

University of Innsbruck - Faculty of Biology

Institute of Microbiology



**Aktivität und Abundanz von methanogenen und
methanotrophen Mikroorganismen im bulk soil
und in der (Mykor)-rhizosphäre**

Nadine Präg, Paul Illmer

Jahrestagung ÖBG, Wien 2013

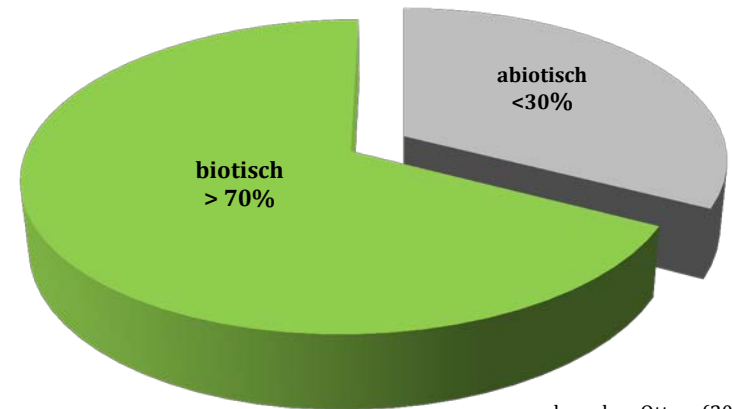
Treibhausgas Methan

- neben CO_2 und FCKWs eines der häufigsten und stärksten Treibhausgase
- 20 – 30 mal effizienter als CO_2
 - Absorption von Infrarotstrahlen
- Klimabericht des IPCC (2007):
 - Präindustrialisierung: **715** ppb
 - 1990er: **1732** ppb
 - 2007: **1774** ppb

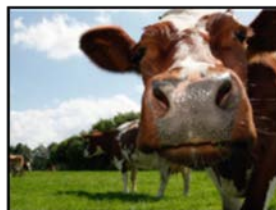


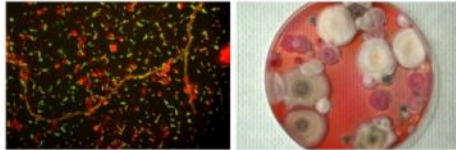
Treibhausgas Methan

- neben CO_2 und FCKWs eines der häufigsten und stärksten Treibhausgase
- 20 – 30 mal effizienter als CO_2
 - Absorption von Infrarotstrahlen
- Klimabericht des IPCC (2007):
 - Präindustrialisierung: **715** ppb
 - 1990er: **1732** ppb
 - 2007: **1774** ppb



based on Ottow (2011)





Einleitung

The tree of life

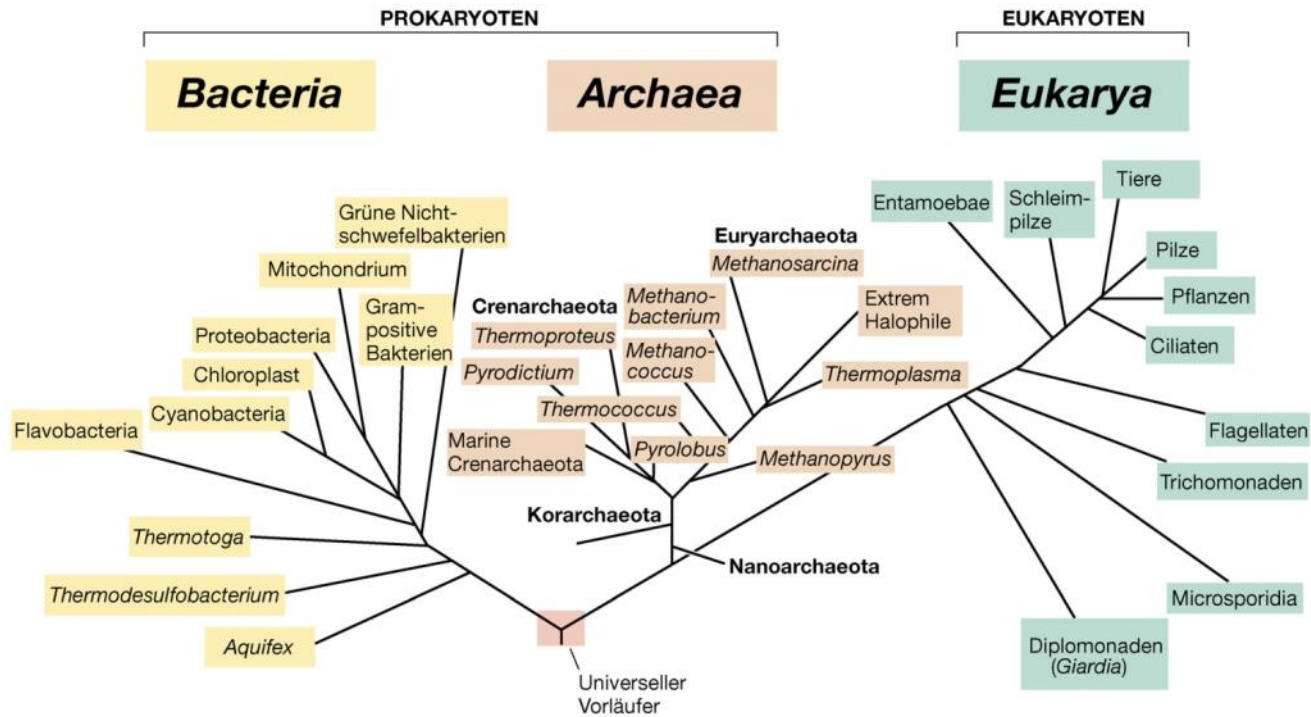
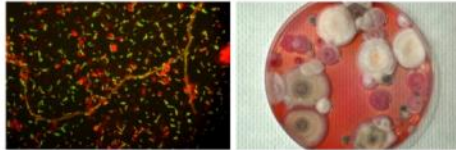


Abb. 1: Phylogenetischer Stammbaum der Organismen (Madigan & Martinko, 2008).



Einleitung

The tree of life

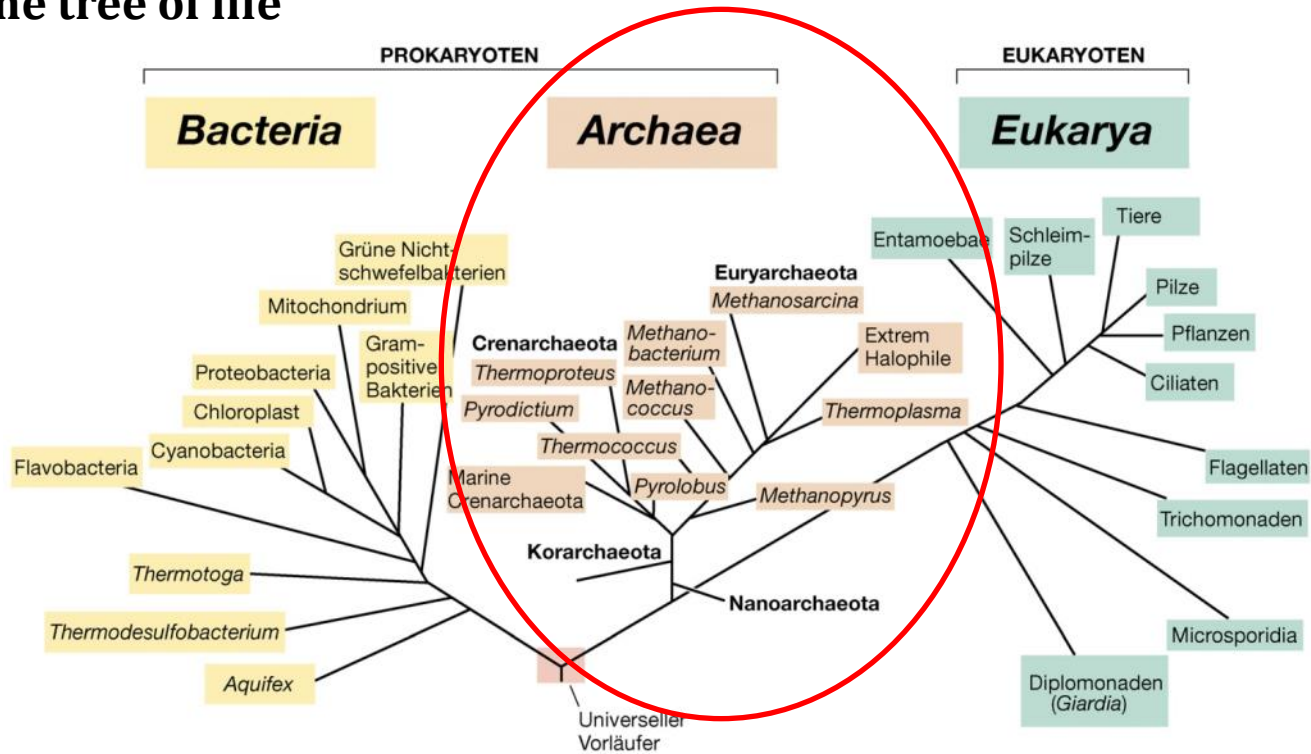


Abb. 1: Phylogenetischer Stammbaum der Organismen (Madigan & Martinko, 2008).

