion der Analyten innerhalb von maximal 50 Minuten. Auf Grundlage der Versuche von *Geyer et al.* [17] wurde in dieser Arbeit letztlich eine isokratische Trennung gewählt. Bei Verwendung von Isopropanol/Methanol (10:90,

v/v) als mobile Phase führt eine Erhöhung der Flussrate von 0,3 ml/min auf 0,5 ml/min auf Grund der geringeren Wechselwirkungszeiten der Analyten und der stationären Phase zur Verringerung der Retentionszeiten. Ebenso verkürzt eine Erhöhung des unpolaren Anteils der mobilen Phase (Isopropanolanteil in Methanol von 10 % auf 20 % erhöht) die Retentionszeiten. Bei der Nutzung von 0,5 ml/min und 10% Isopropanol in Methanol (Versuch 2) und von 0,3 ml/min und 20% Isopropanol in Methanol (Versuch 5) wurden annähernd gleiche Retentionszeiten erreicht. Jedoch sind die im HPLC-System herrschenden Drücke bei einer geringeren Flussrate deutlich niedriger und somit systemschonender.

Bei der HPLC-Trennung der filtrierten Extrakte kam es bei Versuch 2 zu einem stetigen Druckanstieg im System von bis zu 150 bar während einer Messsequenz von 5 Extrakten. Die Ursache hierfür könnte eine Verstopfung der Poren der Säule auf Grund einer Löslichkeitsabnahme der Inhaltsstoffe des Extraktes im relativ polaren Lösungsmittel sein. Gelöst wurde dieses Problem durch Erhöhung des Isopropanol-Anteils in der mobilen Phase auf 20% (Versuch 5). Dadurch musste die Flussrate verringert werden, da es sonst auch durch den veränderten Dampfdruck zu hohen Systemdrücken kommt. Weiterhin wurde nach jeder Messung ein Spülschritt mit hohem Isopropanolanteil und verringerter Flussrate durchgeführt. Dabei konnten jedoch keine auf Verunreinigungen hinweisende Peaks in den Chromatogrammen gefunden werden. Die Retentionszeiten der RQs (Versuch 5) an 10 Messtagen weisen nur sehr geringe Standardabweichungen auf (Tabelle 5). Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist daher gegeben.

Tabelle 5: Stabilität der Retentionszeiten der Chinonverbindungen mit Standardabweichung s

Chinon-Verbindung	Retentionszeit $\pm s$ (n=10) [min]	Chinon-Verbindung	Retentionszeit $\pm s$ (n=10) [min]
UQ-8	6,758 \pm 0,051	MK-8	12,397 \pm 0,074
UQ-9	10,383 \pm 0,060	MK-8(H2)	14,595 \pm 0,118
UQ-10	16,300 \pm 0,131	MK-8(H4)	17,894 \pm 0,100
UQ-10(H2)	24,344 \pm 0,105	MK-8(H6)	21,117 \pm 0,120
UQ-10(H4)	30,448 \pm 0,117	MK-9	19,808 \pm 0,152
MK-5	4,883 \pm 0,088	MK-9(H2)	23,649 \pm 0,080
MK-6	5,188 \pm 0,050	MK-9(H4)	28,847 \pm 0,094
MK-7	7,860 \pm 0,050	MK-9(H6)	34,271 \pm 0,114
MK-7(H2)	9,271 \pm 0,105	PQ-9	11,619 \pm 0,083
MK-7(H4)	11,041 \pm 0,058	K1	3,794 \pm 0,044

2.4.2 Blindwertmessungen

Nach einer Injektion eines Gemisches von Isopropanol und Methanol (50:50, v/v) konnten die gesuchten Chinone nicht detektiert werden. Somit sind bei der Auswertung der Proben keine weiteren Maßnahmen, wie Abzug von Blindwerten, zu beachten. Die Basispeak-Chromatogramme aller Blindwerte weisen Intensitäten um 100.000 counts/s auf. Im Verlauf einer Blindwertmessung variieren die MS-Spektren kaum, zeigen jedoch deutliche Peaks. Das Peakmuster kann dem Säulenmaterial und Weichmachern aus Plastikteilen zugeordnet werden [30, 31]. Verunreinigungen durch in den Proben enthaltene Neutrallipide, welche sich in der Säule anlagern könnten, konnten nicht in den Blindwerten nachgewiesen werden.

2.4.3 Extraktionseffizienz

Für die Chinone MK-4, K1 und UQ-10 wurden Wiederfindungsraten (WFR) bestimmt. Die beste WFR wurden für K1 erreicht (87,2 %), gefolgt von MK-4 (46,0%) und die geringste WFR wurde für das UQ-10 erzielt (21,2%). Ein großer Teil der Chinone scheint während der Filtration des Extraktes verloren zu gehen. Die WFR der Chinone vor der Filtration betragen 102,0% (K1), 54,6% (MK-4) und 45,2 % (UQ-10).

Eine Erhöhung der Wiederfindungsrate könnte eventuell durch ein größeres Volumen von Chloroform bei der Total-Lipid-Fraktionierung mit SPE erreicht werden. Ob die Elution der RQs während der SPE mit Chloroform vollständig war oder auch noch Chinonverbindungen in der Aceton-Phase eluiert worden sind, wurde in dieser Arbeit nicht überprüft.

2.5 Bewertung der respiratorischen Chinone als Biomarker zur Bestimmung der mikrobiellen Gemeinschaft

2.5.1 Variabilität der Chinongehalte

Für die 20 untersuchten Proben konnte der Gesamt-Chinongehalt, mit MK-n, UQ-n, PQ-9 und K1 sowie die reinen MK-n- und UQ-n-Gehalte bestimmt werden.

Der Gesamt-Chinongehalt im Boden schwankt stark zwischen 368,30 nmol*gTM⁻¹ in Probe B2A13 und 2638,61 nmol*gTM⁻¹ in Probe B2A21 (Tabelle 6). Diese Schwankungen scheinen unabhängig von der Art und Anzahl der funktionellen Gruppen der Pflanzen (Gräser, Leguminosen, kleine und große Kräuter) zu sein. Der relative Anteil der Ubichinone liegt in allen Proben zwischen 71 - 78 % und der

Menachinonanteil zwischen 11 - 25 %. Dies deutet auf einen hohen Anteil an aeroben Mikroorganismen hin [18, 19].

Beim Gesamt-Chinongehalt wurden auch gefundene Konzentrationen an Vitamin K1 und Phyllochinon PQ-9 berücksichtigt. Diese beiden isoprenoiden Chinone konnten zwar nachgewiesen werden, ihr Vorkommen ist aber auf Fotosynthese treibende Organismen beschränkt. So können beide Verbindungen zu einem geringen Anteil in Wurzeln vorkommen [18], daher kann es sein, dass die Bodenprobe vor der Extraktion unzureichend von den enthaltenen sehr feinen Wurzeln getrennt wurde. Zudem könnten ebenfalls Algen für das Vorkommen dieser beiden Verbindungen verantwortlich sein [18, 20]. Für die weitere Auswertung der Ergebnisse werden nur noch die erhaltenen Werte der Ubichinone und Menachinone berücksichtigt.

Tabelle 6: Chinongehalte der untersuchten Proben

Probe	Gesamt-Chinongehalt [nmol*gTM ⁻¹]	Menachinonanteil [nmol*gTM ⁻¹]	Ubichinonanteil [nmol*gTM ⁻¹]
B2A01	694,46	184,02	476,92
B2A02	1070,36	206,16	834,78
B2A03	830,26	163,48	643,99
B2A04	629,40	162,44	447,47
B2A05	638,09	211,05	413,39
B2A06	755,54	273,65	444,47
B2A08	665,50	222,64	432,12
B2A09	1360,40	387,53	945,55
B2A10	1729,40	257,58	1461,00
B2A12	660,88	145,71	483,42
B2A13	443,60	137,08	277,86
B2A14	2532,99	351,66	2129,63
B2A15	670,93	213,30	431,19
B2A16	1300,42	271,08	985,30
B2A17	734,43	199,63	504,44
B2A18	911,26	234,27	641,64
B2A19	1509,82	416,69	1044,70
B2A20	869,94	295,13	539,33
B2A21	2638,61	430,19	2144,12
B2A22	1671,54	407,07	1211,20

Die letztendlich über die Kalibriergeraden berechneten Konzentrationen der RQs in den Proben liegen zwischen 10,7 ng*µl⁻¹ und 7843,6 ng*µl⁻¹. Dies zeigt, dass einige

Chinongehalte außerhalb des gewählten Arbeitsbereiches liegen. In späteren Arbeiten sollte der Arbeitsbereich daher vergrößert und erneut die Linearität geprüft werden. Gegebenenfalls können auch ein niedriger und ein hoher Konzentrationsbereich gewählt werden.

2.5.2 Bestimmung von relativen Chinonanteilen

Aus den relativen Anteilen (Molfraktionen in mol%) der RQs konnte für die 20 Proben ein so genanntes Chinon-Profil (*quinone profile method*) mit Mittelwerten und Standardabweichungen erstellt werden (Abbildung 7). Dabei ist deutlich zu erkennen, dass die mittleren relativen Gehalte der Menachinone viel geringer (0,1 bis 8%) sind, als die mittleren Gehalte der Ubichinone (8 bis 33%). Dieser hohe Anteil an Ubichinonen weist auf vornehmlich aerobe Bedingungen im Boden hin [18, 19]. Weiterhin sind die großen Schwankungen der Gehalte an UQ-8 und der Gehalte an UQ-10(H4) auffällig. UQ-8 wird oft in β -, γ -Proteobakterien und einigen α -Proteobakterien gefunden [22], wohingegen UQ-10(H4) in Pilzstämmen vorkommt [21]. Somit könnte geschlossen werden, dass sich die Zusammensetzung der Gramnegativen (G⁻)-Bakterien und Pilze, welche durch Ubichinone charakterisiert werden können [21, 22], in den Proben stärker ändert, als die Zusammensetzung der Grampositiven (G⁺)-Bakterien und Actinobakterien, welche Menachinone enthalten [21, 22]. Die erhaltenen Chinon-Profile können zur Dokumentation von jährlichen Veränderungen der Chinonzusammensetzung an einem Ort genutzt werden. Eine weitere Anwendung liegt im Vergleich verschiedener Orte, welche zum Beispiel durch unterschiedliche Kultivierung und Düngung geprägt sind [1, 21, 22].

Im Vergleich zu anderen Chinonprofilen (Abbildung 8) schwanken die Gehalte der verschiedenen RQs weniger innerhalb der Proben. Zudem ist der Gehalt an Ubichinonen viel größer als der an Menachinonen. Dies steht im Gegensatz zu den auf Grundlage der Literatur erwarteten Gehalten von 30 % Ubichinonen zu 70 % Menachinonen [20]. Ein weiterer wesentlicher Unterschied zwischen den Versuchen von *Saitou et al.* (1999) [1], *Fujie et al.* (1998) [21] und den Versuchen dieser Arbeit liegt in der chemischen Düngung der Böden von *Saitou* und *Fujie*. Diese könnte dazu führen, dass diese Chinon-Profile eine andere Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft darstellen und somit die Chinonzusammensetzung anders ist, als es unter natürlichen Bedingungen ohne Dünnung und Pestizideintrag wäre.

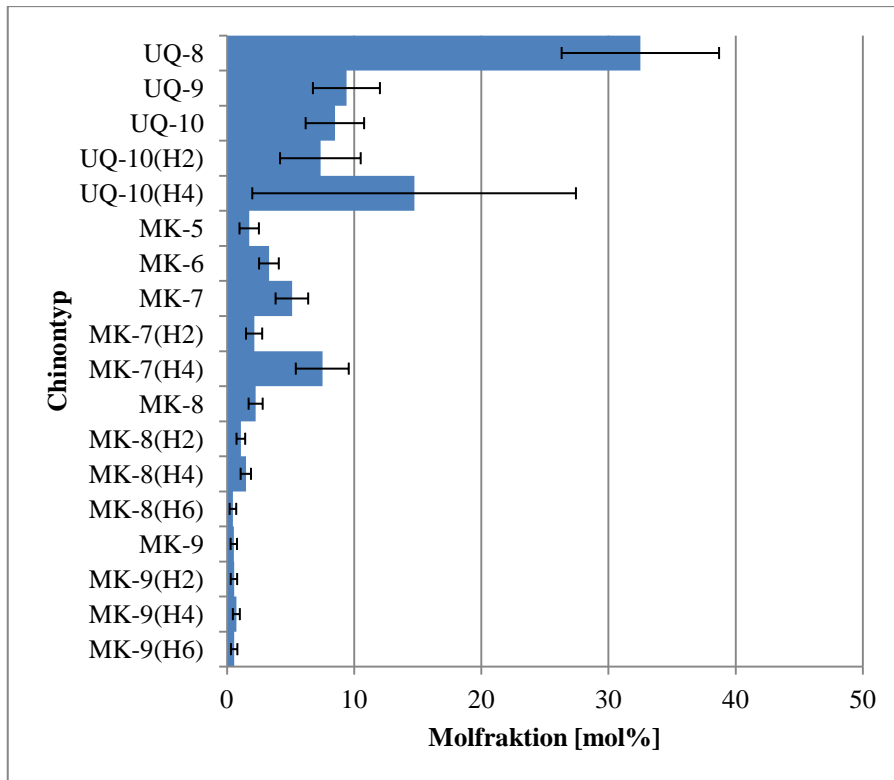


Abbildung 7: Mittel der Chinon-Profile mit Standardabweichung, n=20.

