

Kultivierung von Denitrifikanten mit einem neuen *nirK*-Genotyp

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Silke Falk
aus Ulm/Donau

Marburg/Lahn im März 2009

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Februar 2005 bis 2009 in der Abteilung Biogeochemie des Max-Planck Institutes für terrestrische Mikrobiologie unter der Leitung von Herrn Prof. Ralf Conrad angefertigt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen

am:

Erstgutachter: Prof. Dr. Ralf Conrad

Zweitgutachter: Prof. Dr. Wolfgang Buckel

Tag der Disputation:

Für einen Teil dieser Dissertation ist ein Beitrag zur wissenschaftlichen Publikation geplant:

Falk, S. and Braker, G. Cultivation of denitrifiers with a novel *nirK*-genotype. In Vorbereitung.

Wissenschaftliche Beiträge auf Konferenzen:

Falk, Silke and Braker, Gesche Cultivation of denitrifiers with a novel *nirK*-genotype. Jahrestagung VAAM 2008 in Frankfurt (Poster)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	1
Tabellenverzeichnis	2
Abkürzungsverzeichnis	3
Zusammenfassung	5
I. Einleitung	
1. Der Stickstoffkreislauf	7
2. Der Prozess der Denitrifikation	9
3. Ökologische Relevanz der Denitrifikation	12
4. Denitrifizierende Gemeinschaft in Umweltproben	13
5. Kultivierung von Bakterien	14
6. Ziele der Arbeit	17
II. Material und Methoden	
1. Material	18
1.1 Chemikalien	18
1.2 Puffer, Lösungen und Medien	18
1.3 Verwendete Kits	22
1.4 Mikroorganismen	22
1.5 Oligonukleotide	23
2. Methoden	24
2.1 Bodenparameter	24
2.1.1 Probennahme	24
2.1.2 Ionenchromatographische Bestimmung von Nitrat und Nitrit	24
2.1.3 Wassergehalt und pH	25
2.1.4 Bestimmung des C/N-Gehaltes	26
2.2 Mikrobiologische Analysen	26
2.2.1 Kultivierung von <i>nirK</i> -enthaltenden Denitrifikanten	26
2.2.2 Isolierung und Identifizierung von Denitrifikanten	26
2.2.3 Optimierung der Wachstumsbedingungen	28
2.3 Molekularbiologische Analysen	29
2.3.1 DNA-Extraktion aus Reinkulturen und Bodenproben	29
2.3.2 Amplifizierung spezieller Gene	30
2.3.3 Nachweis der PCR-Amplifikate mittels Agarosegelelektrophorese	32
2.3.4 Reinigung der PCR-Produkte	33
2.3.5 Sequenzierung	33
2.3.6 Phylogenetische Analyse der 16S rRNA-Gen-Sequenzen und der funktionellen Denitrifikationsgene	34
2.3.7 Erstellung einer <i>nirK</i> -Klonbibliothek aus Lahn-Wiesenbodenproben	35
2.3.8 Erfassung von Denitrifikationsgenen mittels Dot-Blot	35
2.3.9 Recognition of Individual genes fluorescence in situ hybridization (RING-FISH)	37
2.4 Messung der Denitrifikationsaktivität <i>nirK</i> -enthaltender Isolate	38

Inhaltsverzeichnis

2.4.1 Umsetzung von NO_3^- zu N_2O	38
2.4.2 Berechnung der N_2O -Freisetzung	39
III. Ergebnisse	
1. Wahl des Habitates	40
2. Bodenparameter	40
3. <i>nirK</i> -Klonbibliothek aus Lahn-Wiesenbodenproben	41
4. Kultivierung und Analyse von Mikroorganismen aus Lahn-Wiesenbodenproben	44
4.1 Kultivierungsexperiment	44
4.2 Amplifizierung des funktionellen Gens <i>nirK</i>	46
5. Isolierung von <i>nirK</i> -enthaltenden Mikroorganismen	47
6. Analysen der 16S rRNA- und Denitrifikationsgene der Isolate	47
6.1 Zuordnung der Isolate anhand der 16S rRNA-Gen-Phylogenie zu kultivierten Stämmen	47
6.2 Phylogenie der <i>nirK</i> -Sequenzen der Isolate	50
6.3 Nachweis der Reinheit der Isolate mittels RING-FISH	51
6.4 Nachweis der Denitrifikationsgene <i>nap/nar</i> , <i>nirS</i> , <i>nor</i> und <i>nos</i>	53
6.5 Vergleich der phylogenetischen Analyse der Denitrifikationsgene <i>nirK</i> , <i>cnorB</i> und <i>nosZ</i> mit der 16S rRNA-Gen-Phylogenie	54
6.6 Nachweis der Denitrifikationsgene <i>nor</i> und <i>nos</i> mittels Dot-Blot-Methode	58
7. Optimierung der Wachstumsbedingungen der Isolate	59
7.1 Wachstum der Isolate unter anoxischen Bedingungen	59
7.2 Auswirkungen von verschiedenen Medien auf das Wachstum der Isolate	60
7.3 Wachstum der Isolate unter oxischen Bedingungen in Flüssigmedium	63
7.4 Auswirkungen von verschiedenen Inkubationstemperaturen auf das Wachstum der Isolate	64
8. Morphologie der Isolate	67
9. Fähigkeit der Isolate zur Umsetzung von NO_3^- zu N_2O	70
IV. Diskussion	
1. Wahl des Habitates	72
2. Bodenbedingungen und Denitrifikation	74
3. Vergleich zwischen <i>nirK</i> -Sequenzen der Klonbibliothek und der kultivierten Isolate aus den Lahn- Wiesenbodenproben	74
4. Kultivierung von <i>nirK</i> -enthaltenden Denitrifikanten aus Lahnwiesenbodenproben	75
5. <i>nirK</i> -enthaltende Isolate der <i>nirK</i> -Cluster I, IIa, V und VII	77
5.1 <i>nirK</i> -enthaltende Isolate der <i>nirK</i> -Cluster IIa, und VII	78
5.1.1 Phylogenie und Wachstumsverhalten der Isolate des <i>nirK</i> -Clusters IIa	78
5.1.2 Phylogenie und Wachstumsverhalten der Isolate des <i>nirK</i> -Clusters VII	79
5.2 <i>nirK</i> -enthaltende Isolate der <i>nirK</i> -Cluster I und V	81
5.2.1 Identifizierung der Isolate der <i>nirK</i> -Cluster I und V	81

Inhaltsverzeichnis

5.2.2 Vergleich der kultivierten Isolate des <i>nirK</i> -Clusters I	82
5.2.3 Nächsten phylogentisch Verwandten der Isolate im <i>nirK</i> -Cluster I	83
5.2.4 Vergleichende Phylogenie der <i>nir</i> -, <i>nor</i> - und <i>nos</i> -Gene der Isolate des <i>nirK</i> -Clusters I	84
5.2.5 Phylogenie und Wachstumsverhalten der Isolate der <i>nirK</i> - Cluster I und V	88
6. Aktivitätsmessung anhand des Umsatzes von NO₃ zu N₂O	89
7. Schlussfolgerung und Ausblick	90
V. Referenzen	92
Lebenslauf	104
Danksagung	106
Erklärung	107

Abbildungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

1	Die biologischen Prozesse des Stickstoffkreislaufs	7
2	Schematische Darstellung der Anordnung sowie der Funktion der Enzyme der Denitrifikation	10
3	Standort der Bodenprobenahme	24
4	Ort der Probenahme	41
5	Ausschnitt des phylogenetischen <i>nirK</i> -Baums	43
6	Ausschnitt des 16S rRNA-Gen-Stammbaums	49
7	Phasenkontrastaufnahme und Fluoreszenz-Aufnahmen der RING-FISH-Methode	52
8	Ausschnitt des <i>norB</i> - Stammbaums	56
9	Ausschnitt des <i>nosZ</i> -Stammbaums	57
10	Dot-Blot-Verfahren mit verschiedenen Sonden	58
11	Wachstumskurven der Isolate in Bodenmedium, R2A- und YEM-Medium	61
12	Wachstumskurven der Isolate 373 und 484 unter oxidischen Bedingungen	63
13	Wachstumskurven der Isolate unter oxidischen Bedingungen in den präferierten Medien	64
14	Wachstumskurven der Isolate bei unterschiedlichen Inkubationstemperaturen	66
15	Lichtmikroskopische Aufnahmen der Isolate	69
16	Umsatz der Isolate von NO_3^- zu N_2O	70

Tabellenverzeichnis

Tabellenverzeichnis

1	Verwendete Bakterienstämme	22
2	Oligonukleotide für die Amplifizierung ausgewählter Gene	23
3	Geräteparameter des Ionenchromatographen	25
4	Isolate und deren bevorzugte Medien	29
5	Positivkontrollen und das jeweilige zu amplifizierende Zielgen	30
6	Pipettierschema der PCR-Mixtur	31
7	PCR-Programme	32
8	Protokoll zur Cyclesequenzierung Reaktion	34
9	Geräteparameter des Gaschromatographen GC-ECD	39
10	Anzahl der transferierten Kolonien der Parallelen A, B je Verdünnungsstufe	45
11	Anzahl der transferierten und angewachsenen Kolonien nach unterschiedlichen Zeitpunkten	46
12	<i>nirK</i> -enthaltende Kolonien	46
13	Zuordnung der Isolate anhand der höchsten Sequenzübereinstimmung der 16S rRNA-Gen-Sequenzen zu kultivierten Stämmen anhand Distanzmatrix	48
14	Vorkommen der Denitrifikationsgenfragmente <i>nar/nap</i> , <i>nir</i> , <i>nor</i> und <i>nos</i> auf genomischer Ebene der Isolate	54
15	Wachstumsverhalten unter oxischen und anoxischen Bedingungen auf Festmedium	59
16	Maximale optische Dichte der Isolate 373 und 484 in verschiedenen Medien	62
17	Optimale Inkubationstemperatur mit maximalen optischen Dichten der Isolate	65
18	Durchschnittliche Zelllänge der Isolate	67
19	Übersichtstabelle der vorliegenden Isolate	73

Akürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

<i>amo</i>	Gen der Ammoniummonoxygenase
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (“bovine serum albumin“)
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
GC-ECD	Gas Chromatograph mit Elektronenfänger-Detektor
IC	Ionenchromatograph
LB	Luria-Bertani
min	Minute
MOPS	(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
<i>nirK</i>	Gen für die kupfer-haltigen Nitrit-Reduktase
<i>nap</i>	Gen der periplasmatischen Nitrat-Reduktase
<i>nar</i>	Gen der membran-gebundenen Nitrat-Reduktase
<i>nor</i>	Gen der Stickstoffmonoxid-Reduktase
<i>nos</i>	Gen der Distickstoffoxid-Reduktase
<i>nirS</i>	Gen der Cytochrom- <i>cd₁</i> -abhängige Nitrit-Reduktase
NH ₄ ⁺	Ammonium
N ₂ O	Distickstoffoxid (nitrous oxide)
NO	Stickstoffmonoxid (nitric oxide)
NO ₃ ⁻	Nitrat
NO ₂ ⁻	Nitrit
NB	Nutrient Broth
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (“Polymerase chain reaction”)
ppm	parts per million
ppb	parts per billion

Akürzungsverzeichnis

rpm	Umdrehungen pro Minute (“rounds per minute”)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
sp.	Art (“species“)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tris	Tris (hydroxymethyl)-Aminomethan
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl- β -Galactopyranosid
YEM	Yeast Extract Mannitol

Weitere Abkürzungen wurden entsprechend der „Information for Authors“ des *European Journal of Biochemistry* verwendet

Zusammenfassung

Die Denitrifikation ist im Ökosystem von entscheidender Bedeutung. Besonders im Boden spielen Denitrifikanten durch die Remineralisierung von Nitrat zu molekularem Stickstoff eine entscheidende Rolle. Eines der Markergene der Denitrifikation ist *nirK*, welches für die kupfer-abhängige Nitrit-Reduktase codiert. Denitrifikanten sind in ihrer Phylogenie sehr divers. Der Stammbaum von *nirK* beherbergt Cluster, die von *nirK*-Umweltsequenzen dominiert sind und keine *nirK*-Sequenz eines Isolates enthalten. Eines dieser Cluster ist Cluster I, welches im Fokus der vorliegenden Arbeit stand, da es von *nirK*-Sequenzen bislang unkultivierter Denitrifikanten aus Bodenproben dominiert wird. Mit einer Kultivierungsmethode die nicht spezifisch auf Denitrifikanten ausgerichtet war, sondern einen unspezifischen Ansatz verfolgte, sollte die Isolierung und Kultivierung *nirK*-enthaltender Organismen dieses Clusters aus Bodenproben ermöglicht werden. Als Probenmaterial dienten Lahn-Wiesenbodenproben. Vor der Kultivierung wurde durch die Erstellung einer *nirK*-Klonbibliothek die Verteilung der *nirK*-Sequenzen innerhalb des beprobten Lahn-Wiesenbodens analysiert. Mit der Ausnahme einer *nirK*-Klonsequenz waren alle *nirK*-Sequenzen auf die Cluster I und VI verteilt. Die aus Probenmaterial angesetzte Bodensuspension wurde vier Wochen unter oxidischen Kultivierungsbedingungen, in Minimalmedium bei einer habitatspezifischen Inkubationstemperatur inkubiert. Acht *nirK*-enthaltende Isolate 187, 406, 467, 471, 469, 373, 484 und 205 wurden mit dieser Methode kultiviert. Die *nirK*-Sequenzen von drei Isolaten gruppierte in das *nirK*-Cluster I, während die *nirK*-Sequenzen weiterer fünf Isolate eine phylogenetische Nähe zu den *nirK*-Sequenzen der Cluster II, VI und VII zeigten. Mit unspezifischen Kultivierungsmethoden gelang es also Kulturen mit einem *nirK*-Genotyp des Clusters I zu kultivieren. Ferner zeigte sich, dass durch molekularbiologische, kultivierungs-unabhängige Methoden zum Teil andere *nirK*-Sequenzen nachgewiesen wurden als durch kultivierungs-abhängige Methoden. Phylogenetische Analysen der 16S rRNA-Gen-Sequenzen ergaben die Zuordnung der Isolate zu den Gattungen *Bradyrhizobium* (Isolat 406, 467, 469 und 471), *Bosea* (Isolat 187), *Mesorhizobium* (Isolat 373 und 484) und *Devosia* (Isolat 205). Die Isolate des *nirK*-Clusters I wurden hierbei alle als Spezies der Gattung *Bradyrhizobium* identifiziert. Auch die weiteren Gene der Denitrifikation *nap/nar*, *nor* und *nos* konnten für die Isolate der Gattungen *Bradyrhizobium* und *Bosea* nachgewiesen werden, mit Ausnahme des Isolates (471) der Gattung *Bradyrhizobium* dem kein *nosZ*-Gen nachgewiesen werden konnte. Für die Isolate der Gattung *Mesorhizobium* wurden neben *nirK* die Denitrifikationsgene *narG*

Zusammenfassung

und *cnorB* bestimmt. Das Isolat 205 der Gattung *Devosia* wies neben *nirK* kein weiteres Gen der Denitrifikation auf.

Ein phylogenetischer Vergleich der 16S rRNA-Gen-Phylogenie der Isolate mit den Phylogenien der funktionellen Gene *nirK*, *norB* und *nosZ*, zeigte eine Kongruenz der Stammbäume, wobei die *nirK*-Phylogenie die Gruppierungen am differenziertesten widerspiegelte. Aufgrund der großen phylogenetischen Nähe zwischen den *nirK*-Sequenzen der Isolate und den *nirK*-Umweltsequenzen des Clusters I kann man vermuten, dass es sich bei diesen Subcluster um eine Taxon-spezifische Gruppierung von *Bradyrhizobium* Spezies handelt.

Trotz ihrer Identifizierung als Spezies der Gattung *Bradyrhizobium* wiesen die Isolate des *nirK*-Clusters I keine phylogenetische Nähe zur Spezies *Bradyrhizobium japonicum* auf, den einzigen bisher bekannten Denitrifikanten innerhalb der Gattung *Bradyrhizobium*. Es lässt sich also vermuten, dass neben *B. japonicum* auch andere *Bradyrhizobium* Spezies in der Lage sind zu denitrifizieren. Eine abschließende Aussage lässt sich aber nicht treffen, da für einige *Bradyrhizobium* Spezies, die als nächsten Verwandten der Isolate auf Basis der 16S rRNA-Gen-Phylogenie bestimmt wurden, keine Spezies-Beschreibung vorliegt.

Die Isolate der Gattungen *Bradyrhizobium* und *Bosea* zeigten sowohl auf genomischer als auch auf funktioneller Ebene die Fähigkeit zur Denitrifikation bis zur N₂O-Produktion. Die Isolate der Gattung *Mesorhizobium* 373 und 484 wiesen zwar auf genomischer Ebene das Potential zur Denitrifikation auf, jedoch wurde auf funktioneller Ebene weder eine Umsetzung des NO₃⁻ zu N₂O, noch ein Wachstum unter anoxischen Bedingungen mit NO₃⁻ als Elektronenakzeptor nachgewiesen. Die denitrifizierenden Spezies der Gattung *Mesorhizobium* wiesen keine phylogenetische Nähe zu den Isolaten der Gattung *Mesorhizobium* der vorliegenden Arbeit auf, so dass es sich bei den vorliegenden Isolaten möglicherweise um neue Spezies der Gattung *Mesorhizobium* handeln könnte. Für das Isolat 205 der Gattung *Devosia* konnte dem *nirK*-Gen keine Funktion zugeordnet werden.

Durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ist es möglich, dass bisher von unkultivierten Organismen aus Bodenhabitaten dominierte *nirK*-Cluster I näher zu charakterisieren.

I. Einleitung

Die sechs Elemente - Wasserstoff (H), Kohlenstoff (C), Stickstoff (N), Sauerstoff (O), Schwefel (S) und Phosphor (P) - bilden die Hauptbestandteile aller biologischen Makromoleküle. Die biologischen Umsetzungen des H, C, N, O und S werden hauptsächlich durch thermodynamisch abhängige Reaktionen von Mikroorganismen katalysiert (Falkowski et al., 2008). Im Verlauf der Evolution entwickelten die Mikroorganismen Schlüsselfunktionen in Stoffkreisläufen der Biosphäre, die das Leben auf der Erde aufrechterhalten und so den Motor dieser biogeochemischen Kreisläufe bilden.

1. Der Stickstoffkreislauf

Stickstoffverbindungen gehören zu den wichtigsten Bestandteilen einer Zelle. Sie sind in wesentlichen Bausteinen des Lebens - wie Nukleinsäuren, Aminosäuren, Adenosin-triphosphat, Chlorophyll und vielen weiteren - enthalten. Neben dem Anabolismus spielt Stickstoff ebenfalls im Katabolismus vieler Bakterien eine wichtige Rolle. Hier kann er sowohl als Elektronendonator in oxischen, als auch als Elektronenakzeptor in anoxischen Habitaten fungieren. Zusammenfassend ergibt sich ein Kreislauf, in dem der Stickstoff verschiedene Oxidationsstufen durchläuft. Dieser Stickstoffkreislauf setzt sich aus mehreren Prozessen zusammen (siehe Abb.1). Von großer Bedeutung sind dabei die Fixierung von molekularem Stickstoff (N_2), die Nitrifikation und die Denitrifikation.

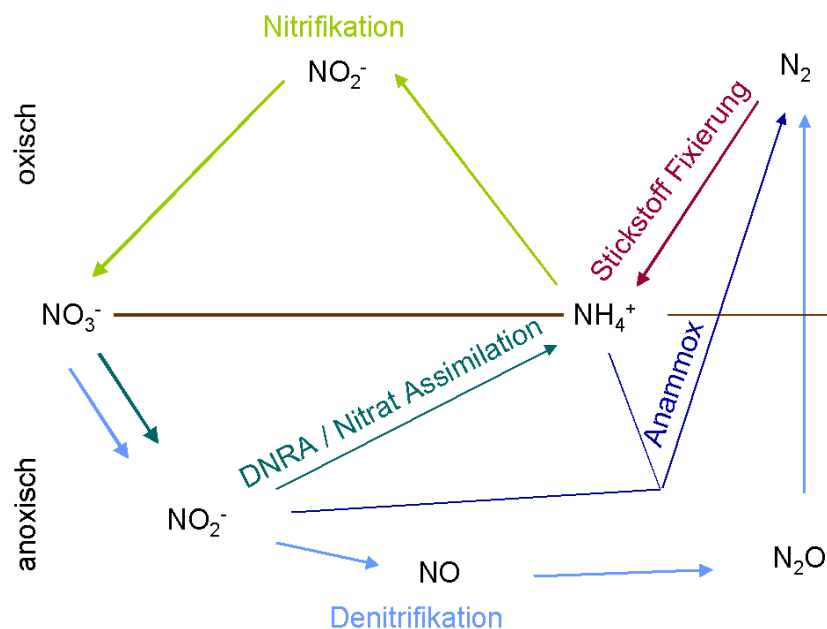


Abbildung 1: Die biologischen Prozesse des Stickstoffkreislaufs unter oxischen und anoxischen Bedingungen.

I. Einleitung

Die Stickstoff-Fixierung wird ausschließlich von Bakterien und einigen Archaeen durchgeführt. Die Stickstoff-fixierenden Bakterien, die Diazotrophen, sind für das Ökosystem von besonderer Bedeutung, weil sie gasförmigen, molekularen Stickstoff in Ammonium (NH_4^+) umwandeln und so dem Boden wieder verfügbar machen. Diazotrophe können sowohl in Symbiose mit Pflanzen vorkommen (Knöllchenbakterien) als auch freilebend auftreten. Während die freilebenden Diazotrophen Stickstoff für den eigenen Nutzen fixieren, stellen die in Symbiose lebenden Diazotrophen den fixierten Stickstoff dem Pflanzenpartner zur Verfügung (Newton, 2007). Die bedeutendsten, in Symbiose lebenden Stickstoff-Fixierer gehen eine Interaktion mit Leguminosen ein und finden sich in der Ordnung *Rhizobiales* und den Familien *Bradyrhizobiaceae*, *Phyllobacteroaceae*, *Rhizobiaceae* und *Xanthobacteraceae* wieder (Madigan et al., 2000). Die Leguminosae bilden mit zirka 18000 Spezies eine der größten Pflanzenfamilien auf der Erde (Moulin et al., 2001) und sind übliche Wiesenbewohner (Tiedje, 1988). Wie die Pflanzen sind auch ihre mikrobiellen Symbionten sehr divers. So zeigten Studien, dass innerhalb der *Methylobacteriaceae* (Jaftha et al., 2002), *Hyphomicrobiaceae* (Rivas et al., 2004) und *Brucellaceae* (Ngom et al., 2004) Stickstoff-fixierende Leguminosen-Symbionten zu finden sind, ebenso unter einigen Gattungen der β -*Proteobacteria* wie *Burkholderia* (Moulin et al., 2001) und *Ralstonia* (Chen et al., 2001) und in einigen unklassifizierten Stämmen der γ -*Proteobacteria* (Benhizia et al., 2004). In der Symbiose reduzieren die Bakterien N_2 aus der Atmosphäre zu Ammonium und stellen dieses den Pflanzen zur Verfügung. Die Pflanze liefert dem Partner dagegen die benötigten Nährstoffe. Das gebildete Ammonium kann im Boden unter oxidischen Bedingungen zu Nitrit (NO_2^-) und weiter zu Nitrat (NO_3^-) oxidiert werden. Dieser Prozess wird als Nitrifikation bezeichnet. Hier fungiert Ammonium als Elektronendonator. Das gebildete Nitrat kann assimilatorisch für den Aufbau von Biomasse oder dissimilatorisch für die Energiegewinnung genutzt werden. Die assimilatorische Nitrat-Reduktion führt von Nitrat über Nitrit zu Ammonium. Durch direkte Aminierung oder Transaminierung werden Aminosäuren gebildet, indem die Aminogruppe auf ein Kohlenstoffgerüst übertragen wird. Die Kohlenstoff-Gerüste leiten sich von Zwischenverbindungen der intermediären Stoffwechselwege her (Schlegel, 1992). Dissimilatorisch wird Nitrat über Nitrit und die gasförmigen Zwischenprodukte, Stickstoffmonoxid und Distickstoffoxid, zum ebenfalls gasförmigen, molekularen Stickstoff reduziert. Damit wird fixierter Stickstoff wieder in die Atmosphäre rückgeführt.

Bei der Denitrifikation werden oxidierte Stickstoffverbindungen als alternative Elektronenakzeptoren genutzt, deren Reduktion über die Atmungskette an

I. Einleitung

Energiegewinnung gekoppelt ist. Neben der Denitrifikation bestehen noch weitere Prozesse der dissimilatorischen Nitrat-Reduktion. So findet in einer anaeroben, Nitrat-limitierten und kohlenstoffreichen Umgebung die dissimilatorische Nitrat-Reduktion zu Ammonium (DNRA) gegenüber der Denitrifikation bevorzugt statt. Das Verhältnis zwischen Kohlenstoff zu Nitrat entscheidet, ob Nitrat über DNRA oder über Denitrifikation reduziert wird. Bei einem niedrigen Verhältnis wird die Denitrifikation der DNRA vorgezogen, weil auf diese Weise so viel Energie wie möglich aus einem Nitrat gewonnen wird. Ist jedoch das Verhältnis hoch, so findet die DNRA bevorzugt statt, weil diese die maximale Elektronenakzeptoren-Kapazität ausnutzt. Vor allem in Pansen und Faulschlamm findet man diese Reaktion, wohingegen im Boden die Denitrifikation dominiert (Tiedje, 1988).

Auch in Biofilmen wurde die Reduktion von Nitrat unter Verwendung von Ammonium als Elektronendonator nachgewiesen (Strous et al., 1999). Diese Reaktion wird als Anaerobe Ammonium-Oxidation (Anammox) bezeichnet, wobei Ammonium und Nitrit zu N_2 reagieren. Dabei wird Ammonium oxidiert und Nitrit reduziert. Im Gegensatz zu Denitrifikanten ist Anammox, nach derzeitigem Kenntnisstand, auf eine phylogenetische Gruppe innerhalb der Planktomyceten beschränkt.

Neben den beschriebenen Prozessen wurden in den letzten zehn Jahren noch weitere Prozesse des Stickstoffkreislaufs nachgewiesen. So wurde neben der Oxidation von Ammonium durch Crenarchaea (Könneke et al., 2005) auch die Interaktion zwischen diesen und Anammox ausführenden Bakterien nachgewiesen (Lam et al., 2007). Innerhalb der Archaeaen wurden des Weiteren hyperthermophile Stickstoff-fixierende, Methanproduzierende Vertreter gefunden (Mehta et al., 2005). Ferner wurde die Existenz von Nitrit-oxidierenden phototrophen (Griffin et al., 2007) und Nitrit-abhängigen anaeroben Methan-oxidierenden Bakterien (Raghoebarsing et al., 2006) nachgewiesen.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeichnen ein komplexeres Bild des Stickstoff-Kreislaufes als dies bis vor zehn Jahren vermutet wurde. Es ist davon auszugehen, dass in den nächsten Jahren weitere Erkenntnisse das Bild komplettieren werden.

2. Der Prozess der Denitrifikation

Vier Enzyme katalysieren die aufeinander folgenden Reduktionsschritte der Denitrifikation: Nitrat-Reduktase, Nitrit-Reduktase, Stickstoffmonoxid-Reduktase und Distickstoffoxid-Reduktase. Die Nitrat-Reduktase katalysiert den ersten Reduktionsschritt von Nitrat zu Nitrit (siehe Abb. 2). Das Enzym ist entweder im periplasmatischen Raum lokalisiert oder in der cytoplasmatischen Membran gebunden. Je nach Lokalisation der Enzyme unterscheidet

I. Einleitung

man zwischen *nap*-Genen (*napABCD*), die für die periplasmatische Nitrat-Reduktase kodieren und den *nar*-Genen (*narG* und *H*), die für die membran-gebundene Nitrat-Reduktase kodieren. Die Beteiligung der periplasmatischen Nitrat-Reduktase an der Denitrifikation war lange Zeit unklar.

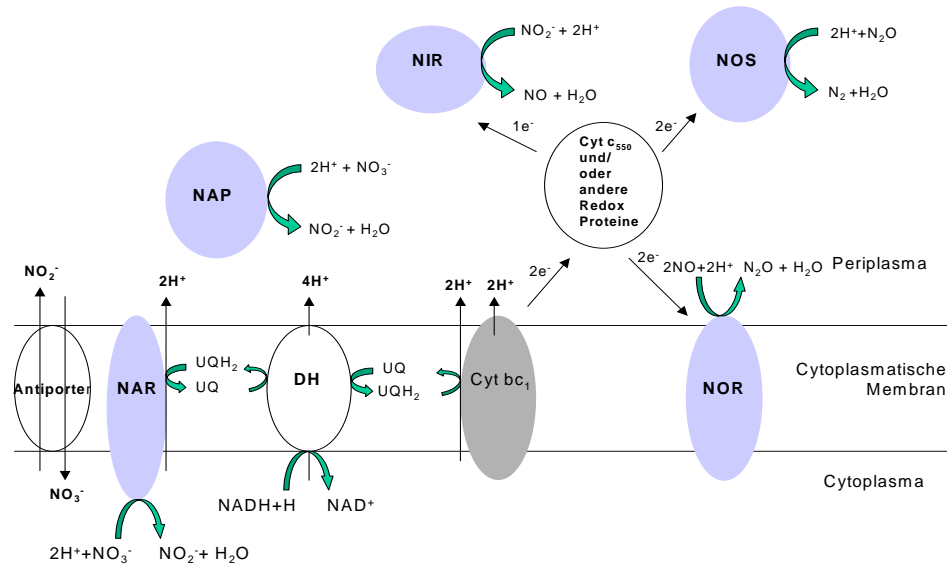


Abbildung 2: Schematische Darstellung (mod. nach Strohm et al., 2007) der Anordnung sowie der Funktion der Enzyme der Denitrifikation. NAP: periplasmatische Nitrat-Reduktase, NAR: membran-gebundene Nitrat-Reduktase, NIR: Nitrit-Reduktase, NOR: NO-Reduktase, NOS: N_2O -Reduktase, UQ/ H_2 : Ubichinon oxidierte/reduzierte Form, DH: NADH Dehydrogenase Komplex, $\text{Cyt } bc_1$: Cytochrom bc_1 Komplex und $\text{Cyt } c$: terminaler oxidase Cytochrom c -Komplex.

Für den Stamm *Pseudomonas* sp. G-179 konnte jedoch bewiesen werden, dass die periplasmatische Nitrat-Reduktase den ersten Reduktionsschritt der Denitrifikation katalysiert (Bedzyk et al., 1999).

In der weiteren Reduktionskaskade kodieren die Gene *nir*, *nor* und *nos* für die Enzyme Nitrit-Reduktase, Stickstoffmonoxid-Reduktase und Distickstoffoxid-Reduktase. Die Schlüsselreaktion der Denitrifikation ist die Reduktion von Nitrit zu dem gasförmigen Stickstoffmonoxid. Dies ist die erste Reaktion, in der sich die Nitratatmung von der Denitrifikation unterscheidet.

Die Nitrit-Reduktase tritt in zwei Formen auf, die funktionell gleich, jedoch strukturell verschieden sind. Während *nirK* für eine kupfer-abhängige Nitrit-Reduktase kodiert, kodiert *nirS* für die Cytochrom cd_1 -abhängige Nitrit-Reduktase. Beide Enzyme kommen nicht gleichzeitig in derselben Zelle vor, üben jedoch die gleiche physiologische Funktion aus (Zumft, 1997). Von den bisher weltweit zusammengetragenen Stämmen überwiegen die Cytochrom cd_1 - gegenüber den kupfer-abhängigen Denitrifikanten (Coyne et al., 1989;

I. Einleitung

Gamble et al., 1977), während letztere eine größere Vielfalt an physiologischen Gruppen und Habitaten umfassen (Zumft, 1997). Diese Enzymtypen sind aber nicht auf eine phylogenetische Gruppe beschränkt, sondern treten in einer großen Diversität von Bakterien auf. Aufgrund der Schlüsselfunktion wird sowohl *nirK* als auch *nirS* als funktionelles Markergen in molekularbiologischen Ansätzen zur Detektion von Denitrifikanten verwendet.

Die kupfer-abhängige Nitrit-Reduktase (CuNIR) ist ein Homotrimer und im Periplasma lokalisiert. Jedes Monomer enthält zwei Kupferatome, Typ I und Typ II. Das Kupferatom des Typs I ist im Zentrum an die Aminosäuren Cystein, Methionin und an zwei Histidine gebunden und ist Ort des Elektronentransfers. Der Kupfer-Typ II ist die Substratbindungsstelle der Nitrit-Reduktase (Libby und Averill, 1992) und ist an drei Histidine gebunden. Analysen der enzymatischen Struktur der kupfer-abhängigen Nitrit-Reduktase bewiesen die Existenz zweier Formen der kupfer-abhängigen Nitrit-Reduktase, I und II (Boulangier und Murphy, 2002), wobei die Bakterien die Nitrit-Reduktase I besitzen (Jones et al., 2008).

Die Cytochrom *cd*₁-Nitrit-Reduktase ist ein Homodimer und ebenfalls im Periplasma lokalisiert. Das Enzym beinhaltet pro Monomer einen c-typ und einen d-typ Häm-Molekül. Während Häm c in der kleineren Domäne lokalisiert und Zentrum für den Elektronentransfer ist, liegt Häm d in der größeren Domäne und ist Ort des katalytischen Zentrums (Williams et al., 1997).

Ferner geht aus vorangegangenen Studien hervor (Bremer et al., 2007; Priemé et al., 2002; Schwarz, 2002), dass von beiden *nir*-Typen nur die *nirK*-Gene aus Bodenproben nachgewiesen werden konnten, während *nirS* nicht amplifizierbar war. Bisher ist nichts über die Präferenzen von *nirK*- und *nirS*-Denitrifikanten in der Umwelt bekannt (Priemé et al., 2002). Eine mögliche Erklärung könnte in den verwendeten Primerpaaren liegen. Diese könnten nur die Sequenzen amplifizieren, die eine enge phylogenetische Verwandtschaft zu den Ursprungssequenzen aufzeigen, mit der die Primer entwickelt wurden (Braker et al., 2000).

Die Reduktion des zelltoxischen Stickstoffmonoxids zu Distickstoffoxid wird von dem Enzym Stickstoffmonoxid-Reduktase katalysiert, welches durch die *nor*-Gene kodiert wird. Hinsichtlich des Elektronendonors wird zwischen der Cytochrom c (cNOR)- und der Chinon-Stickstoffmonoxid-Reduktase (qNOR) unterschieden. Beide Enzyme sind jeweils in der cytoplasmatischen Membran gebunden. Sie werden durch die Gene *cnor* und *qnor* kodiert. Während sich die Stickstoffmonoxid-Reduktasen in ihrer Struktur gleichen,

I. Einleitung

unterscheiden sie sich jedoch in ihrem Vorkommen. So wurde das Gen *cnor* bisher nur in denitrifizierenden Bakterien nachgewiesen, während *qnor* sowohl in denitrifizierenden als auch in nicht-denitrifizierenden Bakterien vorkommt (Braker und Tiedje, 2003).

Das Enzym der Distickstoffoxid-Reduktase, welches im periplasmatischen Raum lokalisiert ist, katalysiert die Reduktion von Distickstoffoxid zu molekularem Stickstoff und wird durch das *nosZ*-Gen kodiert. Dieses Gen tritt nur bei denitrifizierenden Bakterien auf und wird ebenfalls verwendet, um Denitrifikanten-spezifische DNA in Umweltproben nachzuweisen (Scala und Kerkhof, 1999). Genetisch ist das *nosZ*-Gen in einem Gencluster organisiert, welches mehrere Gene umfasst (*nosRZDFYL*). Die anderen Gene kodieren für Transporter- und Regulationsenzyme.

Während der Denitrifikationsreduktionsschritte werden Protonen in das Periplasma gepumpt und so entlang der cytoplasmatischen Membran ein Protonengradient aufgebaut. Beim Rückfluss der Protonen in das Cytoplasma wird durch die ATP-Synthase ATP gebildet. Da jeder Reduktionsschritt der Denitrifikation ein Redoxpotential von mehr als 0,35 Volt umfasst, ist diese der Sauerstoffreduktion energetisch sehr ähnlich (Shapleigh, 2006).

3. Ökologische Relevanz der Denitrifikation

Die Denitrifikation ist für das Ökosystem von wesentlicher Bedeutung. Auf der einen Seite ermöglicht sie die Rückführung von gebundenen Stickstoffverbindungen in Form von gasförmigen N_2 in die Atmosphäre, auf der anderen Seite trägt das gasförmige Zwischenprodukt der Denitrifikation N_2O wesentlich zum Treibhauseffekt (Dickinson und Cicerone, 1986) und zur Zerstörung der Ozonschicht bei (Crutzen, 1970). Die Wirkung von N_2O auf den Treibhauseffekt lässt sich gegenüber CO_2 mit einem 320-fach höheren Treibhauspotential (Global Warming Potential) einordnen (Bothe et al., 2007). Des Weiteren kann NO zu NO_2 oxidiert werden, welches wiederum zu HNO_2 und HNO_3 reagiert und sauren Regen verursacht.