Einleitung

Anaerobe methanogene Archaea

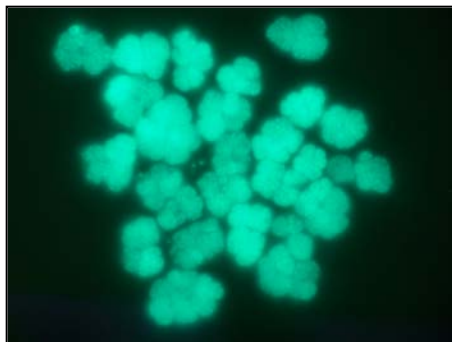
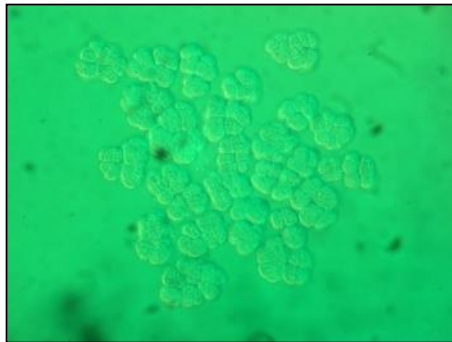


Abb. 2: *Methanosarcina thermophila*.

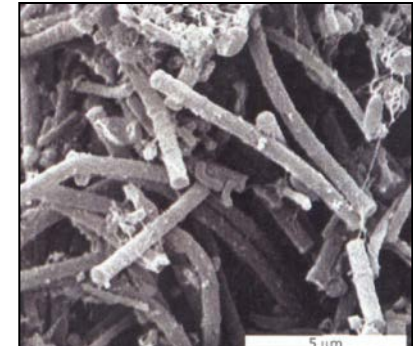
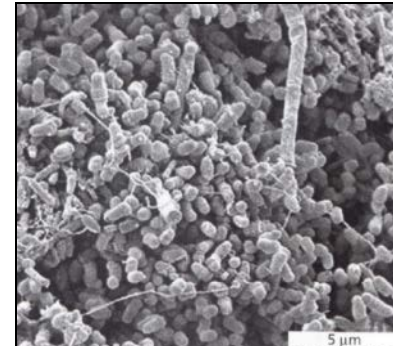
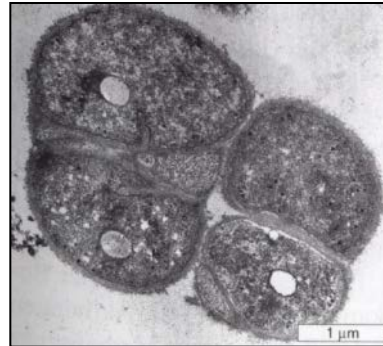


Abb. 3 Methanogene zeigen vielfältige Formen. *Methanosarcina barkeri*, *Methanothermus fervidus*, *Methanobacterium thermoautotrophicum* (v.l.n.r.).

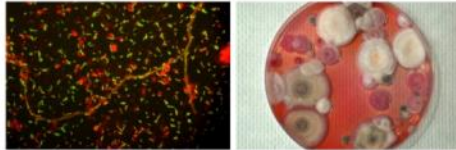
Hydrolytische
Anfangsphase

Acidogenese

Acetogenese

Methanogenese

Abb. 4: Die anaerobe Mineralisation organischer Verbindungen mit Methanbildung setzt sich aus verschiedenen Teilreaktionen zusammen, an denen sehr unterschiedliche *Bacteria* und *Archaea* in syntrophen Assoziationen beteiligt sind.



Einleitung

The tree of life

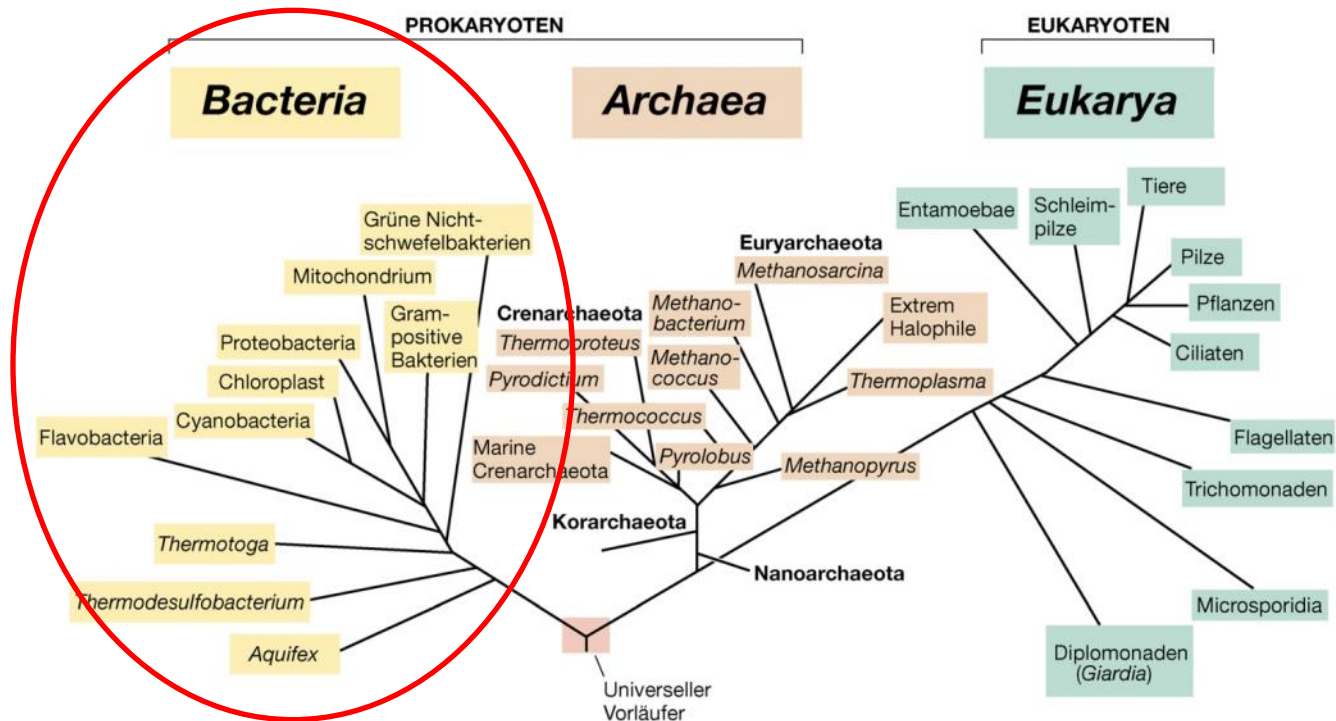
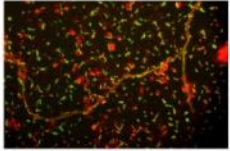


Abb. 1: Phylogenetischer Stammbaum der Organismen (Madigan & Martinko, 2008).