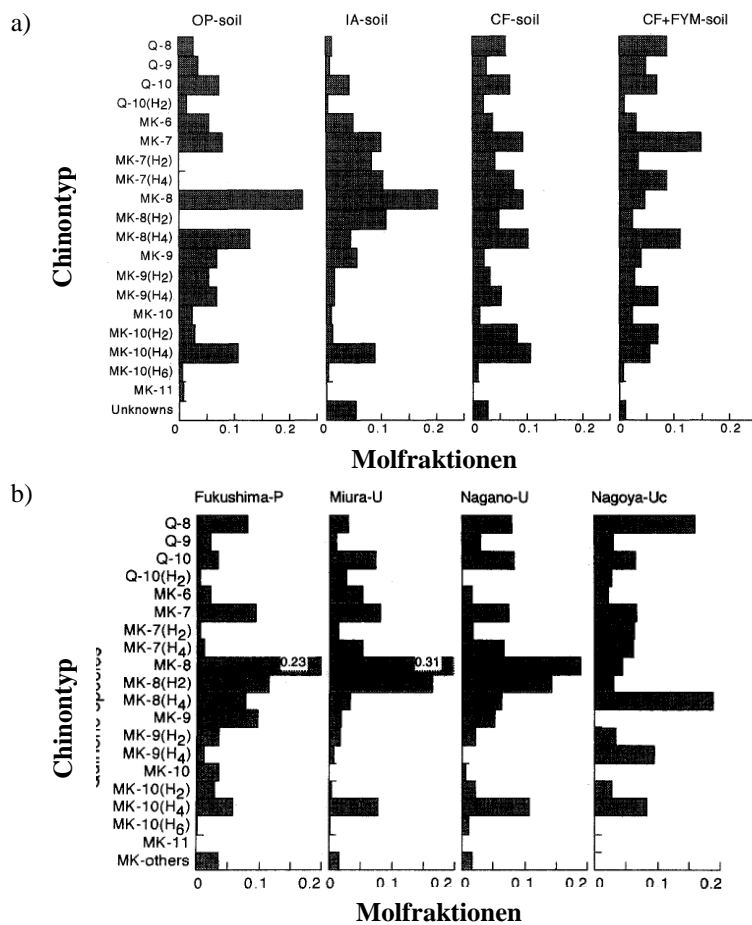


Abbildung 8: Chinon-Profile verschiedener Bodenproben. a nach [21], b nach [1]

Den größten Einfluss auf die Chinonzusammensetzung scheint jedoch die Art des Bodens zu haben. Dieser ist in dieser Arbeit ein Fluvisol (Auenboden) bestehend aus variablen Ton-, Sand- und Schluffgehalten [8, 11]. Die Zusammensetzung des Bodengefüges der untersuchten Felder des Blockes 2 ist geprägt von einem hohen Anteil an Schluff (43,6 - 72,4 %) und geringen Gehalten an Sand (9,7 - 37,1 %) und Ton (17,9 - 25,8 %) (Tabelle 7). Die Variation und Anzahl der funktionellen Gruppen sowie die Pflanzenartenzahl (1 - 60 Spezies) scheint hingegen einen sehr geringen Einfluss auf die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft zu haben (vgl. auch PCA und RDA, siehe Anhang 3 für eine Übersicht zu gemessenen Umweltparametern). Dies konnte bereits in früheren Arbeiten mit anderen Markern gezeigt werden [8, 32].

Tabelle 7: Zusammensetzung des Bodengefüges der untersuchten Proben

	Minimalwert	Maximalwert	Mittelwert
Sandgehalt [%]	9,7	37,1	23,1
Tongehalt [%]	17,9	25,8	21,9
Schluffgehalt [%]	43,6	72,4	55,0

2.5.3 Varianz der Chionkompositionen

Die statistische Auswertung der Probenzusammensetzungen anhand der Molfraktionen der Chinonverbindungen erfolgte mittels Hauptkomponentenanalyse (PCA). Zunächst wurden die relativen Abundanzen aller untersuchten Ubi- und Menachinone berücksichtigt. Dabei zeigt sich, dass die relative Chinonkomposition in den Proben stark von den Ubichinonen bestimmt ist (Abbildung 9a). Im weiteren Verlauf der Untersuchung wurden daher die Ubichinon- und Menachinonzusammensetzungen getrennt voneinander betrachtet und dem entsprechend die Abundanzen neu berechnet. Die dargestellte Gruppierung der Proben erfolgte nach der Anzahl der funktionellen Gruppen der Pflanzen pro Probe (vgl. Anhang 3).

Hauptkomponente 1 mit den relativen Abundanzen der Ubichinone (Abbildung 9b) erklärt die Varianz in den Proben zu 88 % und Hauptkomponente 2 erklärt 8 %. Besonders auffällig ist die hohe Ähnlichkeit der meisten Proben. UQ-10 und UQ-8 korrelieren stark mit der ersten Achse und negativ mit UQ-10(H4), wohingegen UQ-10(H2) mit Achse 2 korreliert und UQ-9 kaum korreliert. Es ist eine Trennung der Ubichinone in ungesättigte und partiell gesättigte Verbindungen zu erkennen, welche über Achse 1 beschrieben wird. Bei Berücksichtigung der Vorkommen der Ubichinone (Tabelle 9) ist entlang der Hauptkomponente 1 eine Auftrennung in G- Bakterien,

charakterisiert durch ungesättigte Ubichinone, und saprotrophe Pilze, welche UQ-10(H2) und UQ-10(H4) enthalten, zu erkennen.

Auch die Menachinonzusammensetzung (Abbildung 9c) zwischen den Proben variiert stark. Dabei korrelieren besonders Menachinone mit 9 Isopreneinheiten (Marker für G+) negativ mit kurzkettigen Menachinonen (Marker für G–). Weiterhin korrelieren diese Verbindungen stark mit Hauptkomponente 1 welche 65 % der Variation der Menachinonzusammensetzung in den Proben erklärt. MK-5 korreliert darüber hinaus negativ mit MK-8 und MK-8(H4).

Die Streuung der Proben aller drei PCAs zeigt, dass das Vorhandensein einer Chinonverbindung nicht in Zusammenhang mit der Art und Anzahl der funktionellen Gruppen der Pflanzen gebracht werden kann.

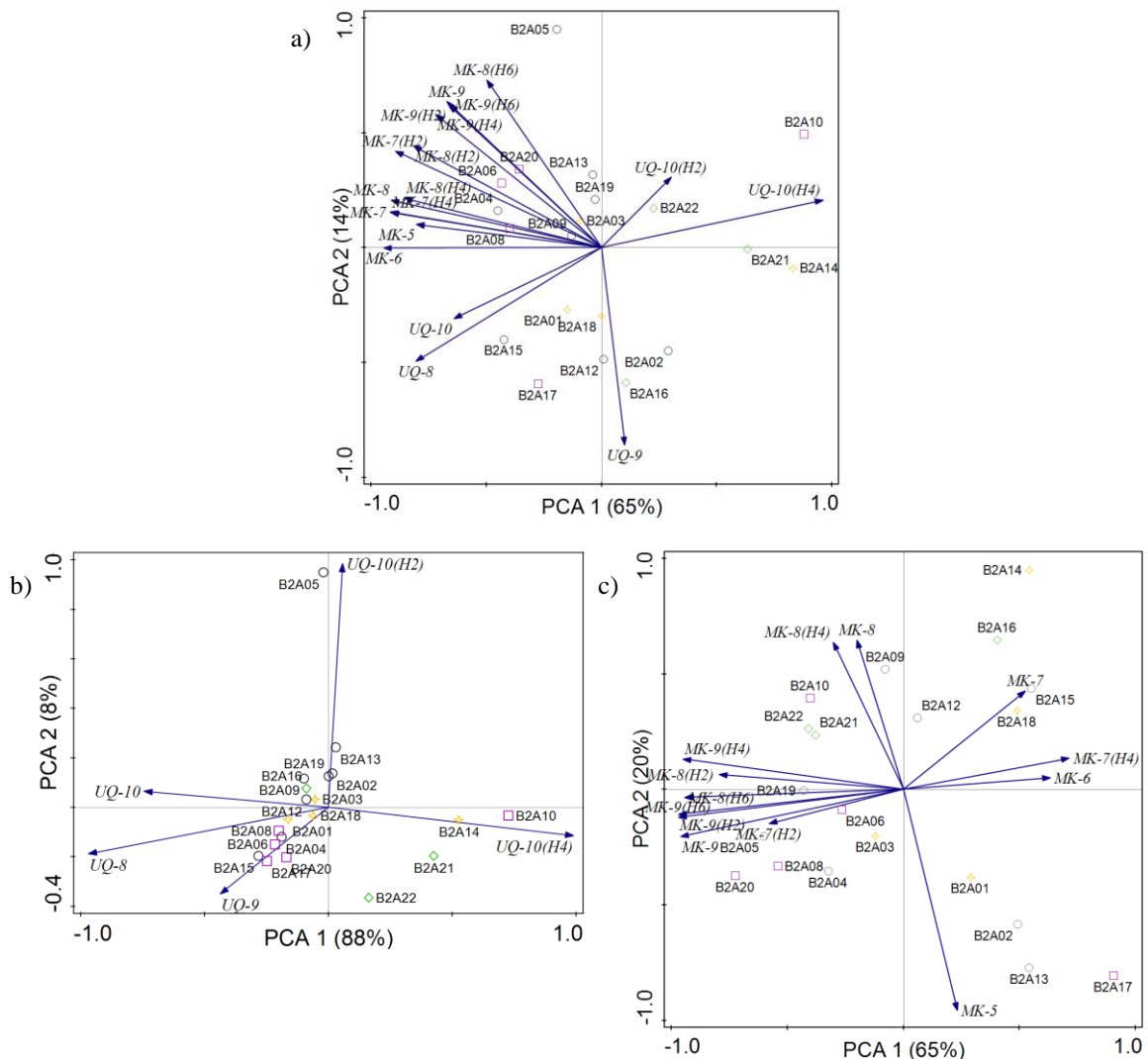


Abbildung 9: Varianz der Proben in Abhängigkeit der Chinonzusammensetzung.

a) PCA aller RQ; b) nur Ubichinone berücksichtigt; c) nur Menachinone berücksichtigt. Gruppierung der Proben nach Anzahl der funktionellen Gruppen (FG): Kreis, 1 FG; Quadrat, 2 FG; Raute, 3 FG; Stern, 4 FG.

2.5.4 Beziehung zwischen Umweltparametern und der Chinonkomposition

Für eine genauere Aufklärung möglicher Einflussfaktoren wurde eine Redundanzanalyse (RDA) durchgeführt. Dabei können Korrelationen zwischen Umweltparametern und der Varianz der Chinondaten aufgezeigt werden.

Da die Anzahl der Proben kleiner der Anzahl der gemessenen Umweltparameter (siehe Anhang 3; 4.6) ist könnten bei gleichzeitiger Betrachtung aller Variablen zufällig hohe Signifikanzen einiger Parameter auftreten[33, 34]. Um dies zu verhindern und vertrauenswürdiger Informationen zu erhalten wurden die gemessenen Parameter gruppiert. Dadurch entstanden vier Variablengruppen (Design-, Boden-, Pflanzen-, Wasserchemie-Variablen) mit je vier bis sieben Umweltvariablen (siehe 4.6). Die Variablen, ihre Gruppierung, Signifikanzniveaus P und die von ihnen erklärte Varianz in der Chinonzusammensetzung zwischen den Proben sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Von den gewählten Gruppen erklären die Bodenvariablen die Varianzen in der Chinonkomposition mit einem Wert von 20,3 % am besten. Weiterhin erklären die Designvariablen, welche den grundlegenden Aufbau des „Jena Experiments“ darstellen, die Varianz zu 10,8 %. Nur einen geringen Anteil an der Erklärung der Varianz haben die gemessenen Pflanzenvariablen (3 %) und Werte der Wasserchemie (6,2 %). Variablen mit P kleiner 0,05 werden als signifikant und Variablen mit P kleiner 0,1 als marginal signifikant angesehen. Aus dieser Betrachtung folgt, dass weder die Wasserchemie- noch die Pflanzenvariablen einen Einfluss auf die Unterschiede der Chinonkompositionen haben.

Bei näherer Betrachtung der Boden- und Designvariablen zeigen diese meist keinen signifikanten Einfluss. Lediglich die vier Variablen 1) Vorhandensein/Abwesenheit von Gräsern, 2) Tongehalt, 3) Gehalt an mikrobiellen Kohlenstoff und 4) Sandgehalt besitzen P-Werte kleiner 0,1, sind (marginal) signifikant und könnten für die Unterschiede der Chinonzusammensetzung der verschiedenen Proben verantwortlich sein. Eine weitere RDA (Abbildung 10) unter Berücksichtigung der genannten vier Variablen zeigt, dass diese Umweltvariablen die Varianz der Chinonkomposition zu 28,9 % erklären (Tabelle 8).