In terrestrischen Ökosystemen entsteht N_2O hauptsächlich durch mikrobielle Nitrifikation und Denitrifikation (van Cleemput, 1998). Durch extensive Stickstoffdüngung auf Agrarflächen wird die Denitrifikation gefördert, was einen Anstieg der N_2O -Emission zur Folge hat (Skiba und Smith, 2000). Der Verlust an Stickstoff durch die Denitrifikation wirkt sich einerseits limitierend auf die Primärproduktion von Pflanzen aus, andererseits macht man sich ihn in der Wasseraufbereitung zu Nutze. Durch ein duales System mit oxischen und anoxischen Bedingungen wird der Stickstoff durch die Nitrifikation oxidiert, während er in der nachfolgenden Denitrifikation reduziert wird und als gasförmiges N_2 aus dem Wasser

I. Einleitung

entweicht (Schlegel, 1992). Durch die Denitrifikation werden also Stickstoffverbindungen zu N_2 rezirkuliert, welches von Stickstoff-fixierenden Bakterien wieder umgesetzt werden kann.

Von besonderer Bedeutung ist dies für die Sedimente der Ozeane, die als Stickstoffsinken fungieren. Die vom Land ausgewaschenen Stickstoffverbindungen führen zu einer erhöhten Stickstoffkonzentration in der Wassersäule und in den Sedimenten (Codispoti und Christensen, 1985). Neben der Denitrifikation ist auch der Prozess des Anammox in marinen Habitaten an der Freisetzung fixierten Stickstoffverbindungen zu N_2 beteiligt (Meronigal et al., 2004).

4. Denitrifizierende Gemeinschaften in Umweltproben

Denitrifizierer werden als fakultativ anaerobe Mikroorganismen definiert, die unter anoxischen Bedingungen Nitrat oder Nitrit zu Distickstoffmonoxid und molekularem Stickstoff reduzieren (Tiedje, 1994). Sie nutzen sowohl organische Kohlenstoffverbindungen (organotrophe Denitrifizierer) als auch anorganische Verbindungen (chemolitotrophe Denitrifizierer) oder Licht (Meronigal et al., 2004) als Energiequellen. Zu den phototrophen Denitrifizierern zählt die Gattung *Rhodospseudomonas* sp., die ihre Energie über Photosynthese gewinnt (Kim et al., 1999).

Die Fähigkeit der Denitrifikation ist phylogenetisch weit verbreitet (Zumft, 1992a) und wurde für mehr als 50 Genera und 130 Spezies beschrieben (Tiedje, 1994). Denitrifikanten finden sich außerhalb der Bakterien ebenfalls unter den Archaeaen (Treich et al., 2005), Pilzen (Cathrine und Raghukumar, 2009) und Eukaryonten (Risgaard-Petersen et al., 2006). Die phylogenetische Diversität der Denitrifikanten spiegelt sich auch in der Diversität ihrer Habitate wider. So wurden Denitrifikanten im Boden, marinen Sedimenten und Süßwasser Sedimenten, aber auch in der Abwasseraufbereitung gefunden. Um die denitrifizierende Bakteriengemeinschaft eines Habitates bestimmen zu können, wurden in der Vergangenheit viele Kultivierungsversuche unternommen, jedoch waren mikroskopisch ermittelte Zellzahlen um einige Zehnerpotenzen höher als die wachstumsfähiger Zellen (Amann et al., 1995). Kultivierungs-abhängige Methoden konnten also im Gegensatz zu molekularbiologischen Methoden kein zuverlässiges Abbild der mikrobiellen Gemeinschaft liefern. Die Charakterisierung mikrobieller Gemeinschaften eines Habitates beruht deshalb häufig auf der phylogenetischen Einordnung der Organismen aufgrund ihres 16S rRNA-Gens (Ward et al., 1990; Woese, 1987). Neben dem 16S rRNA-Gen werden auch funktionelle Gene als phylogenetische Markergene verwendet. Dies gilt vor allem, wenn

I. Einleitung

physiologische Gruppen von Mikroorganismen aufgrund ihrer Diversität nicht anhand des 16S rRNA-Gens zu gruppieren sind. Hierzu zählen die Denitrifikanten (Zumft, 1992b). In vielen Analysen denitrifizierender Gemeinschaften wurden daher anstelle des 16S rRNA-Gens die funktionellen Gene *nirK* und *nirS* verwendet, welche für die Nitrit-Reduktase als Schlüsselenzym der Denitrifikation kodieren (Braker et al., 2000; Bremer et al., 2007; Hallin und Lindgren, 1999; Henry et al., 2004; Henry et al., 2008; Priemé et al., 2002; Sharma et al., 2005; Throbäck et al., 2004; Wolsing und Priemé, 2004; Yan et al., 2003; Yoshie et al., 2001).

Diese Analysen denitrifizierender Gemeinschaften anhand des *nirK*-Gens umfassten diverse Habitate wie Böden (Bremer et al., 2007; Henry et al., 2004; Henry et al., 2008; Sharma et al., 2005; Throbäck et al., 2004; Wolsing und Priemé, 2004), kontaminierte Grundwasserleiter (Yan et al., 2003), Sedimente (Braker et al., 2000), Abwasser (Hallin und Lindgren, 1999; Yoshie et al., 2001) und Sumpf (Priemé et al., 2002). Anhand dieser phylogenetischen Analysen kann man einen *nirK*-Stammbaum erstellen. Die *nirK*-Sequenzen dieses Stammbaumes gruppieren sich in acht unterschiedliche Cluster (Abb. 5). Für die vorliegende Arbeit ist Cluster I von besonderer Bedeutung. Im Gegensatz zu den meisten anderen Clustern wird Cluster I von *nirK*-Sequenzen unkultivierter Organismen aus Böden von unterschiedlichen geographischen Standorten dominiert. Bisher gruppiert nur ein kultivierter Vertreter, *Nitrosomonas* sp. TA-921i-NH₄, in dieses Cluster. Da die *nirK*-Sequenz des *Nitrosomonas*-Stammes nur entfernt zu den anderen *nirK*-Sequenzen des Clusters gruppiert, war es bisher nicht möglich, die *nirK*-enthaltenden Denitrifikanten dieses Clusters taxonomisch, metabolisch und physiologisch näher beschreiben zu können. Da es ohne vorliegende Reinkultur mit molekularbiologischen Methoden allein nicht möglich ist Aussagen über die Physiologie, Taxonomie und den Metabolismus zu treffen, ist die Methode der Kultivierung von entscheidender Bedeutung (Stott et al., 2008).

5. Kultivierung von Bakterien

Die Kultivierung eines Isolates beruht auf der Bildung einer Population aus einer einzelnen Zelle (Overmann, 2006). Die Anzahl bisher kultivierter Bakterien ist verglichen zur Anzahl der Gesamtbakterien sehr gering. So konnten nur 0,3% der Gesamtbakterien aus Bodenproben kultiviert werden (Torsvik et al., 1990). Deshalb lassen sich zu vielen Mikroorganismen, deren Vorkommen auf Basis von 16S rRNA-Gen- oder funktionellen Gen-Sequenzen nachgewiesen wurde, keine kultivierten Verwandten zuordnen. Oftmals werden aber phylogenetische Cluster von ökologisch relevanten, unkultivierten Bakterien

I. Einleitung

dominiert. Um die Funktion dieser Bakteriengruppen untersuchen zu können, müssen sie als Reinkulturen vorliegen. Durch die Entwicklung neuer Kultivierungsmethoden wurde die Kultivierung von bislang nicht kultivierten Bakteriengruppen ermöglicht (Heylen et al., 2006b; Kaeberlein et al., 2002; Keller und Zengler, 2004). Dabei wurden insbesondere folgende Parameter variiert: niedrige Nährstoffkonzentrationen (Connon und Giovannoni, 2002), verschiedene Quellen von Nährstoffen, hohe Verdünnungsstufen des Inokulums (Bruns et al., 2003; Gich et al., 2005), verschiedene Vereinzelmethode (Zengler et al., 2002) und längere Inkubationszeiten (Janssen et al., 2002; Keller und Zengler, 2004). Keller und Zengler (2004) und Jansen et al. (2002) konnten mit der Kombination aus Minimalmedien und längeren Inkubationszeiten viele neue Bakterienspezies isolieren.

Bruns et al. (2003) und Gich et al. (2005) verwendeten für ihre Kultivierung eine MicroDrop-Technik. Diese Methode hat den Vorteil, dass viele Anreicherungsansätze parallel in Mikrotiterplatten inkubiert werden können. Dabei ist die Menge des Inokulums mit einem Microdrop-Mikrodispenser einstellbar und kann, nach Angaben des Herstellers, bis auf eine Zelle pro Inokulumstropfen minimiert werden. Eine alternative Vereinzelmethode kombiniert die Einkapselung von Bakterienzellen in Gel-Mikrotropfen und die weitere Kultivierung in einem Durchflusssystem sowie die Wachstumsaufzeichnung mittels Durchflusszytometrie (Zengler et al., 2002). Des Weiteren wurde ein Platten-Wasch-Verfahren mit anschließender PCR zur Detektion gesuchter Phylotypen entwickelt (Stevenson et al., 2004).

Bisherige Kultivierungsversuche ergaben eine Vielzahl von Denitrifikanten, die viele Habitate dominieren (Gamble et al., 1977; Hallin et al., 2007): *Pseudomonas* sp., *Ralstonia* sp., *Alcaligenes* sp., *Paracoccus* sp., *Rhodobacter* sp., *Rubrivivax* sp., *Thauera* sp., *Burholderia* sp., *Bacillus* sp. und *Streptomyces* sp.. Unter den *Enterobacteriaceae*, den obligaten Anaeroben und den Gram-positiven Bakterien (außer *Bacillus* sp.) wurden bisher keine Denitrifikanten nachgewiesen. In einer Vielzahl von Studien wurde versucht, bisher unkultivierte Denitrifikanten aus verschiedenen Habitaten mit unterschiedlichen Kultivierungsmethoden zu kultivieren. Aus folgenden Habitaten konnten bislang Denitrifikanten erfolgreich angereichert werden: aus marinen Sedimenten und Wassersäulen (Goregues et al., 2005), aus Süßwasser-Sedimenten (Gamble et al., 1977), Belebtschlamm (Heylen et al., 2006b; Su et al., 2001), Abwasser (Patureau et al., 2000), Boden (Fries et al., 1994; Gamble et al., 1977; Hashimoto et al., 2006; Saad und Conrad, 1993), Ackerboden (Chenèby et al., 2000; Dandie et al., 2007a; Fries et al., 1994) und Stallmist (Gamble et al., 1977).

I. Einleitung

Sowohl Fries et al. (1994) als auch Gamble et al. (1977) reicherten Denitrifikanten unter anoxischen Bedingungen und unter Zugabe von Kaliumnitrat an. Die Inkubationszeit betrug nach Fries et al. (1994) drei und nach Gamble et al. (1977) 14 Tage. Ebenfalls wählten Song et al. (2000), Heylen et al. (2006b), Goregues et al. (2005), Hashimoto et al. (2006) und Brettar et al. (2001) zweiwöchige anoxische Kultivierungsbedingungen - unter Zugabe von Kaliumnitrat - für die Isolierung von Denitrifikanten aus Umweltproben. Bei einem Vergleich von verschiedenen Medien und Kultivierungsbedingungen konnten Brettar et al. (2001) die größte Diversität an Denitrifikanten mit Nitrat enthaltendem „Nutrient Broth“ Medium unter anoxischen Kultivierungsbedingungen erzielen. Dieses Ergebnis wurde durch Hashimoto et al. (2006) bestätigt. Nur Oakely et al. (2007) inkubierten Meerwasserfiltrat unter oxischen Bedingungen, erhöhten die Inkubationszeit auf acht Monate und isolierten damit einen engen Verwandten von *Marinobacter maritimus*.

Aus verschiedenen Habitaten wurden also bereits Denitrifikanten isoliert. Die verwendeten spezifischen Kultivierungsbedingungen für Denitrifikanten führten dabei jedoch zu Isolaten, deren *nirK*-Sequenzen keine phylogenetische Nähe zu den *nirK*-Sequenzen des Clusters I zeigten. Vielmehr gruppieren diese zu *nirK*-Sequenzen von anderen, bereits kultivierten Denitrifikanten-Stämmen in Cluster II, V, VII und VIII.

Wie die bereits erwähnten Studien von Keller und Zengler (2004) und Janssen et al. (2006) zeigten, können unspezifische Anreicherungen von Mikroorganismen mit niedrigen Nährstoffkonzentrationen, längeren Inkubationszeiten und oxischen Inkubationsbedingungen zur Kultivierung von bisher unkultivierten Spezies führen. Die unspezifische Anreicherung von Mikroorganismen könnte auch innerhalb der Denitrifikanten zur Kultivierung der bisher unkultivierten, ökologisch relevanten Mikroorganismen des *nirK*-Clusters I führen. Die Methode weist daraufhin, dass unter unspezifischen Bedingungen andere physiologische Eigenschaften von den Bakterien gefordert werden als die Denitrifikation und diese somit nicht als dominant oder selektiv anzusehen ist.

6. Ziele der Arbeit

In einer Vielzahl von molekularbiologischen Studien wurde festgestellt, dass viele *nirK*-enthaltende Denitrifikanten aus Böden unterschiedlicher geographischer Standorte in ein Cluster (Cluster I) des phylogenetischen *nirK*-Baumes gruppieren. Trotz der Fülle an Sequenzen aus Umweltproben in diesem Cluster konnte bislang nur ein Isolat, *Nitrosomonas* TA-921i-NH₄, kultiviert werden, dessen *nirK*-Sequenz in dieses Cluster gruppiert. Aufgrund der entfernten Verwandtschaft des *Nitrosomonas*-Stammes zu den aus Böden stammenden *nirK*-Sequenzen innerhalb des Clusters waren taxonomische, physiologische und metabolische Analysen der Denitrifikanten dieses Cluster daher nur begrenzt möglich. Spezielle Anreicherungsversuche für Denitrifikanten ergaben bisher eine Vielzahl an Isolaten, die jedoch keine phylogenetische Nähe zu den *nirK*-Sequenzen des Clusters I zeigten.

In der vorliegenden Arbeit sollten *nirK*-enthaltende Denitrifikanten aus Cluster I kultiviert werden, um dieses näher charakterisieren zu können. Dazu sollten *nirK*-enthaltende Denitrifikanten des phylogenetischen *nirK*-Clusters I in den beprobten Boden anhand einer Klonbibliothek nachgewiesen werden. Anschließend sollten diese unter Laborbedingungen durch die Anwendung unspezifischer Kultivierungsmethoden isoliert und ihre Wachstumsbedingungen optimiert werden. Die gewonnenen Isolate sollten dann sowohl molekularbiologisch als auch mikrobiologisch analysiert werden. Dabei sollten die Isolate identifiziert und deren Denitrifikationsgene phylogenetisch analysiert und verglichen werden. Ferner sollte die Aktivität dieser Isolate mittels N₂O-Messungen nachgewiesen werden.

II. Material und Methoden

1. Material

1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders erwähnt, von folgenden Firmen bezogen:

- Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
- Fluka, Buchs, Schweiz
- Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- Merck, Darmstadt, Deutschland
- MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland
- New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Deutschland
- Promega, Mannheim, Deutschland
- Qiagen, Hilden, Deutschland
- Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
- Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
- Difco, Detroit, Michigan, USA

Folgende Gase wurden von der Firma Messer-Griesheim (Frankfurt, Deutschland) bezogen: N₂-ECD, Argon-Methan-5%-Gasgemisch, N₂O-(50 ppm)-N₂-Gasgemisch, N₂O-(400 ppb)-synthetische Luft Gasgemisch als N₂O-Standards und Acetylen.

1.2 Puffer, Lösungen und Medien

Puffer

(N-Morpholino)-Propansulfonsäure	20,9 g MOPS
(MOPS)-Puffer 500 mM	100 ml NaOH (1 M)
	pH 7,1
	bei 121°C 30 min autoklaviert
Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer	10 × gebrauchsfertig
	pH 8,3

II. Material und Methoden

Tris-EDTA (TE)-Puffer	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA pH 8,0
Auftragspuffer 6 ×	50% [w/v] Saccharose 0,1% [w/v] Bromphenolblau 4 M Harnstoff 50 mM EDTA
Neutralisierungspuffer für Blot	0,5 M Tris 3 M NaCl auf pH 7,0 einstellen
Waschpuffer für Blot	0,1 M Maleinsäure 0,15 M NaCl 0,3% [v/v] Tween 20 pH 7,5
Maleinsäure Puffer für Blot	0,1 M Maleinsäure 0,15 M NaCl pH 7,5
Detektionspuffer für Blot	0,1 M Tris-HCl pH 9,5
Marker für 50 Ansätze je 12,5 µl: GibcoBRL® 1 kb-Ladder, 250 µg/µl	25 µl 125 µl 6 × Auftragspuffer 475 µl H ₂ O

Lösungen

Lösungen für die Ionenchromatographie zum Nachweis von Nitrat:

Modifizier	1 g 4-Hydroxybenzonnitril in 100 ml Methanol
------------	---

II. Material und Methoden

Eluent	5 mM Na ₂ CO ₃ Modifier 1 ml/l
Standard	1 mM NaNO ₃
Lösung zur Bodensuspension: 4-fach verdünnte Ringer-Lösung (Dunger, 1997)	2,25 g/l NaCl 0,105 g/l KCl 0,12 g/l CaCl ₂ × 6 H ₂ O 0,05 g/l NaHCO ₃ pH 7,0
Lösungen zum Dot-Blot Verfahren: 20 x SSC	3 M NaCl 0,3 M Na ₃ Citrat × 2 H ₂ O pH 7,0
Waschlösung 1	2 × SSC 0,1% [w/v] SDS
Waschlösung 2	0,5 × SSC 0,1% [w/v] SDS

Medien

Die Medien wurden angesetzt. Der pH-Wert, soweit nicht anders erwähnt, mit HCl und NaOH eingestellt und der Ansatz bei 121°C 30 min autoklaviert.

Bodenmedium (Grosser et al., 2000)	2,5 mM NH ₄ NO ₃ 1 mM NaNO ₃ 0,75 mM Na ₂ SO ₄ 4 mM CaSO ₄ 0,25 mM K ₂ SO ₄ 2 mM MgCl ₂ 0,005 mM KH ₂ PO ₄ 0,02 mM FeSO ₄ 15 mM MOPS
------------------------------------	--

II. Material und Methoden

	NB (1:10000) [w/v] pH-Wert 7,1 (für festes Medium wurde 8 g/l Gelrite hinzugefügt)
R2A-Medium	0,5 g/l Hefeextrakt 0,5 g/l Proteose-Pepton 0,5 g/l Casaminosäuren 0,5 g/l Glukose 0,5 g/l lösliche Stärke 0,3 g/l Natrium-Pyruvat 0,3 g/l K_2HPO_4 0,05 g/l $MgSO_4 \times 7 H_2O$ 0,5 g/l Kaliumnitrat pH 7,2 (für festes Medium wurden 15 g/l Agar hinzugefügt)
Hefe-Extrakt-Mannitol (YEM)-Medium	10 g/l Mannit 0,5 g/l K_2HPO_4 0,2 g/l $MgSO_4 \times 7 H_2O$ 0,1 g/l NaCl 0,4 g/l Hefeextrakt pH 7,0
Trypticase soy broth	30 g/l Tryptic Soy Broth pH 7,3
Nutrient Broth (NB) Medium	8,0 g/l Nutrient Broth pH 7,0
Luria-Bertani (LB)-Medium	10 g/l Bacto-Trypton 5 g/l Bacto-Hefeextrakt 5 g/l NaCl

II. Material und Methoden

1.3. Verwendete Kits

Wizard SV Gel & PCR Clean-Up System	Promega, Madison, WI, USA
pGEM-T Easy Vector System	Promega, Madison, WI, USA
Wizard DNA Clean-Up System	Promega, Madison, WI, USA
DIG-High Prime DNA Labeling Starter Kit I	Roche Applied Science, and Detection Mannheim, Deutschland
ABI Prism® BIG Dye® Terminator v3.1 /v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, CA, USA
FastDNA® SPIN Kit for soil	Bio 101, CA, USA

1.4 Mikroorganismen

Folgende Bakterienstämme wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet (siehe Tab.1).

Tabelle 1: Verwendete Bakterienstämme.

	Stamm	Quelle
<i>Alcaligenes</i> sp.	DSMZ 30128	(Braker und Tiedje, 2003)
<i>Pseudomonas</i> sp.	G-179	(Ye et al., 1993)
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	JM 300	(Coyne et al., 1989)
<i>Bosea</i> sp.	PD 19	(Dandie et al., 2007a)
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	DSMZ 1755	(Maier et al., 1978)
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	DSMZ 11554	(Kuykendall et al., 1992)
<i>Mesorhizobium</i> sp.	4FB11	(Song et al., 2000)
<i>Devosia limi</i>	DSMZ 17137	(Vanparys et al., 2005)
<i>Opitutus terrae</i>	DSMZ 11246	(Chin et al., 2001)
<i>Bacillus pumilus</i>	DSMZ 27	(Seki et al., 1978)

II. Material und Methoden

1.5 Oligonukleotide

Die aufgelisteten Primer wurden in der Arbeit verwendet (siehe Tab. 2).

Tabelle 2: Oligonukleotide für die Amplifizierung ausgewählter Gene.

Primer*	Position	Primer sequenz 5'-3'	Zielen	Quelle
napA V 16 ^a		GCNCCNTGYMGNTTYTYGYGG ^b	Nitrat-Reduktase	(Flanagan et al., 1999)
napA V 17 ^a		RTGYTRTRRAANCCCAINGTCCA ^b	Nitrat-Reduktase	(Flanagan et al., 1999)
napA V 66 ^a		TAYTTYTNHSNAARAATHATGTAYGG ^b	Nitrat-Reduktase	(Flanagan et al., 1999)
napA V 67 ^a		DATNGGRTGCATYTCNGCCATRTT ^b	Nitrat-Reduktase	(Flanagan et al., 1999)
narG F	1960 ^c	TAYGTSGGSCARGARAA ^b	Nitrat-Reduktase	(Philippot et al., 2002)
narG R	2650 ^c	TTYTCRTACCABGTBGC ^b	Nitrat-Reduktase	(Philippot et al., 2002)
narH 50F	43-59 ^d	AARTGYATCGGYTGCCA ^b	Nitrat-Reduktase	(Petri und Imhoff, 2000)
narH 430R	437-421 ^d	TCNTCCCAGTTNGGNCC ^b	Nitrat-Reduktase	(Petri und Imhoff, 2000)
nirK 1F	526-542 ^e	GGMATGGT(G/T)CCSTGGCA ^b	Nitrit-Reduktase	(Braker et al., 1998)
nirK 5R	1023-1040 ^e	GCCTCGATCAGRTRRTGG ^b	Nitrit-Reduktase	(Braker et al., 1998)
nirS 1F	763-780 ^e	CCTAYTGCCCGCCRCART ^b	Nitrit-Reduktase	(Braker et al., 1998)
nirS 6R	1638-1653 ^e	CGTTGAACTRCCGGT ^b	Nitrit-Reduktase	(Braker et al., 1998)
cnorB 2F	553-571 ^f	GACAAAGNNNTACTGGTGT ^b	Stickstoffmonoxid-Reduktase	(Braker und Tiedje, 2003)
cnorB 6R	942-925 ^f	GAANCCCCANACNCCNGC ^b	Stickstoffmonoxid-Reduktase	(Braker und Tiedje, 2003)
qnorB 2F	1204-1220 ^f	GGNCAYCARGGNTAYGA ^b	Stickstoffmonoxid-Reduktase	(Braker und Tiedje, 2003)
qnorB 7R	1841-1822 ^f	GGNGGRTTDTACADGAANCC ^b	Stickstoffmonoxid-Reduktase	(Braker und Tiedje, 2003)
nosZ F	1185-1200 ^g	CGYTGTTTCMTCGACAGCCAG	Distickstoffoxid-Reduktase	(Kloos et al., 2001)
nosZ R	1863-1881 ^g	CATGTGCAGNGCRTGGCAGAA ^b	Distickstoffoxid-Reduktase	(Kloos et al., 2001)
16S F	8-27 ^h	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG ^b	16S rRNA	(Amann et al., 1995)
16S R	1392-1407 ^h	ACGGCGGTGTGTACA	16S rRNA	(Amann et al., 1995)
16S R	927-942 ^h	ACCGCTTGTGGGGCCCC	16S rRNA	(Giovannoni et al., 1988)
T7		TAATACGACTCACTATAGGG	pGEM [®] -T Vektor	Invitrogen (2004)
M13 R		CAGGAAACAGCTATGAC	pGEM [®] -T Vektor	Invitrogen (2004)

*forward und reverse Primer werden mit den Buchstaben F und R abgekürzt.

^aDie Positionen beziehen sich auf die *napA* Gene von *Pseudomonas* sp. strain S2.14 und *Paracoccus pantotrophus*

^bN=A/C/G/T; Y=C/T; R=A/G; D=G/A/T; M=A/C H=A/C/T; S=G/C.

II. Material und Methoden

^c Die Primer wurden nach dem Genom Projekt der Datenbank GenBank erstellt

^d Die Positionen beziehen sich auf das *narH*-Gen von *Escherichia coli*

^e Die Positionen beziehen sich auf das *nirK*-Gen von *Alcaligenes faecalis* S-6 EMBL D13155 und im Falle des *nirS* Gens auf *Pseudomonas stutzeri* ZoBell EMBL X56813

^f Die Positionen beziehen sich auf beide *norB*-Gene von *Ralstonia eutropha* H16 (AF002661)

^g Die Positionen beziehen sich auf das *nosZ*-Gen beziehen von *Pseudomonas stutzeri*

^h Die Positionen beziehen sich auf das 16S rRNA-Gen von *Escherichia coli* K12 DSM498^T

2. Methoden

2.1 Bodenparameter

2.1.1 Probenahme

Für die Kultivierung von Denitrifikanten mit einem neuen *nirK*-Genotyp wurde der Boden einer Lahn-Wiese beprobt (siehe Abb. 3). Der Standort (50° 50'27,37''N und 8° 45'39,81''E) ist eine Weide-Graslandschaft und liegt im Uferbereich des Flusses Lahn in unmittelbarer Nähe zum Ort Wehrda am nördlichen Stadtrand von Marburg. Das Bodenmaterial wurde am 15.06.2006 in Triplikaten bis zu einer Tiefe von 0 - 10 cm entnommen, homogenisiert und auf < 2 mm gesiebt.



Abbildung 3: Standort der Bodenprobenahme, Lahn-Wiese August 2006.

2.1.2 Ionenchromatographische Bestimmung von Nitrat und Nitrit

Die Bestimmung des Nitrat- und Nitritgehaltes der Bodenproben erfolgte nach Extraktion mit 2 M KCl- Lösung in einem Ionenchromatographen-System (siehe Tab. 3; Sykam, Fürstenfeldbruck). Die Extraktion wurde nach einem modifizierten Protokoll (Schinner et al., 1991) durchgeführt. Statt 10 g Boden wurde eine 5 g Trockensubstanz entsprechende Bodenmenge in 20 ml (statt 40 ml) einer 2 M KCl-Lösung eingewogen und 1 h bei 150 UPM und 4°C geschüttelt. Danach wurde die Lösung durch stickstoffarme Filter (Rundfilter 2095, Schleicher & Schuell GmbH, Dassel) filtriert und das Filtrat in die

II. Material und Methoden

ionenchromatographische Messung eingesetzt. Als Eichstandard wurde 1 mM Nitratlösung verwendet. Die Auswertung erfolgte mittels der Software Peak Simple (Version 2.66, SRI Inc.).

Tabelle 3: Geräteparameter des Ionenchromatographen.

Säule	6 cm Edelstahlsäule, Ø 4,6 mm; Trägermaterial: Styrol/ Divinobenzol, 10 µm Korngröße; Temperatur: 70°C
Säulenofen	S4110
HPLC-Pumpe	S1121
Suppressorsystem	S4260A + S420B mit Trennsäule, LCA A14; 2,5 cm, Ø 3 mm
Eluent	5 mM Na ₂ CO ₃ + Modifier
Flussrate	1,5 ml min ⁻¹
Detektor	Leitfähigkeitsdetektor S3111 UV/vis Detektor (UVIS 204, Linear, USA)
Reagenzientableau	S7121
Autosampler	S5200 (Schambeck SFD GmbH, Bad Honnef, Deutschland)

2.1.3 Wassergehalt und pH-Wert

Die Bestimmung des Wassergehaltes erfolgte gravimetrisch. Von jeder Bodenprobe wurden 10 g bzw. 5 g feuchter Boden eingewogen, über Nacht im Trockenschrank bei 105°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und danach erneut gewogen.

Mit folgender Formel lässt sich der Wassergehalt berechnen:

$$\text{Wassergehalt [Gew.\%]} = (B_f - B_t) * B_t^{-1} * 100$$

B_f = Einwaage des feuchten Bodens in g

B_t = Einwaage des trockenen Bodens in g

Zur Bestimmung des pH-Wertes der Bodenaufschlammungen in den Inkubationsexperimenten wurden die den Inkubationen entsprechenden Bedingungen gewählt: Eine 10 g Trockensubstanz entsprechende Bodenmenge wurde eingewogen und mit 10 ml Leitungswasser versetzt. Die Aufschlammungen wurden 2 h bei 25°C stehen gelassen und anschließend der pH-Wert mit einer Glaselektrode (Mettler TOLEDO, In Lab[®] 427) und pH-Meter (Microprocessor pH-Meter 539, WTW) in der Suspension gemessen.

II. Material und Methoden

2.1.4 Bestimmung des C/N-Gehaltes

Der C/N-Gehalt stellt den Quotienten aus Gesamtkohlenstoff (C-org) und Gesamtstickstoff (Nt) dar (Scheffer und Schachtschabel, 1989). Zur Bestimmung des C/N-Gehaltes wurde der bei 105°C getrocknete Boden mit einem Mörser zerkleinert und homogenisiert. Der Kohlenstoff- und Stickstoffanteil der Bodenproben wurde durch das Routinelabor des Fachbereichs Chemie der Philipps-Universität Marburg bestimmt.

2.2 Mikrobiologische Analysen

2.2.1 Kultivierung von *nirK*-enthaltenden Denitrifikanten

Die Kultivierung wurde in einem parallelen Ansatz (A, B) mit dem homogenisierten und gesiebten Lahn-Wiesenbodenmaterial durchgeführt. Dazu wurden 10 g des Bodens in 90 ml Ringerlösung aufgenommen. Diese Bodensuspension diente als erste Verdünnungsstufe (10^{-1}). Die nachfolgenden Verdünnungsstufen dieser Suspension wurden in einem Verhältnis von 1:10, bis zu einer Verdünnungsstufe von 10^{-10} ebenfalls in Ringerlösung angesetzt. Aus den Verdünnungsstufen 10^{-3} bis 10^{-10} wurden jeweils 100 µl auf Bodenmedium (Minimalmedium) ausplattiert und bei 15°C vier Wochen unter oxischen Bedingungen inkubiert. Von den Verdünnungsstufen 10^{-4} bis 10^{-8} wurden von dem Ansatz A und B jeweils 10 Parallelen angesetzt, während fünf Parallelen von den Verdünnungen 10^{-9} - 10^{-10} inkubiert wurden. Mit dem Ausstrich von 100 µl auf Festmedium kamen zwei Verdünnungsstufen hinzu, sodass die Platten die Endverdünnungen 10^{-6} bis 10^{-12} besaßen. Als Festigungsmittel des Mediums diente Gelrite. Dieses stellt eine Alternative zu Agar-Agar dar, mit dem selbst kleinste Kolonien auf dem Medium noch gut erkennbar sind. Die sichtbaren Kolonien wurden auf eine frische Festmediumplatte transferiert und diese unter denselben Bedingungen wie die Originalplatte inkubiert.

2.2.2 Isolierung und Identifizierung von Denitrifikanten

Zellaufschluss und Screening nach Denitrifikanten

Alle Kolonien der Endverdünnungsstufen 10^{-6} bis 10^{-12} wurden nach potentiellen Denitrifikanten durchsucht. Dazu sollte das *nirK*-Gen von Isolaten mittels PCR mit *nirK*-spezifischen Primern nachgewiesen werden. Hierzu wurden die Kolonien einzeln in 50 µl *aqua bidest.* aufgenommen. Der Aufschluss der Zellen erfolgte durch einen dreimaligen Gefrier- und Auftauprozess bei -20°C und 100°C für jeweils 3 min. Die aufgeschlossenen Zellen wurden als Template (1 µl) in die PCR (**P**olymerase **C**hain **R**eaction) eingesetzt

II. Material und Methoden

(siehe Kapitel 2.3.2) und das Amplifikat mittels der Agarosegelelektrophorese nachgewiesen (siehe Kapitel 2.3.3).

Die Kolonien, deren DNA ein *nirK*-Gen aufwies, wurden mit einem Verdünnungsausstrich auf Bodenmedium vereinzelt und bis zu vier Wochen bei 15°C unter oxischen Bedingungen inkubiert. Mit aufeinander folgenden Verdünnungsausstrichen wurden diese zu einem Isolat vereinzelt.

Nachweis und Identifizierung

Die Reinheit des Ausstriches und der Zellsuspension wurde mit Mikroskopie und 16S rRNA-Gen-Sequenzierung überprüft. Um die Reinheit des gesamten Ausstriches nachzuweisen, wurden mehrere Kolonien eines Isolates in *aqua bidest.* vereinigt, die amplifizierten 16S rRNA-Genfragmente sequenziert und phylogenetisch analysiert (siehe Kapitel 2.3.2 bis 2.4.6).

Für lichtmikroskopische Untersuchungen wurde das Zellmaterial einer Kolonie in 5 µl Ringerlösung resuspendiert. Dieser Ansatz wurde auf einen Objektträger gebracht und mikroskopiert (Fluoreszenzmikroskop, Axiophot, Zeiss, Jena). Unter Zugabe von 2 µM des 4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid (DAPI)-Reagenzes erfolgte das Anfärben der Gesamt-DNA der Zellen. Nach einer Inkubationzeit von 5 min schloss sich die lichtmikroskopische Analyse an.

Wachstum der Isolate unter anoxischen Bedingungen

Die zu einem Isolat vereinzelt Kulturen wurden dann unter anoxischen Bedingungen auf Bodenmedium kultiviert. Dem Medium wurde dabei 5 mM Kaliumnitrat beigemischt. Die Inkubation erfolgte zum einen auf Festmedium, zum anderen in Flüssigmedien. Die Isolate wurden auf Festmedium ausgestrichen und die Platten in Anaeroben-Töpfen gestellt (Werkstatt Max-Planck Institut für terrestrische Mikrobiologie, Eigenbau, Marburg). Die sauerstofffreie Atmosphäre im Topf wurde durch Anaerocult Platten (Anaerocult[®] A, Merck, Darmstadt, Deutschland) erzeugt und mit Indikatorstäbchen (Anaerotest[®] Merck, Darmstadt, Deutschland) angezeigt. Zusätzlich wurde in den Töpfen ein Überdruck mit N₂ von 0,3 bar angelegt. Die Kulturen wurden sechs Wochen bei 25°C inkubiert.

Die Kultivierung in Flüssigmedium (dasselbe Medium ohne Gelrite) erfolgte unter anoxischen Bedingungen in 120 ml Serumflaschen. Diese wurden mit 30 ml Medium befüllt und mit einem Butylstopfen, der durch eine Alukappe abgedichtet war, verschlossen. Um den Sauerstoff aus dem Medium und der Gasphase zu treiben, wurde das Flüssigmedium bei 0,5 bar 10 min mit N₂ durchgast und ein Überdruck von 0,3 bar angelegt. Die so

II. Material und Methoden

vorbehandelten Flaschen wurden bei 121°C 30 min autoklaviert, bevor sie mit dem *nirK*-enthaltenden Isolat angeimpft wurden und vier Wochen bei 25°C inkubierten. Aus diesen Kulturen stammte das Inokulum im folgenden Optimierungsversuch.

2.2.3 Optimierung der Wachstumsbedingungen

Um die Denitrifikationseigenschaften der Isolate untersuchen zu können, mussten die Wachstumsbedingungen unter anoxischen Verhältnissen optimiert werden.

Die Isolate 205, 373 und 484 wurden ebenfalls in den Versuchsansatz einbezogen und zusätzlich unter oxischen Bedingungen in den Flüssigmedien bei 25°C inkubiert.

Unter Verwendung verschiedener Medien und Inkubationstemperaturen sollte das Wachstum der *nirK*-enthaltenden Isolate optimiert werden. Die Inkubationen erfolgten in 120 ml Serumflaschen mit 30 ml R2A-, YEM- und Bodenmedium, welchen zusätzlich 5 mM KNO₃ hinzugefügt wurden. Für das Isolat 205 wurde zusätzlich TSB-Medium (Trypticase soy Broth) hergestellt. Die Medien wurden bei 0,3 bar 10 min mit N₂ durchspült und anschließend wurde ein Überdruck von 0,3 bar eingestellt. Dann wurden sie mit 1-3 ml Vorkultur in Triplikaten angeimpft und bei 25°C unter Schütteln (100 rpm) bis zu 50 Tage inkubiert. Die Isolate 205, 373 und 484, für die keine Flüssigkultur vorlag, wurden mit Kolonien der bewachsenen Gelriteplatten angeimpft.

