

**Charakterisierung von
fakultativ anaeroben Myxobakterien im Reisfeld**

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades

Der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Biologie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Nicole Treude

aus Bad Berleburg

Marburg/Lahn 2003

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Januar 2000 bis Januar 2003 am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Abteilung Biogeochemie, in Marburg/Lahn unter Leitung von Herrn PD Dr. Werner Liesack und Frau Prof. Dr. Sylvia Schnell durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg
als Dissertation am 24.06.2003 angenommen.

Erstgutachter: PD Dr. Werner Liesack
Zweitgutachter: Prof. Dr. Wolfgang Buckel

Tag der mündlichen Prüfung: 15. 07.2003

Inhaltsverzeichnis

Seite

Abkürzungen

Zusammenfassung

A. Einleitung

1. Eisenminerale.....	1
2. Mikrobielle Eisenreduktion.....	2
3. Phylogenetische Stellung der Eisenreduzierer	3
4. Ökosystem Reisfeld	4
5. Der Eisenzyklus im Reisfeld	5
6. Stamm FAc12.....	6
7. Ziele der Arbeit.....	9

B. Material und Methoden

1. Verwendete Materialien	11
1.1 Chemikalien.....	11
1.2 Gase	11
1.3 Böden und Reispflanzen.....	11
1.4 Mikroorganismen.....	12
2. Mikrobiologische Methoden	12
2.1 Medien.....	12
2.1.1 Grundmedium	12
2.1.1.1 Elektronendonatoren.....	15
2.1.1.2 Elektronenakzeptoren	15
2.1.2 Komplexmedium	16
2.1.3 CY-Agar	16
2.1.4 VY/2-Agar	17
2.1.5 WAT-Agar.....	17
2.1.6 R2A-Agar	18
2.1.7 CT-Medium mit 5 mM Glucose und 0,5 µg ml ⁻¹ Vitamin B12.....	18
2.2 Kultivierungstechnik.....	18
2.3 Anreicherung und Isolierung	19
2.4 Methoden zur Charakterisierung von Bakterien.....	20
2.4.1 Physiologische Tests.....	20
2.4.2 Phylogenetische Methoden.....	20
2.5 Wachstumsversuch mit Stamm FAc12.....	21
3. Analytische Methoden.....	21
3.1 Nachweis von organischen Säuren.....	21
3.2 Nachweis von Eisen(II) und Gesamteisen.....	22
3.2.1 Berechnung der Eisenkonzentrationen in Umweltproben.....	23
3.2.1.1 Wurzel.....	23
3.2.1.2 Reisfeldboden	23
3.3 Nachweis von Protein	24
4. Molekularbiologische Methoden.....	24

4.1 Extraktion von DNA.....	24
4.1.1 Extraktion von genomischer DNA	24
4.1.2 Extraktion von Umwelt-DNA.....	24
4.2 DNA-Amplifikation mittels PCR.....	25
4.3 Agarose-Gelelektrophorese	28
4.4 Erstellung von 16S rRNA-Gen-Klonbibliotheken.....	28
4.4.1 Analyse der 16S rRNA-Gensequenzen	29
4.5 Sequenzierung der 16S rRNA-Gensequenzen.....	29
4.5.1 Phylogenetische Einordnung der 16S rRNA-Gensequenzen	31
4.6 ARDRA-Analysen.....	32
4.7 T-RFLP-Analysen.....	33
5. Reismikrokosmosversuch.....	35
5.1 Experimenteller Aufbau.....	35
5.2 Biomassebestimmung der Reispflanzen.....	36
5.3 Porenwasserproben (Acetatbestimmung)	36
5.4 Eisenbestimmung.....	37
5.5 Quantifizierung von Stamm FAc12 und Verwandten.....	37
C. Ergebnisse	
1. Bakteriologische Experimente.....	39
1.1 Charakterisierung von Stamm FAc12	39
1.1.1 Wachstumsversuch	39
1.1.2 Überprüfung von Stamm FAc12 auf charakteristische myxobakterielle Eigenschaften.....	40
1.1.2.1 Fruchtkörperbildung	40
1.1.2.2 Gleiten.....	41
1.1.2.3 Bakteriolytische Eigenschaften	41
1.2 Überprüfung von <i>Stigmatella aurantiaca</i> auf dissimilatorische Eisenreduktion ...	41
1.3 Überprüfung von „ <i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i> “ auf dissimilatorische Eisenreduktion.....	42
1.4 Anreicherung und Isolation eisenreduzierender Bakterien von Reiswurzeln.....	43
1.4.1 Anreicherung und Isolierung	43
1.4.2 Charakterisierung der Isolate	44
1.4.2.1 Morphologie	44
1.4.2.2 Physiologie	44
1.4.2.3 Phylogenetische Verwandtschaft	44
2. Molekularbiologische Untersuchungen.....	47
2.1 ARDRA-Analyse	47
2.2 Entwicklung eines spezifischen PCR-Systems zur Amplifikation von 16S rRNA-Genen von Stamm FAc12 und Verwandten.....	49
2.3 Überprüfung der Ergebnisse der ARDRA-Analyse mit Hilfe des PCR-Systems FAc12	51
2.4 Nachweis von Stamm FAc12 und Verwandten in verschiedenen Habitaten.....	52
2.5 T-RFLP-Analyse von Stamm FAc12 und Verwandten.....	54
3. Reismikrokosmosexperiment	58
3.1 Wachstum der Reispflanzen	58
3.2 Acetatkonzentration.....	59
3.3 Eisenkonzentration	59
3.4 Reispflanzenwachstums-abhängige Quantifizierung von Stamm FAc12 und Verwandten mit PCR-abhängigen Verdünnungsreihen.....	62