Den größten Einfluss auf die Varianz üben der Tongehalt und der mikrobielle Kohlenstoff aus. Dabei steigt der Menachinongehalt bei steigendem Tongehalt relativ gesehen stärker an als der Gehalt der partiell gesättigten Ubichinone und UQ-9.

Weiterhin kann bei steigendem mikrobiellem Kohlenstoffgehalt eine stärkere Zunahme der Ubichinone beobachtet werden.

Tabelle 8: Umweltparameter und Daten der Redundanzanalyse zur Erklärung der Unterschiede der Chinonzusammensetzung zwischen den Proben

	Umweltparameter	Erklärte Varianz innerhalb der Gruppe[%]	P	angepasste erklärte Varianz [%]
Designvariablen	Gräser	15,30	0,04	10,80
	kleine Kräuter	5,30	0,34	
	Leguminosen	6,40	0,24	
	Anzahl funktionelle Gruppe	5,40	0,28	
	Pflanzenartenzahl	1,90	0,78	
Bodenvariablen	Ton	15,80	0,03	20,30
	mikrob. Kohlenstoff	12,70	0,05	
	Sand	9,80	0,06	
	pH	3,90	0,40	
	Basalrespiration	1,70	0,76	
	Stickstoff	1,50	0,82	
Pflanzenvariablen	organ. Kohlenstoff	4,20	0,34	3,00
	Wurzelmasse	8,20	0,17	
	Masse totes organ. Material	5,20	0,31	
	log_Biomasse	6,10	0,21	
Wasserchemie	Blattflächenindex	3,90	0,51	6,20
	Chlorid	10,00	0,12	
	Magnesium	9,00	0,12	
	Sulfat	8,50	0,10	
	Calcium	2,90	0,58	
	Natrium	2,50	0,69	
	Fluorid	3,00	0,59	
Variablen mit $P \leq 0,6$	Ton	15,80	0,05	28,90
	mikrob. Kohlenstoff	12,70	0,05	
	Sand	9,80	0,09	
	Gräser	5,50	0,21	

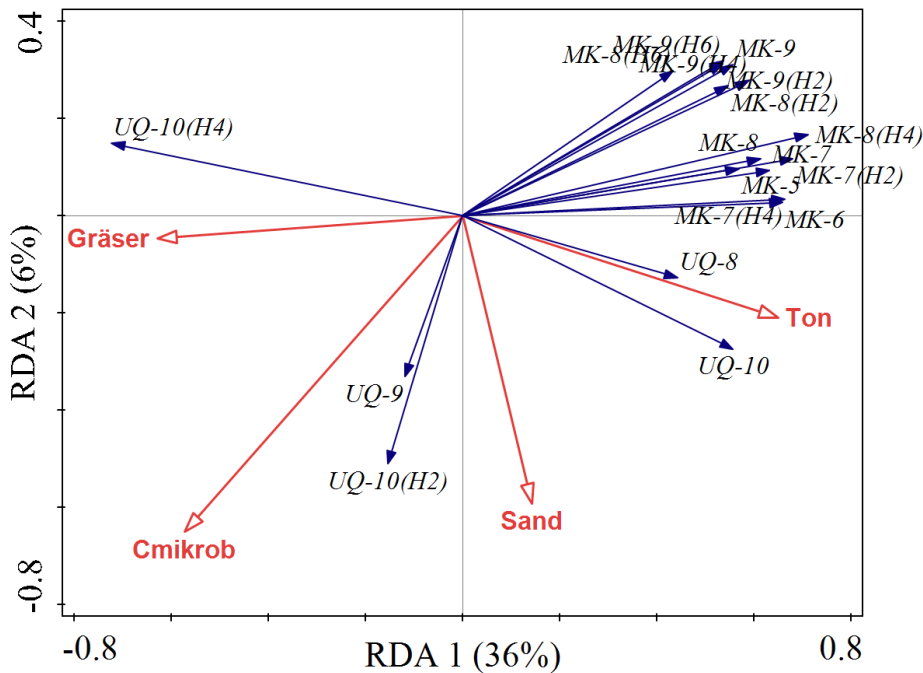


Abbildung 10: Zusammenhang zwischen der Variation der Chinonzusammensetzung und ausgewählten Umweltparametern

2.5.5 Vergleich der Ergebnisse mit Phospholipid-Fettsäure-Markern

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit ist der Vergleich der Ergebnisse der aktuellen RQ-Analyse mit bereits vorhandenen Resultaten einer PLFA-Analyse, um mögliche Parallelen und weiterführende Erkenntnisse bei der Charakterisierung mikrobieller Gemeinschaften aufzuzeigen. Hierfür wurden die Zusammensetzungen der relativen Abundanzen beider Stoffgruppen aller 20 Proben mittels PCA untersucht. Die erhaltenen Achsenwerte (*scores*) einzelner Verbindungen wurden anhand ihres Vorkommen in verschiedenen Mikroorganismengruppen, welche in verschiedenen Literaturstellen beschrieben wurden (vgl. Tabelle 9), oder anhand chemischer Merkmale, wie Kettenlänge, zusammengefasst und ein Mittelwert MW mit Standardabweichung s berechnet.

Zunächst kann gezeigt werden, dass sich die Variation in der relativen Chinonkomposition zwischen den Proben in sechs Gruppen einteilen lässt. Einteilungsmerkmal ist dabei die chemische Struktur der RQs (Abbildung 11a). Hauptachse 1 trennt partiell gesättigte Ubichinone von ungesättigten Ubichinonen und Menachinonen. Obwohl die Menachinone eine sehr hohe Ähnlichkeit in ihren relativen Abundanzen aufweisen können auch sie in drei Gruppen gegliedert werden. So sind die kurzkettingen ungesättigten Menachinone stark mit der ersten Achse der PCA korreliert.

Wohingegen kurzkettige, partiell gesättigte Menachinone und langkettige Menachinone unkorreliert sind. Die Zusammengefassten PLFA-Gruppen weisen eine sehr viel höhere Ähnlichkeit zueinander auf, als die RQ-Gruppen. Sie korrelieren leicht mit der ersten Achse der PCA. Dabei ist ein Gradient von Markern für G⁻-Bakterien über Pilzmarker hinzu Markern für G⁺- und Actinobakterien zu beobachten. Bei einer vergleichenden Betrachtung der PLFAs und RQs zeigt sich, dass Menachinone insgesamt stärker mit Actinobakterien und G⁺-Bakterien korrelieren als die Ubichinone, wohingegen ungesättigte Ubichinone mehr mit G⁻-Bakterien korrelieren.

Werden neben den PLFAs auch die RQs anhand ihres Vorkommens in den phylogenetischen Gruppen der Mikroorganismen eingeteilt (Tabelle 9) so korrelieren die verschiedenen Marker für G⁺- und Actinobakterien sowie die verschiedenen Marker für G⁻-Bakterien miteinander. Zwischen den Pilzmarkern herrscht scheinbar keine Ähnlichkeit innerhalb der relativen Abundanzen.

Tabelle 9: Einteilung der Phospholipid-Fettsäure-Marker und Chinonmarker in phylogenetische Gruppen

Phylogenetische Gruppe	Phospholipid-Fettsäuren	Referenz	Respiratorische Chinone	Referenz
Actinobakterien	17:0(10M), 18:0(10M), 19:0(10M)	[22]	MK-9, MK-9(H2), MK-9(H4), MK- 9(H6)	[14, 21, 22]
Grampositive Bakterien	14:0i, 15:0i, 15:0a, 16:0i, 17:0br, 17:0i, 17:0a, 18:0br	[8, 35]	MK-7, MK-7(H2), MK-8 MK-8(H2) MK-8(H4) MK- 8(H6)	[14, 21, 22]
Gramnegative Bakterien	15:1, 16:1w7c, 16:1w5, 16:1, 17:1, 18:2w7c, 19:1, 17:0cy, 19:0cy	[8, 35]	MK-5, MK-6, UQ-8, UQ-9, UQ-10	[14, 21, 22]
Pilze	18:2w6c	[8, 35]	UQ-10(H2), UQ- 10(H4)	[21]
allgemein-vorkommend	14:0n, 16:0n, 16:1w12, 17:1w8c, 18:0n, 18:1w9c, 18:1w5c, 18:2	[8, 35]		

M, Methylierte Fettsäure; i, iso; a, antiiso; cy, cyclisch; n, unverzweigt; br, verzweigt

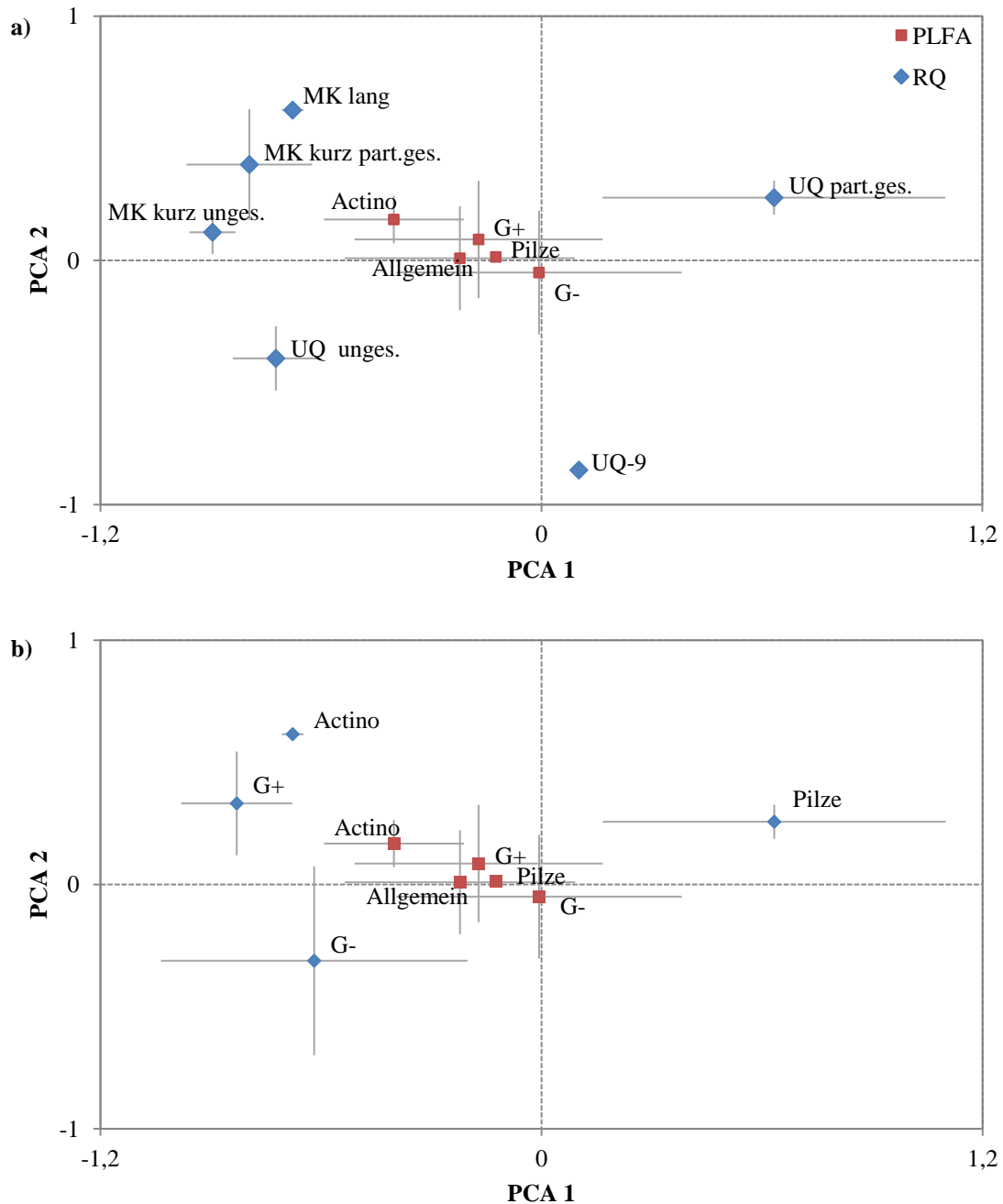


Abbildung 11: Hauptkomponentenanalyse der Unterschiede in den Proben anhand ihrer PLFA- und Chinonzusammensetzung. Mittelwerte mit Standardabweichung. a) PLFA-Zusammensetzung eingeteilt in phylogenetische Gruppen und Zusammensetzung der respiratorischen Chinone eingeteilt in kurz-, langkettige, ungesättigte und partiell gesättigte Mena- und Ubichinone; b) PLFA- und Chinonzusammensetzung eingeteilt in phylogenetische Gruppen.