Einleitung

Aerobe methanotrophe Bacteria

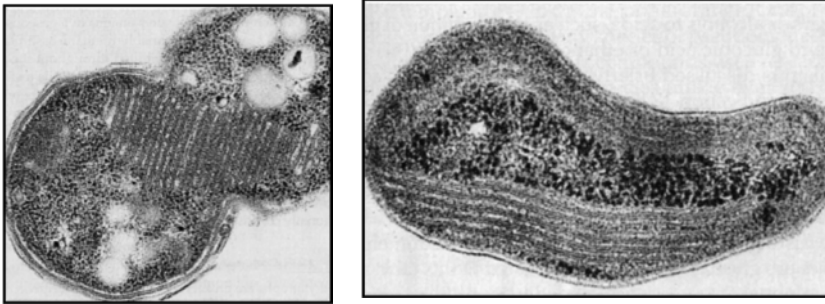
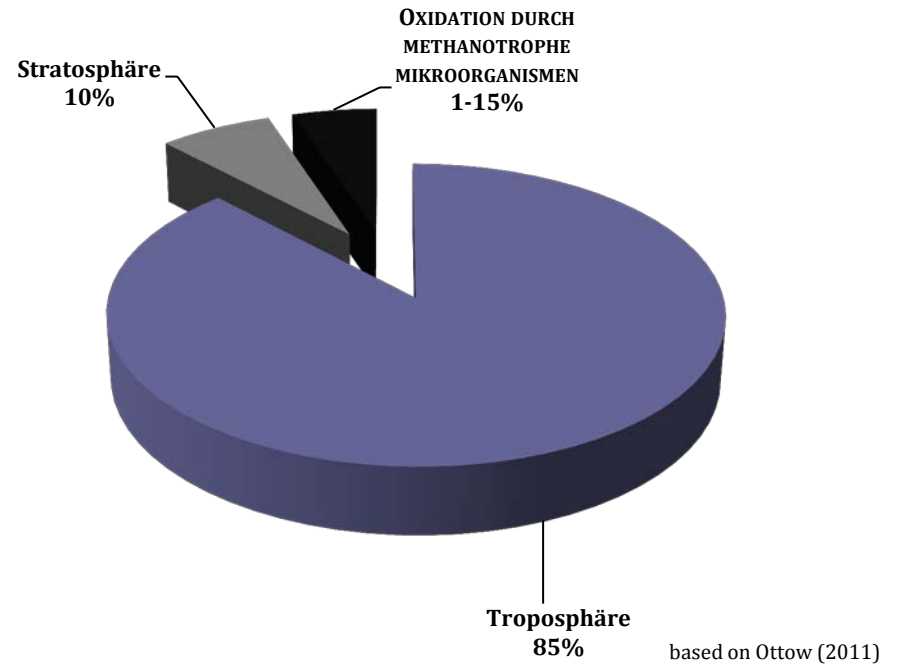
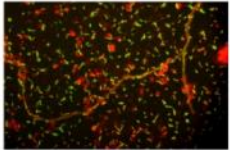
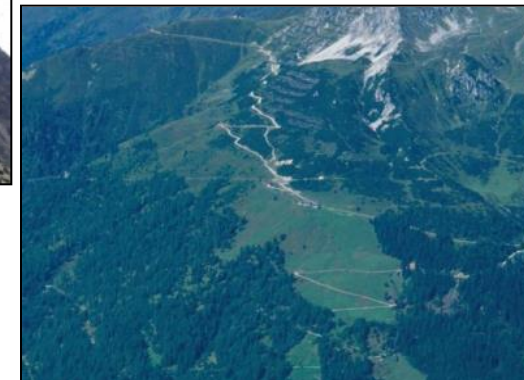


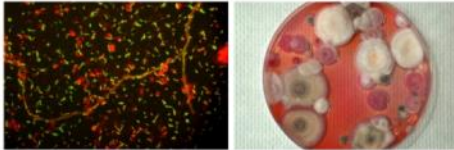
Abb. 4: Electron micrographs of methanotrophs.





Einleitung





Einleitung

Boden – ein sehr heterogenes Habitat

- Komplexe Gemeinschaften von Mikroorganismen
- Anaerobe Mikrohabitate

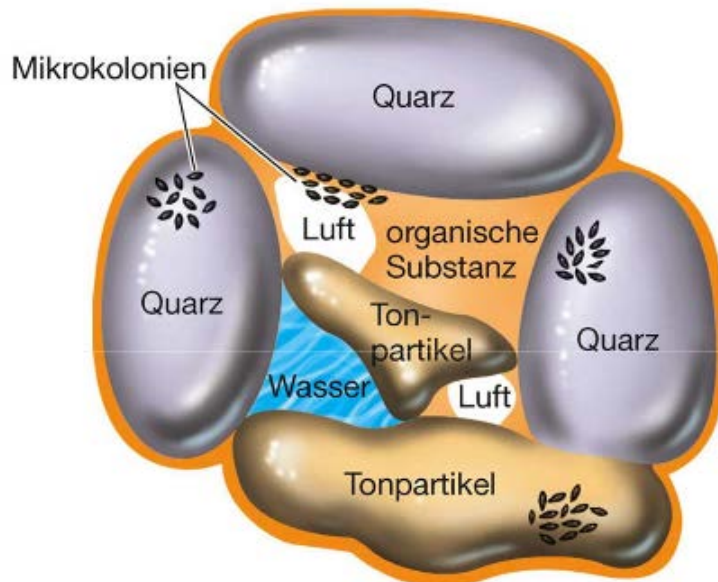


Abb. 5: Auf Bodenpartikeln findet man komplexe Gemeinschaften von Mikroorganismen (Madigan & Martinko, 2009).

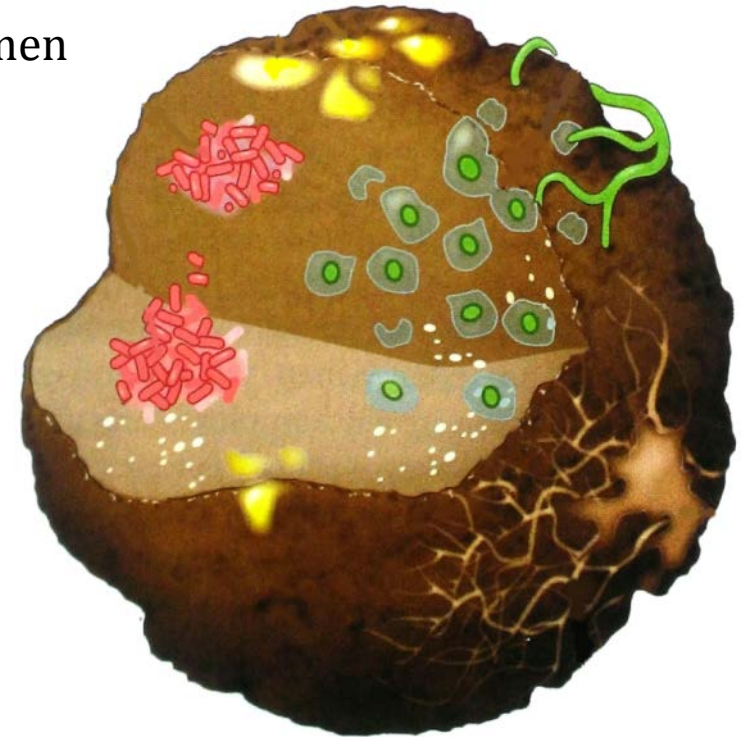
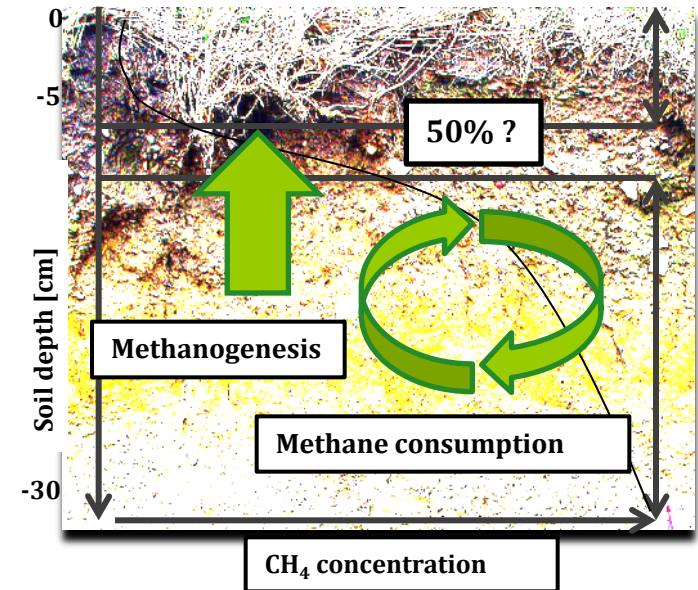


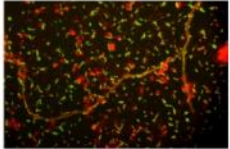
Abb. 6: Mikroorganismen im Boden und Gestein. Ein Bodenpartikel enthält Bakterienkolonien, Biofilme und Mikroorganismen, die zusammen mit Pilzen und Pflanzenwurzeln wachsen (Slonczewski & Foster, 2009).