D. Diskussion

1. Vergleich von Stamm FAc12 mit „ <i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i> “, Stamm KC und den Myxobakterien.....	64
2. Anreicherung und Isolation von eisenreduzierenden Bakterien.....	67
3. Stamm FAc12 und Verwandte im Reisfeldboden und an der Reisswurzel.....	69
3.1 Diversität von Stamm FAc12 und Verwandten an der Reisswurzel.....	69
3.2 Struktur von Stamm FAc12 und Verwandten an der Reisswurzel und im Reisfeldboden	70
3.3 Vorkommen von Stamm FAc12 und Verwandten in Abhängigkeit der Vegetationsphase von Reispflanzen	72
4. Vorkommen von Stamm FAc12 und Verwandten in anderen Böden.....	74

E. Literaturverzeichnis	76
--------------------------------------	-----------

Dank

Abkürzungen

Bp	Basenpaare
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
n	Anzahl der Parallelen
PCR	„polymerase chain reaction“
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SE	Standardfehler
TG	Trockengewicht
T-RFLP	„terminal restriction fragment length polymorphism“
VE	voll entsalzt
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl- β -D-Galactopyranosid
Weitere Abkürzungen wurden entsprechend der „Information for Authors (1998)“ des European Journal of Biochemistry verwendet.	

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Stamm FAc12 und verwandte Mikroorganismen mit molekularbiologischen und mikrobiologischen Arbeitsmethoden charakterisiert. Stamm FAc12 wurde aus anoxischen Anreicherungskulturen von Reisfeldboden mit Acetat und Ferrihydrit isoliert. Die phylogenetische Analyse seines kompletten 16S rRNA-Gens zeigte, daß Stamm FAc12 der Ordnung der *Myxococcales* zuzuordnen ist. Vertreter dieser Ordnung waren bis vor kurzem als strikt aerob charakterisiert worden. Stamm FAc12 wächst aerob in Komplexmedium oder in Mineralmedium mit den Substraten Acetat, Citrat oder Glucose. Anaerob wächst Stamm FAc12 mit Acetat und den Elektronenakzeptoren Eisen(III) oder Nitrat. Aus Anreicherungskulturen von Reiswurzeln mit Acetat und Ferrihydrit wurden elf Stämme isoliert, die 16S rRNA-Gensequenzunterschiede zu Stamm FAc12 von 0,4 – 1,0% aufweisen. Zusammen mit zehn, von 45- und 90 Tage alten Reiswurzeln, gewonnen Umweltsequenzen, „*Anaeromyxobacter dehalogenans*“ und Stamm KC bilden Stamm FAc12 und die elf Isolate, einen neuen, vierten Entwicklungsast innerhalb der *Myxococcales*. Obwohl „*A. dehalogenans*“ (16S rRNA-Gensequenzähnlichkeit zu Stamm FAc12 beträgt 99,5%) und Stamm KC (16S rRNA-Gensequenzähnlichkeit zu Stamm FAc12 beträgt 97,2%) phylogenetisch zu Stamm FAc12 eng verwandt sind, unterscheiden sie sich physiologisch von diesem. So wachsen z.B. Stamm FAc12 und „*A. dehalogenans*“ anaerob mit Eisenreduktion, Stamm KC aber nicht.

Basierend auf den bereits bekannten 16S rRNA-Gensequenzen von Stamm FAc12 und Verwandten wurde ein spezifisches PCR-System entwickelt. Mit Hilfe dieses PCR-Systems wurden Stamm FAc12 und Verwandte an der oxischen Reiswurzel und im anoxischen Reisfeldboden nachgewiesen. Dabeinwiesen Stamm FAc12 und Verwandte die gleiche Populationsstruktur auf wie im Reisfeldboden. Durch verschiedene molekularbiologische Arbeitsmethoden (ARDRA, T-RFLP-Analyse, Klonierung und vergleichende Sequenzierung) wurde gezeigt, dass der höchste 16S rRNA-Gensequenzunterschied zwischen Stamm FAc12 und von Reiswurzeln und Reisfeldboden erzielten Umweltsequenzen 4,4% beträgt. Während eines Mikrokosmosversuches wurden Stamm FAc12 und Verwandte im anoxischen Reisfeldboden unabhängig von der dissimilatorischen Eisenreduktion mit dem spezifischen PCR-System nachgewiesen. Dies deutet darauf hin, dass die physiologische Rolle von Stamm FAc12 und Verwandten im Reisfeldboden noch nicht vollständig geklärt ist.

Stamm FAc12 und Verwandte wurden mit dem PCR-System FAc12 auch in anderen Böden nachgewiesen. Die Restriktionsfragmentmuster, die durch T-RFLP-Analyse der erzielten spezifischen PCR-Produkte erhalten wurden, wichen deutlich von denen der von Reiswurzeln und Reisfeldboden bestimmten Muster ab.

A. Einleitung

1. Eisenmineralien

Eisen ist das vierthäufigste Element der Erdkruste (Schwertmann und Cornell, 1991). Das Element Eisen ist sehr reaktionsfreudig und kommt auf der Erde natürlich nicht elementar vor. Es bildet Minerale, z.B. mit Silikaten, Sulfiden, Karbonaten und Sauerstoff. In den Silikaten (z.B. Olivin; $(\text{MgFe})_2\text{SiO}_4$), den Sulfiden (z.B. Pyrit; FeS_2) und in den Karbonaten (FeCO_3) liegt Eisen als Fe(II) gebunden vor. In den Eisenoxiden und Eisenhydroxiden liegt das Eisen hingegen überwiegend als Fe(III) vor.