Dargestellt sind die Mittelwerte der Scores nach Hauptkomponentenanalyse aller relativen Abundanzen der untersuchten RQs und PLFAs. Die Clusterung der Chinone erfolgte entsprechend ihrer Ähnlichkeiten resultierend aus der PCA oder entsprechend dem Vorkommen innerhalb der phylogenetischen Gruppen. Abkürzungen der respiratorischen Chinone: UQ, Ubichinone; MK, Menachinone; unges., ungesättigte Chinonverbindungen; part.ges., partiell gesättigte Chinonverbindungen; kurz, kurz-kettige Isoprenkette; lang, lang-kettige Isoprenkette. Abkürzungen der phylogenetischen Gruppen: Actino, Actinobakterien; G+, Grampositive Bakterien; G-, Gramnegative Bakterien; Pilze, saprotrophe Pilze; Allgemein, nicht eindeutig einzuordnende PLFAs.

Die Ähnlichkeit zwischen der Zusammensetzung der PLFAs und RQs (jeweils relative Abundanzen der Verbindungen aller Proben) kann ebenfalls über eine Korrelationsmatrix beschrieben werden (Anhang 4). In dieser Arbeit wurde festgelegt, dass bei Korrelationskoeffizienten r größer 0,5 eine Korrelation zwischen den verschiedenen Markern vorhanden ist. Die meisten Korrelationskoeffizienten zwischen PLFA und RQ sind kleiner 0,5 und deuten somit auf eine geringe bis keine Korrelation hin. Nur wenige Verbindungen korrelieren mit $r > 0,5$. Dabei scheinen sich besonders Menachinone mit Phospholipid-Fettsäuren mit C16-C18 zu ähneln. Weiterhin korreliert PLFA 17:1 mit vielen Menachinonen. Lediglich zwei RQs (UQ-8, UQ-10(H4)) zeigen Korrelationskoeffizienten über 0,5 mit PLFAs (17:1, 18:2w7c).

Ausgehend von Hauptkomponentenanalyse und Korrelationsmatrix sind für verschiedene phylogenetische Gruppen sowohl PLFA- als auch RQ-Marker zu finden. Dabei können mit dieser Arbeit Literaturangaben teilweise bestätigt werden [22]. So zum Beispiel die Ähnlichkeit der Fettsäure 15:0a (Marker für G+) mit kurzkettigen unverzweigten und partiell verzweigten Menachinonen, wie MK-8 und MK-8(H2) oder die Korrelation zwischen den Fettsäuren 17:1 und 18:2w7c (Marker für G-) sowie dem Chinon UQ-8.

Der Vergleich beider Marker-Gruppen zeigt darüber hinaus, dass die Komplexität der mikrobiellen Gemeinschaft selbst mit mehr Informationen schwer zu beschreiben ist.

3 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden respiratorische Chinone im Boden untersucht, um auf die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft schließen zu können. Ziel war es (1) eine Literaturrecherche zur Nutzung respiratorischer Chinone als Biomarker zur Charakterisierung mikrobieller Gemeinschaften durchzuführen, (2) eine Extraktions- und Analysenmethode zu erstellen und zu validieren und (3) Bodenproben eines Grasland-Biodiversitäts-Experiments („Jena Experiment“) zu extrahieren und zu analysieren. Aus diesen Punkten ergaben sich weitere wichtige Schwerpunkte wie (4) die Unterschiede der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft, welche mit Hilfe der RQ-Komposition bestimmt werden kann, mit statistischen Methoden zu erklären sowie (5) die Ergebnisse der RQ-Marker mit bereits vorhandenen Resultaten der PLFA-Marker zu vergleichen.

Mit den gewählten Lösungsmitteln und Parametern zur Extraktion wie auch zur Analyse der respiratorischen Chinone (RQ) konnte die Zusammensetzung der RQs bestimmt werden.

Durch Verwendung von Fragmentspektren und der gezielten Suche nach Mutter- und Fragmentationen einzelner Chinonverbindungen konnten Verbindungen für die kein Standard zu Verfügung stand in Bodenproben nachgewiesen werden. Eine für diese explorative Studie ausreichende halbquantitative Bestimmung der RQ-Gehalt in den Proben auf Grundlage von vier Kalibrationsstandards führte zu relativen Molfraktionen der RQs in den Proben. Die dabei beobachteten hohen Anteile an Ubichinonen weisen auf aerobe Bodenbedingungen hin [15].

Für die Extraktion konnte eine Extraktionseffizienz zwischen 21 % (UQ-10) und 87 % (K1) ermittelt werden. Hier sollten weiterführende Untersuchungen durchgeführt werden. So könnten längere Extraktionszyklen, geringere Bodenprobenmengen oder größere Lösungsmittelvolumina bei der SPE zur Erhöhung der Extraktionseffizienz führen.

Auch bei der Messmethode mit HPLC-MS/MS sollten weitere Optimierungen stattfinden. Die dargestellten Untersuchungen konnten zeigen, dass der RQ-Gehalt starken Schwankungen (10,7 ng/µl und 7843,6 ng/µl) unterliegt und eine Erweiterung des Arbeitsbereiches nötig ist. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit weitere Standardverbindungen durch Kultivierung der entsprechenden Bakterien und

anschließender Extraktion herzustellen [17, 21] und so die Quantifizierung zu verbessern.

Die Richtigkeit der literaturgestützten Einteilung der untersuchten Chinonverbindungen in taxonomische Gruppen der Mikroorganismen (Tabelle 9) konnte durch Vergleich mit PLFA-Markern grundsätzlich bestätigt werden. So korrelieren G⁺- und Actinobakterien-Marker beider Marker-Gruppen stark miteinander. Wohingegen die Pilz- und G⁻-Marker wider erwarten kaum korrelieren. Da besonders das Pilzwachstum vom Nährstoffangebot im Boden abhängig ist [6–8] und die Proben für PLFA- und RQ-Analysen nicht zum gleichen Zeitpunkt genommen wurden könnte es hier zufällig zu Unterschieden gekommen sein. Dieser Umstand könnte durch PLFA-Analyse der im Rahmen dieser Arbeit genommenen Bodenproben überprüft werden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass es für genauere taxonomische Aussagen über die mikrobiellen Gemeinschaften im Boden unabdingbar ist mehrere Marker zu untersuchen. Darüber hinaus scheint es sinnvoll die übliche Einteilung in G⁺ und G⁻ aufzubrechen und eine genauere Einteilung, wie zum Beispiel in Proteobakterien, Actinobakterien, Cyanobakterien, Bakteroidetes usw., zu Grunde zu legen. Neben den RQs und den PLFAs können bei einer solchen Einteilung auch u.a. DNS-Sequenzierungen hilfreich sein.

Als vornehmliche Triebkraft für die Unterschiede der Chinonkomposition in den untersuchten Proben konnte in dieser Arbeit der Bodentyp (Tongehalt) bestimmt werden. Dieses Resultat deckt sich mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen. [1, 21]

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine Erweiterung des Biomarkerpools um RQs sinnvoll ist, um bessere Aussagen über die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft treffen zu können. Vorteile der RQ-Methode sind die geringe Extraktions- und Aufarbeitungszeit sowie die Möglichkeit der parallelen Nutzung der gewonnenen SPE-Fractionen zur Bestimmung der NLFAs und PLFAs. Neben der direkten Zuordnung der Chinonverbindungen zu taxonomischen Gruppen entsprechend ihrem Vorkommen [14, 21, 22] können mit den RQs ebenfalls aerobe/anaerobe Bedingungen [15, 18, 19] im Boden aufgezeigt werden und Veränderungen der mikrobiellen Gemeinschaft durch äußere Einflüsse, wie Düngung oder Pestizide [1, 21, 22], beobachtet werden. Die Sensibilität der RQ-Zusammensetzung auf Änderungen der mikrobiellen Gemeinschaft ist größer als die Sensibilität der PLFA-Zusammensetzung,

da vor allem für G⁺ - Bakterien mehr RQ-Marker als PLFA-Marker genutzt werden können [36]. Letztlich besteht die Möglichkeit ausgehend vom Gesamt-Chinongehalt auf die mikrobielle Biomasse zu schließen [1].

Weiterführende Untersuchungen, welche mehrere Biomarker kombinieren, scheinen ein großes Potential zu haben, um weitere Hinweise zur taxonomischen Zusammensetzung der mikrobiellen Bodengemeinschaft zu liefern und zu helfen unser Wissen über die Einflussfaktoren auf Bodenmikroben zu erweitern.

4 Material und Methoden

4.1 Standardverbindungen

Um die Konzentrationen der zu untersuchenden Chinon-Verbindungen abschätzen zu können und Gehalte in mol% zu bestimmen, wurden vier Vertreter der Chinon-Verbindungen als externe Standards ausgewählt, jeweils eine Kalibrationsreihe erstellt und Kalibrationskenndaten berechnet. Dabei handelt es sich um den linearen Arbeitsbereich, Verfahrensstandardabweichung, Nachweis-, Bestimmungs- und Erfassungsgrenze (NG, BG und EG) sowie die Stabilität der Retentionszeiten, Peakflächen und Verbindungen. Darüber hinaus wurden Wiederfindungsraten zur Bestimmung der Extraktionseffizienz bestimmt und Blindwertmessungen durchgeführt. Als Chinonverbindungen wurden das Ubichinon-10 (UQ-10), das Ubichinon-0 (UQ-0) und das Vitamin K1 (K1) (alle: Alfa Aesar/ Thermo Fischer (Kandel) GmbH) sowie das Menachinon-4 (MK-4) (Santa Cruz Biotechnology) ausgewählt. Für die Kalibration wurde eine Verdünnungsreihe der Standards in Isopropanol/Methanol (20:80, v/v) erstellt. Sowohl Isopropanol (LC-MS CHROMASOLV[®], Fluka Analytika/ Sigma-Aldrich Chemie GmbH) als auch Methanol (HyperSolv CHROMANORM[®], VWR International GmbH) waren ohne weitere Reinigung für HPLC-Analysen geeignet.

4.2 Testmessungen

Für erste Untersuchungen wurden bereits extrahierte Proben des „Jena-Ecotron-Experiments“ von 2012 genutzt [37].

Dabei wurden dem „Jena Experiment“ Bodenblöcke entnommen und unter Kuppeln installiert, in denen der Wassergehalt, der Sauerstoffgehalt, der Kohlendioxidgehalt etc. kontrolliert wurden. In vorangegangenen Untersuchungen wurde hier bereits der Gehalt an PLFAs bestimmt. Etwa 70 g der Bodenproben wurden mittels Bligh&Dyer-Extraktion, mit Chloroform/Methanol/ Phosphat-Puffer, extrahiert und das sogenannte Total-Lipid-Extrakt erhalten. [37]

1,5 ml der zur Verfügung stehenden Total-Lipid-Extrakte wurden im N₂-Strom getrocknet und in 1 ml Isopropanol/Methanol (20:80, v/v) gelöst. Diese Proben wurden direkt mittels HPLC-MS/MS analysiert und auf RQs untersucht. Dabei wurden verschiedene HPLC-Methoden genutzt.

4.3 Bodenprobennahme und Aufarbeitung

Während dieser Arbeit wurden ebenfalls Bodenproben des „Jena Experiments“ untersucht. Dabei handelt es sich um ein Langzeit-Grasland-Diversitätsprojekt, welches 2002 in Jena (Standort: 50°55′ N, 11°35′ O, 130 m NN) begründet wurde. Die Gesamte Fläche ist in 82 Felder (20 x 20 m) unterteilt, welche nochmals in mehrere Teilparzellen (3,5 x 3,5 m) für unterschiedliche Versuche unterteilt sind (Abbildung 12). Der Diversitätsgradient dieser Felder variiert von 1 über 4, 8 und 16 bis 60 Pflanzenarten und 1 bis 4 funktionellen Gruppen von Pflanzen. Bei den ausgewählten funktionellen Gruppen handelt es sich um Gräser, Leguminosen, kleine und große Kräuter. [11]



Abbildung 12: Übersicht des Untersuchungsfeldes „Jena Experiment“ in der Saaleaue, Jena. Foto von A. Weigelt 2007 [12]

Die Bodenproben wurden im Mai 2016, in der Saaleaue, auf dem Gelände des „Jena Experiments“, mit einem Vorstecher gesammelt. Von den 10 cm langen Bohrkernen wurden jeweils die obersten 2 cm mit Pflanzen und die enthaltenen Wurzelteile entfernt (Abbildung 13).



Abbildung 13: Probennahme mit Vorstecher

Pro Feld wurde eine Mischprobe aus drei Kernen genommen. Insgesamt wurden 82 Teilparzellen beprobt. Alle feuchten Bodenmischproben wurden über ein 2 mm Maschensieb gesiebt, enthaltene Wurzeln entfernt und bis zur Extraktion bei -20 °C gelagert.

Im Folgenden wird die verwendete Methode zur Extraktion der Chinon-Verbindungen (RQ-Methode) beschrieben. Die gefrorenen Bodenproben wurden unter Verwendung einer modifizierten Bligh&Dyer-Extraktion und unter Verwendung des Extraktions-Automaten Speed Extractor E-916 (Büchi) extrahiert.