Einleitung

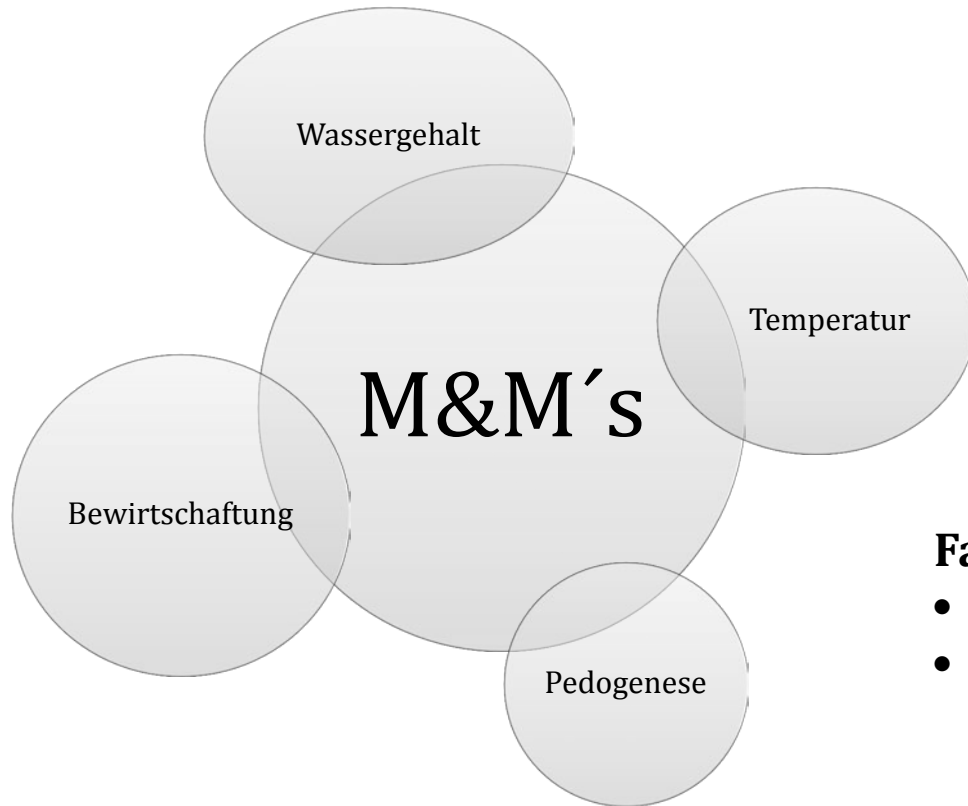
Methankreislauf in Böden

- Böden gelten in der Regel als **Methansenken**
- Methansenke: 50% des produzierten Methans bereits im Boden wieder oxidiert
- Enge Vergesellschaftung von methanogenen und methanotrophen Mikroorganismen



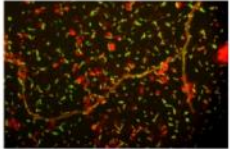


Einleitung

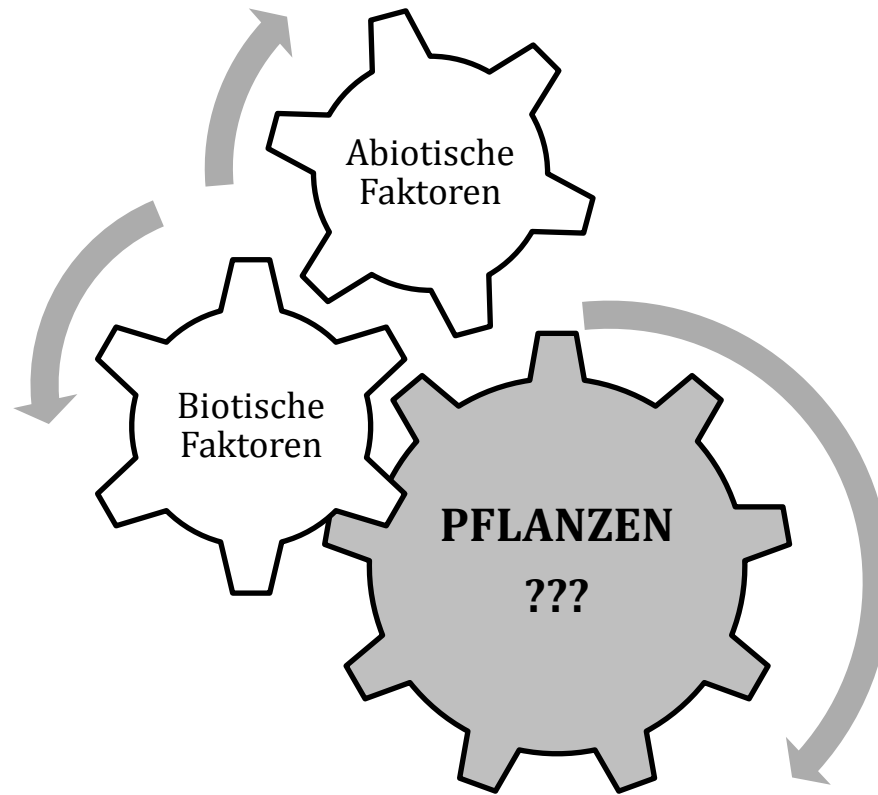


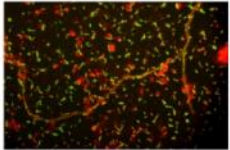
Fazit:

- Böden sind Netto-Methansenken
- z.T. beträchtliche Methanbildungspotentiale



Einleitung





Pflanzen und Methan

Vol 439|12 January 2006|doi:10.1038/nature04420

nature

LETTERS

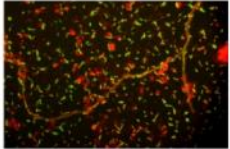
Methane emissions from terrestrial plants under aerobic conditions

Frank Keppler¹, John T. G. Hamilton², Marc Braß^{1,3} & Thomas Röckmann^{1,3}

Role of plants is limited to the transport of microbial produced methane (Schiermeier 2009; Askaer et al. 2011)

Wurzel = Schnittstelle zwischen Boden und Pflanze

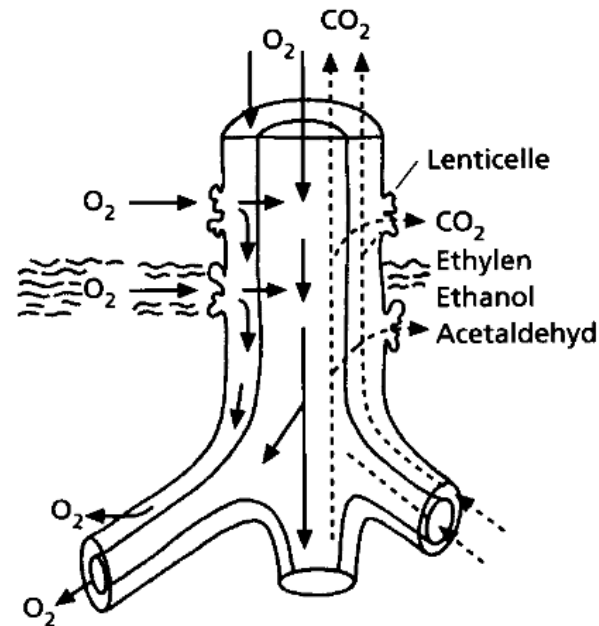
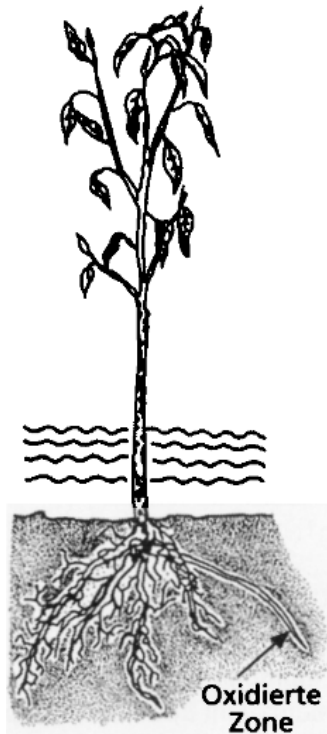
→ **Wurzel als Bindeglied zwischen Klima und Boden**



Pflanzen und Methan

In Reisfeldern:

60% des biogenen Methans stammen aus der Rhizosphäre



Via Aerenchym diffundierender Sauerstoff erlaubt normale Atmung!

Die Reisplanze als «conduit» der Methanemission.



Abb. 7: Terrassen-Reis-Feld in China.