Die strukturelle Einheit der Eisenoxide und Eisenhydroxide ist der Oktaeder. In diesem ist jedes Eisenatom von sechs Sauerstoffionen oder Sauerstoff- und Hydroxidionen umgeben. Die verschiedenen Eisenoxide unterscheiden sich hauptsächlich in der Anordnung der Oktaeder. Die Sauerstoff- und Hydroxidionen bilden Schichten, die entweder hexagonal dicht gepackt (α -Phase) oder kubisch dicht gepackt (β -Phase) vorliegen. Das Eisenatom selbst kann durch verschiedene Metallionen ersetzt werden. So findet man z.B. im Goethit häufig Aluminiumkationen (Schwertmann und Tayler, 1989) und im Ferrihydrit bis zu 9% Silizium (Childs, 1992). Durch die stärkere Bindung des z.B. Siliziumions zum Eisen, im Vergleich zu Sauerstoff- und Hydroxidionen, wird die Ausbildung einer geordneten Kristallstruktur verringert.

Von den 16 bekannten Eisenoxiden kommen Ferrihydrit, Lepidokrokit, Hämatit und Goethit in der Natur am häufigsten vor. In den meisten Böden findet sich das gelbe Eisenoxid Goethit. Das rote Hämatit findet sich eher in Böden mit höheren Bodentemperaturen und niedrigerem Wassergehalt. In hydromorphen Böden (z.B. Reisfelder) findet sich überwiegend das orange Lepidokrokit, weil dieses Oxid bevorzugt bei niedrigen Sauerstoffkonzentrationen gebildet wird. Das rostbraune Ferrihydrit ist vor allem dort zu finden, wo Fe(II) schnell durch Sauerstoff oxidiert wird (Schwertmann und Tayler, 1989).

Das Löslichkeitsprodukt dieser vier Eisenoxide (Ferrihydrit ($5 \text{ Fe}_2\text{O}_3 \times 9 \text{ H}_2\text{O}$), Lepidokrokit ($\beta\text{-FeOOH}$), Hämatit ($\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$) und Goethit ($\alpha\text{-FeOOH}$)) liegt in Wasser zwischen 10^{-38} und 10^{-43} . Die Konzentration der in Lösung frei vorliegenden Fe^{3+} -Ionen liegt somit im

attomolarem Bereich und ist für Bakterien in der Natur ein limitierender Faktor. Da bei neutralem pH-Wert Fe^{2+} -Ionen schnell mit Sauerstoff zu Eisenoxiden oxidiert werden, liegt Eisen in vielen Habitaten ausschließlich als gebundenes Fe(III) vor. Eisenreduzierende Bakterien können allerdings das Fe(III) der Eisenoxide als Elektronenakzeptor nutzen. Die Kristallinität des jeweiligen Eisenoxids (Ferrihydrit < Lepidokrokit < Hämatit < Goethit) spielt bei der mikrobiellen Reduzierbarkeit allerdings eine große Rolle. Sowohl die Partikelgröße (Weber, 1979) wie auch die damit verbundene Oberfläche (Rhoden und Zachara, 1996) ist hierbei von Bedeutung. Ein Eisenoxid mit einer großen Oberfläche (z.B. Ferrihydrit) wird mikrobiell schneller reduziert als ein kristallines mit kleiner Oberfläche (z.B. Goethit).

2. Mikrobielle Eisenreduktion

Die Reduktion von Fe(III) zu Fe(II) kann im mikrobiellen Stoffwechsel grundsätzlich auf zwei verschiedenen Wegen stattfinden. Im **assimilatorischen** Stoffwechsel wird Fe^{2+} überwiegend benötigt, um Enzyme, wie z.B. Katalasen, Peroxidasen, Cytochrome und Eisen-Schwefel-Proteine aufzubauen. Fe^{2+} wird aber auch z.B. für den Transport von Sauerstoff im Organismus benötigt (Hämoglobin, Myoglobin) (Drechsel und Winkelmann, 1997). Um das Fe^{2+} für den Aufbau dieser Moleküle zu gewinnen, muß zunächst das Fe(III) aus den Eisenoxiden gelöst werden. Bakterien, die ausschließlich eine assimilatorische Eisenreduktion betreiben, haben für diesen Zweck Siderophoren entwickelt. Grundsätzlich werden drei Formen von Siderophoren unterschieden: die Catechol-Siderophore, wie z.B. Enterobaktin, die Hydroxamat-Siderophore, zu denen die Ferrioxamine gehören und die Di- oder Tricarbonsäuren-Siderophore wie beispielsweise Citrat. Die Siderophoren werden von den Bakterien ausgeschieden und komplexieren das Fe(III) aus den Eisenoxiden. Die so beladenen Siderophoren werden anschließend durch energieverbrauchende Transportsysteme in die Bakterienzelle wieder aufgenommen. In der Zelle wird das Fe^{3+} dann entweder durch den enzymatischen Abbau der Siderophore (Enterobaktin) oder durch die Reduktion von Fe^{3+} zu Fe^{2+} (Ferrichrome) freigesetzt. Fe^{3+} , das mit Citrat komplexiert wurde, wird ohne diese Tricarbonsäure aufgenommen. Da die assimilatorische Eisenreduktion ein energieverbrauchender Stoffwechselweg ist, wird er streng reguliert (Fuchs, 1999).