Für die Extraktion wurden nur die 20 Proben des Blockes B2 genutzt und eine Einfachbestimmung durchgeführt. Dafür wurden 10 g des feuchten Bodens in Extraktionskammern eingewogen, mit Sand vermischt und bei 70 °C und 120 bar eine Stunde in insgesamt drei Zyklen mit einem Gemisch aus Chloroform (SupraSolv®, Merck Chemicals GmbH), Methanol und Dikaliumhydrogenphosphat (1051041000, Merck Chemicals GmbH) gelöst in bidestilliertem Wasser (TOC <18,5 µS) (2:1:0,8; v/v/v) extrahiert. Das Extrakt wurde mit 20 ml Chloroform und 20 ml bidestilliertem Wasser versetzt und über Nacht im Kühlschrank gelagert. Dabei kam es zur Trennung der wässrigen und organischen Phase. Die wässrige, salzhaltige Phase wurde verworfen und die organische, chloroformhaltige Phase wurde mit dem Evaporator Syncore (Büchi) bei 60 °C auf etwa 4 ml eingengt.

Anschließend erfolgte die Separation der verschiedenen Lipidgruppen mit Festphasenextraktion an einer Silikatsäule (CHROMABOND®, 2 g SiOH, Macherey-Nagel). Nach Konditionierung der Kartusche mit 12 ml Chloroform wurde das Extrakt auf die Silikatphase aufgegeben und neutrale Lipide, Glycolipide und Phospholipide mit 12 ml Chloroform, 12 ml Aceton (SupraSolv®, Merck KGaA) und 48 ml Methanol eluiert. Die Acetonphase wurde verworfen. Die Methanolphase wurde auf etwa 20 ml eingengt und für eventuelle spätere Untersuchungen bei -20 °C gelagert. Die Chloroformphase, in welcher sich ebenfalls die respiratorischen Chinone befinden, wurde im N₂-Strom bis zur vollständigen Trockenheit eingengt und das reine Extrakt bis zur chromatographischen Analyse bei -20 °C gelagert, kurz vor der Analyse erfolgte die Lösung des Extraktes in 1 ml Isopropanol/Methanol (20:80, v/v) und für 10 min mit Ultraschall (35 kHz) weiter gelöst. Später zeigte sich, dass eine Lösung mit Isopropanol/Methanol (50:50, v/v) besser geeignet ist, da sonst einige unpolare Chinonverbindungen ungelöst bleiben. Von dem einen ml Probe wurden 200 µl

abgenommen, über Spritzenvorsatzfilter (MULTOCLEAR-13 PTFE 0,45 μm , Chromatographie Service GmbH) in Vials mit Einsatz (*vial inserts*, 200 μl) filtriert und Aliquote zur Analyse verwendet.

4.4 Analytische Messungen

4.4.1 Grundlagen HPLC

Mit Hilfe der HPLC kann das RQ-Gemisch, welches auch noch andere Verbindungen enthalten kann, gut nach der Masse, Polarität bzw. Länge der Isopren-Seitenkette getrennt werden und so die Bestimmung der Analyten verbessert werden. Während die Analyten im Lösungsmittel gelöst vorliegen und durch die gepackte C18-Säule fließen sorbieren die verschiedenen Analyten entsprechend ihrer Polarität an die Partikel der Festphase [27]. Dadurch wird ihre Retention verringert und das Gemisch so getrennt. Die Stärke der Adsorption von Analyten an unpolaren Festphasen hängt mit der Polarität der Analyten. Je nach Zusammensetzung der mobilen Phase (Isopropanol/Methanol) ändern sich auch die Retentionszeiten der Verbindungen, da sich ein Gleichgewicht sowohl zwischen Analyt und mobiler Phase, als auch zwischen Analyt und fester Phase ausbildet [38]

Im verwendeten System aus C18-Säule und Isopropanol/Methanol-Gemisch als Laufmittel besitzen kleine polare Moleküle geringe Retentionszeiten. Die Elutionsstärke des Laufmittels nimmt mit der Länge der Isopren-Seitenkette und daraus resultierender Abnahme der Polarität ab. Verbindungen mit partiell gesättigten Isopren-Einheiten sind etwas unpolarer als ihre ungesättigten Vertreter und besitzen dementsprechend höhere Retentionszeiten.

4.4.2 Chromatographische Trennung

Die chromatographische Trennung der Extrakte erfolgte mittels HPLC (UltiMate 3000, Dionex Softron GmbH) unter Verwendung einer RP-C18-Säule (ZORBAX Eclipse Plus C18 RRHD, 2,1 x 100 mm, Partikelgröße 1,8 μm , Agilent Technologies) und einer Vorsäule (ZORBAX Eclipse Plus C18, 2,1x5 mm, Partikelgröße 1,8 μm). Die Thermostatterperatur betrug 30 °C und die Injektortemperatur 10 °C. Der Fluss des Laufmittels wurde, je nach Versuch, zwischen 0,3 und 0,5 ml/min variiert und das Laufmittel bestand aus einem Gemisch aus Isopropanol und Methanol (10:90 oder

20:80, v/v). Die Injektion der Proben und Standards erfolgte mit Hilfe eines Autosamplers. Das Injektionsvolumen betrug immer 10 µl.

Die Messungen der extrahierten Proben und der zugehörigen Kalibrationen erfolgte mit den Einstellungen des Versuches 5. Kapitel 2.4 und 2.5 beinhalten die resultierenden Ergebnisse.

Tabelle 10: Übersicht der HPLC-Methodenparameter

Versuch 1	isokratische Methode Flussrate: 0,3 ml/min Laufmittel: Isopropanol/Methanol (10:90, v/v)
Versuch 2	isokratische Methode Flussrate: 0,5 ml/min Laufmittel: Isopropanol/Methanol (10:90, v/v)
Versuch 3	Gradienten Programm Flussrate 0,3 ml/min Laufmittel: Isopropanol/Methanol (10:90, v/v) (6 min) und Isopropanol/Methanol (20:80, v/v) (13,9 min), Rampe: 0,1 min
Versuch 4	Gradienten Programm Flussrate 0,5 ml/min Laufmittel: Isopropanol/Methanol (10:90, v/v) (6 min) und Isopropanol/Methanol (20:80 v/v) (13,9 min), Rampe: 0,1 min
Versuch 5	Isokratische Methode Flussrate: 0,3 ml/min Laufmittel: Isopropanol/Methanol (20:80, v/v)

4.4.3 Grundlagen MS

Sowohl die Ionisierung mit APCI, als auch ESI sind schonende Fragmentierungsmethoden, wobei APCI eine bessere Fragmentierung unpolarer Verbindungen aufweist. Weitere Vorteile der APCI sind, dass keine mehrfach geladenen Ionen $[M+nH]^{n+}$ generiert werden und dass der gesamte Volumenstrom der HPLC in das MS eingetragen werden kann. Eine Ionisierung von langkettigen unpolaren Verbindungen, wie den RQs, ist schlecht mit einer ESI-Quelle durchführbar, da mit ESI besser polare Verbindungen ionisiert werden können. Die Ionisierung mittels APCI ist robust, sensitiv, zuverlässig und weniger anfällig für chemische Interferenzen als eine Ionisierung mittels ESI [27]. Der generelle Aufbau eines MS-Gerätes besteht

aus einer Ionenquelle, einem Konus als Verbindung zwischen Normaldruck-Raum und Vakuum-Raum, einem Massenanalysator, dem Detektor und einer Auswerteeinheit. Bei der APCI wird die Analyt-Lösung über eine Kapillare in das Quellen-Interface geleitet. Dabei wird die Lösung vorgeheizt und das Lösungsmittel verdampft. Der Analyt wird mit Hilfe von Elektronen, welche durch eine Korona-Entladung generiert wurden, ionisiert. Über Konen und Magnet-Linsen erfolgt die Fokussierung der Ionen im MS. Wo sie mittels Quadrupol anhand ihrer m/z -Verhältnisse getrennt und in der *Ion Trap* Ionenfalle durch Energiezufuhr fragmentiert werden. [27]

4.4.4 Massenspektrometrische Detektion

Für die Detektion und Generierung der MS-Fragmentspektren wurde ein Massenspektrometer mit APCI-Ionenquelle (Orbitrap Elite, Thermo Fisher Scientific Inc.) verwendet. Gemessen wurde im positiven Modus, sowohl das gesamte Spektrum (*full scan*), als auch im Einzelreaktionsmodus (*single reaction mode*, SRM) mit kollisionsinduzierter Dissoziation (*collision induced dissoziation*, CID). Die Ionisierung mittels APCI bei 250 °C und Analyse der Chinone erfolgte bei gleichbleibenden Bedingungen.

Zur Bestimmung der Fragmentspektren, der Qualifier bzw. Quantifier und zur Optimierung der Quellen-Parameter wurden Standardverbindungen mit Hilfe einer Glasspritze und einer Spritzenpumpe in die APCI-Quelle geleitet. Die Spritzenpumpe erzeugte einen Fluss von $10 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$, welcher über ein T-Stück in einen Lösungsmittelfluss mit $300 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$, von der HPLC kommend, injiziert wurde. Die Standards wurden in Isopropanol/Methanol (20:80 v/v) gelöst und die Analytkonzentration betrug jeweils $1 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$.

Die Bestimmung der Retentionszeiten der hier relevanten RQs erfolgte durch 34 Einzelmessungen eines Total-Lipid-Extraktes das 2012 extrahiert wurde [37]. Bei jedem Lauf wurde eine andere Muttermasse $[M+H]^+$ bzw. ein anderes Chinon gesucht. Als Grundlage dienten anhand der Summenformeln berechnete exakte Molmassen jeder Verbindung (Anhang 1) und Addition der Masse eines H-Atoms. Anhand der Massenspektren konnten spezifische Fragmentmuster gefunden werden und intensive Peaks als Quantifier (Q1) oder Qualifier (Q2 und Q3) genutzt werden (Anhang 2). Die nötige Anregungsenergie wurde der Größe und Stabilität des jeweiligen Moleküls angepasst, dabei dienten Untersuchungen von *Geyer et al.* [17] als Grundlagen.

4.5 Versuche zur Methodvalidierung

4.5.1 Kalibrationskenndaten

Aus dem Standardgemisch wurden 18 Kalibrationslösungen durch Verdünnung hergestellt und mittels HPLC-MS/MS gemessen. Die Konzentrationen lagen dabei zwischen 0,5 pg/ μ l und 5000 pg/ μ l. Die Intensitäten bzw. Peakflächen der zuvor bestimmten Quantifier wurden zur qualitativen und quantitativen Bestimmung genutzt. Auf Grundlage der Kalibrationen erfolgten eine Linearitätsanalyse sowie die Bestimmung der Nachweis-, Erfassungs-, und Bestimmungsgrenzen der Standardverbindungen. Wichtige Formeln sind in 4.6 zusammengefasst.

4.5.2 Selektivität und Stabilität

Zu überprüfen war ebenfalls die selektive Auftrennung und Detektion der RQs. Dies wurde durch Messung von natürlichen Neutrallipid-Extrakten, welche aus nicht genau untersuchten unterschiedlichen langkettigen Alkanen, isoprenoide Verbindungen und Steroiden bestand, untersucht. Die Trennung erfolgte analog zu Versuch 5 und bei der MS-Detektion wurde nach spezifischen Mutterionen gesucht und diese gezielt fragmentiert. Zudem wurden die Stabilität der Retentionszeiten und der Peakflächen durch Wiederholbestimmungen der Standardverbindungen und der gewonnenen Extrakte untersucht.

4.5.3 Blindwertmessungen

Alle genutzten Glasgeräte, wie Vials, 10 ml Gläschen wurden ohne weitere Vorbereitung verwendet. Die zur Herstellung der Kalibrationslösungen und zum Aliquotieren der Probenextrakte genutzte Glasspritze (500 μ l) wurde vor Verwendung und zwischen den Extrakten 10-mal mit dem Lösungsmittelgemisch gespült um eventuelle Rückstände zu entfernen. Die zur Filtration verwendeten Spritzenvorsatzfilter wurden 3-mal mit dem Lösungsmittelgemisch gespült und vor Verwendung durch spülen mit Luft getrocknet. Um Verfälschung der Messwerte durch zum Beispiel Verunreinigungen im Lösungsmittel oder anderen genutzten Geräten und Chemikalien auszuschließen wurden sowohl der Methodenblindwert als auch der Blindwert des Gerätes ermittelt.

Für die Methoden-Blindwerte wurde Seesand (extra rein, Merck KGaA) als Blindprobe entsprechend der RQ-Methode (4.3) extrahiert, fraktioniert, eingengt, in Isopropanol/Methanol (20:80, v/v) gelöst, mittels HPLC separiert und mit MS detektiert. Für den Geräte-Blindwerte wurden 10 µl des reinen Lösungsmittelgemisches (Isopropanol/Methanol (20:80, v/v)) in das HPLC-APCI-MS/MS-Gerät injiziert, eventuelle Inhaltstoffe entsprechend getrennt und detektiert. Die Detektion erfolgte in beiden Fällen anhand der Muttermassen, Fraktionierungs-Muster und spezifischen Fraktionsmassen.