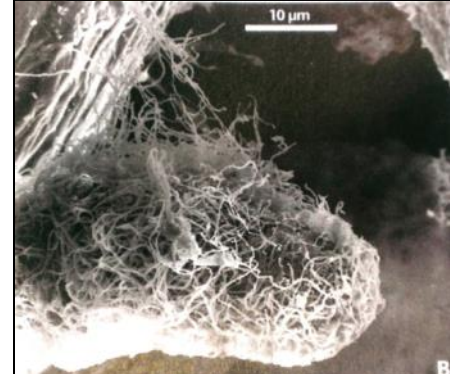
Ziele und Hypothesen

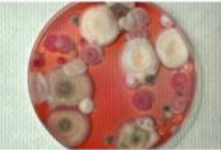
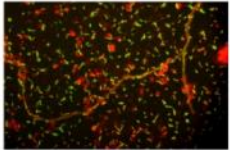
Ziele:

- Bestimmung des Einflusses von verschiedenen Pflanzen (Wiesen- und Waldstandorte) von verschiedenen Böden (Silikat- und Kalkgestein) auf die Methanfreisetzung- und oxidation.
- Untersuchung der **Rhizo- und Mykorrhizosphäre** auf das Vorkommen und die Aktivität von **methanogenen und methanotropen Mikroorganismen** bei verschiedenen Pflanzenarten (+/- Mykorrhiza) im Vergleich zum bulk soil.

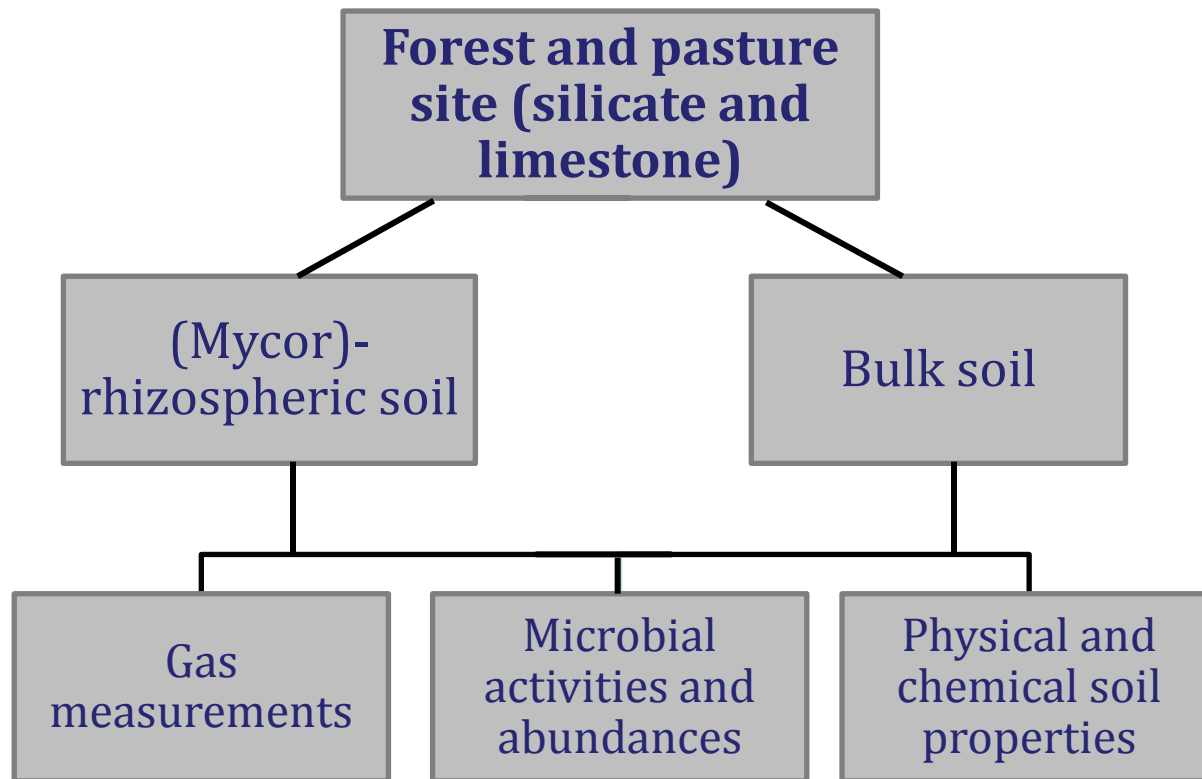
Hypothesen:

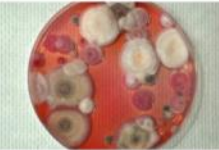
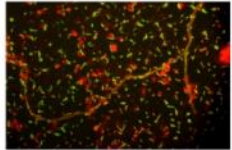
1. Die methanogene und methanotrophe Gemeinschaft wird durch die Pflanzenart und die Mykorrhizierung mit Pilzen beeinflusst.
2. Die Aktivität und Abundanz von M&M's ist in der Mykorrhizosphäre größer als in der Rhizosphäre und im bulk soil.





Experimental set-up





Material & Methoden

Task 1: Gas Measurement

- Messtöpfe +/- verschiedene Pflanzenarten (CH_4 Emission- und Oxidation)
- In vitro Synthese von Pflanzen +/- Mykorrhiza
- Messtöpfe mit Pflanzen +/- Mykorrhiza (CH_4 Emission- und Oxidation)
- Variation von Bodenparametern (Wasser, Temperatur, Lichtintensität)

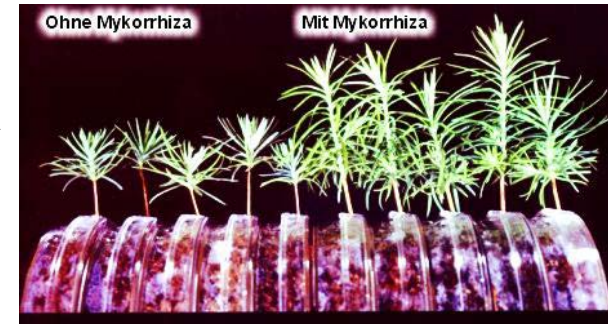


Abb. 8: Messtöpfe mit gasdichten Kunststoffhauben.

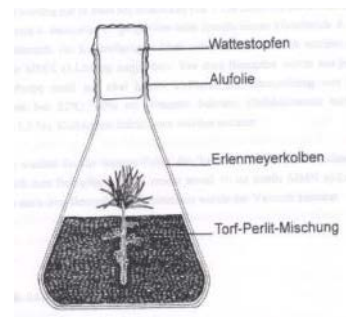


Abb. 9: Ektomykorrhizasynthese; Substrat und sterile Pflanze (modifiziert nach Peterson & Chakravarty, 1991).

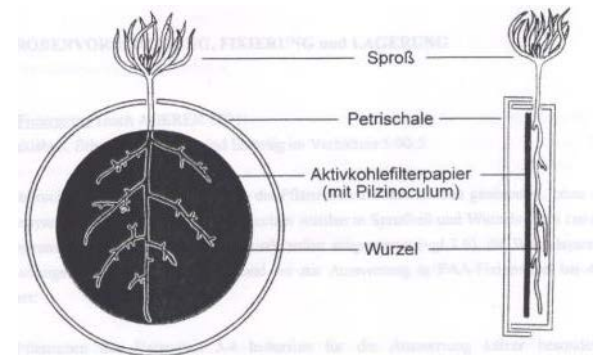


Abb. 10: Paper-Sandwich-Methode nach Kottke et al. (1987).

Material & Methoden

Task 1: Gas Measurement

- Messtöpfe +/- verschiedene Pflanzenarten (CH₄ Emission- und Oxidation)
- In vitro Synthese von Pflanzen +/- Mykorrhiza
- Messtöpfe mit Pflanzen +/- Mykorrhiza (CH₄ Emission- und Oxidation)
- Variation von Bodenparametern (Wasser, Temperatur, Lichtintensität)
- **Ekto- und Endomykorrhiza**



Abb. 10: Messtöpfe mit gasdichten Kunststoffhauben.

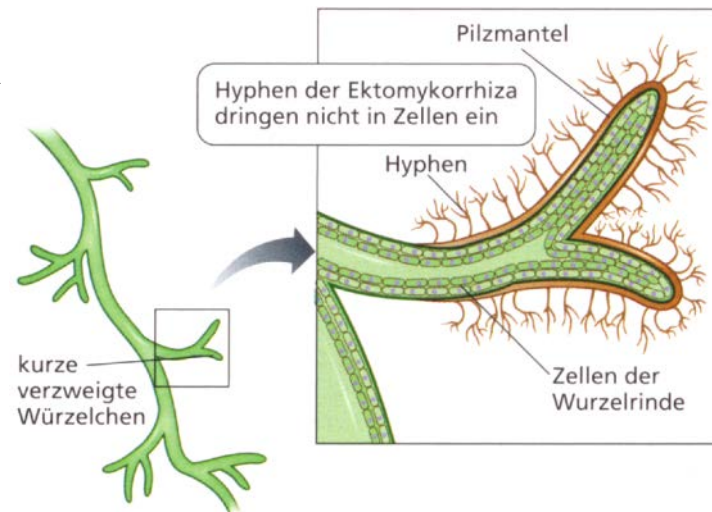


Abb. 11: Ektomykorrhiza: Pilze kolonisieren die Oberfläche einer Seitenwurzel. Querschnitt durch eine Pflanzenwurzel (Slonczewski & Foster, 2009).