Im **dissimilatorischen** Stoffwechsel dient die Eisenreduktion primär der Energiegewinnung. Bei der dissimilatorischen Eisenreduktion werden grundsätzlich zwei Mechanismen beschrieben. Der direkte Kontakt der Mikroorganismen mit den wasserunlöslichen

Eisenoxiden scheint eine wesentliche Voraussetzung für die dissimilatorische Fe(III)-Reduktion zu sein (Munch und Ottow, 1982; Tugel *et al.*, 1986). Allerdings können extrazelluläre Moleküle das Fe(III) aus den Eisenoxiden komplexieren. Diese Chelatoren werden entweder von den eisenreduzierenden Mikroorganismen selbst synthetisiert (z.B. Chinone) (Newmann und Kolter, 2000; Seeliger *et al.*, 1998) oder sind in den entsprechenden Habitaten zu finden (z.B. Huminsäuren) (Lovley *et al.*, 1996). Ein direkter mikrobieller Kontakt zu den Eisenoxiden wird durch diese Chelatoren unnötig, da diese wasserlöslich sind. Dabei sind die meisten Mikroorganismen, die das in den Chelatoren komplexierte Fe(III) reduzieren können, auch in der Lage, Elektronen auf das in den Eisenoxiden gebundene Fe(III) zu übertragen (Lovley, 2000).

Über die Enzyme der dissimilatorischen Eisenreduktion ist bisher noch wenig bekannt. So konnten z.B. Magnuson *et al.* (2000) bei *Geobacter sulfurreducens* eine NADH-abhängige Eisenreduktase in der Membran nachweisen, die ein Cytochrom c besitzt. Kaufmann *et al.* (2001) wiesen im Cytoplasma desselben Organismus eine lösliche Eisenreduktase nach, die NADPH abhängig ist und kein Cytochrom besitzt.

3. Phylogenetische Stellung der Eisenreduzierer

Phylogenetisch bilden die dissimilatorischen Eisenreduzierer keine einheitliche Gruppe. Vertreter dieser physiologischen Gruppe wurden in der Domäne *Archaea* und in der Domäne *Bacteria* gefunden. In der Domäne *Bacteria* finden sie sich überwiegend bei den *Proteobacteria*. In dieser Entwicklungslinie gehören die meisten bekannten dissimilatorischen Eisenreduzierer zu den α - und β - *Proteobacteria*. Die Mitglieder dieser zwei Subklassen der *Proteobacteria* unterscheiden sich nicht nur phylogenetisch, sondern auch physiologisch. In der α -Subklasse der *Proteobacteria* können die meisten eisenreduzierenden Bakterien (*Shewanella*, *Aeromonas* und *Thiobacillus*) neben Fe(III), Nitrat oder Fumarat auch Sauerstoff nutzen. Somit sind sie fakultativ anaerobe Bakterien. Einzige Ausnahme ist hier der strikt anaerobe *Ferrimonas balearica* (Roselló-Mora *et al.*, 1995).

In der β -Subklasse der *Proteobacteria* hingegen finden sich ausschließlich strikt anaerobe dissimilatorische Eisenreduzierer. Alle zur dissimilatorischen Eisenreduktion fähigen Bakterien in dieser phylogenetischen Entwicklungslinie gehören zur Familie der *Geobacteraceae*. Diese Familie enthält zwei, über ihre 16S rRNA-Gensequenz definierte Entwicklungslinien, *Geobacter* (*Geobacter spp.* und *Pelobacter propionicus*) und *Desulfomonas* (*Desulfuromonas spp.* und *Pelobacter spp.*). Mitglieder der Familie

Geobacteraceae können neben Fe(III) auch z.B. Nitrat, Mangan(IV) oder Schwefel als terminalen Elektronenakzeptor nutzen (Lovley *et al.*, 1997).

Dissimilatorische Eisenreduzierer sind vereinzelt auch den $\hat{\alpha}$ -*Proteobacteria* (*Ferribacterium limneticum*; Cummings *et al.*, 1999), den $\hat{\alpha}$ -*Proteobacteria* (*Geospirillum barnesii*; Laverman *et al.*, 1995), dem Phylum *Holophaga/Acidobacterium* (*Geothrix fermentans*; Lonergan *et al.*, 1996, Ludwig *et al.*, 1997) und den gram-positiven Bakterien (*Bacillus infernus*; Boone *et al.*, 1995) zugeordnet.