4.5.4 Extraktionseffizienz

Bei der Extraktion von Bodenproben u.a. kann es im Laufe der Methode zu Verlusten der Analyten kommen. Inwieweit dies auf die vorliegende Methode zutrifft wurde bei den Versuchen zur Extraktionseffizienz überprüft. Dabei wurden einer Probe reinen Seesandes eine definierte Menge der vier Standardverbindungen zugegeben. Diese Proben wurden entsprechend der RQ-Methode behandelt.

4.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten wurde mit Hilfe von Microsoft Excel 2007 und CANOCO 5 durchgeführt.

Bei der Kalibration wurde nach Betrachtung der Wertepaare aus Konzentration x und Peakfläche y davon ausgegangen, dass ein linearer Zusammenhang besteht. Daher wurde eine Kalibriergerade 1. Grades bestimmt (Gleichung 1) [39, 40]. Die beiden Parameter Anstieg b und Achsenschnittpunkt a wurden mit Gleichung 2 und 3 berechnet, unter Verwendung der Gehaltsgrößen der Kalibration x_i , der Messwerte der Kalibrierproben y_i sowie den arithmetischen Mittelwerten \bar{x} und \bar{y} .

$$y = a + bx \quad \text{Gleichung 1}$$

$$b = \frac{\sum_i (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2} \quad \text{Gleichung 2}$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad \text{Gleichung 3}$$

Die Linearität der Kalibriergeraden wurde mit Hilfe des MANDEL-Tests überprüft (Gleichung 4) [41]. Der Tabellenwert F wurde über die Funktion $FINV(\alpha; f_1; f_2)$ bestimmt. Wenn der Tabellenwert größer gleich dem Prüfwert \hat{F} , welcher mit Hilfe der

Reststandardabweichungen einer Funktion 1. Grades (s_{y1}) bzw. 2. Grades (s_{y2}) sowie der Anzahl der Kalibrierproben n berechnet wird, ist liegt eine lineare Funktion vor. Die benötigten Werte zur Berechnung wurden mit der Excel-Funktion *RGP* berechnet.

$$\hat{F} = \frac{(n-2)s_{y1}^2 - (n-3)s_{y2}^2}{s_{y2}^2} \quad \text{Gleichung 4}$$

Durch Mehrfachmessungen der Analysenwerte konnten Fehler über die jeweilige Standardabweichung abgeschätzt werden (Gleichung 5) [41]. Die Berechnung erfolgt mit Hilfe der Gehaltsgrößen der Kalibration x_i , dem arithmetischen Mittel der Gehalte aller Kalibrierproben \bar{x} und der Anzahl der Messungen m .

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{m-1}} \quad \text{Gleichung 5}$$

Die Bestimmung der Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze (Gleichung 6-8) erfolgte nach DIN 32645 [42, 43], unter Verwendung der Verfahrensstandardabweichung s_{x0} , den Quantilen der t-Verteilung $t_{f,\alpha}$ bzw. $t_{f,\alpha/2}$, der Anzahl an Wiederholbestimmungen m , der Anzahl an Kalibrierproben n , dem arithmetischen Mittelwert \bar{x} , der Summe der Abweichungsquadrate von x bei der Kalibration Q_x sowie einem relativen Fehlerwert k . Die Werte der t-Verteilung wurden über die Funktion *TINV*($\alpha;f$) erhalten. Die Verfahrensstandardabweichung wurde aus dem Quotienten der Reststandardabweichung und dem Kalibriergeradenanstieg b berechnet (Gleichung 9). Zur Bestimmung der Reststandardabweichung wurden die geschätzten Funktionswerte der Kalibrierung \hat{y}_i , die Messwerte der Kalibrierproben y_i und die Anzahl der Kalibrierproben n genutzt.

$$NG = s_{x0} * t_{f,\alpha} * \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{Q_x}} \quad \text{Gleichung 6}$$

$$EG = 2 * NG \quad \text{Gleichung 7}$$

$$BG = k * s_{x0} * t_{f,\alpha/2} * \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{k * NG * \bar{x}^2}{Q_x}} \quad \text{Gleichung 8}$$

mit: $f = 9$; $\alpha = 0,05$; $k = 3$

$$s_{x0} = \frac{s_{y,x}}{b} = \frac{1}{b} * \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y_i)^2}{n - 2}}$$

Gleichung 9

Bei der Hauptkomponentenanalyse (PCA, *principal component analysis*) handelt es sich um eine indirekte Gradientenanalyse. In dieser Arbeit werden die Molfraktionen der RQs in nmol% als Variablen berücksichtigt und die Ähnlichkeit zwischen den 20 Proben in Abhängigkeit der RQ-Zusammensetzung analysiert. Zudem wurde bei einer weiteren PCA neben den relativen Anteilen der Chinone auch die relativen Anteile von PLFAs in den Proben beachtet. Diese Analyse sollte Hinweise auf ein ähnliches Verhalten der Verbindungen liefern. Da bestimmte Verbindungen beider Stoffgruppen bestimmten Bakterienklassen zugeordnet werden können, sollten theoretisch Zusammenhänge sichtbar gemacht werden können.

Die Redundanzanalyse (RDA, *redundancy analysis*) zählt zu den direkten Gradientenanalysen und fasst Beziehungen zwischen mehreren Antwortvariablen (*response variables*) zusammen. So kann in dieser Arbeit zum Beispiel die Größe und Signifikanz der Korrelation verschiedener Umweltparameter, wie Bodenzusammensetzung, pH-Wert, Anionen, Kationen, funktionelle Gruppen der Pflanzen, mikrobieller Kohlenstoff, Pflanzen-Biomasse, Mikrobielle Biomasse etc., auf die Chinonzusammensetzung der Proben untersucht werden. Da die zur Verfügung stehenden Umweltfaktoren (23) etwa gleich der Probenanzahl (20) dieser Arbeit ist können beim gleichzeitigen Testen aller Umweltfaktoren zufällige Korrelationen auftreten und so das Ergebnis verfälscht werden. Aus diesem Grund wurden wichtige Umweltparameter herausgenommen, in 4 Gruppen gegliedert und die RDA viermal mit unterschiedlichen Variablengruppen durchgeführt. Bei den Gruppen handelte es sich um a) Designvariablen, wie funktionelle Gruppe der Pflanzen, Pflanzenartenzahl, Anzahl Gräser, Anzahl Kräuter und Anzahl Leguminosen, b) Bodenparameter, wie pH-Wert, organischer Kohlenstoff, Stickstoffgehalt, Sandanteil, Tonanteil, Basalrespiration und mikrobieller Kohlenstoff, c) Pflanzenvariablen, wie Wurzelanteil, Anteil an totem organischen Material, Logarithmus der Biomasseanteile und Blattflächenindex sowie d) Wasserparameter, wie Chlorid-, Fluorid-, Sulfat-, Calcium-, Magnesium- und Natriumgehalt. Die Betrachtung der, mit den jeweiligen Variablen, erklärten Varianz in den Chinonzusammensetzungen zwischen den Proben und der zu den Variablen berechneten Signifikanzen P führte zu einer Einschränkung der Umweltfaktoren auf die anscheinend bedeutendsten Einflussfaktoren zur Erklärung der Varianz. Dabei wurden

Parameter mit P kleiner 0,05 als signifikant angesehen und Parameter mit P kleiner 0,1 als marginal signifikant. Alle Parameter für die galt P kleiner 0,1 wurden für eine weitere RDA berücksichtigt.

Für den Vergleich der Ergebnisse der RQ-Analyse mit denen der bereits vorhandenen PLFA-Analyse wurde eine Korrelationsmatrix genutzt. Die Berechnung erfolgte anhand der relativen Abundanzen der jeweiligen Marker in allen 20 Proben. Für diese Arbeit wurde festgelegt, dass ein Korrelationskoeffizient r größer gleich 0,5 auf eine Korrelation der Substanzen hindeutet. Je größer r desto stärker ist die Korrelation. Werte kleiner 0,5 deuten auf geringe bis keine Korrelation zwischen den verschiedenen Markern hin.

5 Literaturverzeichnis

- [1] SAITOU, Katsuaki ; NAGASAKI, Ken-ichiro ; YAAMAKAWA, Haruyoshi ; HU, Hong Ying ; FUJIE, Koichi ; KATAYAMA, Arata: *Linear Relation between the Amount of Respiratory Quinones and the Microbial Biomass in Soil*. In: *Soil. Sci. Plant Nutr.* 45 (1999), Nr. 3, S. 775–778
- [2] GRAYSTON, Susan J. ; WANG, Shenquiang ; CAMPBELL, Colin D. ; EDWARDS, Anthony C.: *Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere*. In: *Soil Biology and Biochemistry* 30 (1998), Nr. 3, S. 369–378
- [3] BERG, Gabriele ; SMALLA, Kornelia: *Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere*. In: *FEMS microbiology ecology* 68 (2009), Nr. 1, S. 1–13
- [4] ROUSK, Johannes ; BAATH, Erland ; BROOKES, Philip C. ; LAUBER, Christian L. ; LOZUPONE, Catherine ; CAPORASO, J. Gregory ; KNIGHT, Rob ; FIERER, Noah: *Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil*. In: *The ISME journal* 4 (2010), Nr. 10, S. 1340–1351
- [5] FIERER, Noah ; JACKSON, Robert B.: *The diversity and biogeography of soil bacterial communities*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (2006), Nr. 3, S. 626–631
- [6] LAUBER, Christian L. ; STRICKLAND, Michael S. ; BRADFORD, Mark A. ; FIERER, Noah: *The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types*. In: *Soil Biology and Biochemistry* 40 (2008), Nr. 9, S. 2407–2415
- [7] OTTOW, Johannes C. G.: *Mikrobiologie von Böden : Biodiversität, Ökophysiologie und Metagenomik*. Berlin, Heidelberg : Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2011 (Springer-Lehrbuch)
- [8] LANGE, Markus ; HABEKOST, Maike ; EISENHAUER, Nico ; ROSCHER, Christiane ; BESSLER, Holger ; ENGELS, Christof ; OELMANN, Yvonne ; SCHEU, Stefan ; WILCKE, Wolfgang ; SCHULZE, Ernst-Detlef ; GLEIXNER, Gerd: *Biotic and abiotic properties mediating plant diversity effects on soil microbial communities in an experimental grassland*. In: *PloS one* 9 (2014), Nr. 5, S. e96182
- [9] ZAK, Donald R. ; HOLMES, William E. ; WHITE, David C. ; PEACOCK, Aaron D. ; TILMAN, David: *PLANT DIVERSITY, SOIL MICROBIAL COMMUNITIES, AND*

- ECOSYSTEM FUNCTION: ARE THERE ANY LINKS?* In: *Ecology* 84 (2003), Nr. 8, S. 2042–2050
- [10] MARSCHNER, Petra ; YANG, Ching-Hong ; LIEBEREI, Reinhard ; CROWLEY, David E.: *Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere*. In: *Soil Biology and Biochemistry* 33 (2001), Nr. 11, S. 1437–1445
- [11] ROSCHER, Christiane ; SCHUMACHER, Jens ; BAADE, Jussi ; WILCKE, Wolfgang ; GLEIXNER, Gerd ; WEISSER, Wolfgang W. ; SCHMID, Bernhard ; SCHULZE, Ernst-Detlef: *The role of biodiversity for element cycling and trophic interactions : An experimental approach in a grassland community*. In: *Basic and Applied Ecology* 5 (2004), Nr. 2, S. 107–121
- [12] EISENHAUER, Nico ; BEBLER, Holger ; ENGELS, Christof ; GLEIXNER, Gerd ; HABEKOST, Maike ; MILCU, Alexandru ; PARTSCH, Stephan ; SABAIS, Alexander C.W. ; SCHERBER, Christoph ; STEINBEISS, Sibylle ; WEIGELT, Alexandra ; WEISSER, Wolfgang W. ; SCHEU, Stefan: *Plant diversity effects on soil microorganisms support the singular hypothesis*. In: *Ecology* 91 (2010), Nr. 2, S. 485–496
- [13] HIRAISHI, Akira ; KATO, Kenji: *Quinone profiles in lake sediments. Implications for microbial diversity and community structures*. In: *The Journal of General and Applied Microbiology* 45 (1999), Nr. 5, S. 221–227
- [14] HIRAISHI, Akira: *Isoprenoid Quinones as Biomarkers of Microbial Populations in the Environment*. In: *Journal of Bioscience and Bioengineering* 88 (1999), Nr. 5, S. 449–460
- [15] COLLINS, Matthew D. ; JONES, Dorothy: *Distribution of Isoprenoid Quinone Structural Types in Bacteria and Their Taxonomic Implications*. In: *Microbiological Reviews* 45 (1981), Nr. 2, S. 316–354
- [16] BUSSE, Hans-Jürgen ; DENNER, Ewald B.M. ; LUBITZ, Werner: *Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics*. In: *Journal of Biotechnology* 47 (1996), S. 3–38
- [17] GEYER, Roland ; PEACOCK, Aaron D. ; WHITE, David C. ; LYTLE, Cory ; VAN BERKEL, Gary J.: *Atmospheric pressure chemical ionization and atmospheric pressure photoionization for simultaneous mass spectrometric analysis of*