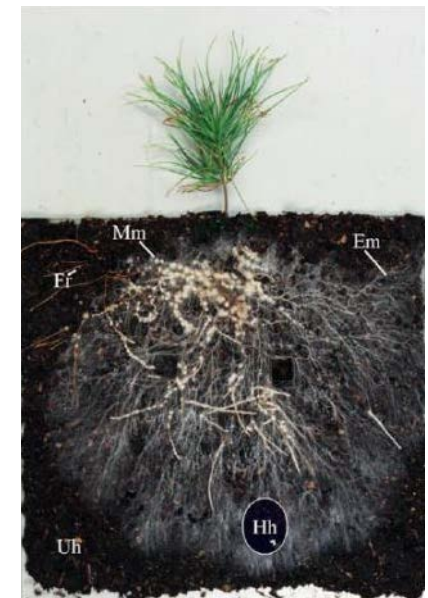
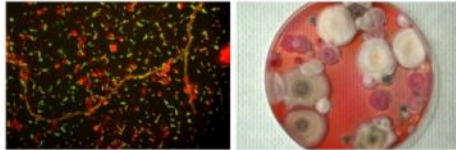


Abb. 12: Kiefersämling mit *Suillus bovinus* (Bomberg et al., 2011).



Material & Methoden

Task 1: Gas Measurement

- Messtöpfe +/- verschiedene Pflanzenarten (CH₄ Emission- und Oxidation)
- In vitro Synthese von Pflanzen +/- Mykorrhiza
- Messtöpfe mit Pflanzen +/- Mykorrhiza (CH₄ Emission- und Oxidation)
- Variation von Bodenparametern (Wasser, Temperatur, Lichtintensität)
- Ekto- und **Endomykorrhiza**

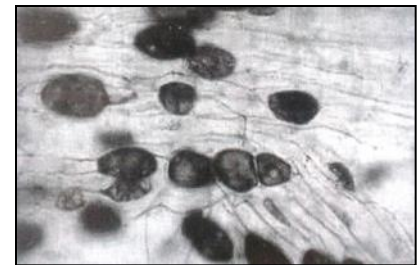
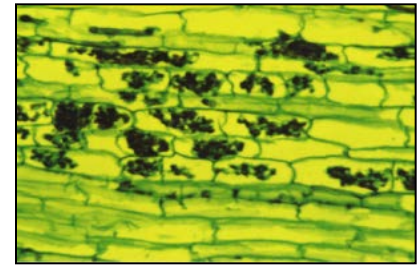


Abb. 10: Messtöpfe mit gasdichten Kunststoffhauben.

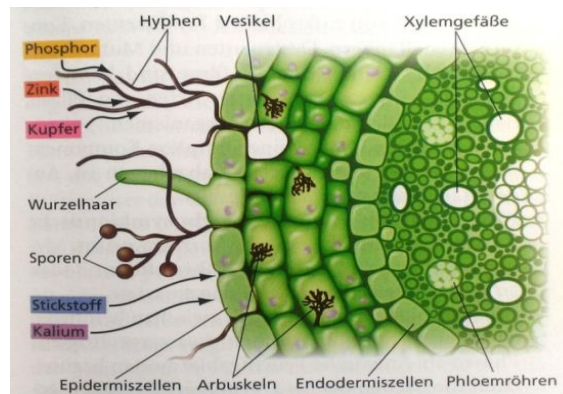


Abb. 13: Endomykorrhiza: Pilze dringen in die Wurzelzellen ein und bilden Arbuskeln (Slonczewski & Foster, 2009).

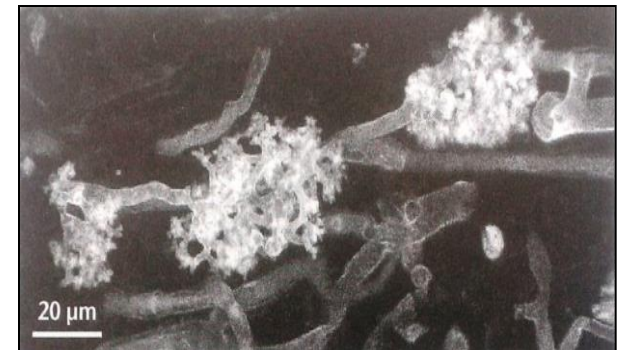
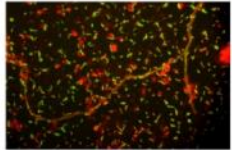


Abb. 14: Arbuskeln innerhalb von Wurzelzellen (Slonczewski & Foster, 2009).



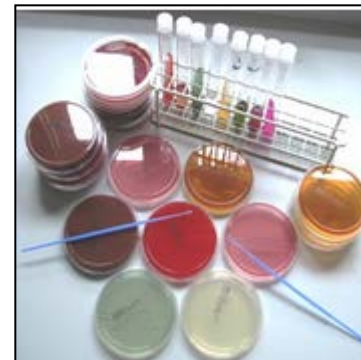
Material & Methoden

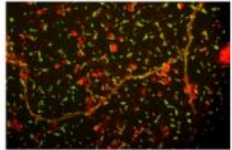
Task 2: Methanogene und Methanotrophe

- Aktivität und Abundanz von M&M's im „bulk soil“ und im (Myko)-Rhizosphärenboden
- Applikation von verschiedenen M&M's in die Böden-Pflanzen-Mykorrhiza-Systeme

Task 3: Soil properties

- Standard-Untersuchungsprogramm der Bodenmikrobiologie

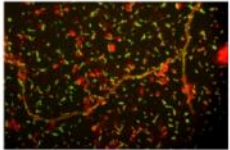




Material & Methoden

(i) *In-situ* Gasmessungen





Material & Methoden

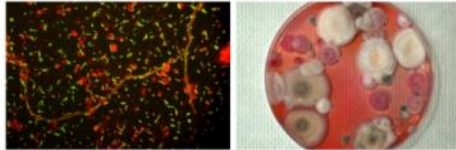
(i) *In-situ* Gasmessungen

(ii) Culture-based approaches

- Abschätzung der potentiellen Aktivität von Methanogenen & Methanotrophen (M&M's)
- MPN-techniques



Abb. 15: Serumflaschen und Glaszylinder zur Messung der potentiellen Methanbildungs- und oxidation.



Material & Methoden

(i) *in-situ* Gasmessungen

(ii) Culture-based approaches

- Abschätzung der potentiellen Aktivität von Methanogenen & Methanotrophen (M&M's)
- MPN-techniques

(iii) Culture-independent approaches

- qPCR, DGGE, dHPLC,

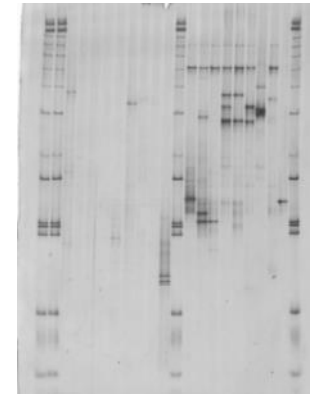


Abb. 16: DGGE als Fingerprint-Analyse.

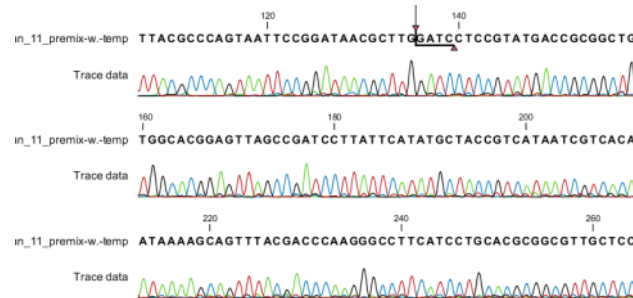


Abb. 17: Chromatogramm einer Sequenzierung.