Das Wachstum der Isolate wurde mit dem Wachstum verschiedener Referenzstämme verglichen. Die Isolate 469, 406, 467 und 471 wurden mit *Bradyrhizobium japonicum* verglichen, da dieser der bisher einzige Vertreter der Gattung *Bradyrhizobium* ist, bei dem eine vollständige Denitrifikation sowohl auf genomischer als auch auf funktioneller Ebene nachgewiesen wurde. Dem Isolat 187 diente der Stamm *Bosea* PD19, den Isolaten 373 und 484 der Stamm *Mesorhizobium* 4FB11 und dem Isolat 205 die Spezies *Devosia limi*, als Referenz. Alle Referenzstämme wurden ebenfalls unter anoxischen Bedingungen auf R2A-Medium (im Falle von *B. japonicum* und *Bosea* PD 19), YEM (im Falle von *Mesorhizobium* 4FB11) und TSB (im Falle des *Devosia limi*) kultiviert.

Die Optimierung der Inkubationstemperatur erfolgte im jeweils präferierten Medium (siehe Tab. 4) für 15 (187, 373, 406, 469, 484) bzw. 22 Tage (406) bei 15°C, 20°C, 25°C, 30°C und 37°C. Während die Isolate 187, 406, 467, 469 und 471 unter anoxischen Bedingungen inkubierten, wurde die optimale Wachstumstemperatur der Isolate 373 und 484 unter oxischen Bedingungen gemessen. Die Ansätze wurden während der Inkubation nicht geschüttelt. Das Wachstum wurde mittels eines Spektralphotometers (Hitachi, U-100

II. Material und Methoden

Spektrophotometer) bei einer optischen Dichte von 578 nm verfolgt. Des Weiteren wurde der Verbrauch an Nitrat mittels Indikator-Teststäbchen verfolgt.

Tabelle 4: Isolate und deren bevorzugte Medien.

Isolat	Medium
187	R2A
373	YEM
406	YEM
467	R2A
469	YEM
471	R2A
484	YEM

Wachstum der Isolate unter oxischen Bedingungen

Das Wachstumsverhalten der Isolate 187, 406, 467, 469 und 471 wurde ebenfalls in 50 ml des präferiertem Flüssigmediums unter oxischen Bedingungen ermittelt.

Als Inokulum diente 1 bis 3 ml einer Vorkultur mit einer OD_{578nm} von 0,01. Die verschiedenen Ansätze wurden bei einer Inkubationstemperatur von 25°C (187, 406, 467, 469, 471) und 30°C (373 und 484) geschüttelt und bis zu 12 Tagen inkubiert.

2.3 Molekularbiologische Analysen

2.3.1 DNA-Extraktion aus Reinkulturen und Bodenproben

Für die Extraktion der Nukleinsäuren aus Reinkulturen wurden 2 ml Kultur abgenommen und bei 14000 rpm (Tischzentrifuge 5417R, Eppendorf, Deutschland) 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 500 µl *aqua.bidest.* resuspendiert und zu 0,5 g Glasbeads (Ø 0,17-0,18 mm, B. Braun Biotech Int. GmbH, Melsungen) gegeben. Der Zellaufschluß erfolgte mechanisch mittels einer Zelmühle (Fast-Prep[®] -24, Firma MP Biomedicals, Heidelberg, Deutschland). Die Zellen wurden zwei Mal für 45 sec bei 6,5 m/s geschüttelt und zwischenzeitlich 1 min auf Eis gekühlt. Durch einen anschließenden Zentrifugationsschritt (14000 rpm 5 min, 4°C) wurde die DNA im Überstand von den Zellresten im Pellet getrennt. Der Überstand wurde in einem Eppendorfgefäß aufgefangen und das Pellet verworfen. Die Reinigung der DNA von Proteinen erfolgte mit dem Wizard[®] DNA Clean-up Kit (Promega, Mannheim, Deutschland) nach den Angaben des Herstellers. Dabei wurde die DNA an eine Matrix gebunden, mit 80% Isopropanol gewaschen und mit reinstem Sigma[®]-Wasser eluiert.

II. Material und Methoden

Die Extraktion von genomischer DNA aus Bodenproben erfolgte mit 0,5 g Bodenmaterial und dem Fast[®]DNA SPIN Kit for soil (BIO 101, CA, USA). Die DNA wurde nach Angaben des Herstellers extrahiert.

Die Konzentration und die Reinheit der extrahierten DNA wurden spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm ermittelt (NanoDrop[®] ND-1000 UV/VIS-Spektralphotometer, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland).

2.3.2 Amplifizierung spezieller Gene

Mit Hilfe spezifischer Primer (siehe Tab. 2) wurden phylogenetische Markergene (16S rRNA) und funktionelle Gene (der Nitrat-Reduktase, der Nitrit-Reduktase, der Stickstoffmonoxid-Reduktase und der Distickstoffoxid-Reduktase) während der PCR vervielfältigt. Als Probe wurden aufgeschlossene Zellen, extrahierte genomische DNA der Isolate oder die extrahierte DNA aus Bodenproben eingesetzt. Jeder Probensatz enthielt neben den Proben auch jeweils eine Positiv- und eine Negativkontrolle (ohne DNA). Die Positivkontrolle bestand aus DNA eines Bakterienstammes mit dem zu amplifizierenden Zielgen (siehe Tab. 5).

Die PCR wurde in den Geräten GeneAmp 9700 Thermocycler (Applied Biosystems, CA, USA) oder im Falle der *nirK*-PCR im PCR-Cycler Primus 96^{plus} (MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland) durchgeführt. Je nach verwendeten Primerpaaren (siehe Tab. 2) wurden unterschiedliche Reaktionsgemische angesetzt (siehe Tab. 6).

Tabelle 5: Positivkontrollen und das jeweilige zu amplifizierende Zielgen.

Stamm	Zielgen
<i>Pseudomonas</i> sp. G-179	<i>nirK, napA</i>
<i>Alcaligenes</i> sp.	<i>qnorB</i>
<i>Pseudomonas stutzeri</i> JM300	<i>narG, narH, nirS, cnorB, nosZ</i>

Mit Ausnahme der Klon-PCR und Klon-Screening-PCR wurden für alle Reaktionen die RedAccu Taq (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) und das Protokoll nach Bremer et al. (2007) verwendet. Sowohl für die Klon-PCR als auch für die Klon-Screening PCR wurde *Taq*-DNA-Polymerase von Invitrogen (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) eingesetzt.

II. Material und Methoden

Tabelle 6: Pipettierschema der PCR-Mixtur.

Lösung	Bremer et al. (2007)	Klone Screening	Klon
Puffer [10 ×]	2,50 µl	1,25 µl	5,0 µl
dNTPs [je 200 µM]	1,00 µl	0,25 µl	1,0 µl
Forward-Primer [10 pmol µl ⁻¹]	2,00 µl	0,3 µl	1,2 µl
Reverse-Primer [10 pmol µl ⁻¹]	2,00 µl	0,3 µl	1,2 µl
BSA [400 ng µl ⁻¹]	2,50 µl	-	-
Taq-Polymerase [1,25 U µl ⁻¹]	1,25 µl	0,1 µl	0,4 µl
MgCl ₂	-	0,375 µl	-
Mit PCR Wasser aufgefüllt	ad 24,00 µl	10,0 µl	ad 50,0 µl
DNA-Template	1 µl		

Im Folgenden werden die verschiedenen PCR-Programme zusammengefasst (siehe Tab. 7), wobei der Hot-Start (95°C 3 bis 5 min) und die Extension-Temperatur (72°C 8 min) bei allen Programmen nicht verändert wurden (außer für *napA*, hier galt: 70°C für 4 min als Hot-Start- und 8 min bei 72°C für die Extension-Temperatur). Die PCR-Programme wurden von den Autoren der jeweiligen Primerkombinationen (siehe Tab. 2) modifiziert übernommen.

Im Gegensatz zu den anderen Protokollen beruht die *nap*-PCR auf einer nested-PCR. Hier wurde das PCR-Produkt des Primerpaares Nap V16 und V17 als Template in einer folgenden PCR mit Primerpaar Nap V66 und V67 eingesetzt.

II. Material und Methoden

Tabelle 7: PCR-Programme.

Primer-kombination*	Zielgen	Zyklen Anzahl	D	A	E	Touchdown Zyklen	Touchdown A temp (°C)
nap ^a V16&17/ V66&67	<i>napA</i>	30	95°C, 30 s	55°C, 45 s	72°C, 45 s	8	59,0 -0,5
nar ^b 1960F & 2650R	<i>narG</i>	30	94°C, 30 s	55°C, 30 s	72°C, 45 s	8	59 -0,5
nar ^c 50F & 430R	<i>narH</i>	25	94°C, 1 min	50°C, 1 min	72°C, 2 min	-	-
nirK ^d 1F & 5R nirS ^d 1F & 5R	<i>nirK/ nirS</i>	25	94°C, 30 s	55°C, 40 s	72°C, 40 s	10	57 -0,5
cnorB ^e 2F &6R qnorB ^e 2F & 7R	<i>cnorB/ qnorA</i>	30	95°C, 30 s	55°C, 40 s	72°C, 40 s	10	57 -0,5
nos ^f 1188F & 1869R	<i>nosZ</i>	25	94°C, 1 min	50°C, 1 min	72°C, 2 min	-	-
16S ^g 9F & 1492 R	16S rRNA	28	94°C, 1 min	57°C, 1 min	72°C, 3 min	-	-
T7 & M13	pGEM-T [®] Vektor	30	95°C, 30 s	55°C, 40 s	72°C, 1 min	-	-
Sequenzier reaktion		25	96°C, 10 s	50°C, 50 s	60°C, 4 min	-	-

D: Denaturierungstemperatur und Denaturierungsdauer, A: Annealingstemperatur und Annealingdauer, E: Elongationstemperatur und Elongationsdauer

2.3.3 Nachweis der PCR-Amplifikate mittels Agarosegelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurden auf ein 1,5% (wt/vol) Agarosegel aufgetragen und mit 1 × TAE-Laufpuffer bei 120 Volt für 45 min elektrophoretisch getrennt. Um die Größe der Banden einer Basenpaargröße zuordnen zu können, wurde ein Längenstandard (1 Kb-Ladder,

II. Material und Methoden

Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) mit definierten Größen zusätzlich auf das Gel aufgetragen. Das Gel wurde nach der Trennung der Fragmente in einem Ethidiumbromidbad ($0,5 \text{ mg l}^{-1}$) gefärbt und fotografiert (INTAS, Gel Jet Imager, Göttingen).

2.3.4 Reinigung der PCR-Produkte

Die Reinigung amplifizierter Produkte erfolgte mit dem Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA) nach Angaben des Herstellers. Waren neben dem erwarteten Amplifikat auch PCR-Produkte anderer Basenpaarlängen amplifiziert worden, so wurde die Bande der erwarteten Größe aus dem Agarosegel ausgeschnitten und ebenfalls mit dem oben genannten Kit nach den Angaben des Herstellers eluiert.

2.3.5 Sequenzierung

Die verwendete DNA-Sequenzierungsmethode beruht auf dem Prinzip des Kettenabbruchs nach Sanger (Sanger et al., 1977). Das Reaktionsgemisch enthält vier verschiedene 5'-fluoreszenzmarkierte Didesoxyribonukleosidtriphosphate. Diese führen zum Abbruch der Polymeraseaktivität, wodurch verschieden lange 3'-fluoreszenzmarkierte DNA-Fragmente entstehen. Vor der Sequenzierungsreaktion wird das zu sequenzierende Fragment mit spezifischen Primern amplifiziert (siehe Tab. 2 und 7) und danach aufgereinigt. Für die Sequenzierreaktion wurden spezifische Primer (für *nirK*: nirK1F, nirK5R; für 16S: 8F und 1405R und für die Inserts: T7, M13), gereinigtes PCR-Produkt und Big-Dye terminator kit version 3.1 (Applied Biosystems, CA, USA) nach den Angaben des Herstellers in eine „Cyclesequencing“ Reaktion eingesetzt (siehe Tab. 8) und lief nach dem Cyclesequencing Programm ab (siehe Tab. 7). Anschließend wurden die restlichen Salze mit Autoseq G-50 Säulchen (Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) entfernt und das Eluat unter Vakuum in der SpeedVac (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland) getrocknet. Die Analyse der Proben erfolgte mit dem automatischen Sequencer ABI 3130 (Applied Biosystems). Es wurden sowohl klonierte Fragmente, wie im Falle der *nirK*-Klonbibliothek, als auch direkt PCR-Produkte sequenziert, die von der genomischen DNA der Isolate amplifiziert worden waren.

II. Material und Methoden

Tabelle 8: Protokoll zur Cyclesequenzierung Reaktion.

Lösung	Konzentration
Big Dye-Mix	2,0 µl
Puffer	3,0 µl
Primer [10 pmol µl ⁻¹]	1,5 µl
DNA-Template	100 ng
PCR Wasser	ad 20 µl

2.3.6 Phylogenetische Analyse der 16S rRNA-Gen-Sequenzen und der funktionellen Denitrifikationsgene

Die aus der Sequenzierung hervorgehenden Rohsequenzdaten wurden mit dem Computer Programm Seqman II (DNASTAR, Madison, Wisconsin, USA) weiterbearbeitet. Die Sequenzabschnitte, die in beide Richtungen sequenziert oder die aufgrund ihrer Länge abschnittsweise sequenziert worden waren, wurden zusammengesetzt. Die Amplifizierung und Sequenzierung der funktionellen- und 16S rRNA-Genfragmente diente der phylogenetischen Einordnung und Identifizierung des Bakteriums. Grundlage für die phylogenetische Analyse war die vergleichende Sequenzanalyse. Der erste Abgleich mit bekannten Sequenzen erfolgte anhand der öffentlich verfügbaren Datenbanken durch das Programm „BLAST“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). Mittels der ARB-Software (Ludwig et al., 2004) erfolgte anschließend die genauere phylogenetische Einordnung. In ARB wurden Datenbanken für die proteinkodierenden Gene *nirK*, *cnorB* und *nosZ* genutzt, die alle zu diesem Zeitpunkt öffentlich verfügbaren Sequenzen enthielten. Zur phylogenetischen Zuordnung der denitrifizierenden Isolate wurde eine 16S rRNA-Gen-Datenbank genutzt.

Die Sequenzen wurden in das Programm geladen und mit der integrierten „FAST-Aligner“-Funktion anhand von schon vorhandenen Sequenzen in ein Alignment gebracht. Die DNA-Sequenzen der proteinkodierenden Gene wurden dann in ein Aminosäure-Alignment umgeschrieben und phylogenetische Bäume berechnet. Unter Verwendung des Neighbour-Joining Algorithmus wurden die aufgearbeiteten Sequenzdaten in den Gesamtbaum der ARB-Datenbank eingebracht und ein vorläufiger Stammbaum erstellt. Die hoch variablen Regionen innerhalb des 16S rRNA-Gens wurden durch die Verwendung von Filtern, die mit der ARB-Software zur Verfügung gestellt wurden, von der phylogenetischen Analyse ausgeschlossen. Von diesem wurden dann Sequenzen ausgewählt und ein abschließender Stammbaum berechnet.

II. Material und Methoden

2.3.7 Erstellung der *nirK*-Klonbibliotheken aus Lahn-Wiesenbodenproben

Eine *nirK*-Klonbibliothek wurde angelegt, um das Vorkommen von *nirK*-enthaltenden Denitrifikanten im untersuchten Lahn-Wiesenboden belegen und die phylogenetische Diversität dieses Gens an diesem Standort untersuchen zu können. Die Erstellung der Klonbibliothek beruhte auf der Amplifizierung des *nirK*-Gens von der extrahierten DNA des beprobten Bodens. Für die Klonierung wurden nur PCR-Produkte verwendet, die mit einer *Taq*-DNA Polymerase ohne Proof-reading Aktivität amplifiziert worden waren (Moltag, Molzym, Bremen, Deutschland oder *Taq*-DNA Polymerase, Sigma, Saint Louis, MS, USA), da für eine erfolgreiche Klonierung ein A-Überhang nötig ist, der nur mit einer solchen gewährleistet wird. Die *nirK*-Amplifikate wurden durch die Klonierung in einzelne Plasmide eingebaut. So war es möglich den Pool von Amplifikaten voneinander zu trennen. Die PCR-Produkte wurden mit dem pGEMT[®] and pGEM[®]-T Easy Vektor Systems-Kit (Promega, Madison, WI, USA) nach den Angaben des Herstellers kloniert. Die transformierten Zellen wurden auf Luria-Bertani(LB)-Ampicillin-X-Gal-Agarplatten ausplattiert, über Nacht bei 37°C inkubiert und positive Kolonien (Blau-Weiss Selektion) auf eine Masterplatte überimpft. Nur die Klone wurden sequenziert, die ein Insert mit der gesuchten Basenpaargröße aufwiesen. Um dieses sequenzieren zu können, wurde das Insert mit Hilfe der T7 und M13 Primer des Vektors amplifiziert (PCR-Programm siehe Tab. 6). Der Ansatz dieser Kolonie-PCR wurde nach den Angaben in Tabelle 6 hergestellt.

2.3.8 Erfassung von Denitrifikationsgenen mittels Dot-Blot

Einige Denitrifikationsgene der Isolate konnten mittels der PCR nicht amplifiziert werden. Um das Fehlen dieser Gene zu bestätigen, wurde die Methode des Blottens angewandt. Hier werden anstelle kurzer Primersequenzen eine markierte Sonde, die die gesamte Länge des gesuchten Genabschnitts umfasst, verwendet. Damit ist der Bindungsbereich an die DNA größer und eine Hybridisierung zwischen Sonde und Zielgen wahrscheinlicher. Um dies zu veranschaulichen, wurde die Dot-Blot Methode angewandt. Das gesamte Protokoll wurde mit Hilfe des DIG-High Primer DNA labeling and Detection Starter Kit (Roche, Applied Science, Mannheim, Deutschland) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Erstellung der Sonde

Das Dot-Blot Verfahren wurde sowohl mit einer *nosZ*- als auch mit einer *norB*-Sonde durchgeführt. Als *nosZ*-Sonde wurde das *nosZ*-Amplifikat des Isolates 467 eingesetzt,

II. Material und Methoden

während als *norB*-Sonde das *norB*-Amplifikat des Organismus *Pseudomonas stutzeri* JM 300 verwendet wurde.

Zur Herstellung der Sonde wurde das gesuchte Genfragment (*norB* und *nosZ*) amplifiziert, über Gelextraktion gereinigt und die Nukleotid-Konzentration bestimmt. Das dabei verwendete Verfahren basiert auf der Methode der „random primed“ DNA Markierung (Feinberg und Vogelstein, 1983). Diese Markierungs-Methode beruht auf den Einbau von Digoxigenin markierten dUTPs mittels random Primer und Klenow Enzym, die alle im Reaktionsgemisch 1 des Kits enthalten sind.

Zur Markierung der Sonde wurde DNA in einer Konzentration von 100 – 300 ng in 16 µl *aqua bidest.* durch 10 minütiges Erhitzen denaturiert, anschließend 4 µl des Reagenz 1 (50 µl eines 5 x konzentrierten Markierungsmix mit Random Primer, DIG-dUTPs, Klenow Enzymen und Puffer) addiert und bei 37°C inkubiert. Nach 20 Stunden wurde die Reaktion durch 10 min Erhitzen auf 65°C gestoppt. Die Effizienz der Sonde wurde vor dem Versuch nach Angaben des Herstellers getestet.

Dot-Blot Verfahren

Die DNA wurde in einer Konzentration von 200 ng auf die Membran (Amersham Hybond™-N⁺, GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) gespottet und durch Backen für 30 min bei 120°C an die Membran gebunden. Anschließend wurde die Membran für 30 min bei 55°C mit vorgewärmten DIG-Easy Hyb prähybridisiert. Für die Hybridisierung wurde die Sonde bei 100°C für 5 min denaturiert und sofort auf Eis gestellt, bevor sie auf die Membran gegeben wurde. Die Menge der einzusetzenden Sonde ist abhängig von der Größe der Membran. Bei einer Größe der Nylonmembran von 100 cm² wurden 3,5 ml der DIG-Easy Hyb-Lösung (Kit) eingesetzt. Je Milliliter DIG-Easy Hyb wurden 25 ng der DIG-markierten Sonde darin gelöst. Die Größe der Nylonmembran betrug für die Dot-Blot Versuche ca. 5 × 2 cm, die mit einer Sondenkonzentration (DIG markierte DNA-Konzentration) von 21,87 ng/ml hybridisiert wurden. Die Membran wurde über Nacht bei 55°C im Hybridisierungssofen mit der Hybridisierungslösung inkubiert. Die Hybridisierungstemperatur richtet sich nach der prozentualen Homologie zwischen der Sonde und Zielgen. Nach den Angaben des Herstellers gilt folgende Gleichung:

$$T_m = 49,82 + 0,41 (\% \text{ G+C}) - (600/l) \quad [l = \text{Länge des Hybrids in Basenpaaren}]$$

$$T_{\text{opt.}} = T_m - 20 \text{ bis } 25^\circ\text{C}$$

$T_{\text{opt.}}$ entspricht der stringenten Hybridisierung bei der bis zu 18% Fehlpaarungen (Mismatches) auftreten können. Wenn der Grad der Homologie von Sonde und Zielgen

II. Material und Methoden

weniger als 80% beträgt, sollte die Hybridisierungstemperatur reduziert werden. Hier gilt: 1% weniger Stringenz entspricht einer Temperaturreduktion von 0,5°C. Die Hybridisierungstemperatur entspricht der Temperatur des Posthybridisierung-Waschschrattes mit SSC. Diese Waschschratte erfolgten erst 2×5 min bei Raumtemperatur in $2 \times$ SSC, 0,1% SDS und anschließend 2×15 min bei 55,5°C in $0,5 \times$ SSC, 0,1% SDS. Die Detektion wurde dann nach den Angaben des Herstellers (DIG High Prime DNA labeling and detection starter Kit I) durchgeführt.

Eine erfolgreiche Hybridisierung zwischen Sonde und Zielgen ist in Form eines bläulichen Punktes auf dem Filter erkennbar. Zeigt sich die Farbreaktion nicht, auch nicht bei geringerer Stringenz der Hybridisierung, so ist davon auszugehen, dass das Zielgen auf der DNA eines Organismus nicht vorhanden ist. Als Hybridisierungs- und Waschbedingungen wurde eine Temperatur von 55,5°C eingestellt, die einer Stringenz von 75% entspricht.

2.3.9 Recognition of Individual genes fluorescence in situ hybridization (RING-FISH)

Die recognition of individual genes fluorescence in situ hybridisation (RING-FISH) Methode kann angewandt werden, um mikroskopisch das Vorkommen von *nirK*-enthaltenden Isolaten aus dem phylogenetischen *nirK*-Cluster I darstellen zu können. Dazu wurde die Methode mit vier Isolaten der vorliegenden Arbeit (187, 406, 467, und 469) durchgeführt.

Die Grundlage bildete die Herstellung zweier *nirK*-Sonden. Die eine war spezifisch für das *nirK*-Cluster I, während die andere *nirK*-Sequenzen aus dem *nirK*-Cluster VII (siehe Abb. 5) anzeigen sollte. Für das *nirK*-Cluster I wurde die Sonde anhand des *nirK*-Genfragmentes des Isolates 467 mittels in vitro Transkription erstellt. Die Sonde des *nirK*-Clusters VII wurde anhand des *nirK*-Genfragmentes des Isolates 205 erstellt. Die Markierung der Sonden wurde mit fluoreszenzmarkierten Antikörper Anti-Digoxigenin-Fluoreszein und Streptavidin-Cy3 durchgeführt. Die Hybridisierung der Sonde fand mit zuvor fixierten Zellen statt. Die anschließende Detektion der Sonden erfolgte mittels den fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Konjugaten Digoxigenin und Biotin, wobei Digoxigenin Anti-DIG-Fluoreszin und Biotin Cy3-Streptavidin detektierte. Die Sonde hybridisiert bei RING-FISH sowohl mit dem Zielgen als auch mit sich selbst. Dadurch entsteht ein Netzwerk, welches sich um die *nirK*-enthaltende Zelle legt und als Ring lichtmikroskopisch erkennbar wird.

Die Anwendung des Protokolls (Pratscher et al., 2009) wurde von Jennifer Pratscher durchgeführt.

II. Material und Methoden

2.4 Messung der Denitrifikationsaktivität der *nirK*-enthaltenden Isolate

2.4.1 Umsatz von NO_3^- zu N_2O

Zur Messung des Umsatzes von NO_3^- zu N_2O wurden die Isolate in 30 ml des jeweils bevorzugten Mediums (siehe Tab. 4) in Triplikaten angeimpft. Die Medien wurden, wie unter 2.2.2. beschrieben, mit N_2 durchgast und anschließend autoklaviert. Das Inokulum entsprach jeweils einer optischen Dichte von 0,01. Den angeimpften Medien wurde Acetylen hinzugegeben, um die enzymatische Reduktion von N_2O zu N_2 zu hemmen. Dadurch kam es zu einer Akkumulation von N_2O , das dann gemessen werden konnte (Ryden et al., 1979; Yoshinari et al., 1977). Das hinzugefügte Volumen an Acetylen entsprach 10% der Gasphase in den Serumflaschen, die entsprechende Menge wurde zuvor aus der Gasphase entnommen.

Die Messung von N_2O erfolgte durch einem Gaschromatograph mit ECD (engl. electron capture detector)-Detektor der Firma Carlo Erba Instruments (GC 8000, siehe Tab. 9). Vor der Entnahme einer Gasprobe wurden die Serumflaschen kurz von Hand geschwenkt, um ein Gleichgewicht zwischen der wässrigen und der Gasphase zu erhalten. Die Entnahme der Gasproben erfolgte mit 0,5 ml Pressure-Luer-Lok-Spritzen[®] (VICI, Baton Rouge, Louisiana, USA), die zuvor durch mehrfaches Aufziehen mit N_2 gespült wurden. Vor jeder Messung wurde eine Eichgerade erstellt, indem 0,05 ml; 0,1 ml; 0,25 ml und 0,5 ml Eichgas (50,9 ppm und 390 ppb) injiziert wurden.

Bei Anwesenheit von Acetylen in den Gasproben musste der Säulenofen zwischen den Messschritten für eine halbe Stunde auf 70°C aufgeheizt werden, um auf der Säule verbleibendes Acetylen zu entfernen.

Die Auswertung der Daten erfolgte mittels Computer mit der Software Peak Simple (Version 2.66, SRI Instruments, Torrence, USA).

Tabelle 9: Geräteparameter des Gaschromatographen GC-ECD.

Säule	4 m Edelstahlsäule, Ø 1/8'' Füllmaterial: Hay Sep [®] N, 75cc, mesh 80/100 Vorsäule: Natron auf festem Träger zur CO_2 -Adsorption
Trärgas	ECD-Stickstoff; Make-up-Gas: 5% CH_4 in Argon
Detektor	ECD; ^{63}Ni
Temperatur	Injektor: 60°C Ofen: 50°C Detektorbasis: 300°C Detektor: 350°C
Strom	1,8 nA
Attenuation	2^0

II. Material und Methoden

2.4.2 Berechnungen der N₂O-Freisetzungen

Zur Berechnung der freigesetzten N₂O-Mengen bzw. der Umsetzung des eingesetzten Nitrats wurden die gemessenen Konzentrationen [ppm] in Stoffmenge [mmol] nach folgender Gleichung umgerechnet:

$$n = \frac{p \times V}{R \times T}$$

n = Stoffmenge [mol]

p = Partialdruck des gemessenen Gases in [bar] (1 ppmv = 10⁻⁶ bar)

V = Volumen des Gasraumes im Reaktionsgefäß [l]

(Volumen der Gasphase [l] + Volumen der Flüssigphase [l] x Bunsenkoeffizient α)

R = allgemeine Gaskonstante (0,083144 [l bar K⁻¹ mol⁻¹])

T: Temperatur [K]

Die gebildete Stoffmenge N₂O wurde auf die eingesetzte Stoffmenge von NO₃⁻ bezogen und die Umsetzung des NO₃⁻ in N₂O in Prozent berechnet.

III. Ergebnisse

1. Wahl des Habitates

In vorangegangenen Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Prof. Overmann (Frederic Gich, LMU München) wurden Mikroorganismen aus alpinem Wiesenboden und Waldboden in Minimalmedium angereichert (Overmann, persönliche Mitteilung, 2005). Die DNA von 280 Anreicherungen wurde isoliert und eine Amplifizierung mit *nirK*-spezifischen Primern vollzogen. Eine anschließende Sequenzierung der *nirK*-Genfragmente ergab für 14 der 280 (6,1%) Anreicherungen eine *nirK*-Sequenz. Diese stammten aus Wiesenbodenproben, während nur drei *nirK*-Sequenzen in Anreicherungen aus Waldbodenproben nachgewiesen worden waren. Aufgrund dieses Ergebnisses wurde im folgenden Versuchsaufbau Wiesenboden als Probenmaterial dem Waldboden vorgezogen.

2. Bodenparameter

Die verwendeten Bodenproben stammen von einer Überflutungs- und Weidefläche des Flusses Lahn (50° 50'27,37''N und 8° 45'39,81''E; siehe Abb. 4), die als Aue charakterisiert wurde (Bodenkarte Maßstab 1:50 000 des Blattes Marburg). Der Bodentyp ist als Vega mit der Spezialisierung Gley-Vega anzusprechen. Die Bodenformen schwanken maßstabs-bedingt zwischen Auenschluff und Auenton. Da die Probenentnahme nur die ersten zehn Zentimeter betraf, ist davon auszugehen, dass es sich bei dem Bodenmaterial um Proben aus dem mit Humus angereicherten Ah-Horizont handelt.

Der Boden des Standortes wies einen leicht sauren pH-Wert von 5,19 auf. Der Wassergehalt dieser Bodenprobe betrug 15%. Der Anteil des Stickstoffs in der Bodentrockenmasse belief sich auf 0,31% und der des Kohlenstoffs auf 3,19%, was einem C/N Verhältnis von 10,6 : 1 entspricht. Die Konzentration an Nitrat in 5 g Boden belief sich auf 4,01 mM, während die Nitritkonzentration mit 17,14 mM bestimmt wurde.

III. Ergebnisse

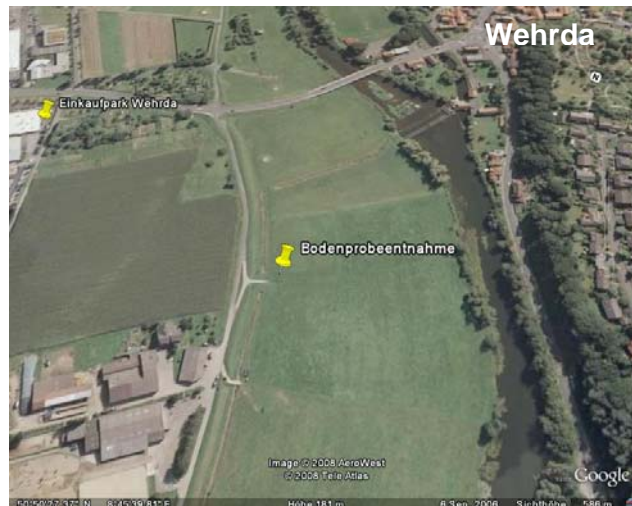


Abbildung 4: Ort der Probenentnahme (Google Earth, 2008).

3. *nirK*-Klonbibliothek aus Lahn-Wiesenbodenproben

Im beprobten Lahn-Wiesenboden wurde das Vorkommen von *nirK*-enthaltenden Mikroorganismen mittels einer *nirK*-Klonbibliothek untersucht. Ferner wurde geprüft, ob die *nirK*-Sequenzen dieser Organismen in das *nirK*-Cluster I gruppieren. Dieses Cluster ist von besonderem Interesse, da es von *nirK*-Sequenzen unkultivierter Organismen aus Bodenhabitaten dominiert wird. Die Böden stammten sowohl von verschiedenen geographischen Standorten als auch aus verschiedenen Habitaten wie Waldboden, Wiesenboden, Feuchtboden und Ackerboden. Neben *nirK*-Sequenzen aus terrestrischen Habitaten, fanden sich ebenfalls *nirK*-Sequenzen aus aquatischen Habitaten in diesem Cluster wieder, zum Beispiel aus marinen Sedimenten, kontaminiertem Grundwasser oder aus Abwasser. Dies war jedoch in wesentlich geringerer Abundanz der Fall.

Die erstellte Klonbibliothek zeigte *nirK*-Sequenzen des Clusters I im beprobten Lahn-Wiesenboden an, wodurch die Grundlage für die nachfolgenden Kultivierungsexperimente gegeben war.

Für die Klonbibliothek wurden *nirK*-Sequenzen von 54 Klonen amplifiziert, sequenziert und phylogenetisch analysiert. Die phylogenetische Analyse der *nirK*-Sequenzen der Klonbibliothek ergab die Zuordnung in die *nirK*-Cluster I, II und VI (siehe Abb. 5). Die Cluster sind Ergebnis der phylogenetischen Distanzberechnung nach dem Neighbour-Joining Algorithmus. Die Analysen mit den Algorithmen Maximum-Parsimony und Maximum-Likelihood ergaben dieselben Cluster.

III. Ergebnisse

Neunzehn *nirK*-Sequenzen der Klonbibliothek gruppierten im Cluster I, während nur eine in Cluster II zu finden war. Letztere war phylogenetisch nah verwandt mit der *nirK*-Sequenz erhalten aus landwirtschaftlich genutzten Boden in Schweden.

In Cluster VI gruppierten neben *nirK*-Sequenzen aus verschiedenen Umwelthabitaten hauptsächlich Sequenzen aus der Klonbibliothek (34 *nirK*-Sequenzen).

III. Ergebnisse

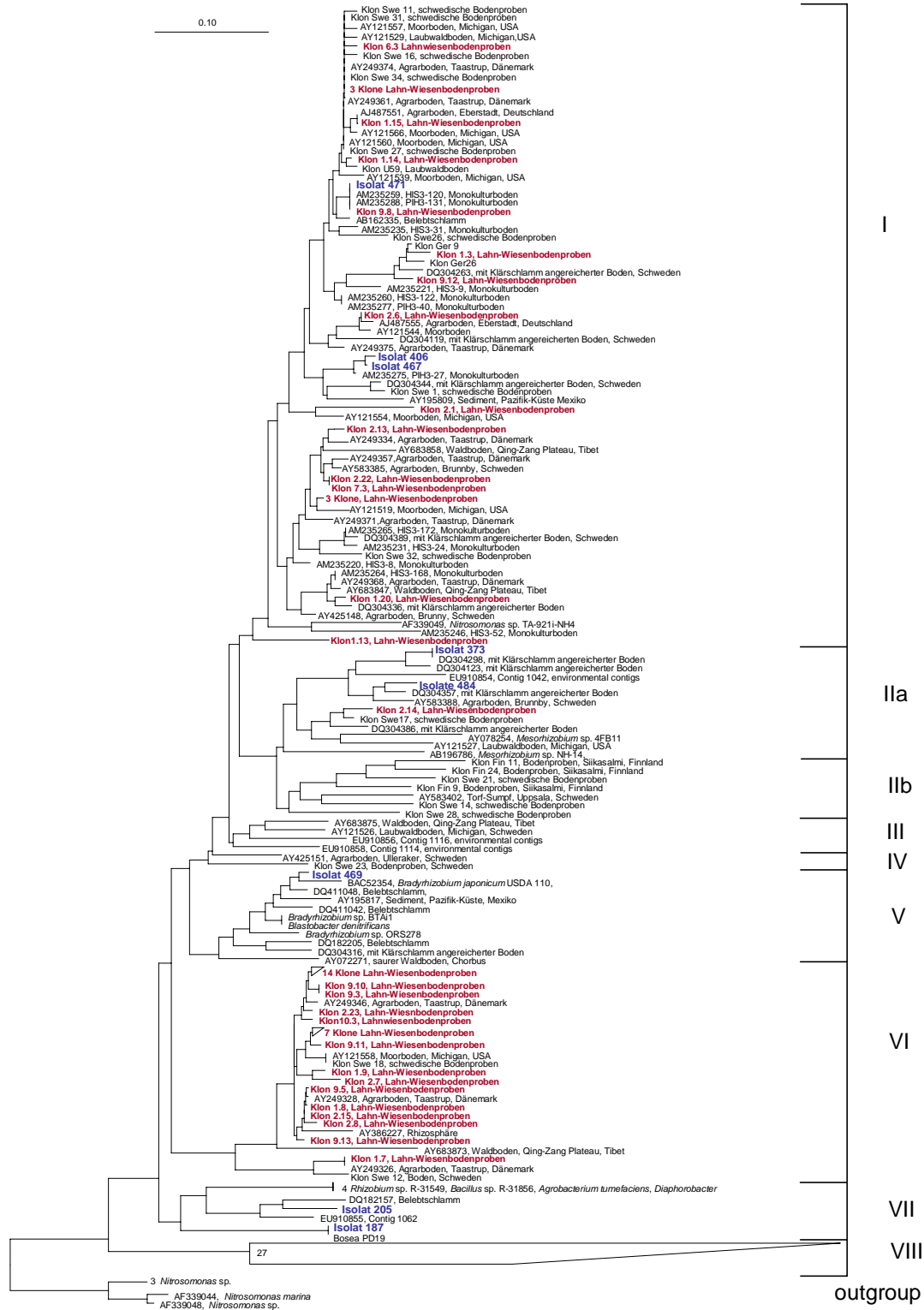


Abbildung 5: Ausschnitt des phylogenetischen *nirK*-Baums, berechnet nach der Neighbour-Joining Methode basierend auf einem Alignment von 125 Aminosäuren. Die verschiedenen *nirK*-Cluster wurden mit römischen Zahlen I bis IX beziffert. In rot sind die *nirK*-Sequenzen der Lahn-Wiesen-Klonbibliothek markiert und in blau die *nirK*-Sequenzen der Isolate. Die phylogenetische Analyse mit den Algorithmen Maximum-Parsimony, Maximum-Likelihood ergaben dieselben, in sich stabilen Cluster. Der Maßstab entspricht 10% Nukleotidaustausch.