4. Ökosystem Reisfeld

Reis ist für nahezu die Hälfte aller Menschen Hauptnahrungsmittel (Wassmann *et al.*, 2000). Die Verdopplung der Weltbevölkerung in den letzten dreißig Jahren erforderte eine deutliche Steigerung der globalen Reisproduktion. Dies wurde allerdings nicht nur durch eine Vergrößerung der Reisanbaufläche erreicht, sondern auch durch den Einsatz geeigneter Düngemittel, der Züchtung und Verwendung neuer Hochertragssorten, sowie veränderte Kulturbedingungen (Statistische Datenbank der FAO; <http://apps.fao.org/lim500/nph-wrap.pl?Production.Crops.Primary&Domain=SUA>). Je nach Wasserverfügbarkeit unterscheidet man vier verschiedene Methoden im Reisanbau: 1) Hochland-, 2) regenbewässerter-, 3) unkontrollierten Überflutungen ausgesetzter- und 4) kontrolliert gefluteter Reisanbau (Neue, 1993). Dabei trägt der Reisanbau in kontrolliert gefluteten Feldern mit über 66% zu der globalen Reisproduktion bei (Sass *et al.*, 1994). Im kontrolliert gefluteten Reisanbau werden die Felder einige Tage vor dem Auspflanzen der Reissämlinge geflutet und ungefähr 20 bis 30 Tage vor der Ernte des Reises wieder trockengelegt (Schütz *et al.*, 1989; Krüger *et al.*, 2001). Nach der Flutung des Reisfeldes wird der Sauerstoff im Boden innerhalb von 1 bis 2 Tagen durch chemische Oxidationsreaktionen und durch aerobe Mikroorganismen verbraucht. Der Sauerstoffverbrauch durch aerobe Mikroorganismen ist dabei zeitlich abhängig vom organischem Gehalt des Bodens und der im Boden vorherrschenden Temperatur (Lindau *et al.*, 1990). So wird der größte Teil des Reisfeldbodens anoxisch. Durch Diffusion von Sauerstoff aus dem Flutwasser bleibt allerdings die oberste Bodenschicht oxisch (Frenzel *et al.*, 1992). Auch eine dünne Zone um die Reisswurzel bleibt, durch Sauerstoffdiffusion aus dem Aerenchym der Reispflanze, oxisch (Lee *et al.*, 1981). In Abwesenheit von Sauerstoff erfolgt der mikrobielle Abbau von organischen Verbindungen durch verschiedene anaerobe Prozesse. Von den komplexen organischen Substanzen des Reisfeldbodens (organischer Dünger, Reisstroh, Reissurzeln, Wurzelexsudate, Algen und Wasserpflanzen aus dem Flutwasser) werden die Polymere, wie

z.B. Cellulose, Hemicellulosen, Stärke, Pectin, Lignine, Fette und Proteine, unter den nun im Boden vorherrschenden anoxischen Bedingungen, zunächst durch hydrolytische Bakterien in die entsprechenden Monomere gespalten (Chin *et al.*, 1998, Lüders *et al.*, 2001). Diese, wie z.B. Monosaccharide, Aminosäuren und Fettsäuren werden von fermentierenden und respiratorischen Bakterien als Substrat verwendet. Dabei entsteht im Reisfeld überwiegend Acetat, H_2 und CO_2 neben höheren Fettsäuren und Alkoholen (Chin und Conrad, 1995; Krylova *et al.*, 1997). Letztere werden durch syntrophe anaerobe Bakterien in Acetat und CO_2/H_2 umgewandelt. Da diese Reaktionen nur bei geringen Wasserstoffkonzentrationen möglich sind, erfordern sie die Anwesenheit von wasserstoffverbrauchenden Mikroorganismen (syntrophe Assoziation). Acetat kann allerdings auch durch acetogene Bakterien aus entweder H_2 und CO_2 oder aus anderen organischen Verbindungen gebildet werden.

Die anaeroben respiratorischen Prozesse finden im Reisfeld und in anderen Habitaten nur statt, wenn bei Abwesenheit von Sauerstoff alternative Elektronenakzeptoren wie Nitrat, Eisen(III), Sulfat und/oder CO_2 vorhanden sind. Der Kohlenstoff wird dabei letztendlich vollständig oxidiert zu CO_2 oder reduziert zu CH_4 . Unter substratlimitierenden Bedingungen dominieren dabei die Mikroorganismen, die den Elektronenakzeptor mit dem positivsten Redoxpotential nutzen können (Nitrat > Eisen(III) > Sulfat > CO_2) und zwar, solange der entsprechende Elektronenakzeptor in ausreichender Konzentration vorhanden ist.

Bei der Trockenlegung des Reisfeldes bei der Ernte des Reises werden die während der Überflutung reduzierten Elektronenakzeptoren, wie NH_4^+ , Eisen(II), S^- und/oder CH_4 wieder durch Sauerstoff oxidiert. Neben dieser saisonalen, kommt es auch zu einer Reoxidation der alternativen Elektronenakzeptoren an der Bodenoberfläche und an der Wurzel, wo auch unter anoxischen Bedingungen im Reisfeldboden Sauerstoff vorkommt (s. oben).

5. Der Eisenzyklus im Reisfeld

Die Reduktion von Eisen(III) zu Eisen(II) ist von quantitativer Bedeutung bei dem Abbau von organischen Verbindungen im Reisfeld. In Experimenten mit anoxischen Aufschlammungen von Reisfeldboden wurde gezeigt, daß die Kohlenstoffoxidation bis zu 50% an die Eisenreduktion gekoppelt ist (Jaekel und Schnell, 1999). In unbepflanzten überfluteten Mikrokosmen wurde nach einer sechswöchigen Inkubation bei $25^\circ C$ die höchste Eisenreduktionsaktivität in einer Bodentiefe von 4-8 mm lokalisiert (Ratering und Schnell, 2000). Ferrihydrit-reduzierende Bakterien weisen im Reisfeldboden eine Zellzahl pro Gramm Trockengewicht Boden auf (10^7 Zellen g TG Boden), die mindestens zehnfach höher ist, als

die der Methanogen. Eisen(III)-reduzierende Bakterien, die aus Reisfeldboden isoliert wurde, gehören phylogentisch sowohl der α -, β - und γ -Gruppe der Proteobakterien an. Diese Bakterien wurden mit H_2 , Acetat oder Lactat als Elektronendonator und Ferrihydrit oder Lepidokrokit als Elektronenakzeptor isoliert (Schnell, persönliche Mitteilung).