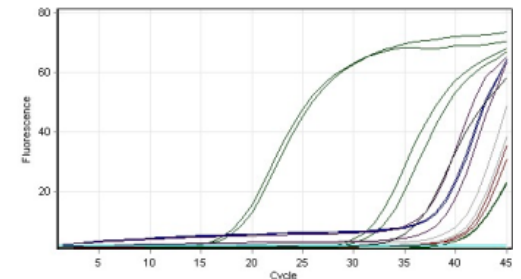
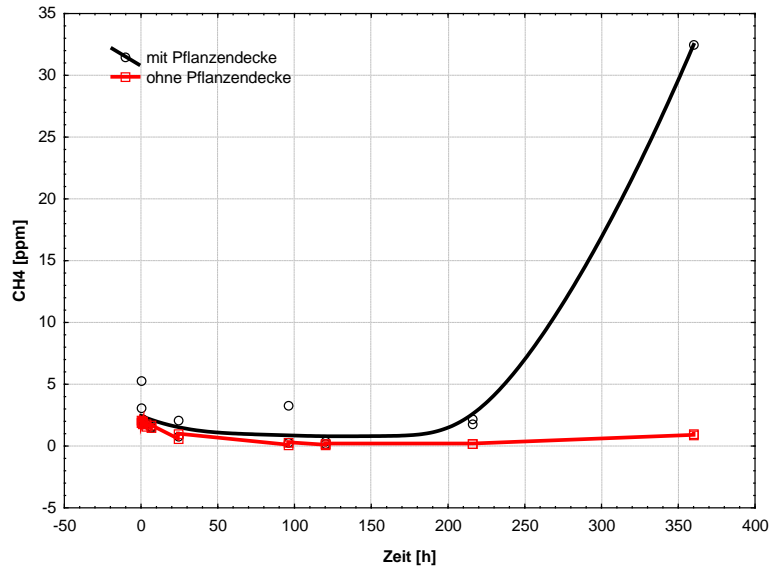


Abb. 18: Real-Time PCR Sybr Green I, Raw Data for Cycling A.Green.

Erste Ergebnisse

Stechzylinder (Wiese)

Methanbildung



Methanoxidation

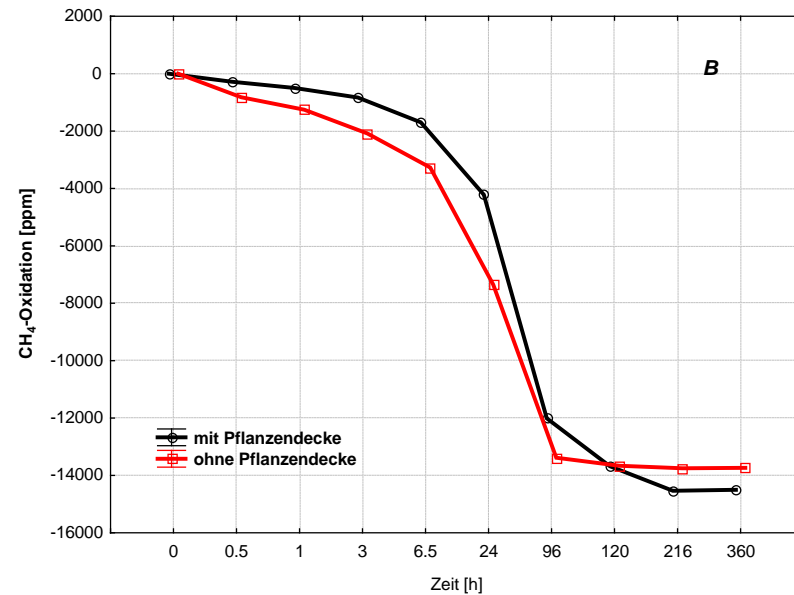
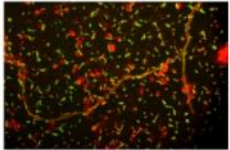


Abb. 19: CH₄-Produktion (A) und -oxidation (B) [ppm] der Bodenstechzylinder nach 15 Tagen mit/ohne Pflanzendecke. (B) Interaktionsplot einer mehrfaktoriellen ANOVA.

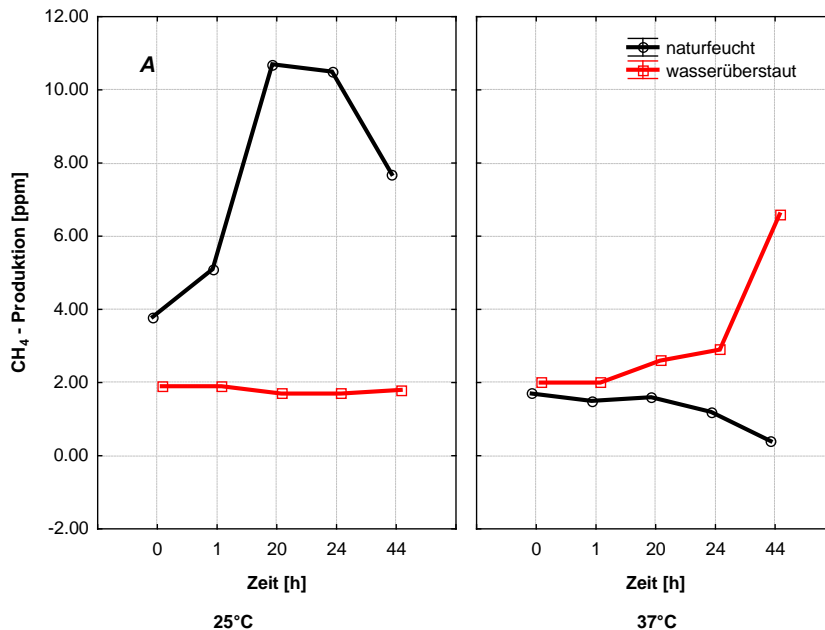


Erste Ergebnisse

Stechzylinder (Wiese)

- naturfeucht/wasserüberstaut
- 25, 37 °C

Methanbildung



Methanoxidation

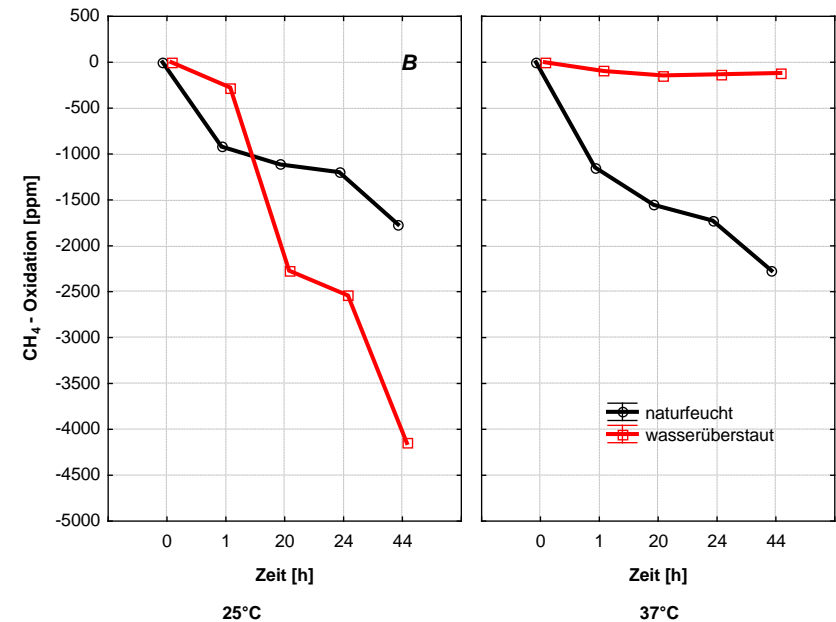
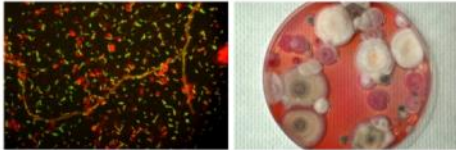


Abb. 20: CH₄-Produktion (A) und -oxidation (B) [ppm] der Bodenstechzylinder innerhalb von 44 Stunden bei 25° und 37°C, jeweils unter naturfeuchten und wasserüberstauten Bedingungen. Interaktionsplot einer mehrfaktoriellen ANOVA.