III. Ergebnisse

4. Kultivierung und Analyse von Mikroorganismen aus Lahn-Wiesenbodenproben

Anhand der *nirK*-Klonbibliothek, Sequenzanalyse und phylogenetischer Einordnung konnten *nirK*-Organismen aus dem *nirK*-Cluster I in den Bodenproben der Lahn-Wiesen nachgewiesen werden. Somit lag die Voraussetzung für eine anschließende Kultivierung dieser Mikroorganismen vor.

4.1 Kultivierungsexperiment

Bisherige Versuche zur Kultivierung von Denitrifikanten hatten mit Ausnahme des Stammes *Nitrosomonas* sp. TA-921-NH₄ keine Isolate ergeben, deren *nirK*-Sequenzen in das Cluster I gruppierten. Ferner war die *nirK*-Sequenz dieses *Nitrosomonas*-Stammes nur entfernt mit den *nirK*-Sequenzen des Clusters I verwandt. Da die Eigenschaften der *nirK*-enthaltenden Mikroorganismen dieses Clusters noch nicht bekannt waren, wurde eine Kultivierungsmethode angewandt, die nicht spezifisch auf Denitrifikanten ausgerichtet war, sondern einen unspezifischen Ansatz verfolgte. Diese Kultivierung von Mikroorganismen erfolgte aus Lahn-Wiesenbodenproben und wurde bei einer Inkubationstemperatur von 15°C durchgeführt.

Die Kultivierung erfolgte oxisch durch Ausplattieren auf Festmedium (Bodenmedium, modifiziert nach Grossert et al., 2000) mit Nutrient Broth als Kohlenstoff-Quelle. Dabei wurden die Verdünnungsstufen 10⁻⁴ bis 10⁻¹⁰ der Bodensuspension verwendet. Es ist zu beachten, dass durch das Ausplattieren der Bodensuspensionen auf Festmedium zwei weitere Verdünnungsstufen entstanden sind. Innerhalb eines Zeitraumes von 29 Tagen wurden die gewachsenen Kolonien von der Festmediumplatte (Originalplatte) auf frisches Festmedium transferiert. Diese Ausstriche wurden dann bei derselben Temperatur inkubiert. Von den Platten der Verdünnungsstufen 10⁻⁶ bis 10⁻¹² wurden alle Kolonien, die im Laufe von 29 Tagen gewachsen waren, transferiert. Trotz identischer Inkubationsbedingungen bildeten nicht alle der transferierten Kolonien neue koloniebildende Einheiten. Die Anzahl dieser transferierten, koloniebildenden Einheiten pro Verdünnungsstufen und Parallele sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Insgesamt wurden 687 Kolonien übertragen, von denen wiederum nur 490 Kolonien bildeten. Die Anzahl der neu hinzukommenden Kolonien auf der Originalplatte stieg mit steigender Inkubationszeit (siehe Tab. 11).

III. Ergebnisse

Tabelle 10: Anzahl der transferierten Kolonien der Parallelen A, B je Verdünnungsstufe. Pro Verdünnungsstufe wurden 10 bzw. 5 Parallelen angesetzt.

Verdünnungsstufe	10 ⁻⁶		10 ⁻⁷		10 ⁻⁸		10 ⁻⁹		10 ⁻¹⁰		10 ⁻¹¹		10 ⁻¹²		
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	
1	-	24	18	15	-	3	-	1	1	1	1	-	2	1	-
2	5	12	11	6	2	-	-	-	-	-	-	4	-	-	-
3	6	16	3	10	-	-	-	5	-	-	-	1	-	-	-
4	6	37	17	4	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
5	6	36	10	6	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	6	33	6	1	2	-	-	-	-	-	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
7	8	15	14	2	-	-	-	-	-	-	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
8	6	26	7	2	-	-	-	-	-	-	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
9	6	25	8	4	1	-	-	-	-	-	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
10	6	33	6	1	-	-	-	-	-	-	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Summe	55	257	100	51	7	3	-	6	1	1	6	2	1	1	-

n.b.: nicht bestimmt

- : keine Wachstum

III. Ergebnisse

Tabelle 11: Anzahl der transferierten und angewachsenen Kolonien der Verdünnungsstufen 10^{-6} bis 10^{-12} nach verschiedenen Kultivierungszeitpunkten.

Kultivierungszeit (Tagen)	Anzahl der Kolonien
6	79
9	74
16	114
29	224
Summe	490

4.2 Amplifizierung des funktionellen Gens *nirK*

Nur die Kolonien, die als *nirK*-enthaltende Organismen charakterisiert werden konnten, waren für den weiteren Verlauf der Arbeit von Interesse. Daher wurden alle Kolonien auf die Präsenz des *nirK*-Gens untersucht. Hierbei erfolgte die Amplifizierung des *nirK*-Gens der jeweiligen Kolonie mittels PCR mit *nirK*-spezifischen Primern. Bei acht von 490 Kolonien (1,6%) konnte ein *nirK*-Genfragment amplifiziert werden (siehe Tab. 12). Ferner ist auffällig, dass die *nirK*-enthaltenden Kolonien aus unterschiedlichen Verdünnungsstufen stammen.

Die Kolonien 373, 406, 467, 469, 471 und 484 waren erst nach einer Inkubationsdauer von 28 bzw. 29 Tagen als solche erkennbar. Dieses Ergebnis gibt einen ersten Hinweis, dass es sich bei den Kolonien um langsam wachsende Organismen handelt. Nur die Kolonien 187 und 205 zeigten bereits nach 16 Inkubationstagen Koloniebildung.

Tabelle 12: *nirK*-enthaltende Kolonien.

Kolonie	Verdünnungsstufe	Kultivierungstage
187	10^{-6} , A	16
205	10^{-6} , A	16
373	10^{-7} , A	29
406	10^{-6} , B	28
467	10^{-8} , A	29
469	10^{-8} , A	29
471	10^{-7} , A	29
484	10^{-7} , A	29

III. Ergebnisse

5. Isolierung von *nirK*-enthaltenden Mikroorganismen

Die *nirK*-enthaltenden Kolonien wurden in sieben aufeinander folgenden Verdünnungsausstrichen zu Isolaten vereinzelt. Die Inkubationsdauer betrug jeweils vier Wochen bei einer Inkubationstemperatur von 15°C.

Nach dem siebten Verdünnungsausstrich konnten die Kolonien anhand ihrer 16S rRNA-Gen-Sequenz identifiziert werden. In diesem Fall zeigten die Elektropherogramme der 16S rRNA-Gen-Sequenzierung für jede Kolonie eine eindeutige Sequenz. Auch die Verwendung eines Gemisches aus mehreren Kolonien ergab in der 16S rRNA-Gen-Sequenzierung eine eindeutige Sequenz für jedes Isolat. Verschiedene Kolonien eines Isolates waren also in ihrer 16 rRNA-Gen-Sequenz identisch.

Ferner wurde der Morphologietyp der Kolonien mikroskopisch bestimmt. Alle Zellen wurden als Stäbchen identifiziert. Sowohl die Ergebnisse der Mikroskopie als auch die eindeutigen 16S rRNA-Gen-Sequenzen wiesen also daraufhin, dass Reinkulturen vorlagen. Eine anschließende Amplifizierung des *nirK*-Gens mit *nirK*-spezifischen Primern bewies, dass *nirK*-enthaltende Organismen isoliert worden waren.

6. Analysen der 16S rRNA- und Denitrifikationsgene der Isolate

6.1 Zuordnung der Isolate anhand der 16S rRNA-Gen-Phylogenie zu kultivierten Stämmen

Um die Isolate phylogenetisch einzuordnen, wurde ihre 16S rRNA-Gen-Sequenz mit den im Internet verfügbaren Datenbanken verglichen (NCBI). Diese Analyse ergab die Zuordnung aller Isolate zur Klasse der α -*Proteobacteria* und zur Ordnung der *Rhizobiales*. Des Weiteren konnten anhand dieser Suche phylogenetisch verwandte Organismen ermittelt werden. Die dabei ermittelten 16S rRNA-Gen-Sequenzen wurden in die eigene ARB-Datenbank integriert und eine Distanzmatrix zum nächsten kultivierten Verwandten berechnet, die auf der Neighbour-Joining Methode beruht. Diese zeigte die Sequenzübereinstimmungen an. Für die Bestimmung der nächsten phylogenetisch Verwandten wurden nur kultivierte Stämme in die Betrachtung einbezogen.

Die 16S rRNA-Gen-Sequenz des Isolates 187 wurde mit 99,6% Sequenzübereinstimmung der 16S rRNA-Gen-Sequenz des Stammes *Bosea* PD19 (Dandie et al., 2007a) zugeordnet (siehe Abb. 6, siehe Tab. 13). Nach Definition deutet eine Sequenzübereinstimmung von mehr als 97% auf dieselbe Spezies hin (Stackebrandt und Goebel, 1994). Eine hohe Sequenzübereinstimmung (99,8% und 98,2%) wurde ebenfalls zwischen den 16S rRNA-Gen-Sequenzen der Isolate 373 und 484 zur 16S rRNA-Gen-Sequenz des Stammes

III. Ergebnisse

Mesorhizobium sp. CCBAU11299 und *Mesorhizobium* sp. CCBAU11217 (Yan et al., 2007) festgestellt. Die phylogenetische Analyse des Isolates 205 ergab eine Identifizierung als *Devosia* Spezies. Dieser Zuordnung liegt eine Sequenzübereinstimmung von 96,9% zu *Devosia limi* (Vanparys et al., 2005) zugrunde. Als Spezies der Gattung *Bradyrhizobium* wurden die Isolate 406, 467, 469 und 471 bestimmt. Die 16S rRNA-Gen-Sequenzen der Isolate 471 und 467 zeigten die größten Sequenzübereinstimmung (97,8 und 98,5%) zur 16S rRNA-Gen-Sequenz des kultivierten *Bradyrhizobium* group Ellin127 (Schoenborn et al., 2004). Allerdings zeigten beide Isolate ebenso eine Sequenzübereinstimmung von 97% zu *Bradyrhizobium elkanii* (AB195987, unpubliziert). Das Isolat 469 zeigte sowohl zum kultivierten Stamm *Bradyrhizobium* sp. RP7b (Osman et al., 2007) als auch zu *Bradyrhizobium canariense* (Steenkamp et al., 2008) mit 99,4% die höchsten Sequenzübereinstimmungen. Eine niedrigere Übereinstimmung von 98% zeigte die 16S rRNA-Gen-Sequenz zu *B.japonicum* MSDJ 5697. Die 16S rRNA-Gen-Sequenz des Isolates 406 wies die höchste Übereinstimmung zu *Bradyrhizobium* sp. RO3 (Haveman et al., 2005) auf.

Tabelle 13: Zuordnung der Isolate anhand der höchsten Sequenzübereinstimmung der 16S rRNA-Gen-Sequenzen zu kultivierten Stämmen mittels einer Distanzmatrix.

Isolat	Zuordnung	Sequenzübereinstimmung (%)
187	DQ377760, <i>Bosea</i> PD 19	99,6
205	AJ786801, <i>Devosia limi</i>	96,9
373	EF149003, <i>Mesorhizobium</i> sp. CCBAU11299	99,8
406	AY928206, <i>Bradyrhizobium</i> sp. RO3	99,1
467	AF408979, <i>Bradyrhizobium</i> group Ellin127	97,9
469	EU364719, <i>Bradyrhizobium</i> sp. RP7b und DQ447782, <i>B.canariense</i>	99,4
471	AF408979, <i>Bradyrhizobium</i> group	98,5
484	EF149004, <i>Mesorhizobium</i> sp. CCBAU11217	98,2

III. Ergebnisse

0.10

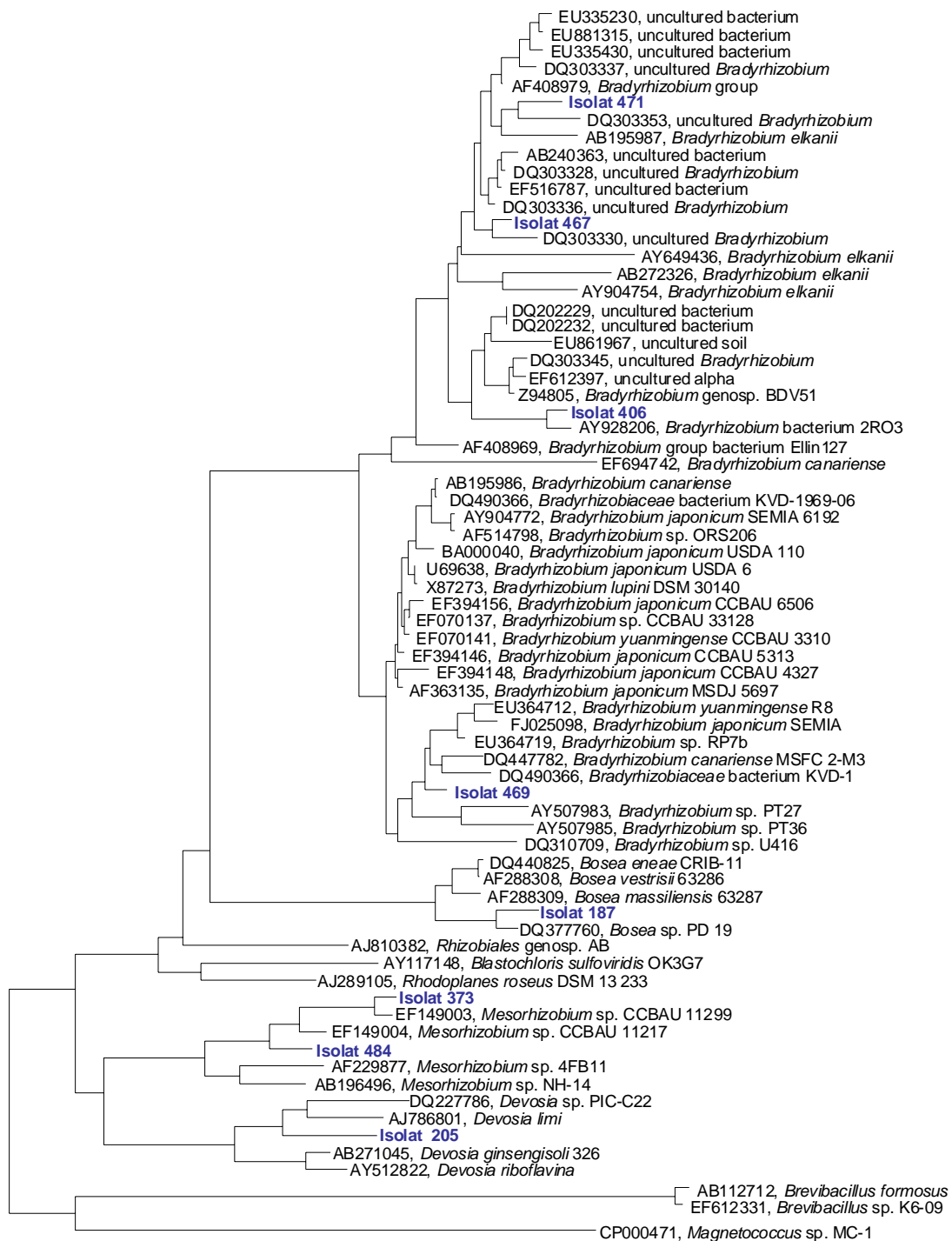


Abbildung 6: Ausschnitt des 16S rRNA-Gen-Stammbaums für die Gruppe der α -Proteobacteria, der die phylogenetische Verwandtschaft der 16S rRNA-Gen-Sequenzen der Isolate (in blau markiert) darstellt. Die Berechnung erfolgte nach der Neighbour-Joining Methode. Der Maßstab entspricht 10% Sequenzunterschied. Mittels eines Filters wurden die hoch variablen Regionen innerhalb des 16S rRNA-Gens von der phylogenetischen Analyse ausgeschlossen.

III. Ergebnisse

6.2 Phylogenie der *nirK*-Sequenzen der Isolate

Der phylogenetischen Zuordnung der Isolate schloss sich die Bestimmung der *nirK*-Phylogenie mittels des Neighbour-Joining Algorithmus an. Die Berechnung ergab eine Zuordnung der *nirK*-enthaltenden Isolate in unterschiedliche phylogenetische Cluster des acht Cluster umfassenden *nirK*-Stammbaums (siehe Abb. 5), die Cluster wurden durch die Algorithmen Maximum-Parsimony und Maximum-Likelihood bestätigt.

So gruppierten die *nirK*-Sequenzen der Isolate 406, 467 und 471 in das phylogenetische *nirK*-Cluster I. Generell stimmten die *nirK*-Sequenzen des Clusters I untereinander zu mindestens 80% überein. Innerhalb des Clusters I konnte zu der *nirK*-Sequenz des Isolates 471 eine identische *nirK*-Sequenz der Klonbibliothek des Lahn-Wiesenbodens (Klon 9.8 Lahn-Wiesenboden) nachgewiesen werden. Das zeigte sich an einer Sequenzübereinstimmung von 100%, die mit Hilfe der Distanzmatrix, basierend auf der Neighbor-Joining Methode, berechnet worden war. Dieselbe Sequenzübereinstimmung wies die *nirK*-Sequenz dieses Isolates zu *nirK*-Klonsequenzen aus den Böden zweier Monokulturen (*Plantago lanceolata* AM235288 und *Holcus lanatus* AM235259) auf. Ebenfalls zu einer *nirK*-Klonsequenz (AM235275) aus Bodenproben von *Plantago lanceolata* gruppierten die *nirK*-Sequenzen der Isolate 406 und 467. Die Sequenzübereinstimmung belief sich zwischen 98% und 99%. Eine solch hohe Sequenzübereinstimmung konnte zwischen den restlichen *nirK*-Sequenzen der Klonbibliothek und den *nirK*-Sequenzen dieser Isolate, obwohl im selben Cluster, nicht bestimmt werden. Ebenfalls in dieses Cluster gruppierte die *nirK*-Sequenz des β -*Proteobakteriums Nitrosomonas* sp. TA-921i-NH₄, dessen *nirK*-Sequenz zeigte eine Übereinstimmung mit den *nirK*-Sequenzen der, den α -*Proteobacteria* zugeordneten Isolate 406, 467 und 471 von 80%.

Im phylogenetischen Cluster IIa gruppierten neben der *nirK*-Sequenz des Lahn-Wiesen-Klons 2.14, die *nirK*-Sequenzen der Isolate 373 und 484. Die phylogenetisch nächst verwandten *nirK*-Sequenzen stammten aus Boden, der mit Klärschlamm angereichert worden war. Sie wiesen eine Sequenzübereinstimmung von 100% (DQ304298) und 95% (DQ304357) zu den *nirK*-Sequenzen der Isolate 373 und 484 auf. Sowohl die *nirK*-Sequenz des Isolates 373 als auch die des Isolates 484 zeigten nur eine entfernte Verwandtschaft zu den *nirK*-Sequenzen der *Mesorhizobium*-Stämme NH-14 und 4FB11 im selben Cluster, was in beiden Fällen einer Sequenzübereinstimmung von 78% entsprach.

Für die *nirK*-Sequenz des Isolates 469 konnte, mit einer Sequenzübereinstimmung von 97%, eine phylogenetische Nähe zu der *nirK*-Sequenz des Stammes *Bradyrhizobium japonicum*

III. Ergebnisse

USDA110 und zu einer *nirK*-Sequenz aus Belebtschlamm im Cluster V nachgewiesen werden.

In Cluster VII gruppierten *nirK*-Sequenzen sowohl der α -Proteobakteria (*Agrobacterium tumefaciens*, *Rhizobium* spp.) als auch der β -Proteobakteria (*Diaphorobacter* sp.) und Bacilli (*Bacillus* sp.R-31856). In dieses Cluster gruppierte die *nirK*-Sequenz des Isolates 205. Sie zeigte mit einer Sequenzübereinstimmung von 89,7% eine große phylogenetische Nähe zu einer *nirK*-Klonsequenz (DQ182157) aus Belebtschlamm. Ebenfalls in dieses Cluster gruppierte die *nirK*-Sequenz des Isolates 187. Sie befand sich in phylogenetischer Nähe zu der *nirK*-Sequenz des Stammes *Bosea* sp. PD19.

6.3 Nachweis der Reinheit der Isolate mittels RING-FISH

Mit der RING-FISH Methode wurde zum einem die Reinheit der *nirK*-enthaltenden Isolate und zum anderen die Spezifität einer *nirK*-Cluster I Sonde nachgewiesen. Diese Methode ermöglicht die Detektion einzelner, chromosomal kodierender Gene (hier *nirK*). Allerdings wurde das RING-FISH-Protokoll nicht für alle Isolate angewandt, sondern stellvertretend für die Cluster I, V und VII mit den Isolaten 406 und 467 für Cluster I, 469 für Cluster V und 187 für Cluster VII. Eine Hybridisierung konnte mit der Cy3-markierten Polynukleotid-RNA-Sonde erreicht werden. Durch Biotin konnte die erfolgreiche Hybridisierung detektiert werden und zeigte sich als Ring um die einzelne stäbchenförmige Zelle (siehe Abb. 7). Die Abbildung 7 zeigt lichtmikroskopische Aufnahmen der Isolate 406, 467, 187 und 469.

Der Vergleich der Fluoreszenz- und Phasenkontrast-Aufnahmen verdeutlicht die Reinheit der dargestellten Isolate. Alle in der Phasenkontrast-Mikroskopie sichtbaren Zellen sind unter dem Fluoreszenz-Mikroskop mit einem Ring markiert. Die Isolate 406 und 467 des phylogenetischen *nirK*-Clusters I ließen sich also mit einer *nirK*-Cluster I-spezifischen Sonde lichtmikroskopisch nachweisen. Hingegen ergab die Hybridisierung einer *nirK*-Cluster VII-spezifischen Sonde mit den Zellen des Cluster I Isolates 406 keine Ringstruktur um die Zelle. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass *nirK*-Cluster I Organismen nur durch eine *nirK*-Cluster I spezifischen Sonde nachweisbar sind. Die *nirK*-Cluster VII spezifische Sonde hybridisierte hingegen sowohl mit der *nirK*-Sequenz des Isolates 187 in Cluster VII als auch mit der *nirK*-Sequenz des Isolates 469 im Cluster V. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass nur die *nirK*-Cluster I Sonden clusterspezifisch an *nirK*-Sequenzen binden.

III. Ergebnisse

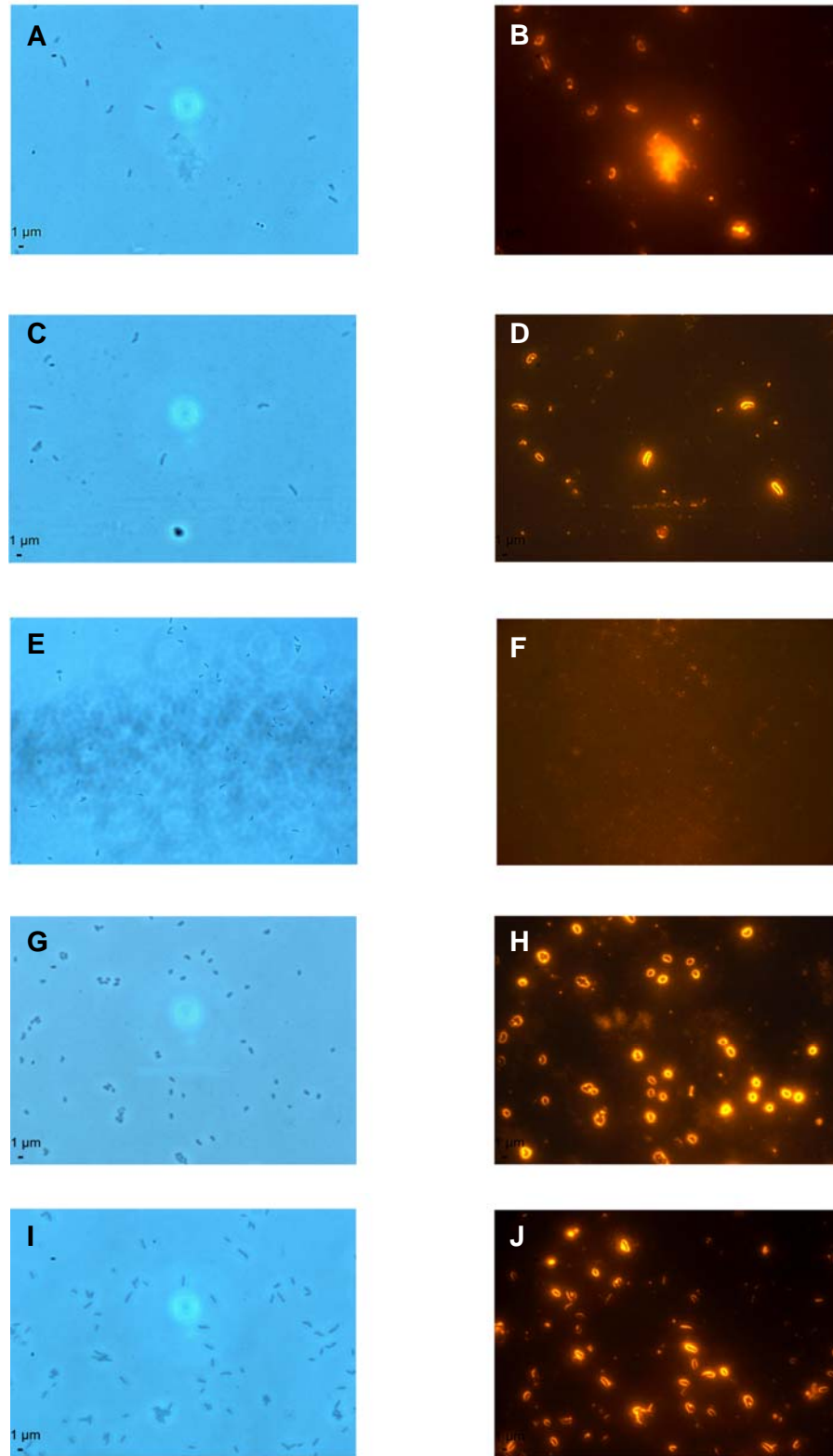


Abbildung 7: Phasenkontrastaufnahme und Fluoreszenz-Aufnahmen der RING-FISH-Methode bei 1000-facher Vergrößerung; **linke Spalte:** Phasenkontrast-Aufnahme der Kulturen; **rechte Spalte:** Aufnahme des korrespondierenden Abschnitts während der Fluoreszenz-Mikroskopie der Kulturen: **A/B:** Isolat 467 Hybridisierung mit Sonde für *nirK*-Cluster I, **C/D:** Hybridisierung des Isolates 406

III. Ergebnisse

mit Sonde für *nirK* Cluster I, **E/F**: Negativ-Kontrolle Hybridisierung des Isolates 406 mit Sonde für *nirK*-Cluster VII **G/H**: Isolat 187 Hybridisierung mit Sonde für *nirK*-Cluster VII **I/J**: Isolat 469 Hybridisierung mit Sonde für *nirK*-Cluster VII.

6.4 Nachweis der Denitrifikationsgene *nar/nap*, *nirS*, *nor* und *nos*

Die Denitrifikation wird durch Enzyme katalysiert die durch die funktionellen Gene *nar* oder *nap*, *nir*, *nor* und *nos* kodiert werden. Diese Gene sollten bei den Isolaten nachgewiesen werden. Da das funktionelle Gen *nirK* bereits für alle Isolate bestimmt wurde, fokussierte sich die Amplifizierung mittels PCR und spezifischen Primern auf die Gene *narG/H*, *napA*, *nirS*, *c/norB* und *nosZ*.

Während das *narG*-Gen auf der DNA der Isolate 373 und 484 amplifiziert werden konnte, war dies weder im Falle des *narH*-Gens noch des *napA*-Gens möglich.

Die Isolate der Gattung *Bradyrhizobium* (406, 467, 469 und 471) und *Bosea* (187) wiesen hingegen ein *napA*-Genfragment anstelle eines *nar*-Gens auf (siehe Tab. 14). Ein *nirS*-Genfragmenten konnte für keines der Isolate amplifiziert werden.

Das für die Stickstoffmonoxid-Reduktase kodierende *cnorB*-Gen und das für die Distickstoffoxid-Reduktase kodierende *nosZ*-Gen wurde von der genomischen DNA der Isolate 187, 406, 467 und 469 erfolgreich amplifiziert. Von der genomischen DNA des Isolates 471 wurde zwar ein *cnorB*- jedoch kein *nosZ*-Genfragment amplifiziert. Ebenso war eine Amplifizierung der *norB*- und *nosZ*-Gene weder von der genomischen DNA der Isolate 373 und 484 noch von der genomischen DNA des Isolates 205 erfolgreich. Letzteres Isolat wies neben dem *nirK*-Gen kein weiteres Gen der Denitrifikation auf.

Die DNA der Isolate 187, 406, 467 und 469 trug also alle funktionellen Gene der Denitrifikation, im Gegensatz zu den Isolaten 205, 373, 471 und 484, deren DNA nicht alle Gene der Denitrifikation zu besitzen scheint.

III. Ergebnisse

Tabelle 14: Vorkommen der Denitrifikationsgenfragmente *nar/nap*, *nir*, *nor* und *nos* auf genomischer Ebene der Isolate. Plus: Amplifizierung des Genes war erfolgreich; Minus: Das Gen konnte nicht amplifiziert werden.

Isolat	<i>narG/narH</i>	<i>napA</i>	<i>nirK/nirS</i>	<i>cnorB/qnorB</i>	<i>nosZ</i>
187	-/-	+	+/-	+/-	+
205	-/-	-	+/-	-/-	-
373	+/-	-	+/-	-/-	-
484	+/-	-	+/-	-/-	-
406	-/-	+	+/-	+/-	+
467	-/-	+	+/-	+/-	+
469	-/-	+	+/-	+/-	+
471	-/-	+	+/-	+/-	-

6.5 Vergleich der phylogenetischen Analyse der Denitrifikationsgene *nirK*, *cnorB* und *nosZ* mit der 16S rRNA-Gen-Phylogenie

Der phylogenetischen Zuordnung der 16S rRNA-Gen-Sequenz wurde die Phylogenie der funktionellen Gene *nirK*, *cnorB* und *nosZ* gegenübergestellt. Wie bereits für das *nirK*-Gen in Kapitel 6.2 beschrieben, wurden die Gene *cnorB* und *nosZ* der Isolate amplifiziert, sequenziert und mit den öffentlich verfügbaren *cnorB*- und *nosZ*-Sequenzen einer Datenbank (NCBI, BLAST) verglichen. Neben *nirK* wurden auch die Sequenzen der funktionellen Genfragmente *cnorB* und *nosZ* in einem phylogenetischen Baum analysiert, in dem sowohl die Sequenzen der Isolate als auch die Sequenzen der nächsten Verwandten eingingen. Anhand des berechneten Neighbour-Joining Stammbaumes wurden die Sequenzübereinstimmungen in einer Distanzmatrix ermittelt.

Die Isolate 406 und 467 des *nirK*-Clusters I gruppierten sowohl auf Basis der *norB*-Phylogenie als auch der *nosZ*-Phylogenie zusammen (siehe Abb. 5, 8 und 9). Für die Isolate 406 und 467 stützt sich diese phylogenetische Nähe im Falle der *norB*-Phylogenie auf eine Sequenzübereinstimmung von 91% und im Falle der *nosZ*-Phylogenie auf 100%.

Innerhalb der Gattung *Bradyrhizobium* konnte bisher nur für die Spezies *Bradyrhizobium japonicum* das komplette Enzymbestock der Denitrifikation nachgewiesen werden. Ein Vergleich der *norB*-, *nosZ*-, *nirK*-Phylogenie mit der 16S rRNA-Gen-Phylogenie konnte daher nur für diese *Bradyrhizobium* Spezies erfolgen. Die 16S rRNA-Gen-Sequenzen der Isolate 406, 467 und 471 zeigten zu dieser Spezies eine Übereinstimmung von 94% bis 96%. Nach Definition deutet eine Sequenzübereinstimmung von weniger als 97% auf eine andere Spezies hin (Stackebrandt und Goebel, 1994). Die entfernte phylogenetische

III. Ergebnisse

Verwandtschaft zwischen den Isolaten 406 und 467 zu *B. japonicum* USDA 110 wurde in den Phylogenien des *nirK*-Gens bestätigt. Sie fußt auf Sequenzübereinstimmungen von 71%. Die Phylogenie des *norB*- und *nosZ*-Gens zeigte hingegen eine größere Sequenzübereinstimmung zwischen den Isolaten und *B. japonicum*. Die *nosZ*-Sequenzen der Isolate 406 und 467 stimmten zu 94% mit der des *B. japonicum*-Stammes überein und die *norB*-Sequenzen zu 99% (Isolat 467) und 88% (Isolat 406).

Ein ähnliches Bild zeigt sich für das Cluster I Isolat 471. Hier wich die *norB*-Phylogenien des Isolates 471 von der *nirK*-Phylogenie ab. Während auf *nirK*-Ebene die Sequenzübereinstimmung zu *B. japonicum* nur 71% betrug, zeigte die *norB*-Phylogenie eine enge phylogenetische Verwandtschaft zu Spezies *B. japonicum* mit einer Sequenzübereinstimmung von 100% an. Die Phylogenie des *nosZ*-Gens stand leider nicht zur Verfügung, da dieses Gen nicht amplifiziert werden konnte.

Für das Isolat 469 des *nirK*-Clusters V zeigte sich eine Kongruenz der Phylogenien der funktionellen Gene *nirK*, *cnorB* und *nosZ* zu *B. japonicum* USDA 110 anhand von Sequenzübereinstimmungen von 97% (*nirK*), 100% (*norB*) und 93% (*nosZ*; siehe Abb. 5, 8 und 9). Dies bestätigte sich ebenso auf Basis der 16S rRNA-Gen-Phylogenie, die eine Sequenzähnlichkeit von 98% zwischen dem Isolat 469 und der 16S rRNA-Gen-Sequenz von *B. japonicum* MSDJ 5697 darstellte.

Die phylogenetische Nähe des Isolates 187 (*nirK*-Cluster VII) zu *Bosea* PD19 zeigte sich anhand der phylogenetischen Einordnung auf Basis der 16S rRNA-Gen-Sequenz mit einer Sequenzübereinstimmung von 99%. Dies bestätigte sich sowohl auf Basis der *nirK*-Sequenz als auch auf Basis der *nosZ*-Sequenz mit einer Sequenzübereinstimmung von 99% und 97%. Die phylogenetische Analyse der *cnorB*-Sequenz ergab ein eigenes Cluster, da bisher noch keine *norB*-Sequenz des *Bosea*-Stammes veröffentlicht wurde.

Die Isolate 373 und 484 des *nirK*-Clusters IIa waren nach der phylogenetischen Analyse der 16S rRNA-Gen-Sequenz mit einer Sequenzübereinstimmung von 98% und 99% zu Spezies der Gattung *Mesorhizobium* zugeordnet worden. Zu den denitrifizierenden Spezies dieser Gattung, *Mesorhizobium* sp. NH-14 und *Mesorhizobium* sp. 4FB11, belief sich die Sequenzübereinstimmung nur auf 94% und 96%. Auch auf *nirK*-Ebene spiegelte sich anhand einer Sequenzübereinstimmung von 74% und 78% eine geringe phylogenetische Verwandtschaft wider. Die phylogenetische Bestätigung auf Basis der *cnorB*- und *nosZ*-Sequenz konnte nicht durchgeführt werden, da für diese Isolate weder das *nor*- noch das *nosZ*-Gen amplifizierbar war.