In Versuchen mit unbepflanzten, anoxischen Mikrokosmen wurde die höchste Eisen(III)konzentration (Reoxidation von Fe(II) im Reisfeldboden) in einer Bodentiefe von 2-4 mm gefunden. Dies ist begründet durch die Oxidation von nach oben diffundierendem Eisen(II) mit Sauerstoff (chemisch/mikrobiell) und Nitrat (mikrobiell) (Ratering und Schnell, 2000). In Experimenten mit anoxisch aufgeschlämmten Reisfeldboden nahm die Fe(III)konzentration nach Zugabe von NO_3^- oder N_2O zu (Klüber *et al.*, 1998). Im überfluteten Reisfeldboden gilt aber die chemische Oxidation von Fe(II) als unwahrscheinlich (Buersh und Morghan, 1976). Nitratreduzierende Bakterien können aber die Reduktion von Nitrat zu N_2 mit der Oxidation von Eisen(II) zu Eisen(III) koppeln (Straub *et al.*, 1996). Im Reisfeldboden wurden Eisen(II)-oxidierende Nitratreduzierer mit einer Zellzahl von 10^6 pro g Trockengewicht Boden nachgewiesen (Ratering und Schnell, 2001).

Auch durch den von der Reisswurzel abgegebenen Sauerstoff wird Eisen(II) zu Eisen(III) reoxidiert. Dadurch bilden sich an der Reisswurzeloberfläche (Rhizoplane) Eisen(III)-Plaques.

Die Zellzahl der Eisen-reduzierenden Bakterien im Boden, der die Wurzel umgibt (Rhizosphäre), ist ca. 10-fach höher als die in den obersten 5 mm der Bodenoberfläche (Schnell, persönliche Mitteilung). Im Boden der Rhizosphäre konnten über eine molekularbiologische Arbeitsmethode („T-RFLP“-Analysen = „terminal restriction fragment length polymorphism“; Liu *et al.*, 1997) Mitglieder der *Geobacteraceae* identifiziert werden (Lüdemann, 1999).

6. Stamm FAc12

Stamm FAc12 wurde aus Reisfeldboden unter strikt anoxischen Bedingungen angereichert und isoliert. Die Anreicherungskulturen enthielten Acetat als Kohlenstoffquelle und Elektronendonator und Ferrihydrit als Elektronenakzeptor. Neben Fe(III) kann Stamm FAc12 auch Nitrat unter anoxischen Bedingungen reduzieren. Aerob wächst Stamm FAc12 mit den Elektronendonatoren Acetat, Citrat und Glucose. Auch wurde Wachstum von Stamm FAc12 auf Agarplatten und in flüssigem Komplexmedium beobachtet. Somit ist Stamm FAc12 fakultativ anaerob. Die vergleichende phylogenetische Analyse des 16S rRNA-Gens ordnete

Stamm FAc12 in die Ordnung der *Myxococcales* innerhalb der α -*Proteobacteria* ein. Dabei wies zunächst *Stigmatella aurantiaca*, ein Myxobakterium, die höchste Sequenzähnlichkeit auf (89,8%).

Mitglieder der *Myxococcales* sind Gram-negative 0,6-1,2 μm breite und 3,0-15,0 μm lange Stäbchen. Sie sind Bodenbakterien und können zerfallendes Pflanzenmaterial, verrottetes Holz, Baumrinden und Kotballen von Pflanzenfressern besiedeln. In diesen Habitaten fallen sie durch die von ihnen gebildeten 10-100 μm großen Fruchtkörper auf. Unter Nährstoffmangel schwärmen 10^5 - 10^7 Myxobakterien einer Art zusammen und bilden ein Zellaggregat (Schlegel, 1992). Dabei wird das vegetative Wachstum der einzelnen Zellen eingestellt und ca. 65-90% der Zellen autolysieren. Anschließend erfolgt eine Differenzierung des Zellaggregats in Stiel, Basis, Sporangien und Myxosporen. Die austrocknungsresistenten Myxosporen sichern einen neuen Lebenszyklus einer Makromolekül auflösungsfähigen Population (Dawid, 2000). Dieses Verhalten der Myxobakterien ist durch ihre Ernährung begründet. Physiologisch lassen sich die Myxobakterien nämlich in zwei Gruppen einteilen, die bakteriolytische und die cellulolytische. Die Bakterien der bakteriolytischen Gruppe vermögen andere Mikroorganismen mit Hilfe von Exoenzymen aufzulösen. Zellulose können allerdings nur Bakterien der Gattung *Polyangium* verwerten (cellulolytische Gruppe). Dieser Makromolekülabbau kann nur stattfinden, wenn eine genügend hohe Exoenzymkonzentration vorliegt und diese ist wiederum von der Zelldichte abhängig (Reichenbach, 1999). Bis vor kurzem waren Myxobakterien als strikt aerob charakterisiert worden. Vor kurzem beschrieben Sanford *et al.*, 2002 allerdings ein fakultativ anaerobes Myxobakterium („*Anaeromyxobacter dehalogenans*“), das unter anoxischen Bedingungen mit Acetat und 2-Chlorphenol isoliert wurde. Auch Stamm KC ist ein Mitglied der *Myxococcales* und wurde mit reduziertem 2,6-Anthrachinon, einem Huminsäureanalogon, und Nitrat als Elektronenakzeptor aus einem mit Perchlorat verunreinigten Sediment isoliert (Coates *et al.*, 2002). Dieser Mikroorganismus kann ausschließlich Nitrat als Elektronenakzeptor nutzen und ist somit strikt anaerob. Stamm FAc12 weist eine hohe Sequenzähnlichkeit zu „*Anaeromyxobacter dehalogenans*“ Stamm 2CP-1 (99,5%) und Stamm KC (97,2%) auf.