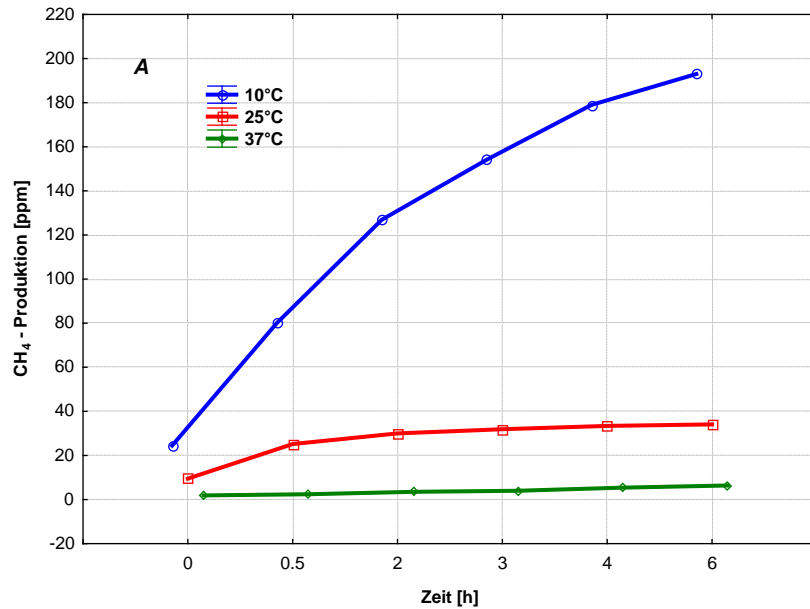


Erste Ergebnisse

Poa pratensis

- Temperaturvarianten (10, 25, 37 °C)

Methanbildung



Methanoxidation

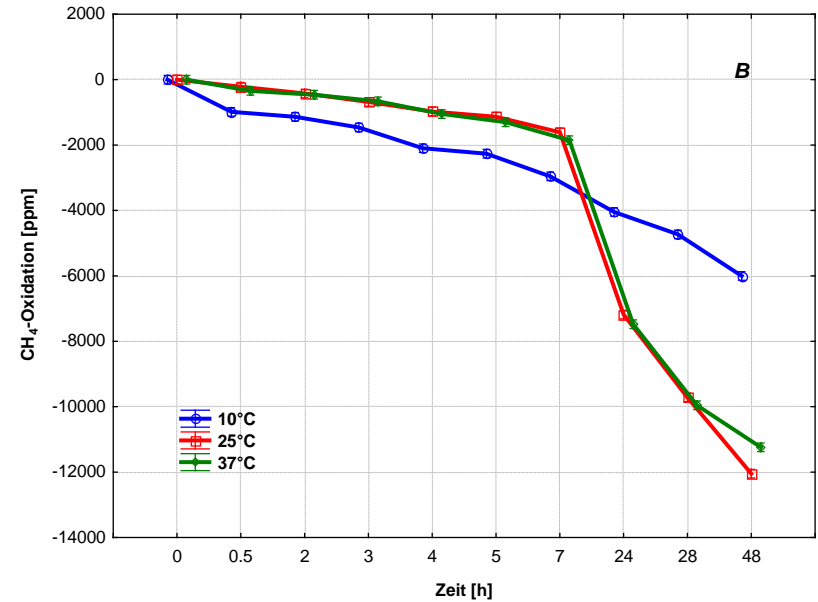


Abb. 21: CH₄-Produktion (A) und -oxidation (B) [ppm] eines Standardbodens mit *Poa pratensis* innerhalb von 48 Stunden bei 10, 25 und 37°C. Interaktionsplot aus einer multivariaten ANOVA.

Erste Ergebnisse

Inokulationsversuche

- *Methanosarcina* sp.

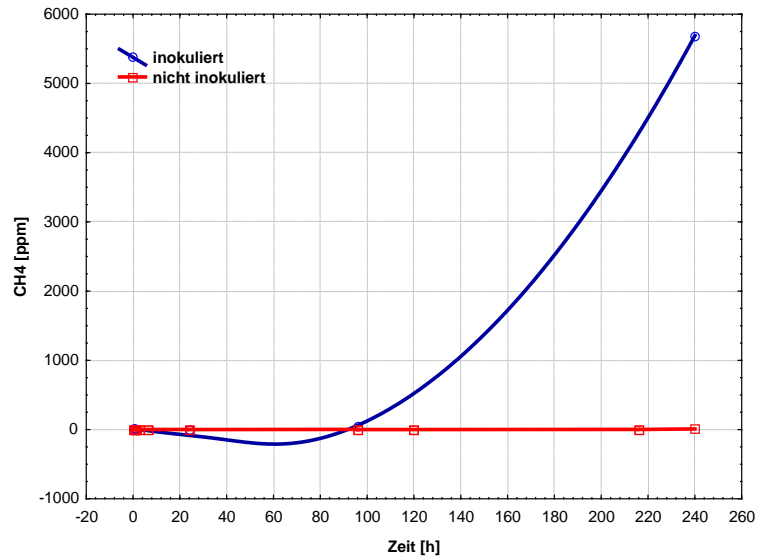


Abb. 22: Methanproduktion [ppm] nach Inokulation eines Wiesen-Bodenstechzylinders mit *Methanosarcina* sp.

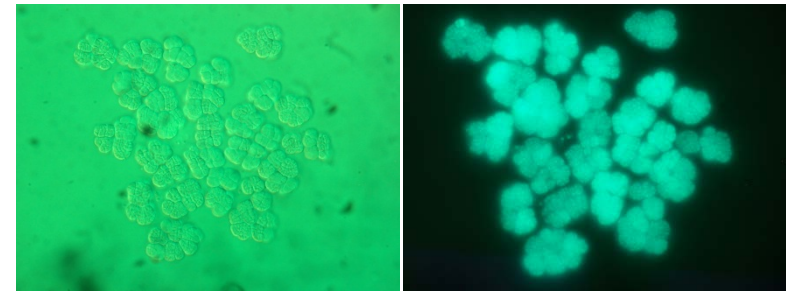
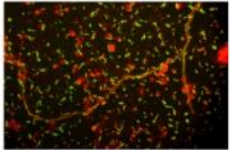


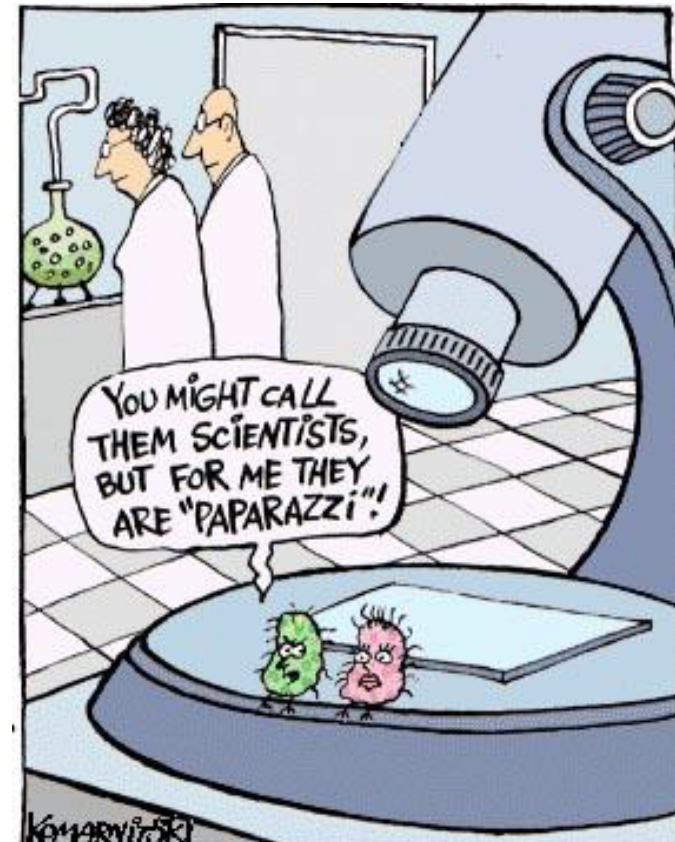
Abb. 25: *Methanosarcina thermophila*,

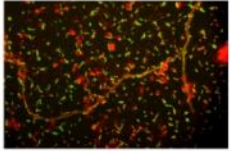
?????



Ausblick

- **Pflanzen** beeinflussen mit Sicherheit den Methanzyklus durch die veränderte Verfügbarkeit von Elektronendonoren und - akzeptoren in der Rhizosphäre.
- Einbeziehung von **Mykorrhiza**, um dein Einfluss der Symbiose auf den **Methanzyklus** nachzuweisen.
- Integrative Betrachtung diverser Einflussparameter soll erstmals ermöglichen, die **Interaktion zwischen methanogenen *Archaea* und methanotropen Bakterien mit Pflanzen, der Rhizosphäre und mit Mykorrhiza** zu untersuchen.





Institut für Mikrobiologie AG Illmer