III. Ergebnisse

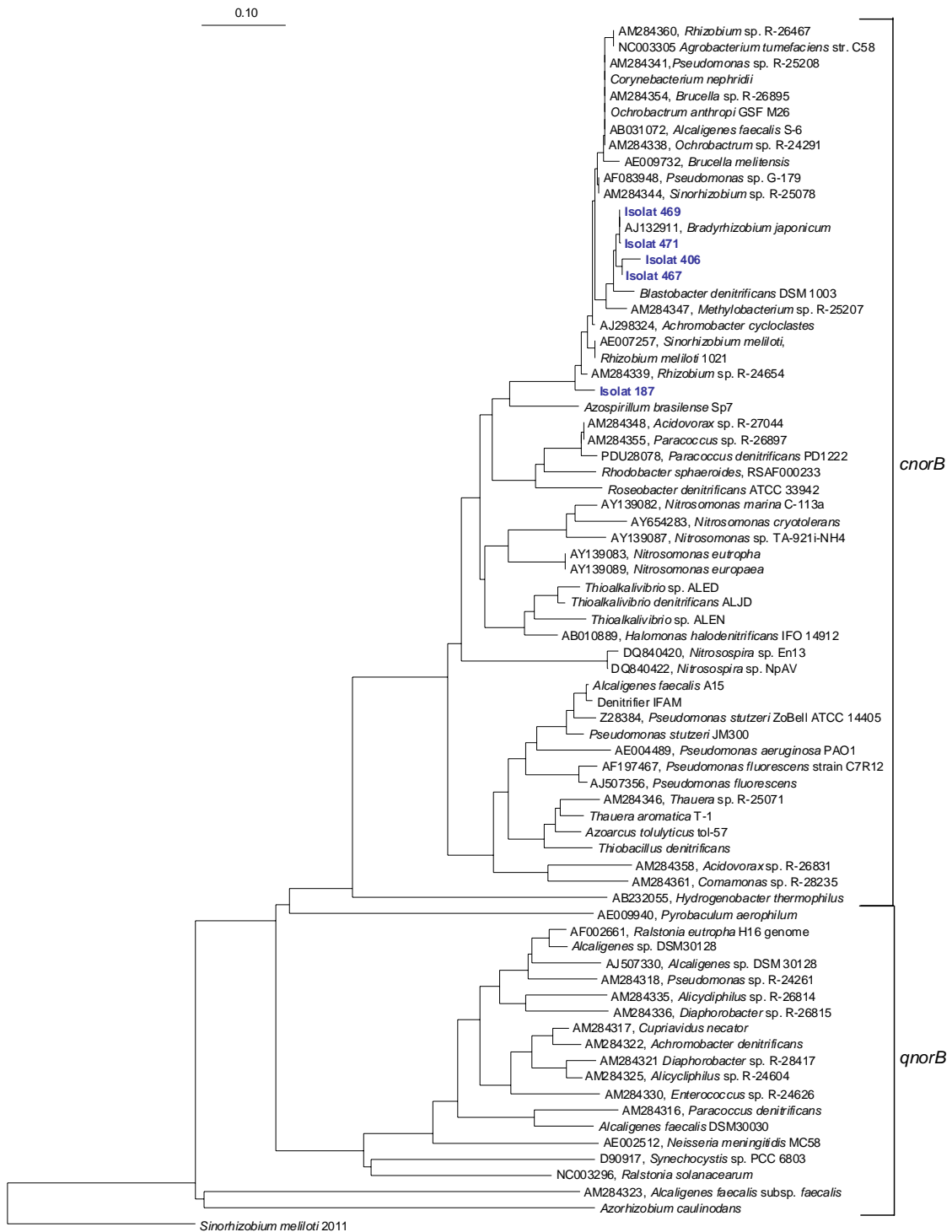


Abbildung 8: Ausschnitt des phylogenetischen *norB*-Stammbaums berechnet nach der Neighbour-Joining Methode, basierend auf einem Aminosäurealignment von 100 Aminosäuren. Der Maßstab entspricht 10% Nukleotid austausch. Die Sequenzen der in dieser Arbeit erhaltenden Isolate sind in blau markiert.

III. Ergebnisse

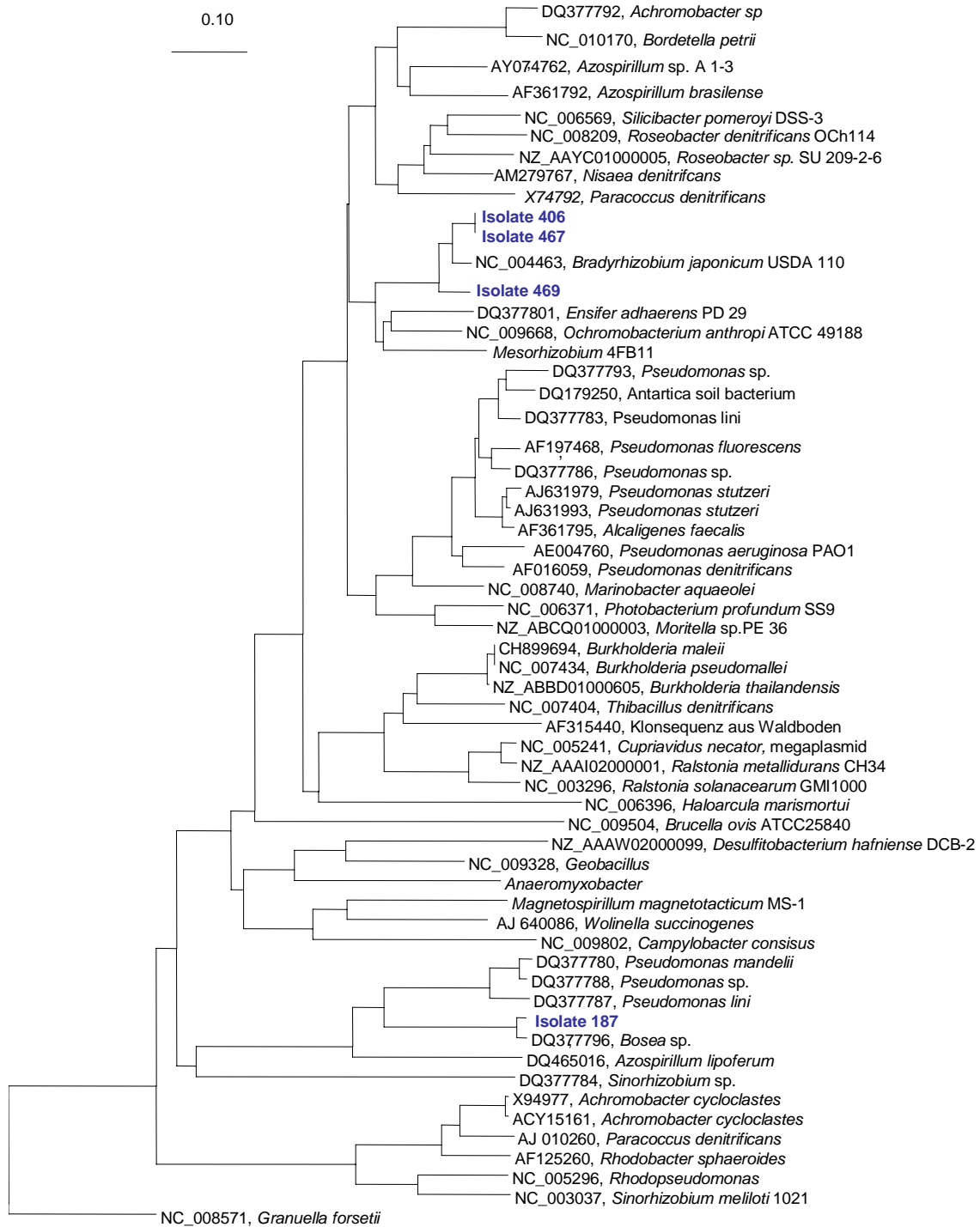


Abbildung 9: Ausschnitt des phylogenetischen *nosZ*-Baums, nach der Neighbour-Joining Methode basierend auf einem Alignment von 117 Aminosäuren. In die Berechnung wurden ausschließlich *nosZ*-Gen-Sequenzen von isolierten Organismen aufgenommen. Der Maßstab entspricht 10% Nukleotidaustausch. Die Sequenzen der in dieser Arbeit erhaltenden Isolate sind in blau markiert.

III. Ergebnisse

6.6 Nachweis der Denitrifikationsgene *nor* und *nos* mittels Dot-Blot-Methode

Weder das *cnorB*- noch das *nosZ*-Gen konnte von der genomischen DNA der Isolate 373 und 484 mittels PCR amplifiziert werden. Mit der Methode des Dot-Blots sollte überprüft werden, ob diese Gene wirklich nicht in dem Genom der Isolate vorhanden waren, oder ob sie eventuell durch die genspezifischen Primer während der PCR nicht detektiert worden waren. Als *nosZ*-Sonde wurde das *nosZ*-Amplifikat des Isolates 467 eingesetzt, während als *norB*-Sonde das *norB*-Amplifikat des Organismus *Pseudomonas stutzeri* JM 300 verwendet wurde.

Die *norB*-Sonde hybridisierte sowohl mit der genomischen DNA der Isolate 373 und 484 (siehe Abb. 10B 4 und 5) als auch mit den Kontrollen *Pseudomonas stutzeri* JM 300 und *Mesorhizobium* 4FB11 (siehe Abb. 10 B). Dies deutet auf das Vorkommen eines *norB*-Gens für die Isolate 373 und 484 hin. Für die Negativkontrollen der DNA der Stämme *Opitutus terrae* und *Bacillus* sp. wurde sehr schwache Signale nachgewiesen.

Neben der Detektion des Standards wurde eine erfolgreiche Hybridisierung der *nosZ*-Sonde mit der DNA des Isolates 467 festgestellt, während für die DNA des Isolates 471 kein Farbumschlag zu sehen war (siehe Abb. 10). Die *nosZ*-Sonde hybridisierte also mit dem DNA-Extrakt der Positiv-Kontrolle, jedoch nicht mit der DNA des Isolates 471 (siehe Abb. 10 A). Das Fehlen des *nosZ*-Gens im Isolat 471 wurde demnach mit der Dot-Blot Methode bestätigt.

Die Abwesenheit der Denitrifikationsgene im Isolat 205 konnte in diesem Versuch nicht getestet werden, weil aufgrund des ausbleibenden Wachstums in Flüssigmedium eine ausreichende Menge an DNA nicht zur Verfügung stand.

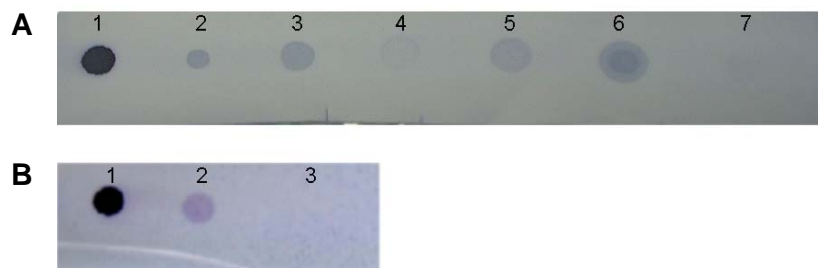


Abbildung 10: Dot-Blot-Verfahren mit verschiedenen Sonden. **A:** Dot-Blot mit *norB*-Sonde; 1 DIG-Standard, 2 Hybridisierung der Sonde mit DNA (0,2 µg) *Pseudomonas stutzeri* JM 300, 3: Hybridisierung der Sonde mit DNA (0,2 µg) von *Mesorhizobium* 4FB11; 4: Hybridisierung der Sonde mit DNA (0,2 µg) von *Bacillus* sp. als negativ Kontrolle; 5: Hybridisierung der Sonde mit DNA (0,2 µg) des Isolates 373; 6: Hybridisierung der Sonde mit DNA (0,2 µg) des Isolates 484; 7: Hybridisierung mit DNA (0,2 µg) des Stammes *Opitutus terrae* als negativ Kontrolle. **B:** Dot-Blot mit *nosZ*-Sonde; 1 DIG-Standard, 2 Hybridisierung der Sonde mit DNA (0,2 µg) des Isolates 467, 3: Hybridisierung der Sonde mit DNA (0,2 µg) des Isolates 471.

III. Ergebnisse

7. Optimierung der Wachstumsbedingungen der Isolate

Die Isolate wurden unter anoxischen Bedingungen in Gegenwart einer oxidierten Stickstoffverbindung inkubiert. Anschließend wurden mittels verschiedener Flüssigmedien und unterschiedlicher Inkubationstemperaturen die Wachstumsbedingungen der Isolate optimiert.

7.1 Wachstum der Isolate unter anoxischen Bedingungen

Die Vereinzelnung unter oxischen Bedingungen zeigte die Fähigkeit der Isolate zur aeroben Lebensweise. Als Kriterien zur Identifizierung von Denitrifikanten dienen das Wachstum unter anoxischen Bedingungen in Gegenwart einer oxidierten N-Verbindung, sowie das Vorhandensein der Denitrifikationsgene. Letzteres wurde im vorangegangenen Kapitel (6.2 bis 6.6) bereits bestätigt. Um die anaerobe Lebensweise der Isolate auf Festmedium zu prüfen, wurden diese unter anoxischen Bedingungen sechs Wochen bei 25°C inkubiert. Während von den acht Isolaten vier (205, 373, 406 und 484) kein Wachstum zeigten, bildeten hingegen die Isolate 187, 467, 469 und 471 Kolonien (siehe Tab. 15). Die Kolonien waren klein und von weißlicher Farbe.

Tabelle 15: Wachstumsverhalten unter oxischen und anoxischen Bedingungen auf Festmedium. Die Bildung von Kolonien wurde mit +, keine Koloniebildung mit – notiert.

Isolat	Aerobes Wachstum	Anaerobes Wachstum
187	+	+
205	+	-
373	+	-
406	+	-
467	+	+
469	+	+
471	+	+
484	+	-

Neben dem Festmedium wurden die Isolate ebenso unter anoxischen Bedingungen in Flüssigmedien kultiviert. Wie auch schon auf dem Festmedium zeigten die Isolate 187, 467, 469 und 471 auch in flüssigem, aneroben Medium Wachstum, während für die Isolate 205, 373 und 484 kein Wachstum unter anoxischen Bedingungen nachweisbar war. Das Isolat

III. Ergebnisse

406 konnte im Gegensatz zum Festmedium im anoxischen Flüssigmedium kultiviert werden.

7.2 Auswirkungen von verschiedenen Medien auf das Wachstum der Isolate

Das Wachstumsverhalten der Isolate wurde mit der Verwendung von verschiedenen Flüssigmedien optimiert. Als Medien wurden YEM, R2A und das Bodenmedium, mit welchem die Isolate aus Bodenprobe isoliert worden waren, eingesetzt. Während YEM ein Rhizobien-spezifische Medium ist, wurde das R2A-Medium speziell für langsamwachsende Organismen entwickelt. Für das Isolat 205 konnte trotz der Verwendung des zusätzlichen TSB-Mediums weder unter oxischen noch unter anoxischen Bedingungen Wachstum detektiert werden. Hingegen ließ sich bei der Referenzkultur *Devosia limi* unter oxischen Bedingungen Wachstum nachweisen. Das Isolat 205 wuchs also nur auf Festmedium, wodurch die nachfolgenden Versuche mit diesem Isolat nicht durchgeführt werden konnten.

Die Wachstumskurven der Isolate 187, 406, 467, 469 und 471 unter anoxischen Bedingungen sind in Abbildung 11 zusammengefasst. Die Verwendung von unterschiedlichen Medien zeigte eine deutliche Präferenz der Isolate für die YEM und R2A gegenüber dem Bodenmedium. Die Isolate 187, 467 und 471 wiesen im R2A-Medium die höchsten optischen Dichten auf, während die Isolate 469 und 406 die höchsten optische Dichte im YEM-Medium zeigten (siehe Abb. 11). Die Dauer der lag-Phase variierte je nach Isolat, abhängig vom verwendeten Medium, zwischen einem (Isolat 187) und bis zu acht Tagen (Isolat 471) und ebenso die Dauer der exponentiellen Wachstumsphase. Diese umfasste einen zeitlichen Bereich von bis zu 14 Tagen (Isolat 467).

Das Isolat 187 trat bereits einen Tag nach der Beimpfung in die exponentielle Wachstumsphase ein. Diese erstreckte sich über sieben Tage (siehe Tab. 16, Abb. 11 A). Bei *Bosea* sp. PD 19 konnte keinerlei Wachstum nachgewiesen werden.

Obwohl die Isolate 406, 467, 469 und 471 zur selben phylogenetischen Gattung von Bakterien gehören, bevorzugten sie nicht nur unterschiedliche Medien, sie zeigten ebenfalls einen unterschiedlichen Wachstumsverlauf. So variierte die Dauer der exponentiellen Phase.

III. Ergebnisse

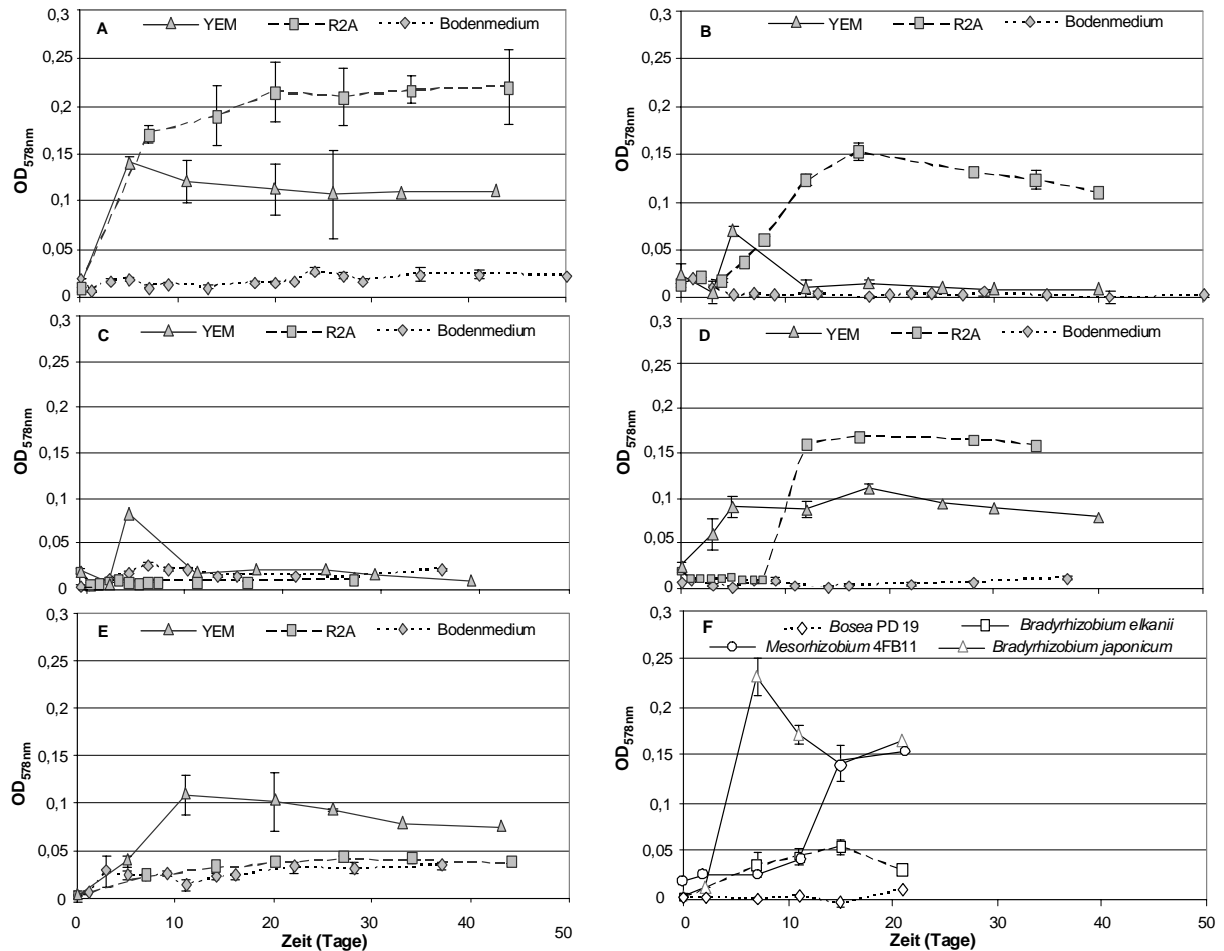


Abbildung 11 A-E: Wachstumskurven der Isolate in Bodenmedium, R2A-Medium und YEM-Medium. A: Isolat 187; B: Isolat 467; C: Isolat 406; D: Isolat 471; E: Isolat 469. Die Balken stellen den Standardfehler dar. **F:** Wachstumskurve der Referenz-Stämme: *B. japonicum*, *Bosea PD 19*, und *Mesorhizobium 4FB11* in R2A- bzw. YEM-Medium. Die Balken stellen den Standardfehler dar.

Während das Wachstum der Kulturen 469 und 467 in neun bzw. 14 Tagen exponentiell anstieg, erstreckte sich die exponentielle Phase der Kulturen 471 und 406 in YEM-Medium über vier bzw. zwei Tage. Der Übergang in die stationäre Phase erfolgte für die Kultur 467 bei einer optischen Dichte (OD_{578nm}) von 0,15. Die höchste optische Dichte der Kultur 469 wurde bei einer OD_{578nm} von 0,108 ermittelt. Das maximale Wachstum erreichte das Isolat 406 bei einer optischen Dichte von 0,085, während es für das Isolat 471 bei einer OD_{578nm} von 0,16 lag. Nitrat war bei allen Kulturen schon nach den ersten Tagen nicht mehr nachweisbar.

Der Referenzstamm *B. japonicum* (DSMZ 1755) wies im Vergleich zu den Isolaten 406, 467, 467 und 471 ein wesentlich höheres Wachstum auf. Ein Vergleich der Wachstumskurven zwischen den Isolaten der Gattung *Bradyrhizobium* und dem

III. Ergebnisse

Referenzstamm machte deutlich, dass sich die Dauer des exponentiellen Wachstums von acht bis zehn Tagen ähnelte.

Tabelle 16: Maximale optische Dichte der Isolate nach Inkubationstagen in verschiedenen Medien unter anoxischen oder oxischen Bedingungen im Fall der Isolate 373 und 484.

Isolat	O ₂ -Bedingung	Max. optische Dichte	Eintritt in die stationäre Phase (nach Inkubationstagen)	Medium
187	anoxisch	0,24	7	R2A
406	anoxisch	0,085	5	YEM
467	anoxisch	0,15	20	R2A
469	anoxisch	0,108	10	YEM
471	anoxisch	0,16	12	R2A
373	oxisch	0,42	13	YEM
484	oxisch	0,7	8	YEM
<i>B. japonicum</i>	anoxisch	0,23	7	R2A
<i>Mesorhizobium</i> sp. 4FB11	anoxisch	0,14	15	YEM

Für die Isolate 373 und 484 war nur unter oxischen Bedingungen Wachstum nachweisbar. Der Stamm *Mesorhizobium* sp. 4FB11 war hingegen in der Lage auch anaerob zu wachsen. Der Stamm erreichte im YEM-Medium eine maximale optische Dichte (OD_{578nm}) von 0,15. Mit Hilfe von verschiedenen Medien sollte für die Isolate 373 und 484 eine Optimierung der Wachstumsbedingungen unter oxischen Bedingungen herbeigeführt werden. Die Medien wurden mit 1 ml Vorkultur angeimpft. Das Inokulum entsprach einer optischen Dichte von 0,01. Das höchste Wachstum konnte unter der Verwendung des Mediums YEM verzeichnet werden (siehe Abb.12). Die maximale optische Dichte (OD_{578nm}) betragen 0,705 für das Isolat 484 und 0,42 für das Isolat 373.

Um eine Kontamination der Kulturen während der Wachstumsphase ausschließen zu können, wurden die 16S rRNA-Gen-Sequenz aller Isolate nach dem Versuch sequenziert. Alle Kulturen wurden in ihrer Reinheit bestätigt.

III. Ergebnisse

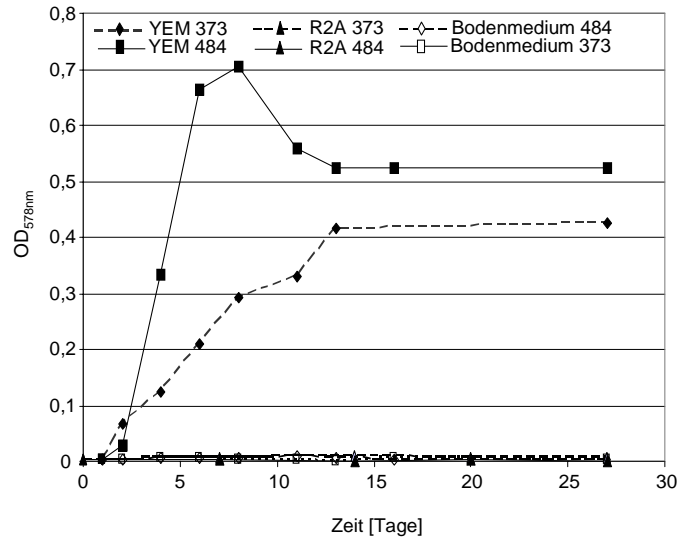


Abbildung 12: Wachstumskurven der Isolate 373 und 484 unter oxischen Bedingungen mit unterschiedlichen Medien. Die Balken stellen den Standardfehler dar.

7.3 Wachstum der Isolate unter oxischen Bedingungen in Flüssigmedium

Bereits durch die gewählte, oxische Kultivierungsmethode, war den isolierten Bakterien eine aerobe Atmung nachgewiesen worden. Um das Wachstumsverhalten der Isolate in Flüssigmedium unter oxischen Bedingungen aufzuzeichnen, wurden die Isolate unter diesen Bedingungen inkubiert. Jedes der Isolate wurde im jeweils präferierten Medium als Triplikat angeimpft und bei der jeweils optimalen Temperatur unter Schütteln inkubiert. Wie bereits festgestellt wurde, zeigte das Isolat 205 im Flüssigmedium keine Wachstumsaktivität, sodass diese Kultur nicht in den Versuchsaufbau integriert wurde.

Abbildung 13 verdeutlicht das Wachstumsverhalten der Isolate unter oxischen Bedingungen. Für die Isolate 187, 467, 469 und 471 war ein starkes Wachstum unter diesen Bedingungen nachweisbar. Wie bereits zuvor festgestellt worden war, sind die Isolate also in der Lage, sowohl oxische als auch anoxische Wachstumsbedingungen tolerieren zu können. Es zeigt sich ein stärkeres Wachstum unter oxischen als unter anoxischen Bedingungen. Allerdings zeigte nur eines der Triplikate des Isolates 469 Wachstum, weshalb die Wachstumskurve nur als eine Beispielkurve zu verstehen ist. Des Weiteren war für das Isolat 406 nur schwaches Wachstum nachweisbar.

III. Ergebnisse

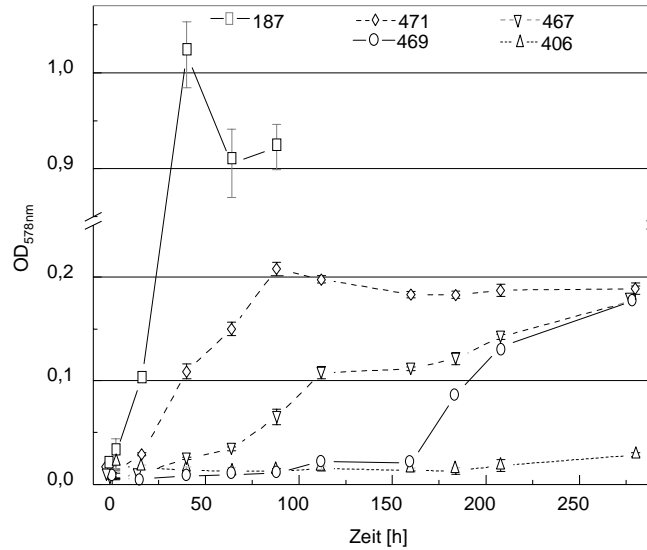


Abbildung 13: Wachstum der Isolate unter oxischen Bedingungen in den präferierten Medien: 187 in R2A, 406 in YEM, 467 in R2A, 469 in YEM und 471 in R2A. Die Balken stellen den Standardfehler dar.

7.4 Auswirkungen von verschiedenen Inkubationstemperaturen auf das Wachstum der Isolate

Um die optimale Inkubationstemperatur der Isolate zu ermitteln, wurden diese bei den Temperaturen 15, 20, 25, 30 und 37°C zum Wachsen gebracht. Mit Ausnahme der Isolate 205, 373 und 484 wurden alle Isolate unter anoxischen Bedingungen inkubiert. Die Isolate 373 und 484 wurden unter oxischen Bedingungen inkubiert. Da das Isolat 205 in Flüssigmedium kein Wachstum zeigte, wurde es nicht in den Versuchsaufbau integriert.

Die Isolate 187, 467 und 471 wurden im R2A-Medium und die Isolate 406, 484, 373 und 469 im YEM-Medium angeimpft. Nach 15 (Isolate 187, 373, 484, 406, 467 und 469) bzw. 22 (Isolat 471) Tagen wurde das Wachstum der Isolate bestimmt (siehe Abb. 14 und Tabelle 17).

III. Ergebnisse

Tabelle 17: Optimale Inkubationstemperatur mit maximalen optischen Dichten der Isolate nach 15 Tagen Inkubation.

Isolat	OD _{578nm}	Temperatur (°C)
187	0,347	25
406	0,018	25/30
467	0,067	25
469	0,066	25
471	0,208/0,203	25/30
373	0,5	30
484	0,47	30

Wie in Abbildung 14 zu sehen, wiesen alle Isolate in einem Temperaturbereich von 25 bis 30°C die maximale optische Dichte auf. Die Wachstumskurven zur Ermittlung der optimalen Temperatur der Isolate 187, 467 und 469 beschrieben einen glockenförmigen Verlauf. Das Wachstum dieser Isolate war bei einer Inkubationstemperatur von 15°C sehr gering. Bei einem Anstieg der Inkubationstemperatur auf 20 °C stieg die optische Dichte der Isolate 187, 467 und 469 und erreichte bei einer Temperatur von 25°C ihr Maximum. Stieg die Inkubationstemperatur weiter, nahm die optische Dichte der Isolate wieder ab. Für die Isolate 373 und 484 der Gattung *Mesorhizobium* konnte die höchste optische Dichte bei 30°C unter oxischen Bedingungen ermittelt werden.

Für die Isolate 406 und 471 konnte zwischen 25°C und 30°C keine eindeutige Temperaturpräferenz festgestellt werden. Von den drei Replikaten des Isolates 471 war nur eines bewachsen, weshalb die vorliegende Wachstumskurve bei unterschiedlichen Inkubationstemperaturen nur als repräsentative Kurve zu verstehen ist.

Auch nach diesem Versuch wurde die Reinheit der Isolate mittels 16S rRNA-Gen-Sequenzierung überprüft. Die Reinheit der Isolate konnte auch in diesem Fall bestätigt werden.

III. Ergebnisse

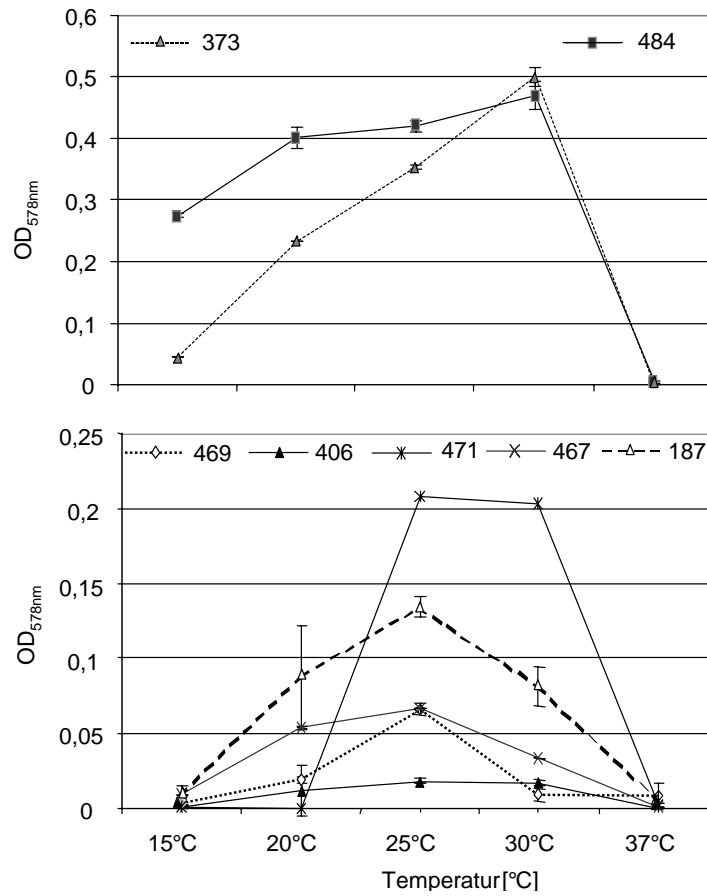


Abbildung 14: Wachstumskurven zur Ermittlung der optimalen Wachstumstemperatur der Isolate 187, 406, 467, 469 und 471 unter anoxischen und 373 und 484 unter oxischen Bedingungen nach einer Inkubationszeit von 15 bzw. 22 Tagen; die Balken stellen den Standardfehler dar.

III. Ergebnisse

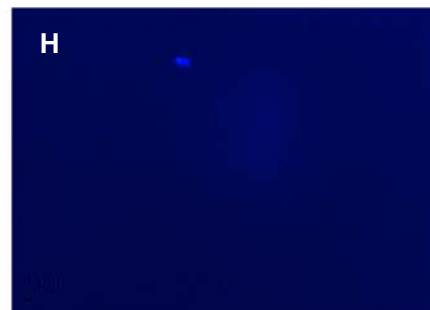
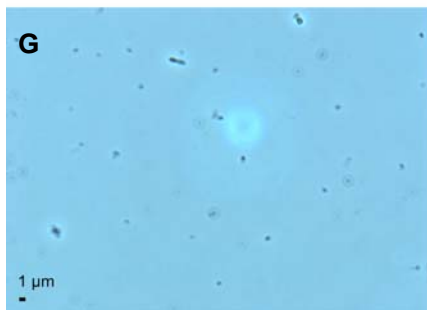
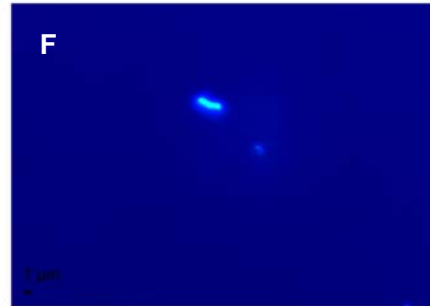
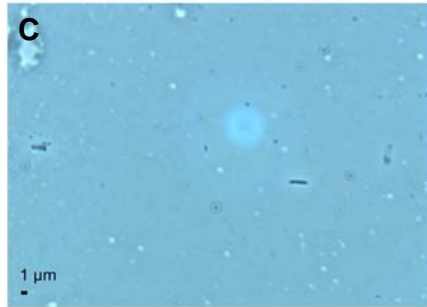
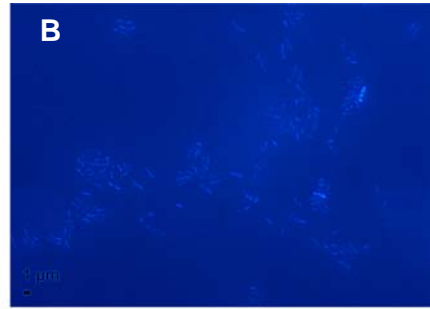
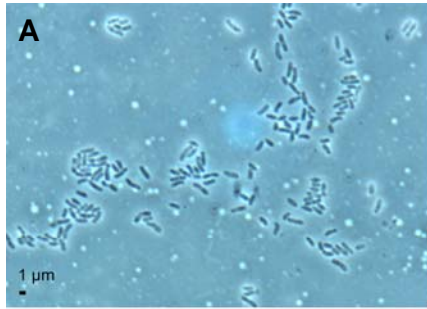
8 Morphologie der Isolate

Die unter oxischen Bedingungen wachsenden Kolonien der einzelnen Isolate 187, 406, 467, 469, 471, 484 und 373 waren alle weißlich mit klar abgegrenzten Rändern. Durch Lichtmikroskopie ließen sich die DAPI gefärbten Zellen gegenüber dem Hintergrund eindeutig identifizieren (siehe Abb. 15). Wie in Abbildung 15 erkennbar ist, weisen alle Isolate stäbchenartige Zellen auf. Die Zelllänge variierte zwischen 2 und 3 μm (siehe Tab. 18).

Tabelle 18: Durchschnittliche Zelllänge der Isolate.

Isolat	Länge (μm)
187	2,5
205	3,0
373	3,4
406	2,4
467	2,4
469	2,3
471	2,3
484	2,0

III. Ergebnisse



Abbildungsbeschriftung siehe nächste Seite

III. Ergebnisse

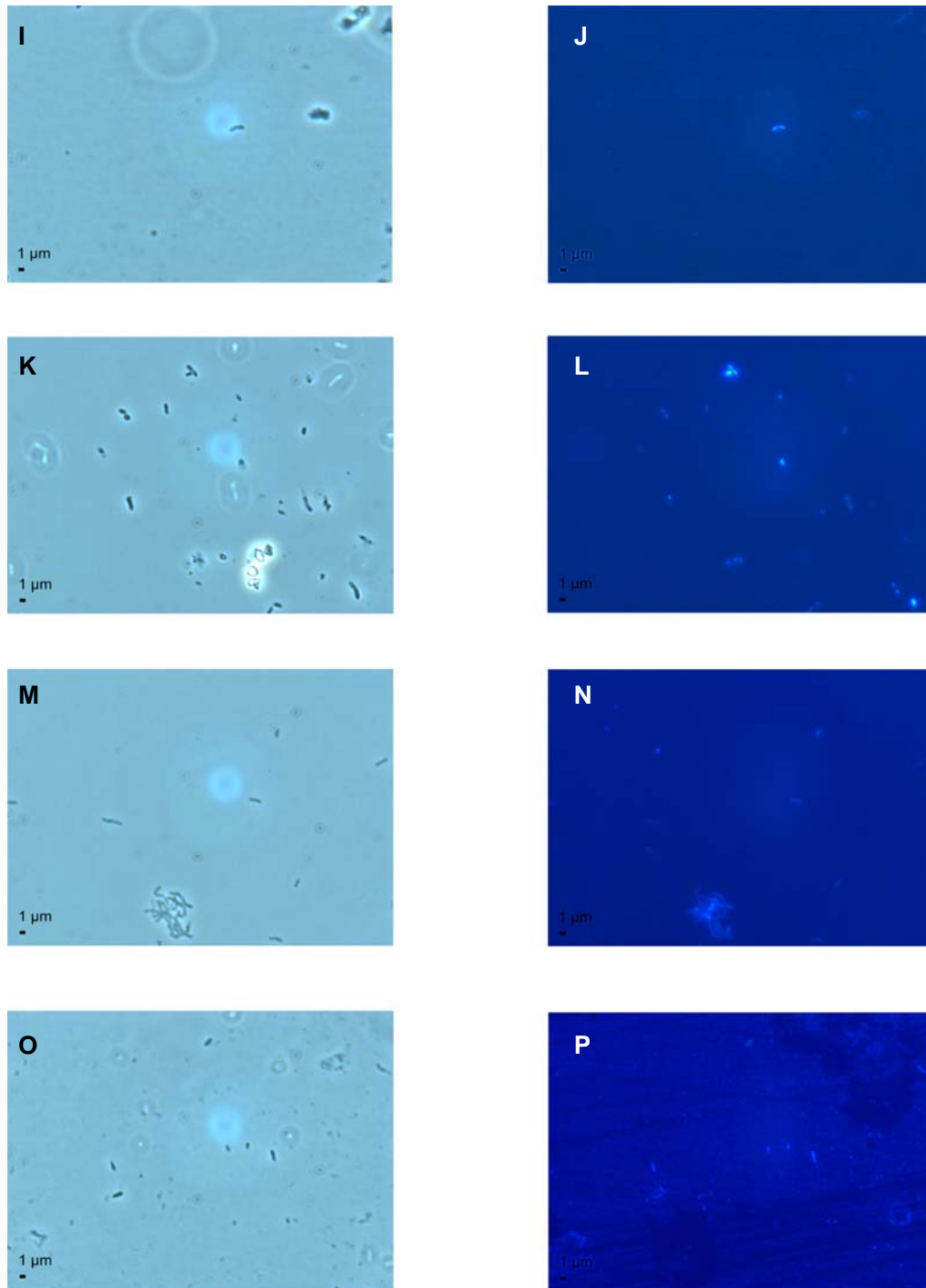


Abbildung 15: Lichtmikroskopische Aufnahmen mit 1000-facher Vergrößerung der Isolate 187 (A, B), 205 (C, D), 373 (E, F) 406 (G,H), 467 (I, J), 469 (K, L), 471 (M,N), 484 (O, P). Linke Bildhälfte: Phasenkontrastbilder. Rechte Bildhälfte: DAPI-Färbung der DNA.