Kultivierungsunabhängig wurden Umweltsequenzen mit molekularbiologischen Arbeitsmethoden von 45- und 90 Tage alten Reiswurzeln gewonnen (Rosencrantz, 1998), die mit der 16S rRNA-Gensequenz von Stamm FAc12, „*Anaeromyxobacter dehalogenans*“ und

Stamm KC einen unabhängigen Entwicklungsast innerhalb der *Myxococcales* bilden (s. Abb. C.2).

7. Ziele der Arbeit

In dieser Arbeit sollten Stamm FAc12 und Verwandte mit molekularbiologischen und mikrobiologischen Arbeitsmethoden charakterisiert werden. Die folgenden Aspekte sollten dabei bearbeitet werden:

1. Die Diversität von Stamm FAc12 und Verwandten auf der Reisswurzel sollte mit ARDRA („amplified ribosomal DNA restriction analysis“; Vaneechoutte *et al.*, 1992) erfaßt werden. Damit sollte überprüft werden, ob die von Rosencrantz (1998) von 45- und 90 Tage alten Reisswurzeln gewonnenen Umweltsequenzen bereits die Diversität von Stamm FAc12 und Verwandten auf der Reisswurzel vollständig widerspiegeln.

2. Um festzustellen, ob Stamm FAc12 und Verwandte im anoxischen Reisfeldboden die selbe strukturelle Zusammensetzung und Diversität aufweisen, wie an der oxischen Reisswurzel, wurden T-RFLP-Analysen mit aus Reisfeldboden und aus Reisswurzel extrahierter DNA durchgeführt. Die aus diesen zwei Habitaten extrahierte DNA wurde hierfür zunächst mit einem für Stamm FAc12 und Verwandte spezifischen PCR-System amplifiziert. Die für Stamm FAc12 und Verwandte spezifischen Amplifikate wurden dann mit der T-RFLP-Methode analysiert.

3. In einem mit Reis bepflanzten Mikrokosmen sollten Stamm FAc12 und Verwandte in Abhängigkeit zum Reispflanzenwachstum an der Reisswurzel und im Reisfeldboden nachgewiesen und quantifiziert werden. Dabei sollte sowohl der Nachweis wie auch die Quantifizierung mit dem bereits entwickelten, für Stamm FAc12 und Verwandte spezifischen, PCR-System durchgeführt werden. Da Stamm FAc12 mit dem Elektronenakzeptor Ferrihydrit und dem Elektronendonator Acetat angereichert und isoliert wurde, sollten auch die Konzentrationen von Fe(II), Fe(III) und Acetat in beiden Habitaten parallel bestimmt werden.

4. Anreicherungen von Ferrihydrit-reduzierenden Bakterien sollten mit Elektronendonatoren durchgeführt werden, die an der Reisswurzel und im Reisfeldboden vorkommen. Damit sollte überprüft werden, ob die mit molekularbiologischen Methoden ermittelten Ergebnisse sich mit denen durch diese Anreicherungen gewonnenen Daten vergleichen lassen.

5. Die vor kurzem beschriebenen phylogenetisch nah verwandten Bakterien, „*Anaeromyxobacter dehalogenans*“ und *Stigmatella aurantiaca*, sollten auf die physiologische Fähigkeit dissimilatorisch Eisen reduzieren zu können, überprüft werden.

6. Mit dem für Stamm FAc12 und Verwandte spezifischen PCR-System sollten weitere, Reisfeld unabhängige, Habitate auf das Vorkommen dieser Gruppe überprüft werden. Wurde in einem der getesteten Habitate Stamm FAc12 und Verwandte nachgewiesen, folgte mit dem so erhaltenen spezifischen Amplifikat eine T-RFLP-Analyse. Somit konnte auch in diesen Habitaten die Diversität und strukturelle Zusammensetzung von Stamm FAc12 und Verwandten festgestellt werden.

B. Material und Methoden

1. Verwendete Materialien

1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien besaßen den Reinheitsgrad „zur Analyse“ und wurden von den folgenden Firmen bezogen:

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Applied Biosystems, Weiterstadt

Difco Laboratories, Detroit, Michigan, U.S.A.

BioRad Laboratories, München

Biozym Diagnostik, Oldendorf

Fluka, Buchs, Schweiz

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Merck, Darmstadt

MWG Biotech, Ebersberg

Promega, Mannheim

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

1.2 Gase

Alle verwendeten Gase wurden von der Firma Messer-Griesheim AG, Frankfurt a. M. bezogen.

1.3 Böden und Reispflanzen

a) Reisfeldboden aus Arborio (Oberitalien, Poebene), Probenahme April 2000 (Mikrokosmosexperiment (B.5)).

b) Reisfeldboden I aus Arborio (Oberitalien, Poebene), Probenahme November 1995 (Detektion von Stamm FAc12 und Verwandten (B.4.2b) und T-RFLP-Analysen (B.4.7)).

c) 90 Tage alte Reisswurzeln (*Oryza sativa* Variante Roma)

d) 112 Tage alte Reisswurzeln (*Oryza sativa* Varianten Koral, Lido und Roma) wurden freundlicherweise von P. Frenzel (MPI für terrestrische Mikrobiologie, Marburg) zur

Verfügung gestellt (Anreicherungen (B.2.3), Detektion von Stamm FAc12 und Verwandten (B.4.2b) und T-RFLP-Analysen (B.4.7)).