- microbial respiratory ubiquinones and menaquinones*. In: *Journal of Mass Spectrometry* 39 (2004), Nr. 8, S. 922–929
- [18] NOWICKA, Beatrycze ; KRUK, Jerzy: *Occurrence, biosynthesis and function of isoprenoid quinones*. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1797 (2010), Nr. 9, S. 1587–1605
- [19] LI, Yi-Liang ; PEACOCK, Aaron D. ; WHITE, David C. ; GEYER, Roland ; ZHANG, Chuanlun L.: *Spatial patterns of bacterial signature biomarkers in marine sediments of the Gulf of Mexico*. In: *Chemical Geology* 238 (2007), 3-4, S. 168–179
- [20] HIRAIISHI, Akira ; IWASAKI, Mitsuru ; KAWAGISHI, Tomoki ; YOSHIDA, Naoko ; NARIHIRO, Takashi ; KATO, Kenji: *Significance of Lipoquinones as Quantitative Biomarkers of Bacterial Populations in the Environment*. In: *Microbes and Environments* 18 (2003), Nr. 2, S. 89–93
- [21] FUJIE, Koichi ; HU, Hong-Ying ; TANAKA, Hajime ; URANO, Kohei ; SAITOU, Katsuki ; KATAYAMA, Arata: *Analysis of Respiratory Quinones in Soil for Characterization of Microbiota*. In: *Soil Sci. Plant Nutr.* 44 (1998), Nr. 3, S. 393–404
- [22] KUNIHIRO, Tadao ; VEUGER, Bart ; VASQUEZ-CARDENAS, Diana ; POZZATO, Lara ; LE GUITTON, Marie ; MORIYA, Kazuyoshi ; KUWAE, Michinobu ; OMORI, Koji ; BOSCHKER, Henricus T. S. ; VAN OEVELEN, Dick: *Phospholipid-derived fatty acids and quinones as markers for bacterial biomass and community structure in marine sediments*. In: *PloS one* 9 (2014), Nr. 4, S. e96219
- [23] TAKASU, Hiroyuki ; KUNIHIRO, Tadao ; NAKANO, Shin-ichi: *Estimation of carbon biomass and community structure of planktonic bacteria in Lake Biwa using respiratory quinone analysis*. In: *Limnology* 14 (2013), Nr. 3, S. 247–256
- [24] SONG, Dejun ; KATAYAMA, Arata: *Monitoring microbial community in a subsurface soil contaminated with hydrocarbons by quinone profile*. In: *Chemosphere* 59 (2005), Nr. 3, S. 305–314
- [25] HEDRICK, David B. ; WHITE, David C.: *Microbial respiratory quinones in the environment*. In: *Journal of Microbiological Methods* 5 (1986), 5-6, S. 243–254
- [26] COLLINS, Matthew D.: *Analysis of Isoprenoid Quinones*. In: *Methods in Microbiology* 18 (1985), S. 329–366

- [27] N.N.: *Mass Spectrometry, Fundamental LC-MS, Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (APCI)*. URL www.chromacademy.com
- [28] GILLAN, Frank T. ; JOHNS, R. B.: *Normal-phase HPLC Analysis of Microbial Carotenoids and Neutral Lipids*. In: *Journal of Chromatographic Science* 21 (1983), Nr. 1, S. 34–38
- [29] *Allgemeine Mikrobiologie : 53 Tabellen*. 8., vollst. überarb. und erw. Aufl. Stuttgart : Thieme, 2007
- [30] TRUFELLI, Helga ; PALMA, Pierangela ; FAMIGLINI, Giorgio ; CAPPIELLO, Achille: *An overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry*. In: *Mass spectrometry reviews* 30 (2011), Nr. 3, S. 491–509
- [31] N.N.: *Common LC/MS Contaminants*. URL [www.cigs.unimo.it/CigsDownloads/labs/lcmsit/Contaminants Ion Trap.doc](http://www.cigs.unimo.it/CigsDownloads/labs/lcmsit/Contaminants%20Ion%20Trap.doc)
- [32] MELLADO-VAZQUEZ, Perla G.: *Plant and soil related effects on the soil microbial community composition and soil microbial carbon dynamics*. Universität Jena. Dissertation. 2016
- [33] LEPŠ, Jan ; ŠMILAUER, Petr: *Multivariate Analysis of Ecological Data using CANOCO*. Cambridge, New York : Cambridge University Press, 2003
- [34] CAJO J.F. TER BRAAK: *Unimodal models to relate species to environment*, 1996
- [35] RUESS, Liliane ; CHAMBERLAIN, Paul M.: *The fat that matters : Soil food web analysis using fatty acids and their carbon stable isotope signature*. In: *Soil Biology and Biochemistry* 42 (2010), Nr. 11, S. 1898–1910
- [36] PAUL, Eldor Alvin (Hrsg.): *Soil microbiology, ecology, and biochemistry*. 3rd ed. Amsterdam : Elsevier/Academic Press, 2007
- [37] MELLADO-VÁZQUEZ, Perla G. ; LANGE, Markus ; BACHMANN, Dörte ; GOCKELE, Annette ; KARLOWSKY, Stefan ; MILCU, Alexandru ; PIEL, Clement ; ROSCHER, Christiane ; ROY, Jacques ; GLEIXNER, Gerd: *Plant diversity generates enhanced soil microbial access to recently photosynthesized carbon in the rhizosphere*. In: *Soil Biology and Biochemistry* 94 (2016), S. 122–132
- [38] MEYER, Veronika R.: *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie*. 10., vollst. überarb. und erw. Aufl. Weinheim : Wiley-VCH, 2009

- [39] MILLER, James N. ; MILLER, Jane C.: *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*. 4. Aufl. Harlow, England : Prentice Hall, 2000
- [40] DOERFFEL, Klaus: *Statistik in der analytischen Chemie*. 4., durchges. Aufl. Leipzig : Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, 1987
- [41] KRUIVE, Anneli ; REBANE, Riin ; KIPPER, Karin ; OLDEKOP, Maarja-Liisa ; EVARD, Hanno ; HERODES, Koit ; RAVIO, Pekka ; LEITO, Ivo: *Tutorial review on validation of liquid chromatography-mass spectrometry methods: part I*. In: *Analytica chimica acta* 870 (2015), S. 29–44
- [42] DIN 32645. 2008. *Chemische Analytik - Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen - Begriffe, Verfahren, Auswertung*
- [43] MOLT, K. ; TELGHEDER, U.: *Berechnung der Verfahrensstandardabweichung und Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze aus einer Kalibrierung gemäß DIN 32645*. 2010

6 Anhang

Anhang 1: Übersicht relevanter Chinonverbindungen

Chinonverbindung	CAS-Nummer	exakte Molmasse ¹ [g*mol ⁻¹]	Summenformel	logP ²
Ubichinone				
UQ-0	605-94-7	182,057909	C9H10O4	0,8 ^a
UQ-5 ³	-		C34H50O4	2,61 ^a
UQ-6 ³	1065-31-2	590,43351	C39H58O4	12,79 ^a
UQ-7 ³	188652-08-6	658,496111	C44H66O4	14,82 ^a
UQ-8	2394-68-5	726,558711	C49H74O4	16,86 ^a
UQ-9	303-97-9	794,621311	C54H82O4	18,98 ^a
UQ-10	303-98-0	862,683911	C59H90O4	20,93 ^a
UQ-10(H2)	3073-95-8	864,699561	C59H92O4	-
UQ-10(H4)	91224-34-9; 115721-97-6	866,715212	C59H94O4	-
Menachinone				
MK-4	863-61-6	444,302831	C31H40O2	10,94 ^a
MK-4(H2) ³	-	446,318481	C31H42O2	-
MK-5	1182-68-9	512,365431	C36H48O2	-
MK-6	84-81-1	580,428031	C41H56O2	15,01 ^a
MK-7	2124-57-4	648,490631	C46H64O2	17,05 ^a
MK-7(H2)	105165-45-5	650,506281	C46H66O2	-
MK-7(H4)	86155-15-9	652,521931	C46H68O2	-
MK-8	523-38-6	716,553232	C51H72O2	19,08 ^a
MK-8(H2)	21632-35-9	718,568882	C51H74O2	-
MK-8(H4)	62075-99-4	720,584532	C51H76O2	-
MK-8(H6)	61540-54-3	722,600182	C51H78O2	-
MK-9	523-39-7	784,615832	C56H80O2	21,11 ^a
MK-9(H2)	13201-12-2	786,631482	C56H82O2	-
MK-9(H4)	26793-71-5	788,647132	C56H84O2	-
MK-9(H6)	98259-86-0; 61565-44-4; 75088-30-1	790,662782	C56H86O2	-
MK-10	523-40-0	852,678432	C61H88O2	23,15 ^a
MK-11	19228-10-5	920,741032	C66H96O2	25,18 ^a
Demethylmenachinone				
DMK-6 ³	-	566,412381	C40H54O2	-

Fortsetzung Anhang 1: Übersicht relevanter Chinonverbindungen				
Chinonverbindung	CAS-Nummer	exakte Molmasse¹	Summenformel	logP²
DMK-7³	26111-04-6	634,474981	C45H62O2	14,036 ^b
DMK-8³	29790-47-4	702,537581	C50H70O2	15,923 ^b
DMK-9³	2197-56-0	770,600182	C55H78O2	17,809 ^b
Methylmenachinone				
MMK-7³	97274-14-1	663,514106	C47H66O2	14,725 ^b
MMK-8³	401894-97-1	731,576707	C52H74O2	16,612 ^b
Plastochinon				
PQ-9	4299-57-4	748,615832	C53H80O2	20,18 ^a
Phyllochinon				
K1	84-80-0	450,349781	C31H46O2	12,18 ^a

1: berechnet aus den Monoisotopenmassen der Elemente; 2: berechnet mit ACD/ Labs Percepta Platform, (a) ChemSpider.com entnommen; (b) SciFinder.com entnommen; 3: Verbindungen konnten in den Extrakten nicht eindeutig bestimmt werden; -: keine Angaben

Anhang 2: Parameter zur Detektion von Ubichinonen (UQ-n) und Menachinonen (MK-n) mit APCI.

Verbindung	AE [eV]	Q1	Q2	Q3
UQ-0	35,0	165,00	183,065734	-
UQ-8	44,0	197,08	727,566536	-
UQ-9	48,0	197,08	795,629136	-
UQ-10	52,0	197,08	863,691736	-
UQ-10(H2)	45,0	527,50	865,707386	197,081384
UQ-10(H4)	45,0	529,50	867,723037	197,081384
MK-4	38,0	427,35	445,310656	187,075905
MK-5	40,0	285,5	513,373256	187,075905
MK-6	41,0	563,4	581,435856	187,075905
MK-7	44,0	631,60	649,498456	187,075905
MK-7(H2)	44,0	633,60	651,514106	187,075905
MK-7(H4)	44,0	635,60	653,529756	187,075905
MK-8	48,0	699,60	717,561057	187,075905
MK-8(H2)	48,0	701,60	719,576707	187,075905
MK-8(H4)	48,0	187,07	721,592357	187,075905
MK-8(H6)	48,0	187,07	723,608007	187,075905
MK-9	52,0	599,60	785,623657	187,075905
MK-9(H2)	52,0	187,07	787,639307	187,075905
MK-9(H4)	52,0	187,07	789,654957	187,075905
MK-9(H6)	52,0	187,07	791,670607	187,075905
MK-10	53,0	599,60	853,686257	187,075905
MK-11	55,0	187,08	921,748857	-
PQ-9	44,0	521,50	749,623657	187,075905
K1	42,0	433,39	451,357606	187,075905

AE: Anregungsenergie in eV; Q1; m/z des Quantifier, Q2: m/z des ersten Qualifier, entspricht dem Mutterion $[M+H]^+$; Q3: m/z des zweiten Qualifier; m/z mit einer Genauigkeit von 500 ppm

Anhang 3: Zusammenfassung der gemessenen Umweltparameter

Probe	funktionelle Gruppen	Pflanzenartenzahl	Sandgehalt [%]	Tongehalt [%]	Schluffgehalt [%]
B2A01	4	4	37,10	19,34	43,57
B2A02	1	2	32,89	18,44	48,67
B2A03	4	60	29,76	19,30	50,94
B2A04	1	1	26,42	22,34	51,23
B2A05	1	1	22,39	23,62	53,98
B2A06	2	4	18,34	22,06	59,61
B2A08	2	2	26,49	23,53	49,98
B2A09	1	4	26,29	22,30	51,41
B2A10	2	16	20,08	18,53	61,40
B2A12	1	8	32,21	20,62	47,17
B2A13	1	1	30,19	20,11	49,71
B2A14	4	8	27,21	21,11	51,68
B2A15	1	1	23,14	23,66	53,20
B2A16	3	4	18,45	24,90	56,65
B2A17	2	8	14,30	24,28	61,41
B2A18	4	16	15,09	24,75	60,16
B2A19	1	2	18,73	25,84	55,44
B2A20	2	2	18,62	24,43	56,95
B2A21	3	8	13,83	20,91	65,26
B2A22	3	16	9,72	17,90	72,38