III. Ergebnisse

9 Fähigkeit der Isolate zur Umsetzung von NO_3^- zu N_2O

Die Fähigkeit der Isolate zur Denitrifikation wurde anhand des Umsatzes von NO_3^- zu N_2O nachgewiesen. Als Vergleich wurde der Umsatz zu N_2O der anaerob wachsenden Referenzstämmen *B.japonicum* und *Mesorhizobium* sp. 4FB11 herangezogen. Die Isolate wurden unter den in Kapitel 6 ermittelten optimalen Bedingungen inkubiert. Nach 15 Tagen Inkubation wurde der Umsatz zu N_2O der Isolate 187, 406, 467, 471, 469 und der Referenzstämmen bestimmt.

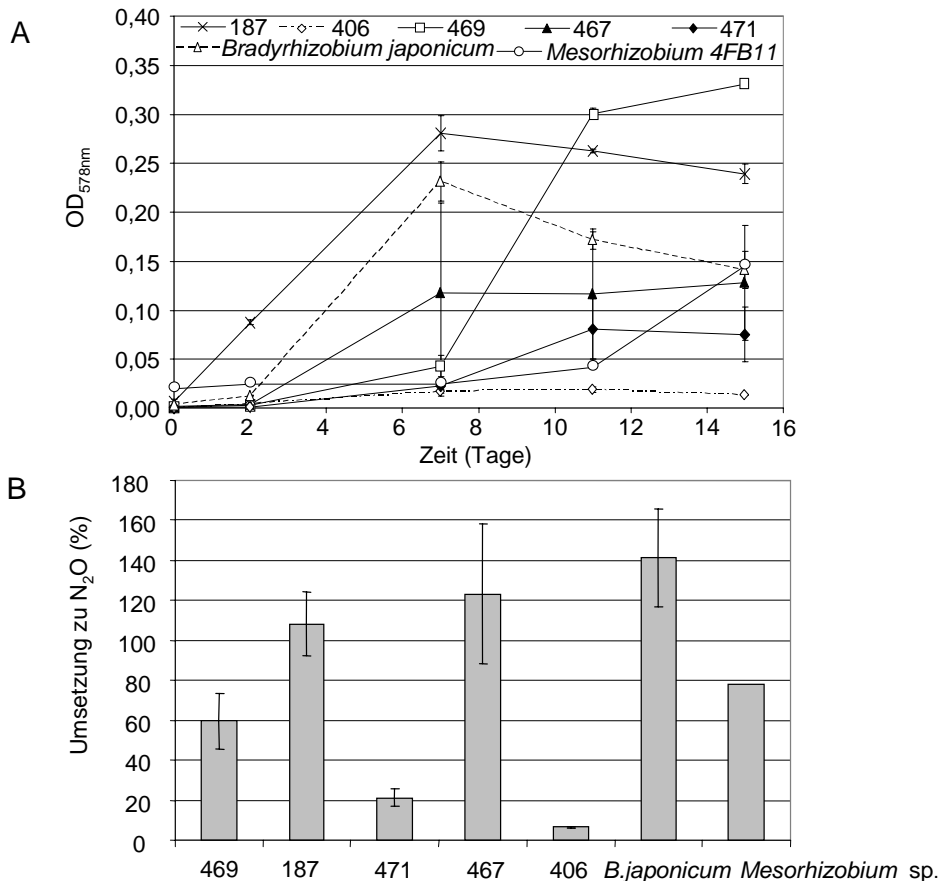


Abbildung 16: Umsatz von NO_3^- zu N_2O der Isolate 187, 406, 467, 469, 471 und der Stämme *B.japonicum* und *Mesorhizobium* sp. 4FB11 und deren Wachstumskurven. **A:** Wachstumskurven ($\text{OD}_{578\text{nm}}$) der Isolate über die Inkubationsdauer. **B:** Umsetzung des NO_3^- zu N_2O in Prozent. Der Balken repräsentiert den Standardfehler.

Im Vergleich aller Isolate wurde für die Isolate 187, 467 und 469 sowohl die höchsten optischen Dichten als auch die höchste Umsetzung von NO_3^- zu N_2O ermittelt (siehe Abb. 16). Des Weiteren wurden zwischen den Replikaten große Schwankungen der N_2O -Produktion festgestellt. Für das Isolat 469 beruhen die Daten anstatt von drei nur auf zwei Replikaten.

III. Ergebnisse

Die Kulturen 187, 467 und 469 setzten jeweils 108% (Kultur 187), 123% (Kultur 467) und 59% (Kultur 469) des im Medium vorhandenen Nitrats um. Das entsprechende Wachstum belief sich auf eine optische Dichte von 0,24 (Kultur 187), 0,13 (Kultur 467) und 0,23 (Kultur 469). Dem gegenüber setzten die Isolate 471 und 406 nur 21% bzw. 7% des eingesetzten NO_3^- in N_2O um. Die optische Dichte als Wachstumsparameter bestätigte ebenfalls diese niedrige Aktivität mit geringem Wachstum von 0,07 für das Isolat 471. Obwohl die Inkubationsbedingungen dieselben waren wie unter optimalen Bedingungen, konnten die da erzielten optischen Dichten während dieses Versuchs nicht erreicht werden. Für das Isolat 406 konnte nur minimales Wachstum und ein minimaler Umsatz von NO_3^- zu N_2O nachgewiesen werden (siehe Abb.16). Die Referenz-Stämme *B.japonicum* und *Mesorhizobium* 4FB11 waren ebenfalls in der Lage N_2O zu produzieren. Der *Bradyrhizobium*-Stamm setzte mit 140% mehr um als die Isolate der vorliegenden Arbeit. Allerdings zeigte dieser nicht die höchste optische Dichte. Der *Mesorhizobium*-Stamm 4FB11 zeigte einen Umsatz des eingesetzten Nitrats von 78% und zu diesem Zeitpunkt eine optische Dichte von 0,14.

Abschließend wurde die Reinheit der Kulturen mittels 16S rRNA-Gen-Sequenzierung bestätigt. Für die Negativkontrolle (nur Medium) konnte weder Wachstum noch ein Umsatz zu N_2O gemessen werden.

Die Daten zeigen also für die Isolate 187, 467, 469 und 471 Umsetzung von NO_3^- zu N_2O an. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Denitrifikationsgene lässt sich der Schluss ziehen, dass es sich bei den Isolaten 187, 467, 469 und 471 um Denitrifikanten handelt (siehe Tab. 14). Obwohl das Isolat 406 ein niedriges Wachstum zeigte, wurde trotzdem ein Umsatz zu N_2O nachgewiesen. Das spricht für eine Denitrifikationsaktivität des Isolates.

Da dem Isolat 471 die Distickstoffoxid-Reduktase fehlt, ist von einer unvollständigen Denitrifikation zu N_2O auszugehen. Für die Isolate 373 und 484 der Gattung *Mesorhizobium* konnte keine Denitrifikation nachgewiesen werden, obwohl die Gene *nir* und *nor* bestimmt werden konnten. Demzufolge ist eine Charakterisierung als Denitrifikant unter den getesteten Bedingungen für diese Isolate nicht möglich.

VI. Diskussion

Der phylogenetische Baum von *nirK* zeigt Cluster (I, III, IV und VI), zu denen bisher keine *nirK*-Sequenzen von Isolaten gruppieren. Deshalb war es bislang nicht möglich, die Bakterien dieser Cluster näher zu charakterisieren (siehe Abb. 5). Im Fokus der vorliegenden Arbeit stand die Kultivierung von *nirK*-enthaltenden Isolaten aus dem *nirK*-Cluster I, da dieses von *nirK*-Sequenzen aus Bodenhabitaten dominiert ist. Durch die Anwendung unspezifischer Kultivierungsmethoden wurden *nirK*-enthaltende Denitrifikanten der Cluster I, IIa, V und VII aus Wiesenbodenproben isoliert. Von den acht kultivierten Isolaten wiesen fünf sowohl das genetische Potential zur Denitrifikation als auch einen messbaren Umsatz zu N₂O auf und wurden daher als Denitrifikanten charakterisiert (siehe Tab. 19). Anhand dieser neuen Isolate ist es nun möglich, die Phylogenie und Physiologie der Denitrifikanten des *nirK*-Clusters I näher zu untersuchen.

1. Wahl des Habitats

Die Wahl des Wiesenhabitats als Probennahme begründete sich auf Vorversuche, die von der Arbeitsgruppe um Prof. Overmann (Frederic Gich, LMU München) durchgeführt wurden (mündliche Mitteilung 2005). Von den angereicherten Mikroorganismen wurden 6,1% als *nirK*-enthaltende Denitrifikanten bestimmt. Diese Zahl ist ähnlich mit dem von Tiedje et al. (1988) festgestellten Anteil von 5% Denitrifikanten in einer mikrobiellen Gemeinschaft aus Bodenproben. Für einige der *nirK*-Sequenzen des Vorversuches konnte eine phylogenetische Nähe zu den *nirK*-Sequenzen des Clusters I gezeigt werden. Des Weiteren ließ sich aus Wiesenbodenproben eine größere Anzahl an *nirK*-enthaltenden Denitrifikanten anreichern (14) als im Waldboden (3). Dies könnte zum einem durch die Anreicherungsbedingungen verursacht worden sein, oder zum anderen auf die unterschiedlichen Habitate des Probenmaterials zurückzuführen sein. Der Unterschied zwischen Wiesen- und Waldhabitaten in Bezug auf Denitrifikantengemeinschaften wurde durch eine Studie bereits gezeigt (Rich et al., 2003). Als Ursache wird sowohl eine geringere Nitratkonzentration des Waldbodens aufgrund niedriger Nitrifikationsraten (Mintie et al., 2003) als auch der erhöhte Durchwurzelungsgrad in Waldböden angegeben, der die Denitrifikation hemmt (Mergel et al., 2001). Speziell die Denitrifikanten mit kupfer-haltiger Nitrit-Reduktase leben bevorzugt in wurzelfreien Räumen, wie die Studie von Mergel et al. (2001) belegt.

VI. Diskussion

Tabelle 19: Übersichtstabelle der vorliegenden Isolate: Ihr genetisches Potential zur Denitrifikation, ihre Zuordnung anhand der 16S rRNA-Gen-Sequenzen und der Nachweis ihrer Aktivitäten (Umsetzung von NO_3^- zu N_2O in %).

Isolat	Denitrifikationsgene			nächster kultivierter Verwandter anhand der 16S rRNA-Gen-Phylogenie (Sequenzidentität in %)	Umsatz von NO_3^- zu N_2O (%)	Denitrifikanten
	<i>narG/napA</i>	<i>nirK/nirS</i>	<i>norB/nosZ</i>			
187	-/+	+/-	+	<i>Bosea</i> PD 19 (99,6)	108	+
205	-	+/-	-	<i>Devosia limi</i> (96,9)	-	n.b.
406	-/+	+/-	+	<i>Bradyrhizobium</i> sp. RO3 (99,1)	7	+
467	-/+	+/-	+	<i>Bradyrhizobium</i> group Ellin 127 (97,8)	123	+
469	-/+	+/-	+	<i>Bradyrhizobium</i> sp. RP7b und <i>Bradyrhizobium canariense</i> (99,4)	59	+
471	-/+	+/-	-	<i>Bradyrhizobium</i> group (98,5)	21	+
373	+/-	+/-	n.b.	<i>Mesorhizobium</i> sp. CBAU 11299 (99,8)	-	-
484	+/-	+/-	n.b.	<i>Mesorhizobium</i> sp. CBAU 11217 (98,8)	-	-

n.b.: nicht bestimmt

2. Bodenbedingungen und Denitrifikation

Die Pflanzengemeinschaft prägt durch ihre Wurzelexudate die abiotischen Faktoren und die mikrobielle Gemeinschaft des Bodens (Kowalchuk et al., 2002). Neben den Pflanzen haben auch Bodenparameter wie der pH-Wert und das C/N-Verhältnis einen Einfluss auf die mikrobielle Gemeinschaft im Boden (Brodie et al., 2002; Cavigelli und Robertson, 2001). Das Verhältnis von Kohlenstoff zu Stickstoff des beprobten Lahn-Wiesenbodens war mit 10,6 vergleichbar mit zuvor gemessenen C/N-Verhältnissen aus anderen Wiesen- bzw. Ackerböden, in denen Denitrifikanten nachgewiesen worden waren (Bremer et al., 2007; Rich et al., 2003; Wolsing und Priemé, 2004; Zhang et al., 2006).

Der pH-Wert des beprobten Lahn-Wiesenbodens der vorliegenden Arbeit belief sich auf 5. Nach Knowles (1982) korreliert der pH-Wert positiv mit der Denitrifikationsrate und ist in einem Bereich von 7,0 bis 8,0 am höchsten. Priemé et al. (2002) sehen in einem niedrigen pH-Wert die Ursache für ein geringes Vorkommen von Denitrifikanten. Der leicht saure Charakter des beprobten Bodens könnte durch Wurzelexudate hervorgerufen worden sein (Šimek et al., 2002). Weiterhin könnte das ausschließliche Vorkommen der *nirK*-enthaltenden Bakterien der Ordnung *Rhizobiales* durch Wurzelexudate gefördert worden sein, da nur Bakterien dieser Ordnung nachgewiesen wurden.

3. Vergleich zwischen *nirK*-Sequenzen der Klonbibliothek und der kultivierten Isolate aus den Lahn-Wiesenbodenproben

Um einen Überblick über die im Lahn-Wiesenboden vorkommenden *nirK*-Genotypen zu erhalten, wurde zunächst in einem kultivierungs-unabhängigen Ansatz eine Klonbibliothek erstellt. Ein Vergleich der *nirK*-Klonsequenzen mit den *nirK*-Sequenzen der isolierten Denitrifikanten der vorliegenden Arbeit verdeutlichte, dass nicht jedes Isolat durch einen Klon der Klonbibliothek repräsentiert wurde. Des Weiteren wurden in der Klonbibliothek auch *nirK*-Sequenzen gefunden, die keine phylogenetische Verwandtschaft zu den *nirK*-Sequenzen der Isolate aufwiesen. Durch die Klonierung wurden demnach andere *nirK*-Sequenzen bestimmt als mit der Kultivierungstechnik. Die *nirK*-Sequenzen der isolierten Kulturen zeigten weiterhin eine höhere Diversität als die *nirK*-Sequenzen der Klonbibliothek. Letztere waren nur auf drei Cluster, die *nirK*-Sequenzen der Isolate hingegen über fünf Cluster verteilt. Ferner konnte nur im Falle des Isolates 471 eine direkte phylogenetische Nähe zwischen einer *nirK*-Klonsequenz der Klonbibliothek und der *nirK*-Sequenz eines Isolates festgestellt werden. Vorhergehende Studien zeigten, dass die Erfassung der mikrobiellen Gemeinschaft anhand einer molekularbiologischen,

VI. Diskussion

kultivierungs-unabhängigen Methode, wie der Klonbibliothek ein genaueres Abbild der vorherrschenden Gemeinschaft verschafft als dies mit mikrobiellen, kultivierungs-abhängigen Methoden möglich ist (Amann et al., 1995). Allerdings zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass durch kultivierungs-abhängige Methoden auch Organismen isoliert werden können, die in geringen Abundanzen auftreten und daher in einer Klonbibliothek möglicherweise nicht erfasst werden. Mit der gewählten Kultivierungsmethode wurden also zum einem *nirK*-enthaltende Isolate des in hoher Abundanz auftretenden Clusters I kultiviert und zum anderen Isolate 187, 205 und 469, die nur geringe Abundanzen besaßen und deren *nirK*-Sequenzen in der Klonbibliothek nicht auftraten. Allerdings wurden nicht zu allen *nirK*-Klonsequenzen, die in hoher Abundanz auftraten, Isolate kultiviert, was durch die „Große Platten-Zahl-Anomalie“ erklärbar ist (Staley und Konopka, 1985). Diese besagt, dass sich die Anzahl der mikroskopisch sichtbaren Zellen von der Anzahl der bestimmbaren Lebzellzahl um Zehnerpotenzen unterscheidet. Die unterschiedliche Detektion von Organismen durch kultivierungs-abhängige und kultivierungs-unabhängige Methoden stützt sich auf die Ergebnisse einer ganzen Reihe von Studien (Donachie et al., 2007; Giovannoni und Stingl, 2007; Lliros et al., 2008; Nichols, 2007; Stott et al., 2008). Donachie et al. (2007) analysierten die mikrobielle Diversität verschiedener Habitate sowohl mit Kultivierung als auch mit einer 16S rRNA-Gen-Klonbibliotheken. Es zeigte sich, dass die Erfassung von Organismen über die 16S rRNA-Gen-Klonbibliotheken und die Kultivierungsansätze aus Proben der Rhizosphäre, dem Ozean, dem See, dem Salzwerk und den Federn, stark voneinander abwichen. Die Autoren kamen daher zu dem Schluss, dass für ein umfassendes Verständnis der mikrobiellen Diversität eines Standortes sowohl mikrobielle als auch molekularbiologische Methoden notwendig sind. Durch die Kombination aus mikrobiellen, kultivierungs-abhängigen und molekularbiologischen, kultivierungs-unabhängigen Methoden gelang es in der vorliegenden Arbeit zum einem ein Abbild der Abundanz der denitrifizierenden Gemeinschaft in Bodenproben zu erhalten und zum anderen Denitrifikanten zu erfassen, deren Abundanz zu gering war um von einer Klonbibliothek detektiert zu werden.

4. Kultivierung von *nirK*-enthaltenden Denitrifikanten aus Lahn-Wiesenbodenproben

Die spezifische anoxische Anreicherung von Denitrifikanten aus Umweltproben ermöglichte die Isolierung diverser Denitrifikanten in einer Vielzahl von Studien (Brettar et al., 2001; Chenèby et al., 2000; Dandie et al., 2007a; Fries et al., 1994; Gamble et al., 1977; Hallin et

VI. Diskussion

al., 2007; Hashimoto et al., 2006; Heylen et al., 2006b; Patureau et al., 2000; Su et al., 2001). Vertreter der *nirK*-Cluster I Denitrifikanten konnten mit diesen Methoden bisher jedoch nicht kultiviert werden. So isolierten Heylen et al. (2006b) zwar Denitrifikanten unter anoxischen Bedingungen mit Nitrat und Nitrit als Elektronenakzeptor, jedoch zeigten deren *nirK*-Sequenzen keine phylogenetische Nähe zu den Sequenzen des *nirK*-Clusters I. Vielmehr gruppieren diese in das Cluster VII, welches bereits von kultivierten Denitrifikanten dominiert ist.

Weiterhin zeigten vorangegangene Untersuchungen, dass unter anoxischen Bedingungen, bei einer Inkubationstemperatur von 20°C bis 37°C aus Ackerbodenproben keine Denitrifikanten des *nirK*-Clusters I zu isolieren waren, obwohl mittels einer *nirK*-Klonbibliothek Organismen dieses Clusters nachgewiesen wurden (Schwarz, 2002). Bereits in einem Vorversuch von der AG Overmann, LMU München wurde ein unspezifischer Kultivierungsansatz verfolgt. Die dort angewandte Methode (Bruns et al., 2003; Gich et al., 2005) beruht auf einer Kultivierungsmethode mit Minimalmedium und einer kleinen Menge an Inokulum. Dieser unspezifische, oxische Kultivierungsansatz wurde für die vorliegende Arbeit übernommen, weil die Anreicherung von *nirK*-enthaltenden Mikroorganismen mit dieser Methode möglich war. Dabei wurde die Inkubationstemperatur auf 15°C herabgesetzt, um das Überwachsen der langsam wachsenden Bodenorganismen durch bekannte Organismen zu verhindern. Dieser Kultivierungsansatz führte in der vorliegenden Arbeit zu 687 Kolonien, von denen jedoch nur 490 auf frisches Medium übertragbar waren. Overmann (2006) sieht in dem reduzierten Wachstum nach einem Bakterien-Transfer mehrere Ursachen. So könnte die Anzahl der transferierten Zellen für ein erneutes Wachstum zu gering gewesen sein oder die Zelle wurde von einem lebensnotwendigen Wachstumspartner getrennt, wodurch ein Anwachsen der Kultur nicht mehr möglich war.

Die übertragbaren, *nirK*-enthaltenden Kolonien der vorliegenden Arbeit wurden anschließend unter anoxischen Bedingungen als Flüssigkulturen in Serumflaschen weiter kultiviert. Sowohl die Kultivierung der Flüssigkultur in Serumfalschen als auch die Kultivierung auf Festmedium gelten als Batch-Kultivierungsverfahren, da dem Kultivierungssystem keine Stoffe zugeführt oder abgeführt werden. Der Zelle steht in einem geschlossenen System nur eine limitierte Menge an Kohlenstoff- und Energiequellen zur Verfügung. Des Weiteren reichern sich während des Zellwachstums die Produkte des Metabolismus im Medium an. Die Zelle ist also in der Batch-Kultur sich stetig verändernden Wachstumsbedingungen ausgesetzt. Die Batch-Kultur steht der kontinuierlich-wachsenden Kultur gegenüber, in der die Zelle stetig mit Energie- und Kohlenstoffquellen versorgt wird

VI. Diskussion

und die Produkte des Metabolismus entfernt werden, sodass die Wachstumsbedingungen konstant bleiben. Die Kultivierung von ökologisch relevanten Mikroorganismen über das Batch-Kultivierungs-Verfahren steht in der Kritik, da sie nur die Organismen mit der höchsten Wachstumsrate und der niedrigsten Substrat-Spezifität selektiert, und nicht die, die mikrobielle Prozesse in einem Ökosystem dominieren (Jannasch, 1967). Durch die Verwendung eines hoch verdünnten Inokulums wurde das Wachstum des bevorzugten Organismus gegenüber dem mit einer höheren Nährstofftoleranz in einer Batch-Kultur erhöht (Button et al., 1993). Auch Ferris et al. (1996) erkannten, dass das Animpfen mit hoch verdünntem Inokulum die Isolierung von bis dahin unkultivierten Organismen erleichtert. Allerdings zeigte sich in dieser Arbeit, dass die Isolate des ökologisch relevanten *nirK*-Clusters I alle aus unterschiedlichen Verdünnungsstufen stammen. Dabei entsprach die Verdünnungsstufe 10^{-6} einer Koloniezahl von 10^4 Koloniebildende Einheiten (colony forming units, CFU) per ml und die Verdünnung 10^{-8} einer Anzahl von 10^2 CFU pro ml. Es deutet sich an, dass die Verdünnungsstufen der Bodensuspension nicht der entscheidende Faktor zur Kultivierung der vorliegenden Isolate ist.

Der unspezifische Kultivierungs-Prozess der vorliegenden Arbeit wurde unter oxischen Bedingungen durch die Verwendung des nährstoffarmen Mediums (Bodenmedium), unterstützt. Dieses Minimalmedium geht auf ein Medium zurück, welches speziell für Bodenorganismen entwickelt worden ist. So zeichnet es sich zum Beispiel durch eine sehr niedrige Konzentration an Phosphaten und eine hohe Konzentration an Calcium aus (Angle et al., 1991). Nach einer vierwöchigen Inkubationszeit führte die Kultivierungsmethode der vorliegenden Arbeit zur Isolierung von acht *nirK*-enthaltenden Organismen von denen drei zu den *nirK*-Sequenzen des phylogenetischen Clusters I gruppierten. Durch die angewendete, unspezifische Kultivierungsmethoden wie der Verwendung von Minimalmedien, einer längeren Inkubationszeit und die Wahl einer habitatspezifischen Inkubationstemperatur konnten also ökologisch relevante Organismen isoliert werden.

5. *nirK*-enthaltende Isolate der *nirK*-Cluster I, IIa, V und VII

Die *nirK*-enthaltenden Isolate aus dem Lahn-Wiesenboden konnten anhand der 16S rRNA-Gen-Phylogenie zur Ordnung der *Rhizobiales* und zur Klasse der α -*Proteobacteria* zugeordnet werden. Ferner wurden sie als Vertreter der Gattungen *Bradyrhizobium*, *Bosea*, *Mesorhizobium* und *Devosia* identifiziert. Neben Vertretern der Gattung *Bradyrhizobium* sind auch *Mesorhizobium* Spezies als Stickstoff-fixierende, sowohl in Symbiose lebende als auch als freilebende Bakterien bekannt, während Vertreter der Gattungen *Bosea* und *Devosia*

VI. Diskussion

bisher nicht als solche charakterisiert wurden. Denitrifizierende Spezies wurde neben *Bradyrhizobium* auch innerhalb der Gattung *Bosea* sowohl auf genomischer als auch auf funktioneller Ebene bereits bestimmt. Im Gegensatz zu den Isolaten der Gattungen *Bradyrhizobium* und *Bosea*, konnte den *Mesorhizobium* und *Devosia* zugeordneten Isolaten keine Denitrifikationsaktivität von NO_3^- zu N_2O nachgewiesen werden.

5.1 *NirK*-enthaltende Isolate der *nirK*-Cluster IIa und VII

5.1.1 Phylogenie und Wachstumsverhalten der Isolate des Clusters IIa

In der vorliegenden Arbeit wurden die *nirK*-enthaltenden, stäbchenförmigen Isolate 373 und 484 kultiviert und auf Basis der 16S rRNA-Gen-Phylogenie als *Mesorhizobium* Spezies identifiziert. Die *nirK*-Sequenzen dieser Isolate, deren Zelllänge sich auf 2,0 bis 3,4 μm belief, gruppieren in das *nirK*-Cluster IIa. Die Bakterien der Gattung *Mesorhizobium* werden in weiteren Publikationen als schnell-wachsende Organismen beschrieben (Mannetje, 1967; Monza et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit ließ sich für diese Isolate unter oxischen Bedingungen ein optimaler Temperaturbereich von 25°C bis 30°C feststellen. Für die Isolate 373 und 484 ließ sich Wachstum ausschließlich unter oxischen Bedingungen nachweisen, was sich durch andere *Mesorhizobium* Spezies bereits gezeigt hatte (Monza et al., 2006). Weiteren Autoren war es hingegen möglich, *nirK*-enthaltende *Mesorhizobium*-Stämme (NH-14 und 4FB11) unter anoxischen Bedingungen mit Zugabe von Nitrit bzw. Nitrat als Elektronenakzeptor zu kultivieren (Okada et al., 2005; Song et al., 2000). Die unterschiedliche Physiologie dieser Stämme zu den Isolaten spiegelte sich sowohl im *nirK*- als auch im 16S rRNA-Gen-Stammbaum wider. So zeigten die *nirK*-Sequenzen der Isolate 373 und 484 eine Sequenzübereinstimmung zu den *nirK*-Sequenzen der denitrifizierenden *Mesorhizobium*-Stämme NH-14 und 4FB11 von nur 74% bis 78%. Die durchschnittliche Sequenzübereinstimmung von *nirK*-Sequenzen innerhalb eines Clusters belief sich in der vorliegenden Arbeit auf 79% bis 93%, wobei phylogenetisch sehr nah verwandte *nirK*-Sequenzen eine Übereinstimmung von 97% bis 100% aufwiesen. Die Übereinstimmung mit den Stämmen NH-14 und 4FB11 von 74% bis 78% belegt also eine entfernte Verwandtschaft. Ein ähnliches Bild zeichnet sich auf Basis der 16S rRNA-Gen-Phylogenie ab. Hier lag die Sequenzübereinstimmung der Isolate 373 und 484 zu beiden *nirK*-enthaltenden *Mesorhizobium*-Stämmen bei 94% bis 96%. Da nach allgemeiner Definition innerhalb einer Spezies eine Übereinstimmung der 16S rRNA-Gen-Sequenzen von 97% gilt (Stackebrandt und Goebel, 1994), würden die Isolate 373 und 484 der Gattung *Mesorhizobium* und die *nirK*-enthaltenden *Mesorhizobium*-Stämme NH-14 und 4FB11 zu

VI. Diskussion

unterschiedlichen Spezies gehören. Vielmehr wiesen die 16S rRNA-Gen-Sequenzen der Isolate eine Sequenzübereinstimmung von 98% und 99% zu den *Mesorhizobium*-Stämmen CCBAU 11217 und 11299 auf (Yan et al., 2007). Diese Stämme wurden aber bisher nicht als Denitrifikanten charakterisiert, sodass auch keine *nirK*-Sequenz dieser Stämme vorliegt. Neben dem *nirK*-Gen wies der *Mesorhizobium*-Stamm NH-14 die Denitrifikationsgene *norB* und *nosZ* auf (Song et al., 2000). Im Gegensatz dazu konnte von der genomischen DNA der Isolate 373 und 484 weder das *norB*- noch das *nosZ*-Gen amplifiziert werden. Diese wurden erst mit einer Sonde im Dot-Blot-Verfahren bestimmt. Eine mögliche Ursache könnte in der Modifikation des *norB*-Gens innerhalb der Primerbindestelle liegen, sodass eine Detektion dieser Gene erst mittels einer längeren Sonde und unter weniger stringenten Bedingungen möglich war. Obwohl das Enzymbesteck der Denitrifikation nachgewiesen wurde, waren die Isolate 373 und 484 nicht fähig, unter anoxischen Bedingungen mit Nitrat als Elektronenakzeptor zu wachsen. Es ist möglich, dass den Isolaten für das Wachstum unter anoxischen Bedingungen eine zusätzliche Komponente im Medium fehlte. Die vorhandenen Denitrifikationsgene *nar*, *nir* und *nor* weisen aber auf die potentielle Fähigkeit der Denitrifikation dieser Isolate hin.

Auch Monza et al. (2006) konnten ein *nosZ*-Genfragment auf der DNA dem Stamm *Mesorhizobium loti* U226 nachweisen, obwohl dieser keinerlei Wachstum unter anoxischen Bedingungen mit Zugabe von Nitrat als Elektronenakzeptor zeigte. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Erkenntnissen der Genomsequenzierung von *Mesorhizobium loti*, bei der keine denitrifizierenden Gene auf dem Genom nachgewiesen wurden (Kaneko et al., 2000).

Die isolierten Kulturen deuten darauf hin, dass neben den *Mesorhizobium*-Stämmen NH-14 und 4FB11 weitere Spezies das genetische Potential zur Denitrifikation besitzen.

5.1.2 Phylogenie und Wachstumsverhalten der Isolate des *nirK*-Clusters VII

Die *nirK*-Sequenz des Isolates 187 gruppierte innerhalb der *nirK*-Sequenzübereinstimmung in das *nirK*-Cluster VII und wurde auf Basis der 16S rRNA-Gen-Phylogenie mit einer Sequenzübereinstimmung von 99% dem Stamm *Bosea* PD 19 (Dandie et al., 2007a) als nächstem phylogenetischem Stamm zugeordnet. Phylogenetische Analysen bestimmten den Stamm PD19 als *Bosea enea* (La Scola et al., 2003). Die große phylogenetische Nähe bestätigte sich ebenfalls auf Basis der *nirK*- (99% Sequenzübereinstimmung) und der *nosZ*-Phylogenie (97% Sequenzübereinstimmung). Weiterhin wies sowohl die DNA des Isolates 187 als auch die des Stammes PD19 ein *norB*-Gen auf (Dandie et al., 2007b). Im Gegensatz

VI. Diskussion

zu den Gattungen *Bradyrhizobium* und *Mesorhizobium* wurde für einige *Bosea* Spezies erst in den letzten Jahren eine symbiontische Lebensweise nachgewiesen (Rincón et al., 2008).

Des Weiteren zeigt das Wachstum sowohl unter oxischen als auch unter anoxischen Bedingungen, dass es sich bei dem vorliegenden Isolat 187 der Gattung *Bosea* um einen fakultativen Anaerobier handelt, der Nitrat und andere oxidierte N-Verbindungen als alternativen Elektronenakzeptoren nutzen kann. Während sich die Angaben über die Zelllänge von 1,4 µm bis 1,6 µm durch das Isolat 187 bestätigten, lag die optimale Wachstumstemperatur für das Isolat 187 bei 25°C anstelle von 30°C bis 37°C (Das et al., 1996). Die Ursache für die unterschiedliche Temperaturpräferenz kann jedoch in der Verwendung unterschiedlicher Medien gesehen werden. So verwendeten sowohl Das et al. (1996) als auch Dandie et al. (2007) Komplexmedien, während die optimale Wachstumskurve für das Isolat 187 mit dem R2A bestimmt wurde.

Die *nirK*-Sequenz des Isolates 205 gruppierte in das phylogenetische *nirK*-Cluster VII. Die nächsten kultivierten und phylogenetisch verwandten Spezies des Isolates 205 wurden anhand des 16S rRNA-Gens mit einer Sequenzübereinstimmung von 97% als eine *Devosia limi* bestimmt. Diese Bodenbakterien gehören zur Familie der *Hyphomicrobiaceae* und wurden erstmals 1996 beschrieben (Nakagawa et al., 1996). Weiterhin konnte sowohl bei der Spezies *Devosia neptun* (Rivas et al., 2003) als auch bei *Devosia ribolavina* (Nakagawa et al., 1996) eine Nitrat- und Nitrit-Reduktion nachgewiesen werden. Auf dem Genom des Isolates 205 konnte hingegen nur *nirK* als einziges Gen der Denitrifikation bestimmt werden. Bisher wurde die Denitrifikation weder auf genomischer noch auf funktioneller Ebene für Vertreter der Gattung *Devosia* nachgewiesen. So liefert das Isolat der vorliegenden Arbeit den ersten Nachweis eines *nirK*-Gens innerhalb dieser Gattung.

Da das Isolat 205 keinerlei Wachstum in Flüssigmedium zeigte, konnte weder ein Umsatz von NO_3^- zu N_2O noch konnten die optimalen Wachstumsparameter bestimmt werden. Dies steht im Gegensatz zu Ergebnissen von Yoo et al. (2006), deren *Devosia*-Kultur in flüssigem R2A-Medium innerhalb von zwei Tagen die maximale Wachstumsdichte erreicht hatte.

Des Weiteren konnte in der vorliegenden Arbeit ebenfalls keinerlei Wachstum unter anoxischen Bedingungen auf Festmedium verzeichnet werden. Dies zeigte sich auch in anderen Studien, in denen Wachstum ebenfalls nur unter oxischen Bedingungen, allerdings sowohl auf Fest- als auch in Flüssigmedium, bestimmt wurden (Nakagawa et al., 1996; Vanparys et al., 2005; Yoo et al., 2006; Yoon et al., 2007). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass das *nirK*-Gen über horizontalen Gentransfer in den Stamm gelangt sein könnte und funktionslos bezüglich der Denitrifikation ist. Weiterhin kann das Enzym der kupfer-

VI. Diskussion

haltigen Nitrit-Reduktase auch andere Funktionen ausüben. So wurden Bakterien isoliert, deren kupfer-haltige Nitrit-Reduktase toxisches Selenit in elementares Selenium reduziert (Basaglia et al., 2007). Daher kann nur der Nachweis eines *nirK*-Gens nicht als eindeutiger Beweis für eine potentielle vorhandene Denitrifikation gewertet werden.