Probe	mikrob. Kohlenstoff [mg*g⁻¹]	Wurzelbiomasse [g*m⁻²]	Basalrespiration [µl O₂ h⁻¹ g⁻¹]	log_Biomasse	Masse totes organ. Material [g]
B2A01	942,66	114,44	2,45	2,02	5,03
B2A02	1076,10	372,11	1,85	1,85	7,12
B2A03	1068,29	439,75	2,56	2,31	2,33
B2A04	529,58	81,93	1,30	1,92	32,50
B2A05	704,70	320,32	2,33	1,67	8,40
B2A06	1075,43	206,61	2,07	1,98	3,41
B2A08	799,06	177,65	1,49	1,95	10,30
B2A09	1128,35	533,51	1,80	1,79	2,15
B2A10	893,06	609,79	2,28	1,90	2,60
B2A12	931,88	162,96	2,29	1,96	0,44
B2A13	845,32	80,21	2,14	1,39	4,75
B2A14	1098,98	46,71	1,96	1,86	3,02
B2A15	777,93	42,11	1,47	0,00	0,44
B2A16	1171,74	145,01	2,75	2,24	5,08
B2A17	924,77	228,39	2,21	2,01	1,69
B2A18	901,10	344,67	2,04	2,19	5,45
B2A19	964,47	317,21	1,80	1,84	3,74
B2A20	733,26	93,16	1,38	1,49	4,65
B2A21	1135,66	199,34	1,83	2,28	1,74
B2A22	686,04	412,33	2,17	2,18	9,09

Fortsetzung Anhang 3: Zusammenfassung der gemessenen Umweltparameter

Probe	organ. Kohlenstoff [mg*g⁻¹]	Stickstoff- gehalt [%]	Blattflächen -index	Boden-pH- Wert	Chlorid- gehalt
B2A01	2,44	0,28	1,72	7,43	11,75
B2A02	2,53	0,26	1,09	7,35	2,49
B2A03	3,13	0,32	3,51	7,25	0,57
B2A04	1,99	0,22	0,96	7,38	3,44
B2A05	2,23	0,25	1,30	7,42	0,21
B2A06	3,11	0,31	2,29	7,33	14,82
B2A08	2,87	0,29	2,51	7,34	7,50
B2A09	3,24	0,31	1,32	7,32	0,74
B2A10	3,44	0,33	1,70	7,31	0,82
B2A12	2,52	0,26	2,60	7,33	2,33
B2A13	2,21	0,23	0,71	7,42	0,29
B2A14	2,74	0,28	1,56	7,36	0,21
B2A15	2,48	0,26	0,54	7,42	2,70
B2A16	3,20	0,31	1,93	7,35	10,43
B2A17	3,05	0,31	1,54	7,33	4,76
B2A18	3,23	0,32	1,59	7,47	3,27
B2A19	3,19	0,31	1,22	7,34	10,06
B2A20	2,66	0,28	1,03	7,38	0,17
B2A21	3,13	0,32	2,29	7,28	0,21
B2A22	3,69	0,37	3,32	7,24	0,40
Probe	Fluorid- gehalt	Sulfatgehalt	Calcium- gehalt	Magnesium- gehalt	Natrium- gehalt
B2A01	0,60	20,74	84,78	9,18	8,06
B2A02	0,73	16,74	100,60	8,54	6,265
B2A03	0,81	24,57	94,43	8,93	7,69
B2A04	0,68	43,36	91,15	6,8	6,285
B2A05	0,59	37,05	78,98	8,47	6,213
B2A06	0,56	65,67	118,38	11,8	7,9
B2A08	0,66	59,48	112,78	11,1	9,1
B2A09	0,81	19,47	105,10	10	6,178
B2A10	0,48	45,00	108,00	14,2	6,048
B2A12	0,54	24,97	99,65	10,9	6,295
B2A13	0,89	21,68	97,00	6,66	4,555
B2A14	0,84	36,26	107,13	9,28	6,718
B2A15	0,68	97,85	104,55	9,01	9,543
B2A16	0,62	53,29	102,15	9,62	5,42
B2A17	0,59	42,24	111,10	10,3	5,355
B2A18	0,44	93,70	133,10	14,7	9,38
B2A19	0,58	31,15	111,35	10,6	4,663
B2A20	0,70	24,80	105,58	9,17	5,915
B2A21	0,66	32,62	108,23	10	5,73
B2A22	0,63	52,95	108,98	10,2	10,47

Anhang 4: Korrelationsmatrix									
	MK-5	MK-6	MK-7	MK-7(H2)	MK-7(H4)	MK-8	MK-8(H2)	MK-8(H4)	MK-8(H6)
14:0i	-0,193	-0,253	-0,306	-0,166	-0,270	-0,185	-0,155	-0,309	-0,048
14:0n	0,324	0,380	0,382	0,396	0,447	0,304	0,288	0,302	0,293
15:0a	-0,323	-0,430	-0,297	-0,295	-0,489	-0,183	-0,077	-0,206	-0,110
15:0i	0,041	0,001	-0,152	0,033	-0,099	-0,029	0,046	-0,200	0,161
15:1	0,173	0,300	0,292	0,168	0,288	0,211	0,123	0,234	0,028
15:1	0,289	0,384	0,450	0,373	0,454	0,312	0,265	0,295	0,187
16:0i	0,385	0,469	0,369	0,524	0,528	0,276	0,289	0,180	0,392
16:0n	-0,255	-0,274	-0,443	-0,289	-0,326	-0,299	-0,315	-0,378	-0,156
16:1	-0,416	-0,567	-0,464	-0,573	-0,648	-0,366	-0,356	-0,399	-0,419
16:1w12	0,276	0,353	0,378	0,280	0,418	0,231	0,145	0,234	0,053
16:1w5	-0,346	-0,395	-0,320	-0,501	-0,482	-0,244	-0,274	-0,231	-0,421
16:1w7c	0,367	0,193	0,096	0,102	0,134	0,018	0,045	0,144	0,079
17:0(10m)	0,173	0,224	0,088	0,297	0,200	0,203	0,229	0,268	0,441
17:0a	0,214	0,311	0,350	0,463	0,400	0,244	0,308	0,217	0,413
17:0br	0,006	0,023	0,110	-0,086	0,057	0,003	-0,076	0,126	-0,187
17:0br	0,335	0,320	0,502	0,365	0,428	0,357	0,342	0,363	0,162
17:0cy	-0,443	-0,178	-0,199	-0,189	-0,171	-0,121	-0,092	-0,107	0,027
17:0i	0,257	0,492	0,428	0,471	0,540	0,375	0,299	0,383	0,341
17:1	0,345	0,358	0,383	0,517	0,383	0,391	0,544	0,410	0,665
17:1	0,275	0,435	0,498	0,332	0,441	0,364	0,291	0,467	0,159
17:1w8c	0,314	0,521	0,545	0,480	0,617	0,358	0,297	0,432	0,269
18:0(10m)	0,500	0,619	0,562	0,584	0,665	0,404	0,355	0,444	0,372
18:0br	0,384	0,484	0,446	0,469	0,552	0,329	0,296	0,330	0,308
18:0n	0,110	0,199	0,292	0,322	0,385	0,087	0,107	0,195	0,177
18:1w5c	0,071	0,122	0,260	0,166	0,242	0,076	0,031	0,289	0,040
18:1w9c	0,033	0,027	-0,063	0,140	0,032	0,047	0,107	-0,030	0,189
18:2	0,259	0,391	0,371	0,281	0,433	0,253	0,151	0,260	0,086
18:2w6c	0,126	0,224	-0,004	0,157	0,228	0,013	-0,073	-0,113	-0,027
18:2w7c	-0,381	-0,481	-0,425	-0,513	-0,541	-0,360	-0,321	-0,364	-0,386
19:0(10 m)	0,202	0,359	0,297	0,453	0,455	0,238	0,242	0,304	0,399
19:0cy	-0,064	-0,135	-0,091	0,057	-0,087	-0,010	0,132	0,037	0,291
19:1	-0,164	-0,093	-0,045	-0,100	0,043	-0,151	-0,240	-0,094	-0,155

Fortsetzung Anhang 4: Korrelationsmatrix									
	MK-9	MK-9(H2)	MK-9(H4)	MK-9(H6)	UQ-8	UQ-9	UQ-10	UQ-10(H2)	UQ-10(H4)
14:0i	-0,102	-0,076	-0,125	-0,080	-0,164	0,044	0,232	-0,039	0,180
14:0n	0,238	0,251	0,236	0,238	0,343	-0,053	0,148	-0,071	-0,395
15:0a	-0,054	-0,071	-0,087	-0,047	-0,338	-0,067	-0,121	-0,062	0,410
15:0i	0,135	0,122	0,074	0,114	-0,225	-0,139	-0,155	0,492	0,065
15:1	0,004	0,015	0,017	0,007	0,458	0,128	0,182	-0,222	-0,362
15:1	0,156	0,169	0,177	0,162	0,373	-0,090	0,226	-0,191	-0,383
16:0i	0,327	0,332	0,305	0,317	0,128	-0,248	0,153	0,326	-0,381
16:0n	-0,184	-0,163	-0,163	-0,170	-0,457	-0,061	0,036	0,202	0,373
16:1	-0,387	-0,390	-0,383	-0,367	-0,262	0,274	-0,244	0,009	0,431
16:1w12	0,030	0,039	0,051	0,030	0,450	0,144	0,187	-0,033	-0,458
16:1w5	-0,351	-0,353	-0,320	-0,341	-0,122	0,140	-0,183	-0,258	0,371
16:1w7c	0,092	0,056	0,036	0,066	0,296	0,396	-0,178	0,165	-0,318
17:0(10m)	0,395	0,391	0,349	0,375	-0,017	-0,079	0,036	0,235	-0,184
17:0a	0,350	0,353	0,309	0,353	0,009	-0,382	0,111	0,114	-0,191
17:0br	-0,176	-0,185	-0,168	-0,190	0,325	0,291	-0,069	-0,149	-0,170
17:0br	0,204	0,174	0,225	0,174	0,456	0,022	-0,027	-0,082	-0,435
17:0cy	-0,103	-0,048	-0,092	-0,072	-0,098	-0,081	0,128	-0,338	0,237
17:0i	0,281	0,289	0,280	0,270	0,365	-0,104	0,195	0,111	-0,486
17:1	0,619	0,594	0,556	0,588	0,014	-0,389	-0,242	0,113	-0,187
17:1	0,182	0,164	0,187	0,161	0,507	0,028	0,075	-0,218	-0,450
17:1w8c	0,234	0,234	0,260	0,222	0,331	-0,213	0,135	-0,127	-0,403
18:0(10m)	0,352	0,343	0,356	0,333	0,362	-0,123	0,181	0,083	-0,544
18:0br	0,259	0,267	0,257	0,254	0,366	-0,072	0,171	0,003	-0,466
18:0n	0,122	0,116	0,122	0,119	-0,005	-0,237	-0,009	0,154	-0,139
18:1w5c	0,042	0,007	0,032	0,022	0,185	0,044	-0,007	-0,059	-0,185
18:1w9c	0,220	0,222	0,222	0,212	-0,347	-0,381	0,117	0,164	0,150
18:2	0,046	0,063	0,075	0,049	0,450	0,099	0,201	-0,102	-0,442
18:2w6c	-0,027	0,002	0,016	-0,020	-0,037	-0,091	0,429	0,231	-0,158
18:2w7c	-0,339	-0,332	-0,327	-0,314	-0,307	0,087	-0,184	-0,231	0,502
19:0(10 m)	0,322	0,331	0,311	0,318	0,073	-0,176	0,220	0,191	-0,309
19:0cy	0,244	0,250	0,160	0,245	-0,187	-0,228	-0,174	-0,005	0,175
19:1	-0,275	-0,250	-0,245	-0,257	0,058	0,175	-0,001	0,090	-0,029

Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. Georg Pohnert und Herrn Professor Dr. Gerd Gleixner für die Möglichkeit der Durchführung dieser Masterarbeit mit analytischem Schwerpunkt. Weiterhin danke ich dem Max-Planck-Institut für Biogeochemie in Jena für die Bereitstellung der notwendigen Geräte und Chemikalien. Mein Besonderer Dank gilt dabei Dr. Vanessa-Nina Roth für die enge Zusammenarbeit und wissenschaftliche Betreuung während der Arbeit. Weiterhin Danke ich Dr. Markus Lange für unzählige nützliche Hinweise zu statistischen Fragen sowie den Doktoranden Su Ding, Carsten Simon, Somak Chowdhury und Stefan Karlowsky für die Hilfe bei praktischen Aufgaben, theoretischen Problemen und für die Einarbeitung an HPLC, MS und Büchi-Extractor.

Letztendlich geht mein Dank auch an meine Familie und Freunde, welche mich während meines Studiums immer unterstützt und motiviert haben.

Selbstständigkeitserklärung

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

Jena, 01. März 2017 _____