5.2 *NirK*-enthaltende Isolate der *nirK*-Cluster I und V

5.2.1 Identifizierung der Isolate der *nirK*-Cluster I und V anhand der 16S rRNA-Gen-Phylogenie

Obwohl die Fähigkeit zur Denitrifikation unter anoxischen Bodenbedingungen energetisch von großem Nutzen ist, finden sich nur den Spezies *Bradyrhizobium japonicum*, *Sinorhizobium meliloti* und *Azorhizobium caulinodans* unter der Ordnung *Rhizobiales*, die das vollständige Enzymbesteck der Denitrifikation besitzen (Davidson et al., 1993; Garcia-Plazaola et al., 1993; Holloway et al., 1996; Mesa et al., 2004). Auch neueste Studien konnten denitrifizierende Aktivitäten innerhalb der Gattung *Bradyrhizobium* nur für die Spezies *B. japonicum* feststellen (Fernández et al., 2008; Sameshima-Saito et al., 2004). Durch die Kopplung zwischen Denitrifikation und Stickstoff-Fixierung wird unter anoxischen Bedingungen überschüssiger Stickstoff (in Form von Nitrat), der sich hemmend auf die Stickstoff-Fixierung auswirken würde, über die Denitrifikation eliminiert (Mesa et al., 2004; O'Hara und Daniel, 1985). Ferner besitzt die Denitrifikation eine wichtige Entgiftungsfunktion für die Zellgifte NO₂ und NO. Diese können durch die vorhandene Stickstoffmonoxid-Synthase-Aktivität sowohl in der Wurzel als auch in den Knöllchen von *Lupinus* gebildet werden (Yamasaki und Sakihama, 2000).

Neben der vollständigen Denitrifikation zum molekularen Stickstoff zeigte sich bei manchen Stämmen von *Bradyrhizobium japonicum* eine verkürzte Denitrifikation, die mit der Produktion von N₂O abschließt (Sameshima-Saito et al., 2004). Diese Vielfalt der Denitrifikationsprozesse innerhalb einer Spezies spiegelt sich auch in den Isolaten der vorliegenden Arbeit wider. Während durch das Fehlen des *nosZ*-Gens sich für das Isolat 471 eine verkürzte Denitrifikation andeutete, wies die DNA des Isolates 467 hingegen alle Gene der Denitrifikation auf. Trotz unterschiedlicher Denitrifikationsgene wurden aber beide Isolate anhand der übereinstimmenden 16S rRNA-Sequenz von 98%, als eine *Bradyrhizobium* Spezies identifiziert. Ebenso wurden die Isolate 469 und 406 der Gattung *Bradyrhizobium* zugeordnet. Beide wiesen das komplette Enzymbesteck der Denitrifikation auf. Es ist jedoch zu beachten, dass die *nirK*-Sequenz des Isolates 469 nicht zu den *nirK*-Sequenzen des *nirK*-Clusters I, sondern in Cluster V gruppierte (siehe Abb.5). Innerhalb des

VI. Diskussion

nirK-Stammbaumes zeichnete sich daher eine Differenzierung zwischen den einzelnen Arten der Gattung *Bradyrhizobium* ab.

Die Sequenzübereinstimmung der 16S rRNA-Gen-Sequenzen innerhalb der Gattung *Bradyrhizobium* ist sehr hoch. Zur Differenzierung der Spezies wird deshalb neben dem 16S rRNA-Gen auch die Sequenzierung der „internal transcribed spacer“ Region genutzt. Diese Region erhöht die Abgrenzung der *Bradyrhizobium* Spezies voneinander (van Berkum und Fuhrmann, 2000). Die hohe Sequenzübereinstimmung zu verschiedenen Spezies der Gattung *Bradyrhizobium* bestätigte sich im Falle der Isolate 469, 467 und 471. Mit Ausnahme des Isolates 469 zeigten keine Isolate der vorliegenden Arbeit eine phylogenetische Nähe zur bisher einzigen denitrifizierenden Spezies *B.japonicum*. Das lässt die Vermutung zu, dass neben *B. japonicum* auch andere Spezies in der Lage sind zu denitrifizieren. Eine abschließende Aussage kann aber nur auf Gattungsebene getroffen werden, da von einigen nächsten verwandten Stämmen der *Bradyrhizobium* keine Speziesbeschreibung vorliegt, sodass es sich auch um Subspezies von *B.japonicum* handeln könnte.

5.2.2 Vergleich der kultivierten Isolate der *nirK*-Cluster I und V

Die Isolate 471, 406, 467 und 469 wurden anhand der übereinstimmenden 16S rRNA-Sequenz der Gattung *Bradyrhizobium* zugeordnet. Während die *nirK*-Sequenz des Isolates 469 zu der *nirK*-Sequenz von *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 in Cluster V gruppierte, fielen die *nirK*-Sequenzen der Isolate 406, 467 und 471 in das Cluster I. Dort zeigten sie eine Übereinstimmung von über 90% mit *nirK*-Umweltsequenzen, was Ausdruck großer phylogenetischer Nähe ist. Bisher enthielt das *nirK*-Cluster I nur die *nirK*-Sequenz eines Isolates als einzigen kultivierten Vertreter. Dieses Isolat wurde aus aquatischen Umweltproben (Chesapeake Bay, Maryland, USA) isoliert (Casciotti und Ward, 2001). Darüber hinaus wurden noch weitere Bakterien, deren DNA das *nirK*-Gen aufwies aus diesem küstennahem Habitat kultiviert. Anhand des 16S rRNA-Gens wurden diese als Vertreter der Gattung *Nitrosomonas* identifiziert (Casciotti und Ward, 2001; Voytek und Ward, 1995) und wiesen auf genomischer Ebene neben dem *nirK*- auch das *norB*-Gen auf. Während die funktionelle Ebene für diese *Nitrosomonas*-Stämme noch nicht bestimmt wurde, wiesen die Spezies *Nitrosomonas europae* sowohl die Gene *nir* und *nor* als auch eine N₂O-Produktion auf (Beaumont et al., 2002; Beaumont et al., 2004). Der Nachweis von Denitrifikationsgenen in nitrifizierenden *Nitrosomonas*-Stämmen war nicht erstaunlich, da bereits die Reduktion von Nitrat zu Nitrit, Ammonium oder Distickstoffoxid bei *Nitrobacter*

VI. Diskussion

Spezies und ebenso bei *Nitrosospira* Spezies beobachtet wurde (Bock et al., 1988; Shaw et al., 2006). Phylogenetische Analysen der *nirK*-Sequenzen der *Nitrosomonas*-Stämme von Casciotti et al. (2001) ergaben eine Übereinstimmung mit den *nirK*-Sequenzen des Stammbaumes von maximal 68%. Damit wiesen sie keine phylogenetische Nähe zu den *nirK*-Sequenzen des *nirK*-Stammbaumes auf (siehe Abb.5). Eine Ausnahme bildete die *nirK*-Sequenz des *Nitrosomonas*-Stammes TA-921i-NH4, die in das Cluster I gruppierte. Diese Sequenz war jedoch mit 80% Sequenzübereinstimmung nur sehr gering zu den anderen *nirK*-Sequenzen des Clusters I verwandt, wohingegen die meisten Sequenzen dieses Clusters untereinander eine Übereinstimmung von mehr als 90% zeigten. Die separate Stellung dieser *nirK*-Sequenz innerhalb des Clusters I wurde durch eine Vielzahl an Studien belegt (Avrahami et al., 2002; Bremer et al., 2007; Priemé et al., 2002; Wolsing und Priemé, 2004; Zhang et al., 2006). Da Cluster I von *nirK*-Sequenzen aus Böden dominiert wird, entsprach die entfernte phylogenetische Stellung der *nirK*-Sequenz von *Nitrosomonas* TA-921i-NH4 aus dem marinen Habitat den Erwartungen. Im Vergleich zu *Nitrosomonas* TA-921i-NH4 zeigten die *nirK*-Sequenzen der kultivierten Denitrifikanten 471, 406 und 467 eine größere phylogenetische Nähe zu den *nirK*-Umweltsequenzen innerhalb des Clusters I. Da die Isolate 471, 406 und 467 aus Bodenproben stammen, sind taxonomische und physiologische Schlüsse von ihnen bezüglich der unkultivierten Denitrifikanten des Cluster I eher möglich als von dem Stamm TA-921i-NH4. Der Unterschied zwischen *Nitrosomonas* TA-921i-NH4 und den Isolaten 406, 467 und 471 zeichnet sich auch anhand ihrer 16S rRNA-Gen-Phylogenie ab. So gehören die neuen Isolate 471, 406 und 467 alle zu den α -*Proteobacteria*, während *Nitrosomonas* TA-921i-NH4 zu den β -*Proteobacteria* zählt. Die separate phylogenetische Stellung des *Nitrosomonas* TA-921i-NH4 und die große phylogenetische Nähe der unterschiedlichen *nirK*-Sequenzen der Isolate 406, 467 und 471 der Gattung *Bradyrhizobium* zu den Umweltsequenzen des *nirK*-Clusters I deuten darauf hin, dass die *nirK*-Sequenzen des Clusters I von *Bradyrhizobium* Spezies stammen könnten. Obwohl das *nirK*-Genfragment im Gesamtbaum phylogenetisch sehr divers ist, weisen die *nirK*-Sequenzen des Clusters I eine große phylogenetische Nähe auf, was vermuten lässt, dass sie einer einzelnen Spezies entstammen.

5.2.3 Nächste phylogenetische Verwandte der Isolate im *nirK*-Cluster I

Wie zuvor festgestellt wurde, deuten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf eine phylogenetische Nähe der *nirK*-Cluster I Bakterien zu der Gattung *Bradyrhizobium* hin. Die größte phylogenetische Nähe weisen die *nirK*-Sequenzen der Isolate 406, 467 und 471 zu

VI. Diskussion

nirK-Klonsequenzen aus Bodenproben der Monokulturen *Plantago lanceolata* (Spitzwegerich) und *Holcus lanatus* (Wolliges Honiggras) auf (Bremer et al., 2007). Diese Nähe wird durch eine Sequenzübereinstimmung zwischen *nirK*-Sequenzen der Isolate und den *nirK*-Sequenzen der Klone von 98% und 99% unterstützt. Die Mehrzahl (86 von 109) der *nirK*-Klonsequenzen von Bremer et al (2007) gruppierten in das Cluster I. Die große Ähnlichkeit zwischen den *nirK*-Sequenzen der Isolate und den *nirK*-Sequenzen aus der Rhizosphäre von *Plantago lanceolata* und *Holcus lanatus* entspricht der Ähnlichkeit ihrer Habitate. Sowohl die *nirK*-Klonsequenzen der Monokultur als auch die Isolate stammen aus Wiesenbodenproben. Wie bereits von Bremer et al. (2007) festgestellt wurde, üben Wurzelexudate einen spezies-spezifischen Einfluss auf die mikrobielle Gemeinschaft von *nirK*-Denitrifikanten aus. Hierbei bestimmt vermutlich die Zusammensetzung der Exudate die Komposition der mikrobiellen Gemeinschaft (Orwin et al., 2006). Bremer et al. (2007) schlussfolgern, dass die nicht-leguminosen Pflanzen einen spezies-spezifischen Effekt auf die funktionelle Gruppe der *nirK*-Denitrifikanten ausüben. Die Zusammensetzung der kultivierten Isolate 471, 467 und 406 der Gattung *Bradyrhizobium* könnten also durch Wurzelexudate von nicht-leguminosen Pflanzen beeinflusst worden sein. Aufgrund der diversen geographischen Probenorte im Cluster I kann ferner vermutet werden, dass die Bakterien der Gattung *Bradyrhizobium* Generalisten sind, die in verschiedenen Böden freilebend oder in Symbiose vorkommt.

5.2.4 Vergleichende Phylogenie der *nir*-, *nor*- und *nos*-Gene der Isolate der *nirK*-Cluster I und V

Die Charakterisierung von Denitrifizierer-Gemeinschaften in Umweltproben erfolgt anhand phylogenetischer Analysen der *nir*-, *nor*- und *nos*-Gene. Diese Charakterisierungen lassen jedoch keine Schlussfolgerung über die evolutionäre Beziehung zwischen diesen Genen zu, da die Zusammenstellung der Denitrifikanten-Gemeinschaft nicht von jedem Denitrifikationsgen deckungsgleich widerspiegelt wird (Heylen et al., 2007). Dies kann zum einem durch die Primerwahl bedingt sein oder zum anderen durch das Auftreten einzelner Gene für die Reduktionsschritte der Denitrifikation. Anhand von Reinkulturen lassen sich hingegen evolutionäre Beziehungen zwischen funktionellen Genen analysieren, da hier der Bezug auf eine einzelne Spezies sichergestellt ist. Eine allgemeine Aussage über die evolutionäre Beziehung für alle kultivierten Denitrifikanten treffen zu wollen ist nicht möglich, da die Gene an verschiedenen Orten des Bakterien-Genoms lokalisiert sein können, zum Beispiel in einem Cluster auf dem Chromosom, verstreut über das gesamte

VI. Diskussion

Chromosom oder auf einem Plasmid. Damit unterliegen sie unterschiedlichen evolutionären Ereignissen.

Die gemeinsame Lokalisation der Denitrifikationsgene zeigt sich am Beispiel des Stammes *Sinorhizobium meliloti* 1021 der diese Gene auf dem Plasmid, pSymA trägt (Holloway et al., 1996) sowie am Beispiel der Spezies *Pseudomonas stutzeri*, wo sie in einem Cluster organisiert sind. In diesen Fällen könnte von einer gemeinsamen Evolution der Denitrifikationsgene ausgegangen werden (Zumft, 1997). Währenddessen sind die Denitrifikationsgene im Falle von *B.japonicum* über das gesamte Chromosom verteilt , wodurch unabhängige Evolutionsrichtungen der einzelnen Gene möglich werden (Mesa et al., 2004; Zumft, 2005).

VI. Diskussion

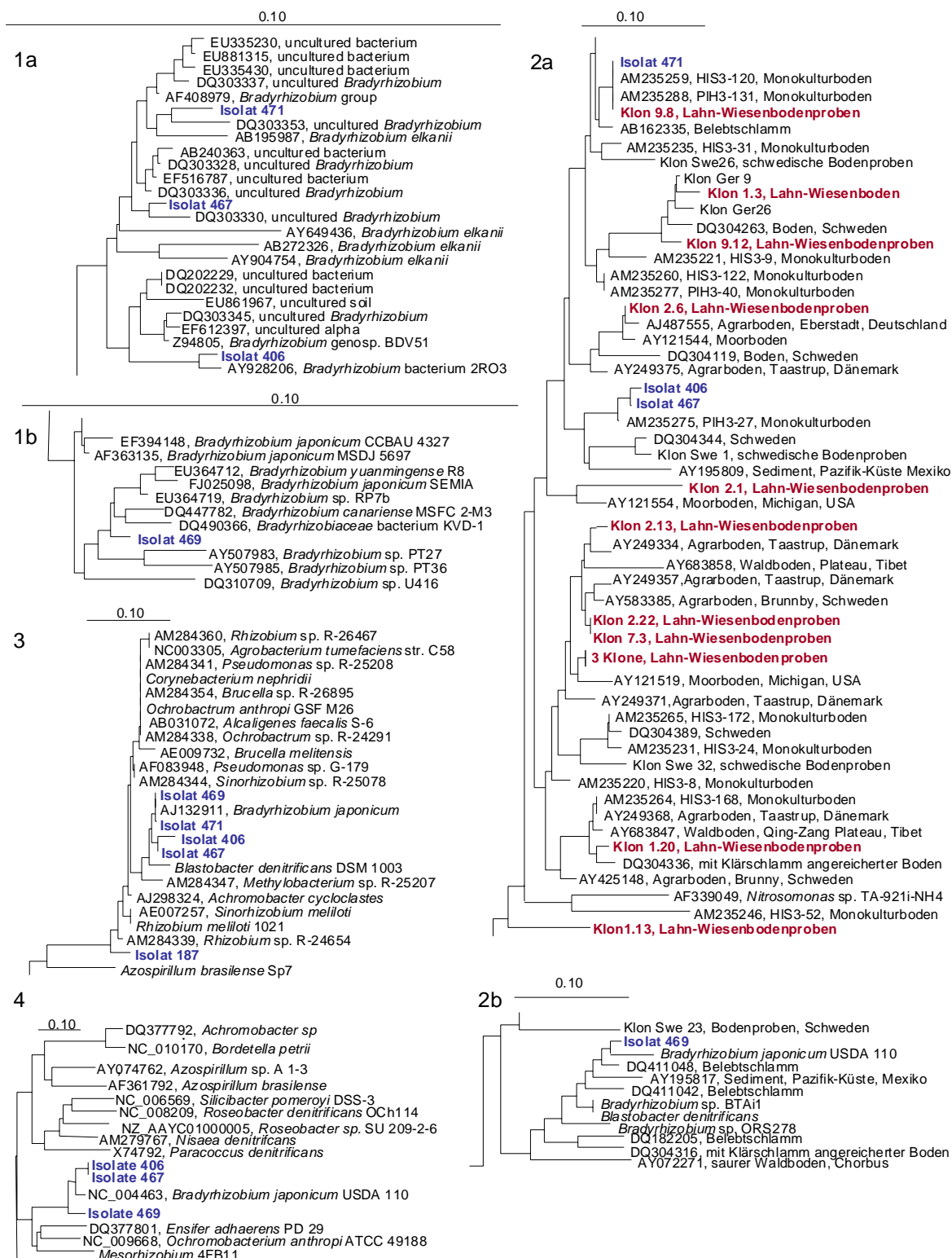


Abbildung 17: Auszüge der phylogenetischen Bäume; 1a und b: 16S rRNA-Gen-Stammbaum (siehe Abb. 6); 2a: Cluster I des *nirK*-Stammbaums; 2b: Cluster V des *nirK*-Stammbaums (siehe Abb. 5); 3: *nosZ*-Stammbaum (siehe Abb. 8); 4: *nosZ*-Stammbaum (siehe Abb. 9). Die Berechnung beruht auf der Neighbour-Joining Methode. Der Maßstab entspricht 10% Sequenzunterschied. Die Sequenzen der Isolate sind in blau und die der Klonbibliothek in rot markiert.

VI. Diskussion

Die *nirK*-, *norB*- und *nosZ*-Phylogenien des Isolates 469 aus dem *nirK*-Cluster V verhielten sich kongruent zueinander (siehe Abb. 17). Alle Phylogenien zeigten eine nahe Verwandtschaft zu den Sequenzen von *B.japonicum*. Zwar wurde das Isolat 469 anhand der 16S rRNA-Gen-Sequenzierung den Spezies *B.canariense* und *Bradyrhizobium* sp. RP7b zugeordnet, jedoch war eine Sequenzübereinstimmung von 98% ebenfalls für *B.japonicum* MSDJ5697 bestimmt worden. Das kongruente Bild der Phylogenien der funktionellen Gene *nirK*, *norB* und *nosZ* zeigte sich ebenfalls für die Isolate 406, 467 und 471 des *nirK*-Clusters I. Insbesondere die große phylogenetische Nähe der Isolate 406 und 467 im *nirK*-Cluster I (Sequenzübereinstimmung von 90%) spiegelte sich sowohl in der *norB*-Phylogenie (Sequenzübereinstimmung von 91%) als auch in der *nosZ*-Phylogenie (Sequenzübereinstimmung von 100%) wider.

Als phylogenetisch nächsten Verwandten dieser Isolate 406, 467 und 471 auf Basis der 16S rRNA-Gen-Phylogenie (siehe Tab. 19) wurden Spezies der Gattung *Bradyrhizobium* bestimmt, die bislang nicht als Denitrifikanten charakterisiert worden waren.

Der einzige kultivierte und denitrifizierende Vertreter dieser Gattung war *B. japonicum*. Die entfernte Verwandtschaft der Isolate 406, 467 und 471 zu *B. japonicum*, die anhand der 16S rRNA-Gen-Sequenz ermittelt worden war, zeigte sich ebenfalls auf Basis der *nirK*-Phylogenie (Sequenzübereinstimmung von 71% bis 79%), während die *norB*- (88% bis 100% Sequenzübereinstimmung) und *nosZ*-Gene (94% Sequenzübereinstimmung) eine größere phylogenetische Nähe zeigten. Daraus könnte die Schlussfolgerung gezogen werden, dass das *nirK*-Gen ein differenzierteres Bild der phylogenetischen Beziehung widerspiegelt, als das *norB*-Gen oder *nosZ*-Gen. Obwohl der Verwandtschaftsgrad nicht identisch ist, ist dieselbe phylogenetische Einordnung der vorliegenden Isolate erkennbar (siehe Abb. 17). Diese kongruente Phylogenie könnte auf ein gemeinsames Denitrifikationscluster hindeuten, in dem die Denitrifikationsgene dieser Isolate organisiert sind.

Im Gegensatz zu den kongruenten Phylogenien der Cluster I Isolate, zeigten viele vergleichende Studien von Isolaten eine Diskrepanz zwischen den Phylogenien funktioneller Gene und der 16S rRNA-Gen-Phylogenie (Dandie et al., 2007a; Delorme et al., 2003; Goregues et al., 2005; Gregory et al., 2003). Diese Studien bezogen sich jedoch entweder nicht auf das *nirK*-Gen oder auf andere phylogenetische Cluster des *nirK*-Baumes. Die Diskrepanz zeigt sich vor allem im *nirK*-Cluster VII, wo sowohl *nirK*-Sequenzen von α -*Proteobacteria* (*Agrobacterium tumefaciens*, *Rhizobium* spp.) gruppierten als auch β -*Proteobacteria* (*Diaphorobacter* sp.) und *Bacilli* (*Bacillus* sp.R-31856). Das *nirK*-Cluster I

VI. Diskussion

war bislang nur im Falle des Isolates *Nitrosomonas* TA-921i-NH₄ Gegenstand phylogenetischer Vergleiche gewesen. Hierbei wurde ebenfalls eine Kongruenz zwischen der *nirK*- und 16S rRNA-Gen-Phylogenie nachgewiesen (Casciotti und Ward, 2001; Heylen et al., 2006a). Es ist aber zu beachten, dass der Stamm TA-921i-NH₄, zu den β -*Proteobacteria* gehört, während die *nirK*-enthaltenden Isolate in diesem Cluster zur Klasse der α -*Proteobacteria* zu zuordnen sind. Allerdings zeigt sich anhand der entfernten Verwandtschaft der *nirK*-Sequenzen der Isolate zu der des *Nitrosomonas*-Stamm mit einer Sequenzübereinstimmung von 80%, eine Abgrenzung der Klassen auf *nirK*-Ebene. Möglicherweise handelt es sich also bei den *nirK*-Sequenzen des Clusters I, deren Sequenzen über 90% mit denen der Isolate dieser Arbeit übereinstimmen, um ein *Bradyrhizobium* spezifisches Subcluster, wie es bereits für die Familie *Rhizobiaceae* berichtet wurde (Heylen et al., 2006a). Bisher waren phylogenetische Aussagen über die Isolate des *nirK*-Clusters I nicht möglich, da keine eng verwandten Isolate zu den Umweltsequenzen vorlagen.

5.2.5 Phylogenie und Wachstumsverhalten der Isolate der *nirK*-Cluster I und V

Wie in den vorangegangenen Kapiteln bereits beschrieben, wurden die Isolate der *nirK*-Cluster I und V als Vertreter der Gattung *Bradyrhizobium* identifiziert. Bakterien der Gattung *Bradyrhizobium* liegen sowohl in Symbiose als auch freilebend vor und werden in sechs Spezies unterteilt: *B. japonicum*, *B. elkanii*, *B. yuanmingense*, *B. betae*, *B. canariense*, *B. liaoningense*, und *B. denitrificans* (Jordan, 1982; Kuykendall et al., 1992; Rivas et al., 2004; van Berkum et al., 2006; Vinuesa et al., 2005; Xu et al., 1995; Yao et al., 2002). Weiterhin zeichnen sich Bakterien der Gattung *Bradyrhizobium*, im Vergleich zur Gattung *Mesorhizobium* durch ihr langsames Wachstumsverhalten aus (Fernández et al., 2008; Kuykendall, 2005; Monza et al., 2006). Dies bestätigt sich anhand der Daten dieser Arbeit, in denen die Isolate der Gattung *Bradyrhizobium* des *nirK*-Clusters I die maximalen Wachstumsdichten unter anoxischen Bedingungen mit Nitrat als Elektronenakzeptor nach maximal 14 Tagen und unter oxischen Bedingungen nach maximal drei Tagen erreichten. Die Spezies der Gattung *Bradyrhizobium* werden als Gram-negative, pleomorphe Stäbchen mit einer Zelllänge von 1,2 μm bis 3,0 μm beschrieben und gelten als mobil. Sie wachsen optimal bei einer Temperatur von 25°C bis 30°C und einem pH-Wert zwischen 6 bis 7 (Kuykendall, 2005). Auch diese Isolate der vorliegenden Arbeit wiesen eine durchschnittliche Zelllänge von 2,3 μm bis 2,5 μm auf, hatten eine optimale

VI. Diskussion

Wachstumstemperatur von 25°C und konnten als fakultative Anaerobier charakterisiert werden.

Innerhalb der Isolate der Gattung *Bradyrhizobium* zeigten sich unterschiedliche Präferenzen der Medien. Während die Isolate 471 und 467, die derselben *Bradyrhizobium* Spezies zugeordnet wurden, R2A-Medium bevorzugten, präferierten die Isolate unterschiedlicher *Bradyrhizobium* Spezies 406 und 469, das YEM-Medium. Die Bevorzugung von unterschiedlichen Medien, spiegelt sich in der Phylogenie der Isolate wider. Zusammenfassend ist festzustellen, dass die in der Literatur angegebenen Charakteristika sich in den vorliegenden Isolaten wiederfinden lassen.

6. Aktivitätsmessungen anhand des Umsatzes von NO_3^- zu N_2O

Die Aktivität der Denitrifikanten wurde anhand des Umsatzes von NO_3^- zu N_2O gemessen. Frühere Studien nahmen die Abnahme an Nitrat und Nitrit als Maß der Denitrifikation, doch konnte dadurch keine Unterscheidung zwischen Denitrifikation und Nitrat-Atmung getroffen werden (Betlach, 1982). Um Denitrifikation als anaeroben Atmungsprozess begründen zu können, müssen nach Mahne und Tiedje (1995) zwei Kriterien erfüllt werden: Zum einen soll mindestens 80% des eingesetzten NO_3^- oder NO_2^- zu N_2O und N_2 umgesetzt werden, zum anderen soll dieser Umsatz mit einem Anstieg des Wachstums korreliert sein. Für *Propionibakterium* sp. und *Fusarium oxysporum* konnten Umsätze des NO_3^- zu N_2O von 100% bestimmt werden (Kaspar, 1982; Shoun und Tanimoto, 1991). In diesem Sinne wurde Denitrifikation für eine Vielzahl an Bakterien nachgewiesen (Mahne und Tiedje, 1995) unter anderem für *B. japonicum*. Nach den Kriterien von Mahne und Tiedje (1995) konnten nur bei den Isolaten 467 und 187 die Denitrifikation als anaerober Atmungsprozess nachgewiesen werden, da deren Umsetzungsraten über 80% lagen und Zellwachstum zu verzeichnen war. Die Isolate 469 und 471 zeigten während des Umsatzes zu N_2O (% Umsatz) auch ein ansteigendes Zellwachstum, was auf Energieumsetzung und den Aufbau von Biomasse durch die Denitrifikation schließen lässt. Vermutlich handelt es sich bei den Isolaten 469 und 471 trotz geringerer Umsetzungsraten um denitrifizierende fakultativ anaerobe Bakterien. Eine Erklärung für diese geringen Umsatzraten könnte auf kleinste Mengen an verbliebenden Sauerstoff in den Kulturansätzen zurückgehen, der unter Acteylen eine Reaktion mit NO eingehen kann und somit der Reduktion zu N_2O nicht mehr zur Verfügung steht (Bollmann und Conrad, 1997).

Es ist anzumerken, dass sich die von Mahne und Tiedje (1995) aufgestellten Kriterien auf hoch wachsende Denitrifikanten bezogen und somit Denitrifikanten mit geringem

VI. Diskussion

Wachstum nicht miteinbezieht. Neben den Isolaten zeigten ebenfalls *B. japonicum* und *Mesorhizobium* 4FB11 sowohl Zellwachstum als auch N₂O-Produktion (% Umsatz). Die Umsetzungen über 100%, die sowohl in Messungen von Mahne und Tiedje (1995) als auch bei Schwarz (2002) auftraten, könnten auf Messungenauigkeiten zurückgehen

7. Schlussfolgerung und Ausblick

Durch die in der vorliegenden Arbeit angewendete Kultivierungsmethode wurden *nirK*-enthaltende Isolate kultiviert. Diese Kultivierungsmethode war nicht spezifisch auf Denitrifikanten ausgerichtet, sondern verfolgte eine unspezifische Kultivierungsstrategie. Die *nirK*-Sequenzen der Isolate gruppieren die phylogenetischen *nirK*-Cluster I, IIa, V und VII. Anhand der isolierten Kulturen sind erste Charakterisierungen des *nirK*-Clusters I möglich, welches durch *nirK*-Sequenzen unkultivierter Organismen dominiert ist. Phylogenetische Analysen identifizierten die *nirK*-enthaltenden Denitrifikanten des Clusters I als Vertreter der Gattung *Bradyrhizobium*. Aufgrund der großen phylogenetischen Nähe zwischen den *nirK*-Sequenzen der Isolate und den *nirK*-Umweltsequenzen des Clusters lässt sich die Vermutung eines *Bradyrhizobium*-spezifischen Subclusters innerhalb des Clusters I aufstellen. Die Isolate der Gattung *Bradyrhizobium* als auch der Gattung *Bosea*, dessen *nirK*-Sequenz in das Cluster VII gruppierte, wiesen auf genomischer Ebene alle Gene der Denitrifikation (*nar/nap*, *nir* und *nor*) zu N₂O auf. Dies bestätigte sich ebenso auf funktioneller Ebene aufgrund messbarer Umsetzung von NO₃⁻ zu N₂O. Im Vergleich der Phylogenien der funktionellen Gene *nirK*, *norB* und *nosZ* stellte die *nirK*-Phylogenie das differenzierteste Abbild der denitrifizierenden Gemeinschaft dar. Für die Isolate 373 und 484 der Gattung *Mesorhizobium* konnten zwar auf genomischer Ebene die Gene *nar*, *nir* und *nor* nachgewiesen werden, jedoch war kein Wachstum unter anoxischen Bedingungen mit NO₃⁻ als Elektronenakzeptor messbar und somit auch keine Aktivität der Enzyme nachweisbar. Bisherige Kultivierungsstudien konnten *nirK*-enthaltende, denitrifizierende *Mesorhizobium*-Stämme zwar nachweisen, jedoch standen diese nicht in direkter phylogenetischer Nähe zu den in der vorliegenden Arbeit kultivierten Isolaten der Gattung *Mesorhizobium*. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass es sich bei den isolierten Vertretern der Gattung *Mesorhizobium*, um eine andere Spezies handelt.

Das Isolat 205 der Gattung *Devosia* wies als einziges Gen der Denitrifikation *nirK* auf. Da die anderen Denitrifikationsgene *nar/nap*, *nor* und *nos* nicht gefunden wurden und auch keine Umsetzung zu N₂O nachgewiesen wurde, ist eine Denitrifikation unwahrscheinlich. Das deutet auf die Funktionslosigkeit des vorhandenen *nirK*-Gens und möglicherweise auf

VI. Diskussion

dessen Erwerb durch horizontalen Gentransfer hin. Änderungen der Kultivierungsbedingungen, z.B. des Mediums könnten vermutlich zu einem Wachstum in Flüssigmedium führen.

Anhand der vorliegenden Isolate ist es nun möglich, das Gesamt-Genom dieser Isolate zu sequenzieren, um damit Aussagen über die Lokalisation der Denitrifikationsgene treffen zu können. Dieses Vorgehen könnte weitere Hinweise über die *nirK*-Gene des Cluster I geben. Neben *nirK*-Cluster I werden die Cluster IIb, III und VI ebenso von bisher unkultivierten Bakterien dominiert. Wie sich anhand der Ergebnisse zeigte, wurde der Großteil der Isolate nach einer Inkubationszeit von vier Wochen nachgewiesen. Die maximale Kolonieentwicklung liegt nach Janssen et al. (2002) bei einer Inkubationsdauer von zehn Wochen. Die in dieser Arbeit angewandten Kultivierungsbedingungen könnten mit einer Verlängerung der Inkubationszeit von vier auf zehn Wochen zu *nirK*-enthaltenden Bakterien der *nirK*-Cluster IIb, III und VI führen. Eine andere Kultivierungsvariation zur Isolierung dieser Cluster könnte die kürzlich entwickelte Verwendung von Boden-Substrat-Membran-Systemen sein, die Kultivierung von bisher unkultivierten, langsam-wachsenden Bakterien aus Bodenproben möglich machen soll (Ferrari und Gillings, 2009). Durch die große Relevanz der Denitrifikanten im Ökosystem Boden, sind weitere Erkenntnisse über die denitrifizierende Gemeinschaft anhand von Isolaten von größter Wichtigkeit.

V. Referenzen

Amann,R.I., Ludwig,W., and Schleifer,K.H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59: 143-169.

Angle,J.S., Mcgrath,S.P., and Chaney,R.L. (1991) New culture-medium containing ionic concentrations of nutrients similar to concentrations found in the soil solution. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3674-3676.

Avrahami,S., Conrad,R., and Braker,G. (2002) Effect of soil ammonium concentration on N₂O release and on the community structure of ammonia oxidizers and denitrifiers. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5685-5692.

Basaglia,M., Toffanin,A., Baldan,E., Bottegal,M., Shapleigh,J.P., and Casella,S. (2007) Selenite-reducing capacity of the copper-containing nitrite reductase of *Rhizobium sultae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 269: 124-130.

Beaumont,H.J.E., Hommes,N.G., Sayavedra-Soto,L.A., Arp,D.J., Arciero,D.M., Hooper,A.B. et al. (2002) Nitrite reductase of *Nitrosomonas europaea* is not essential for production of gaseous nitrogen oxides and confers tolerance to nitrite. *J. Bacteriol.* 184: 2557-2560.

Beaumont,H.J.E., van Schooten,B., Lens,S.I., Westerhoff,H.V., and Van Spanning,R.J.M. (2004) *Nitrosomonas europaea* expresses a nitric oxide reductase during nitrification. *J. Bacteriol.* 186: 4417-4421.

Bedzyk,L., Wang,T., and Ye,R.W. (1999) The periplasmic nitrate reductase in *Pseudomonas* sp. strain G-179 catalyzes the first step of denitrification. *J. Bacteriol.* 181: 2802-2806.

Benhizia,Y., Benhizia,H., Benguedouar,A., Muresu,R., Giacomini,A., and Squartini,A. (2004) Gamma proteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. *System. Appl. Microbiol.* 27: 462-468.

Betlach,M.R. (1982) Evolution of bacterial denitrification and denitrifier diversity. A. van Leeuw. *J. Microb.* 48: 585-607.

Bock,E., Wilderer,P.A., and Freitag,A. (1988) Growth of *Nitrobacter* in the absence of dissolved oxygen. *Water Res.* 22: 245-250.

Bollmann,A. and Conrad,R. (1997) Acetylene blockage technique leads to underestimation of denitrification rates in oxic soils due to scavenging of intermediate nitric oxide. *Soil Biol. Biochem.* 29: 1067-1077.

Bothe, H, Fergususon, S. J., and Newton, W. E. (2007) *Biology of the nitrogen cycle.* Amsterdam: Elsevier Academic Press. 427.

Boulanger,M.J. and Murphy,M.E.P. (2002) Crystal structure of the soluble domain of the major anaerobically induced outer membrane protein (AniA) from pathogenic *Neisseria*: A new class of copper-containing nitrite reductases. *J. Mol. Biol.* 315: 1111-1127.

V. Referenzen

- Braker,G. and Tiedje,J.M.** (2003) Nitric oxide reductase (*norB*) genes from pure cultures and environmental samples. Appl. Environ. Microbiol. 69: 3476-3483.
- Braker,G., Fesefeldt,A., and Witzel,K.P.** (1998) Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. Appl. Environ. Microbiol. 64: 3769-3775.
- Braker,G., Zhou,J.Z., Wu,L.Y., Devol,A.H., and Tiedje,J.M.** (2000) Nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in Pacific northwest marine sediment communities. Appl. Environ. Microbiol. 66: 2096-2104.
- Bremer,C., Braker,G., Matthies,D., Reuter,A., Engels,C., and Conrad,R.** (2007) Impact of plant functional group, plant species, and sampling time on the composition of *nirK*-type denitrifier communities in soil. Appl. Environ. Microbiol. 73: 6876-6884.
- Brettar,I., Moore,E.R.B., and Hofle,M.G.** (2001) Phylogeny and abundance of novel denitrifying bacteria isolated from the water column of the central Baltic Sea. Microb. Ecol. 42: 295-305.
- Brodie,E., Edwards,S., and Clipson,N.** (2002) Bacterial community dynamics across a floristic gradient in a temperate upland grassland ecosystem. Microb. Ecol. 44: 260-270.
- Bruns,A., Hoffelner,H., and Overmann,J.** (2003) A novel approach for high throughput cultivation assays and the isolation of planktonic bacteria. FEMS Microbiol. Ecol. 45: 161-171.
- Button,D.K., Schut,F., Quang,P., Martin,R., and Robertson,B.R.** (1993) Viability and isolation of marine Bacteria by dilution culture - theory, procedures, and initial results. Appl. Environ. Microbiol. 59: 881-891.
- Casciotti,K.L. and Ward,B.B.** (2001) Dissimilatory nitrite reductase genes from autotrophic ammonia-oxidizing bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 67: 2213-2221.
- Cathrine,S.J. and Raghukumar,C.** (2009) Anaerobic denitrification in fungi from the coastal marine sediments off Goa, India. Mycological Research 113: 100-109.
- Cavigelli,M.A. and Robertson,G.P.** (2001) Role of denitrifier diversity in rates of nitrous oxide consumption in a terrestrial ecosystem. Soil Biol. Biochem. 33: 297-310.
- Chen,W.M., Laevens,S., Lee,T.M., Coenye,T., De Vos,P., Mergeay,M., and Vandamme,P.** (2001) *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. Int. J. Syst. Evol. Micr. 51: 1729-1735.
- Chenèby,D., Philippot,L., Hartmann,A., Henault,C., and Germon,J.C.** (2000) 16S rDNA analysis for characterization of denitrifying bacteria isolated from three agricultural soils. FEMS Microbiol. Ecol. 34: 121-128.
- Chin,K.J., Liesack,W., and Janssen,P.H.** (2001) *Opitutus terrae* gen. nov. sp. nov. to accommodate novel strains of the division 'Verrucomicrobia' isolated from rice paddy soil. Int. J. Syst. Evol. Micr. 51: 1965-1968.

V. Referenzen

- Codispoti, L.A. and Christensen, J.P.** (1985) Nitrification, denitrification and nitrous oxide cycling in the eastern tropical South Pacific ocean. *Mar. Chem.* 16: 277-300.
- Connon, S.A. and Giovannoni, S.J.** (2002) High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3878-3885.
- Coyne, M.S., Arunakumari, A., Averill, B.A., and Tiedje, J.M.** (1989) Immunological identification and distribution of dissimilatory heme *cd*₁ and nonheme copper nitrite reductases in denitrifying Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 2924-2931.
- Crutzen, P.J.** (1970) Influence of nitrogen oxides on atmospheric ozone content. *Q. J. Roy. Meteor. Soc.* 96: 320.
- Dandie, C.E., Burton, D.L., Zebarth, B.J., Trevors, J.T., and Goyer, C.** (2007a) Analysis of denitrification genes and comparison of *nosZ*, *cnorB* and 16S rDNA from culturable denitrifying bacteria in potato cropping systems. *System. Appl. Microbiol.* 30: 128-138.
- Dandie, C.E., Miller, M.N., Burton, D.L., Zebarth, B.J., Trevors, J.T., and Goyer, C.** (2007b) Nitric oxide reductase-targeted real-time PCR quantification of denitrifier populations in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 4250-4258.
- Das, S.K., Mishra, A.K., Tindall, B.J., Rainey, F.A., and Stackebrandt, E.** (1996) Oxidation of thiosulfate by a new bacterium, *Bosea thiooxidans* (strain BI-42) gen nov, sp nov. Analysis of phylogeny based on chemotaxonomy and 16S ribosomal DNA sequencing. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46: 981-987.
- Davidson, E.A., Matson, P.A., Vitousek, P.M., Riley, R., Dunkin, K., García-Méndez, G., and Maass, J.M.** (1993) Processes regulating soil emissions of NO and N₂O in a seasonally dry tropical forest. *Ecology* 74: 130-139.
- Delorme, S., Philippot, L., Edel-Hermann, V., Deulvot, C., Mougel, C., and Lemanceau, P.** (2003) Comparative genetic diversity of the *narG*, *nosZ*, and 16S rRNA genes in fluorescent pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1004-1012.
- Dickinson, R.E. and Cicerone, R.J.** (1986) Future global warming from atmospheric trace gases. *Nature* 319: 109-115.
- Donachie, S.P., Foster, J.S., and Brown, M.V.** (2007) Culture clash: challenging the dogma of microbial diversity. *Isme J.* 1: 97-99.
- Falkowski, P.G., Fenchel, T., and DeLong, E.F.** (2008) The microbial engines that drive earth's biogeochemical cycles. *Science* 320: 1034-1039.
- Feinberg, A.P. and Vogelstein, B.** (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132: 6-13.
- Fernández, L.A., Perotti, E.B., Sagardoy, M.A., and Gómez, M.A.** (2008) Denitrification activity of *Bradyrhizobium* sp. isolated from Argentine soybean cultivated soils. *World J. Microb. Biot.* 24: 2577-2585.

V. Referenzen

- Ferrari,B.C. and Gillings,M.** (2009) Cultivating fastidious bacteria: Viability staining and micromanipulation from soil substrate membrane system. *Appl. Environ. Microbiol.* doi: 10.1128/AEM.02407-08.
- Flanagan,D.A., Gregory,L.G., Carter,J.P., Karakas-Sen,A., Richardson,D.J., and Spiro,S.** (1999) Detection of genes for periplasmic nitrate reductase in nitrate respiring bacteria and in community DNA. *FEMS Microbiol. Lett.* 177: 263-270.
- Fries,M.R., Zhou,J.H., Cheesanford,J., and Tiedje,J.M.** (1994) Isolation, characterization, and distribution of denitrifying toluene degraders from a variety of habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2802-2810.
- Gamble,T.N., Betlach,M.R., and Tiedje,J.M.** (1977) Numerically dominant denitrifying bacteria from world soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 926-939.
- Garcia-Plazaola,J.I., Becerril,J.M., Arreseigor,C., Hernandez,A., Gonzalezmurua,C., and Apariciotejo,P.M.** (1993) Denitrifying ability of 13 *Rhizobium meliloti* strains. *Plant Soil* 149: 43-50.
- Gich,F., Schubert,K., Bruns,A., Hoffelner,H., and Overmann,J.** (2005) Specific detection, isolation, and characterization of selected, previously uncultured members of the freshwater bacterioplankton community. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 5908-5919.
- Giovannoni,S. and Stingl,U.** (2007) The importance of culturing bacterioplankton in the 'omics' age. *Nat. Rev. Microbiol.* 5: 820-826.
- Giovannoni,S.J., DeLong,E.F., Olsen,G.J., and Pace,N.R.** (1988) Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial-cells. *J. Bacteriol.* 170: 720-726.
- Goregues,C.M., Michotey,V.D., and Bonin,P.C.** (2005) Molecular, biochemical, and physiological approaches for understanding the ecology of denitrification. *Microb. Ecol.* 49: 198-208.
- Gregory,L.G., Bond,P.L., Richardson,D.J., and Spiro,S.** (2003) Characterization of a nitrate respiring bacterial community using the nitrate reductase gene (*narG*) as a functional marker. *Microbiology* 149: 229-237.
- Griffin,B.M., Schott,J., and Schink,B.** (2007) Nitrite, an electron donor for anoxygenic photosynthesis. *Science* 316: 1870.
- Grosser,R.J., Friedrich,M., Ward,D.M., and Inskeep,W.P.** (2000) Effect of model sorptive phases on phenanthrene biodegradation: Different enrichment conditions influence bioavailability and selection of phenanthrene-degrading isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2695-2702.
- Hallin, S., Braker, G, and Philippot, L.**(2007) Molecular tools to assess the diversity and density of denitrifying bacteria in their habitats. In *Molecular biology, biochemistry, ecology, and applied aspects of the nitrogen cycle*Bothe, H., Ferguson, Stuart J., and Newton, W. E. 313-330. Elsevier.
- Hallin,S. and Lindgren,P.E.** (1999) PCR detection of genes encoding nitrite reductase in denitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1652-1657.

V. Referenzen

- Hashimoto,T., Whang,K.S., and Nagaoka,K.** (2006) A quantitative evaluation and phylogenetic characterization of oligotrophic denitrifying bacteria harbored in subsurface upland soil using improved culturability. *Biol. Fert. Soil* 42: 179-185.
- Haveman,S.A., Swanson,E.W.A., Voordouw,G., and Al,T.A.** (2005) Microbial populations of the river-recharged Fredericton aquifer. *Geomicrobiol. J.* 22: 311-324.
- Henry,S., Baudoin,E., López-Gutiérrez,J.C., Martin-Laurent,F., Baumann,A., and Philippot,L.** (2004) Quantification of denitrifying bacteria in soils by *nirK* gene targeted real-time PCR. *J. Microbiol. Meth.* 59: 327-335.
- Henry,S., Texier,S., Hallet,S., Bru,D., Dambreville,C., Chèneby,D. et al.** (2008) Disentangling the rhizosphere effect on nitrate reducers and denitrifiers: Insight into the role of root exudates. *Environ. Microbiol.* 10: 3082-3092.
- Heylen,K., Gevers,D., Vanparys,B., Wittebolle,L., Geets,J., Boon,N., and De Vos,P.** (2006a) The incidence of *nirS* and *nirK* and their genetic heterogeneity in cultivated denitrifiers. *Environ. Microbiol.* 8: 2012-2021.
- Heylen,K., Vanparys,B., Gevers,D., Wittebolle,L., Boon,N., and De Vos,P.** (2007) Nitric oxide reductase (*norB*) gene sequence analysis reveals discrepancies with nitrite reductase (*nir*) gene phylogeny in cultivated denitrifiers. *Environ. Microbiol.* 9: 1072-1077.
- Heylen,K., Vanparys,B., Wittebolle,L., Verstraete,W., Boon,N., and De Vos,P.** (2006b) Cultivation of denitrifying bacteria: optimization of isolation conditions and diversity study. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 2637-2643.
- Holloway,P., McCormick,W., Watson,R.J., and Chan,Y.K.** (1996) Identification and analysis of the dissimilatory nitrous oxide reduction genes, *nosRZDFY*, of *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 178: 1505-1514.
- Jaftha,J.B., Strijdom,B.W., and Steyn,P.L.** (2002) Characterization of pigmented methylotrophic bacteria which nodulate *Lotononis bainesii*. *System. Appl. Microbiol.* 25: 440-449.
- Jannasch,H.W.** (1967) Enrichments of aquatic Bacteria in continuous culture. *Archiv für Mikrobiologie* 59: 165-173.
- Janssen,P.H., Yates,P.S., Grinton,B.E., Taylor,P.M., and Sait,M.** (2002) Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, and *Verrucomicrobia*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2391-2396.
- Jones,C.M., Stres,B., Rosenquist,M., and Hallin,S.** (2008) Phylogenetic analysis of nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide respiratory enzymes reveal a complex evolutionary history for denitrification. *Mol. Biol. Evol.* 25: 1955-1966.
- Jordan,D.C.** (1982) Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule Bacteria from Leguminous plants. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32: 136-139.
- Kaeberlein,T., Lewis,K., and Epstein,S.S.** (2002) Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science* 296: 1127-1129.

V. Referenzen

- Kaneko,T., Nakamura,Y., Sato,S., Asamizu,E., Kato,T., Sasamoto,S. et al.** (2000) Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *Dna Res.* 7: 331-338.
- Kaspar,H.F.** (1982) Nitrite reduction to nitrous oxide by *Propionibacteria*: detoxication mechanism. *Arch. Microbiol.* 133: 126-130.
- Keller,M. and Zengler,K.** (2004) Tapping into microbial diversity. *Nat. Rev. Microbiol.* 2: 141-150.
- Kim,J.K., Lee,B.K., Kim,S.H., and Moon,J.H.** (1999) Characterization of denitrifying photosynthetic bacteria isolated from photosynthetic sludge. *Aquacult. Eng.* 19: 179-193.
- Kloos,K., Mergel,A., Rosch,C., and Bothe,H.** (2001) Denitrification within the genus *Azospirillum* and other associative bacteria. *Austral. J. Plant Physiol.* 28: 991-998.
- Könneke,M., Bernhard,A.E., de la Torre,J.R., Walker,C.B., Waterbury,J.B., and Stahl,D.A.** (2005) Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* 437: 543-546.
- Kowalchuk,G.A., Buma,D.S., de Boer,W., Klinkhamer,P.G.L., and van Veen,J.A.** (2002) Effects of above-ground plant species composition and diversity on the diversity of soil-borne microorganisms. *A. van Leeuw. J. Microb.* 81: 509-520.
- Kuykendall, L. D.**(2005) Family VII. *Bradyrhizobiaceae* fam. nov. Genus I. *Bradyrhizobium* Jordan 1982, 137^{VP}. In Bergeys Manual of Systematic Bacteriology Vol Two Part CGarrity, George M. 438-442. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- Kuykendall,L.D., Saxena,B., Devine,T.E., and Udell,S.E.** (1992) Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. *Can. J. Microbiol.* 38: 501-505.
- La Scola,B., Mallet,M.N., Grimont,P.A.D., and Raoult,D.** (2003) *Bosea eneeae* sp. nov., *Bosea massiliensis* sp. nov. and *Bosea vestrisii* sp. nov., isolated from hospital water supplies, and emendation of the genus *Bosea* (Das et al. 1996). *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 53: 15-20.
- Lam,P., Jensen,M.M., Lavik,G., McGinnis,D.F., Müller,B., Schubert,C.J. et al.** (2007) Linking crenarchaeal and bacterial nitrification to anammox in the Black Sea. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 7104-7109.
- Libby,E. and Averill,B.A.** (1992) Evidence that the type 2 copper centers are the site of nitrite reduction by *Achromobacter-Cycloclastes* nitrite reductase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187: 1529-1535.
- Lliros,M., Casamayor,E.O., and Borrego,C.** (2008) High archaeal richness in the water column of a freshwater sulfurous karstic lake along an interannual study. *FEMS Microbiol. Ecol.* 66: 331-342.
- Ludwig,W., Strunk,O., Westram,R., Richter,L., Meier,H., Yadhu,K. et al.** (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res.* 32: 1363-1371.

V. Referenzen

- Madigan, M. T., Martinkon, J. M., and Parker, J.** (2000) Brock, Biology of microorganisms. Upper Saddle River, NJ, USA: Prentice Hall. 991.
- Mahne, I. and Tiedje, J.M.** (1995) Criteria and methodology for identifying respiratory denitrifiers. Appl. Environ. Microbiol. 61: 1110-1115.
- Maier, R.J., Campbell, N.E.R., Hanus, F.J., Simpson, F.B., Russel, S.A., and Evans, H.J.** (1978) Expression of hydrogenase activity in free-living *Rhizobium japonicum*. P. Natl. Acad. Sci. USA 75: 3258-3262.
- Mannetje, L.** (1967) A re-examination of taxonomy of genus *Rhizobium* and related genera using numerical analysis. A. van Leeuw. J. Microb. 33: 477-491.
- Megonigal, J. P., Hines, M. E., and Visscher, P. T.** (2004) Anaerobic metabolism: linkages to trace gases and aerobic processes. Oxford, UK: Elsevier-Pergamon. 424.
- Mehta, M.P., Huber, J.A., and Baross, J.A.** (2005) Incidence of novel and potentially archaeal nitrogenase genes in the deep Northeast Pacific Ocean. Environ. Microbiol. 7: 1525-1534.
- Mergel, A., Schmitz, O., Mallmann, T., and Bothe, H.** (2001) Relative abundance of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in layers of a forest soil. FEMS Microbiol. Ecol. 36: 33-42.
- Mesa, S., Alché, J.D., Bedmar, E.J., and Delgado, M.J.** (2004) Expression of *nir*, *nor* and *nos* denitrification genes from *Bradyrhizobium japonicum* in soybean root nodules. Physiol. Plant. 120: 205-211.
- Mintie, A.T., Heichen, R.S., Cromack, K., Myrold, D.D., and Bottomley, P.J.** (2003) Ammonia-oxidizing bacteria along meadow-to-forest transects in the Oregon cascade mountains. Appl. Environ. Microbiol. 69: 3129-3136.
- Monza, J., Irisarri, P., Díaz, P., Delgado, M.J., Mesa, S., and Bedmar, E.J.** (2006) Denitrification ability of rhizobial strains isolated from *Lotus* sp. Anton. Leeuw. Int. J. G. 89: 479-484.
- Moulin, L., Munive, A., Dreyfus, B., and Boivin-Masson, C.** (2001) Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. Nature 411: 948-950.
- Nakagawa, Y., Sakane, T., and Yokota, A.** (1996) Transfer of "*Pseudomonas riboflavina*" (Foster 1944), a gram negative, motile rod with long-chain 3-hydroxy fatty acids, to *Devosia riboflavina* gen. nov, sp. nov, nom rev. Int. J. Syst. Bacteriol. 46: 16-22.
- Newton, W. E.** (2007) Physiology, biochemistry, and molecular biology of nitrogen fixation. In Molecular biology, biochemistry, ecology, and applied aspects of the nitrogen cycle Bothe, H., Ferguson, Stuart J., and Newton, W. E. 109-129. Elsevier.
- Ngom, A., Nakagawa, Y., Sawada, H., Tsukahara, J., Wakabayashi, S., Uchiumi, T. et al.** (2004) A novel symbiotic nitrogen-fixing member of the *Ochrobactrum* clade isolated from root nodules of *Acacia mangium*. J. Gen. Appl. Microbiol. 50: 17-28.
- Nichols, D.** (2007) Cultivation gives context to the microbial ecologist. FEMS Microbiol. Ecol. 60: 351-357.

V. Referenzen

- Okada,N., Nomura,N., Nakajima-Kambe,T., and Uchiyama,H.** (2005) Characterization of the aerobic denitrification in *Mesorhizobium* sp. strain NH-14 in comparison with that in related rhizobia. *Microbes Environ.* 20: 208-215.
- Orwin,K.H., Wardle,D.A., and Greenfield,L.G.** (2006) Ecological consequences of carbon substrate identity and diversity in a laboratory study. *Ecology* 87: 580-593.
- Osman,S., Moissl,C., Hosoya,N., Briegel,A., Mayilraj,S., Satomi,M., and Venkateswaran,K.** (2007) *Tetrasphaera remsis* sp. nov., isolated from the regenerative enclosed life support module simulator (REMS) air system. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 57: 2749-2753.
- O'Hara,G.W. and Daniel,R.M.** (1985) Rhizobial denitrification - a review. *Soil Biol. Biochem.* 17: 1-9.
- Patureau,D., Zumstein,E., Delgenes,J.P., and Moletta,R.** (2000) Aerobic denitrifiers isolated from diverse natural and managed ecosystems. *Microb. Ecol.* 39: 145-152.
- Petri,R. and Imhoff,J.F.** (2000) The relationship of nitrate reducing bacteria on the basis of *narH* gene sequences and comparison of *narH* and 16S rDNA based phylogeny. *System. Appl. Microbiol.* 23: 47-57.
- Philippot,L., Piutti,S., Martin-Laurent,F., Hallet,S., and Germon,J.C.** (2002) Molecular analysis of the nitrate-reducing community from unplanted and maize-planted soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 6121-6128.
- Pratscher,J., Stichternoth,C., Fichtl,K., Schleifer,K.H., and Braker,G.** (2009) Application of Recognition of Individual Genes-Fluorescence In Situ Hybridization (RING-FISH) To Detect Nitrite Reductase Genes (*nirK*) of Denitrifiers in Pure Cultures and Environmental Samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 802-810.
- Priemé,A., Braker,G., and Tiedje,J.M.** (2002) Diversity of nitrite reductase (*nirK* and *nirS*) gene fragments in forested upland and wetland soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 1893-1900.
- Raghoebarsing,A.A., Pol,A., Pas-Schoonen,K.T., Smolders,A.J.P., Ettwig,K.F., Rijpstra,W.I.C. et al.** (2006) A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification. *Nature* 440: 918-921.
- Rich,J.J., Heichen,R.S., Bottomley,P.J., Cromack,K., and Myrold,D.D.** (2003) Community composition and functioning of denitrifying bacteria from adjacent meadow and forest soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 5974-5982.
- Rincón,A., Arenal,F., González,I., Manrique,E., Lucas,M.M., and Pueyo,J.J.** (2008) Diversity of rhizobial bacteria isolated from nodules of the gypsophyte *Ononis tridentata* L. growing in spanish soils. *Microb. Ecol.* 56: 223-233.
- Risgaard-Petersen,N., Langezaal,A.M., Ingvarsdén,S., Schmid,M.C., Jetten,M.S.M., Op den Camp,H.J.M. et al.** (2006) Evidence for complete denitrification in a benthic foraminifer. *Nature* 443: 93-96.

V. Referenzen

- Rivas,R., Willems,A., Palomo,J.L., Garcia-Benavides,P., Mateos,P.F., Martinez-Molina,E. et al.** (2004) *Bradyrhizobium betae* sp nov., isolated from roots of *Beta vulgaris* affected by tumour-like deformations. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 54: 1271-1275.
- Rivas,R., Willems,A., Subba-Rao,N.S., Mateos,P.F., Dazzo,F.B., Kroppenstedt,R.M. et al.** (2003) Description of *Devosia neptuniae* sp. nov. that nodulates and fixes nitrogen in symbiosis with *Neptunia natans*, an aquatic legume from India. *System. Appl. Microbiol.* 26: 47-53.
- Ryden,J.C., Lund,L.J., and Focht,D.D.** (1979) Direct measurement of denitrification loss from soils: I. Laboratory evaluation of acetylene inhibition of nitrous oxide reduction. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 43: 104-110.
- Saad,O.A.L.O. and Conrad,R.** (1993) Adaptation to temperature of nitric oxide-producing nitrate-reducing bacterial populations in soil. *Syst. Appl. Microbiol.* 16: 120-125.
- Sameshima-Saito,R., Chiba,K., and Minamisawa,K.** (2004) New method of denitrification analysis of *Bradyrhizobium* field isolates by gas chromatographic determination of ¹⁵N-labeled N₂. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 2886-2891.
- Sanger,F., Nicklen,S., and Coulson,A.R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
- Scala,D.J. and Kerkhof,L.J.** (1999) Diversity of nitrous oxide reductase (*nosZ*) genes in continental shelf sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1681-1687.
- Scheffer and Schachtschabel** (1989) *Lehrbuch der Bodenkunde*. Stuttgart: Ferinand Enke Verlag. 593.
- Schinner, F. R., Öhlinger, and Kandeler, E.** (1991) *Bodenbiologische Arbeitsmethoden*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. 389.
- Schlegel, Hans G.** (1992) *Allgemeine Mikrobiologie*. Stuttgart; New York: Thieme. 980.
- Schoenborn,L., Yates,P.S., Grinton,B.E., Hugenholtz,P., and Janssen,P.H.** (2004) Liquid serial dilution is inferior to solid media for isolation of cultures representative of the phylum-level diversity of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 4363-4366.
- Schwarz, Julia.** (2002) Einfluss der Temperatur auf die Nitrat-reduzierende Lebensgemeinschaft im Boden. Philipps-University Marburg, Germany. Thesis/Dissertation.
- Seki,T., Chung,C.K., Mikami,H., and Oshima,Y.** (1978) Deoxyribonucleic-acid homology and taxonomy of genus *Bacillus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 28: 182-189.
- Shapleigh, J. P.**(2006) The Denitrifying Prokaryotes. In *The Prokaryotes* Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., and Stackebrandt, E. 769-792. Springer press, New York, N.Y.
- Sharma,S., Aneja,M.K., Mayer,J., Munch,J.C., and Schloter,M.** (2005) Diversity of transcripts of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) in rhizospheres of grain legumes. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 2001-2007.

V. Referenzen

- Shaw,L.J., Nicol,G.W., Smith,Z., Fear,J., Prosser,J.I., and Baggs,E.M.** (2006) *Nitrosospira* spp. can produce nitrous oxide via a nitrifier denitrification pathway. Environ. Microbiol. 8: 214-222.
- Shoun,H. and Tanimoto,T.** (1991) Denitrification by the fungus *Fusarium oxysporum* and involvement of cytochrome-P-450 in the respiratory nitrite reduction. J. Biol. Chem. 266: 11078-11082.
- Šimek,M., Jíšová,L., and Hopkins,D.W.** (2002) What is the so-called optimum pH for denitrification in soil? Soil Biol. Biochem. 34: 1227-1234.
- Skiba,U. and Smith,K.A.** (2000) The control of nitrous oxide emissions from agricultural and natural soils. Glob. Change Sci. 2: 379-386.
- Song,B., Palleroni,N.J., and Häggblom,M.M.** (2000) Isolation and characterization of diverse Halobenzoate-degrading denitrifying bacteria from soils and sediments. Appl. Environ. Microbiol. 66: 3446-3453.
- Stackebrandt,E. and Goebel,B.M.** (1994) A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. Int. J. Syst Bacteriol. 44: 846-849.
- Staley,J.T. and Konopka,A.** (1985) Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. Annu. Rev. Microbiol. 39: 321-346.
- Steenkamp,E.T., Stepkowski,T., Przymusiak,A., Botha,W.J., and Law,I.J.** (2008) Cowpea and peanut in southern Africa are nodulated by diverse *Bradyrhizobium* strains harboring nodulation genes that belong to the large pantropical clade common in Africa. Mol. Phylogenet. Evol. 48: 1131-1144.
- Stevenson,B.S., Eichorst,S.A., Wertz,J.T., Schmidt,T.M., and Breznak,J.A.** (2004) New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes. Appl. Environ. Microbiol. 70: 4748-4755.
- Stott,M.B., Crowe,M.A., Mountain,B.W., Smirnova,A.V., Hou,S.B., Alam,M., and Dunfield,P.F.** (2008) Isolation of novel bacteria, including a candidate division, from geothermal soils in New Zealand. Environ. Microbiol. 10: 2030-2041.
- Strous,M., Fuerst,J.A., Kramer,E.H., Logemann,S., Muyzer,G., Pas-Schoonen,K.T. et al.** (1999) Missing lithotroph identified as new planctomycete. Nature 400: 446-449.
- Su,J.J., Liu,B.Y., Lin,J., and Yang,C.P.** (2001) Isolation of an aerobic denitrifying bacterial strain NS-2 from the activated sludge of piggery wastewater treatment systems in Taiwan possessing denitrification under 92% oxygen atmosphere. J. Appl. Microbiol. 91: 853-860.
- Throbäck,I.N., Enwall,K., Jarvis,Å., and Hallin,S.** (2004) Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. FEMS Microbiol. Ecol. 49: 401-417.
- Tiedje, J. M.**(1994) Denitrifiers. In Methods of soil analysis Weaver, R. W. and Mickelson, S. H. 245-267. Soil science society of America, Madison, WI.

V. Referenzen

- Tiedje, James M.** (1988) Ecology of denitrification and of dissimilatory nitrate reduction to ammonium. In *Biology of anaerobic microorganisms* Zehnder, Alexander J. B. 179-244. John Wiley and Sons, Inc., New York, N.Y.
- Torsvik, V., Goksøyr, J., and Daae, F.L.** (1990) High diversity in DNA of soil Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 782-787.
- Treusch, A.H., Leininger, S., Kletzin, A., Schuster, S.C., Klenk, H.P., and Schleper, C.** (2005) Novel genes for nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. *Environ. Microbiol.* 7: 1985-1995.
- van Berkum, P. and Fuhrmann, J.J.** (2000) Evolutionary relationships among the soybean bradyrhizobia reconstructed from 16S rRNA gene and internally transcribed spacer region sequence divergence. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 50: 2165-2172.
- van Berkum, P., Lelbold, J.M., and Eardly, B.D.** (2006) Proposal for combining *Bradyrhizobium* spp. (*Aeschynomene indica*) with *Blastobacter denitrificans* and to transfer *Blastobacter denitrificans* (Hirsch and Muller, 1985) to the genus *Bradyrhizobium* as *Bradyrhizobium denitrificans* (comb. nov.). *System. Appl. Microbiol.* 29: 207-215.
- van Cleemput, O.** (1998) Subsoils: chemo- and biological denitrification, N₂O and N₂ emissions. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 52: 187-194.
- Vanparrys, B., Heylen, K., Lebbe, L., and De Vos, P.** (2005) *Devosia limi* sp nov., isolated from a nitrifying inoculum. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 55: 1997-2000.
- Vinuesa, P., León-Barrios, M., Silva, C., Willems, A., Jarabo-Lorenzo, A., Pérez-Galdona, R. et al.** (2005) *Bradyrhizobium canariense* sp nov., an acid-tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (Papilionoideae: Genisteae) from the Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. genistearum, *Bradyrhizobium* genospecies alpha and *Bradyrhizobium* genospecies beta. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 55: 569-575.
- Voytek, M.A. and Ward, B.B.** (1995) Detection of ammonium-oxidizing bacteria of the beta-subclass of the class *Proteobacteria* in aquatic samples with the PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1444-1450.
- Ward, D.M., Weller, R., and Bateson, M.M.** (1990) 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature* 345: 63-65.
- Williams, P.A., Fülöp, V., Garman, E.F., Saunders, N.F.W., Ferguson, S.J., and Hajdu, J.** (1997) Haem-ligand switching during catalysis in crystals of a nitrogen-cycle enzyme. *Nature* 389: 406-412.
- Woese, C.R.** (1987) Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51: 221-271.
- Wolsing, M. and Priemé, A.** (2004) Observation of high seasonal variation in community structure of denitrifying bacteria in arable soil receiving artificial fertilizer and cattle manure by determining T-RFLP of *nir* gene fragments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 48: 261-271.
- Xu, L.M., Ge, C., Cui, Z., Li, J., and Fan, H.** (1995) *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov, isolated from the root-nodules of soybeans. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 706-711.

V. Referenzen

- Yamasaki,H. and Sakihama,Y.** (2000) Simultaneous production of nitric oxide and peroxyxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS Lett.* 468: 89-92.
- Yan,T., Fields,M.W., Wu,L., Zu,Y., Tiedje,J.M., and Zhou,J.** (2003) Molecular diversity and characterization of nitrite reductase gene fragments (*nirK* and *nirS*) from nitrate- and uranium-contaminated groundwater. *Environ. Microbiol.* 5: 13-24.
- Yan,X.R., Chen,W.F., Fu,J.F., Lu,Y.L., Xue,C.Y., Sui,X.H. et al.** (2007) *Mesorhizobium* spp. are the main microsymbionts of *Caragana* spp. grown in Liaoning Province of China. *FEMS Microbiol. Lett.* 271: 265-273.
- Yao,Z.Y., Kan,F.L., Wang,E.T., Wei,G.H., and Chen,W.X.** (2002) Characterization of rhizobia that nodulate legume species of the genus *Lespedeza* and description of *Bradyrhizobium yuanmingense* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 52: 2219-2230.
- Ye,R.W., Fries,M.R., Bezborodnikov,S.G., Averill,B.A., and Tiedje,J.M.** (1993) Characterization of the structural gene encoding a copper-containing nitrite reductase and homology of this gene to DNA of other denitrifiers. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 250-254.
- Yoo,S.H., Weon,H.Y., Kim,B.Y., Hong,S.B., Kwon,S.W., Cho,Y.H. et al.** (2006) *Devosia soli* sp. nov., isolated from greenhouse soil in Korea. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 56: 2689-2692.
- Yoon,J.H., Kang,S.J., Park,S., and Oh,T.K.** (2007) *Devosia insulae* sp nov., isolated from soil, and emended description of the genus *Devosia*. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 57: 1310-1314.
- Yoshie,S., Noda,N., Miyano,T., Tsuneda,S., Hirata,A., and Inamori,Y.** (2001) Microbial community analysis in the denitrification process of saline-wastewater by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA and the cultivation method. *J. Biosci. Bioeng.* 92: 346-353.
- Yoshinari,T., Hynes,R., and Knowles,R.** (1977) Acetylene inhibition of nitrous oxide reduction and measurement of denitrification and nitrogen-fixation in soil. *Soil Biol. Biochem.* 9: 177-183.
- Zengler,K., Toledo,G., Rappé,M., Elkins,J., Mathur,E.J., Short,J.M., and Keller,M.** (2002) Cultivating the uncultured. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 15681-15686.
- Zhang,Y.G., Li,D.Q., Wang,H.M., Xiao,Q.M., and Liu,X.D.** (2006) The diversity of denitrifying bacteria in the alpine meadow soil of Sanjiangyuan natural reserve in Tibet plateau. *Chinese Sci. Bull.* 51: 1245-1254.
- Zumft, W. G.** (1992a) *The Denitrifying Prokaryotes*. Springer-Verlag New York, LLC.
- Zumft,W.G.** (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61: 533-616.
- Zumft,W.G.** (2005) Nitric oxide reductases of prokaryotes with emphasis on the respiratory, heme-copper oxidase type. *J. Inorg. Biochem.* 99: 194-215.
- Zumft, Walter G.**(1992b) The denitrifying prokaryotes. In *The Prokaryotes* Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., and Schleifer, Karl-H. I, 554-582. Springer Verlag, New York.

Lebenslauf

Lebenslauf

02/ 2005 - heute Doktorarbeit am Max-Planck Insitut für terrestrische Mikrobiologie mit dem Thema: Kultivierung von Denitrifikanten mit einem neuen *nirK*-Genotyp

Studium

01/2005 Abschluss zur Diplom Biologin (1,5) mit der Diplomarbeit:
Molekularbiologische Untersuchung der mikrobiellen Aktivität in Sedimenten der Nordrügenschten Boddenkette anhand der Transkription der metabolischer Gene nir und dsr

10/1997 – 01/2005 Studium der Biologie an der Ernst-Moritz Arndt Universität Greifswald mit folgenden Schwerpunkten:
Hauptfach: Ökologie, bei Prof. Gliesche
Nebenfach: Biochemie, bei Prof. Bode
Nebenfach: Molekularbiologie und Mikrogenphysiologie, bei Prof. Hecker

Schulbildung

1995 Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife

1986- 1995 Rudolf-Steiner Schule Wuppertal

1985-1986 Waldorf-School Minneapolis/Minnesota, USA

1982-1985 Freie Waldorf Schule Gladbeck

Praktikum

09/2002 – 11/2002 studentische Hilfskraft am **Alfred-Wegener Insitut Sylt** bei Prof. Dr. Lüning zum Thema:
Kultivierung von marinen Makroalgen

07/2002 – 08/2002 Praktikum am **Alfred-Wegener Insitut Bremerhaven** bei Dr. Helmke zum Thema:
Charakterisierung der Bakterien Gemeinschaft in polaren Habitaten

11/2001- 03/2002 Projekt-Praktikum an der **Universität von Amsterdam** in der Abteilung Aqautische Mikrobiologie, bei Dr. Matthijs zum Thema:
Expression von peripheren Proteinen unter Phosphat- und Nitrat-Limitatierung des Stammes Synechcystis PCC6803

09/2001 – 10/2001 Berufs-Praktikum bei **Henkel (Düsseldorf) KgaA**, Dr. Janßen Abteilung für Mikrobiologie und Hygiene:
Etablierung eines Adhäsionsexperiments um Biofilmbildung an verschiedenen Oberflächen zu testen

03/1996 – 04/1997 Freiwilliges ökologisches Jahr, Jugendaufbauwerk Ost in der Sozialtherapeutischen Einrichtung Kransdorf, Insel Rügen

Lebenslauf

Auslandsaufenthalte

11/2001 – 03/2002 Projekt-Praktikum an der Universität von Amsterdam
06/1985 – 07/1986 Aufenthalt in Minneapolis, Minnesota/ USA

EDV-und Sprachkenntnisse

Englisch sehr gut
Französisch Grundkenntnisse
Erfahrung im Umgang mit MS Office (Word, Excel, Power Point),
Reference Manager und ARB-Phylogenie-Berechnungsprogramm

Weiterbildungen

12/2006 Staatlich anerkannte Fortbildungsveranstaltung nach § 15 Abs. 4 Satz
Gen TSV für Projektleiter und Beauftragte für die biologische
Sicherheit
01/2006 Ausbildungswochenende Erste-Hilfe im Labor
10/2005 – 02/2006 Teilnahme an der betrieblichen Fortbildung im „Scientific writing“

Konferenzen

04/2008 Jahreskonferenz der Allgemeinen und angewandten Mikrobiologie
(VAAM):
*Kultivierung von Denitrifikanten mit einem neuen nirK-
Genotyp (Poster)*
06/2005 SPOT-ON Konferenz: Internationale Tagung zum
Stickstoffkreislauf im Meer:
*Community structure of nirS-type
denitrifying bacteria in coastal estuarine sediments*

Veröffentlichungen

2006 S. Falk, M.Hannig, C.Gliesche, R.Wardenga, M.Köster, K.Jürgens,
and G.Braker. *NirS*-containing denitrifier communities in the water
column and sediment of the Baltic Sea (2007). *Biogeoscience*, 4, 255-
268.

Soziales Engagement

2005 – 2007 Doktoranden-Vertreterin des Max-Planck Insitutes Marburg

Danksagung

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Ralf Conrad für die Bereitstellung der Arbeit und der Begutachtung des Themas.

Ebenfalls danke ich Herrn Prof. Dr. Buckel für die Erstellung des Zweitgutachtens dieser Arbeit.

Frau Dr. Gesche Braker sei Dank für die Betreuung des Themas und die fruchtbaren Diskussionen.

Der Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Dr. Overmann danke ich für die Bereitstellung der Anreicherungen, die als Vorversuche in der Arbeit dienten.

Jennifer Pratscher danke ich für die Durchführung der RING-FISH Experimente.

Allen Mitgliedern der AG Braker sei mein herzlicher Dank geschuldet, vor allem Michael Hannig für die stetige Diskussion und das Korrekturlesen.

Ebenso ein ganz großes Dankeschön, vor allem an die Mitglieder der Abteilung Biogeochemie für die netten unzähligen Stunden im Institut und darüber hinaus.

Meiner WG gehört ebenso ein Lob, da sie viele Stress-Situationen aushalten mussten.

Ganz großen Dank an meine lieben Freunde aus nah und fern die mich zu jeder Zeit tatkräftig unterstützt haben.

Zuletzt möchte ich meiner Familie für die großartige Unterstützung danken.

Erklärung

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Kultivierung von Denitrifikanten mit einem neuen *nirK*-Genotyp“

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetztigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient

Marburg, den 30.03.09