Die verwendeten Böden wurden nach der Entnahme getrocknet. Um eine gleichmäßige Verteilung der Bodeneinhaltsstoffe zu erreichen, wurden die Böden nach der Trocknung mit einem Backenbrecher zerkleinert und mit einem Sieb auf eine Korngröße von 2 mm gesiebt. Dabei wurden auch Steine und Wurzeln entfernt.

1.4 Mikroorganismen

„*Anaeromyxobacter dehalogenans*“ (Stamm 2CP-1 und Stamm 2CP-C) wurde von der American Type Culture Collection (Promochem, Wesel) bezogen.

Stigmatella aurantiaca wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig) bezogen.

2. Mikrobiologische Methoden

2.1 Medien

2.1.1 Grundmedium (Süßwassermedium)

Zur Anreicherung, Isolierung von dissimilatorischen Eisenreduzierern wurde ein leicht modifiziertes Süßwassermedium nach Widdel und Bak (1992) hergestellt. Dieses Medium wurde auch zur Kultivierung von Stamm FAc12 eingesetzt. Außerdem wurden „*Anaeromyxobacter dehalogenans*“ und *Stigmatella aurantiaca* in diesem Medium auf ihre Fähigkeit überprüft, dissimilatorisch Eisen reduzieren zu können. Die Mineralsalze des Mediums (Tab. B.1) wurden in destilliertem Wasser gelöst und in einem speziellen Kolben (Widdel und Bak, 1992) autoklaviert. Um ein erneutes Lösen von Luftsauerstoff nach dem Abkühlen zu verhindern, wurde das Medium unter einer N₂/CO₂-Atmosphäre abgekühlt. Nicht hitzebeständige Komponenten wurden erst nach Erkalten des Mediums aus sterilen Stammlösungen zugegeben. Der pH-Wert wurde mit steriler 1 M HCl, bzw. 1 M Na₂CO₃-Lösung auf pH 6,8 eingestellt. Anschließend wurde das Medium unter Überdruck in sterile 50 ml bzw. 100 ml Schraubverschlußfläschen abgefüllt.

Dieses Grundmedium wurde für die einzelnen Versuche entweder mit einer Sulfidlösung (1 mM Endkonzentration) reduziert oder es wurden 40 mM Eisen(III)citrat oder 30 mM Ferrihydrit zugegeben. Eisen(III)citrat wurde zunächst durch Erwärmen gelöst und anschließend die anderen Salze des Grundmediums zugegeben. Ferrihydrit wurden in einer wässrigen Stammlösung unter N_2/CO_2 -Atmosphäre autoklaviert und anschließend in das noch heiße Grundmedium gegeben.

Tab. B.1 : Süßwassermedium

Mineralsalze

NaCl	1,00 g
MgCl ₂ 6 H ₂ O	0,40 g
CaCl ₂ 2 H ₂ O	0,15 g
KCl	0,50 g
KH ₂ PO ₄	0,20 g
NH ₄ Cl	0,25 g

ad 1000 ml destilliertem H₂O**Spurenelementlösung**

FeCl 4 H ₂ O	1,000 g
ZnCl ₂	0,070 g
MnCl ₂ 2 H ₂ O	0,080 g
H ₃ BO ₃	0,006 g
CoCl ₂ 6 H ₂ O	0,130 g
CuCl ₂ 2 H ₂ O	0,002 g
NiCl ₂ 6 H ₂ O	0,024 g
Na ₂ MoO ₄ 2 H ₂ O	0,036 g

ad 1000 ml 50 mM HCl

Zusätze

Spurenelementlösung	1,0 ml 1000 ml ⁻¹
1M NaHCO ₃ -Lösung	30,0 ml 1000 ml ⁻¹
Vitamin B ₁₂ -Lösung ^a	1,0 ml 1000 ml ⁻¹
Vitamin 8-Lösung	1,0 ml 1000 ml ⁻¹
0,5 M Cysteinlösung ^b	1,2 ml 1000 ml ⁻¹
Riboflavinlösung ^c	1,0 ml 1000 ml ⁻¹

Vitamin 8-Lösung

D(+)-Biotin	1 mg
4- Aminobenzoessäure	4 mg
Nicotinsäure	10 mg
Ca-D-(+)-Pantothenat	5 mg
Pyridoxamindihydrochlorid	15 mg
DL-á-Liponsäure	1 mg
Folsäure	3 mg
Thiaminiumdichlorid	10 mg

ad 100 ml destilliertem H₂O

^a Für die Vitamin B₁₂-Lösung wurden 0,005 mg Cyanocobalamin in 100 ml destilliertem H₂O gelöst und autoklaviert.

^b Die 0,5 M L-Cysteinlösung wurde unter Stickstoff mit anoxischem, destilliertem H₂O angesetzt und steril gefiltert.

^c Für die Riboflavinlösung wurden 0,005 mg Riboflavin in 100 ml 20 mM Essigsäure gelöst und autoklaviert.

2.1.1.1 Elektronendonatoren (Süßwassermedium)

Monocarbonsäuren

Für die Stammlösungen der Fettsäuren wurden die Salze der jeweiligen Säuren verwendet. Anschließend wurden die Lösungen in fest verschlossenen Flaschen autoklaviert.

1 M Acetat Endkonzentration im Medium : 10 mM

1 M Propionat Endkonzentration im Medium: 10 mM

Wasserstoff

H₂/CO₂ 80% Wasserstoff und 20% Kohlendioxid

2.1.1.2 Elektronenakzeptoren (Süßwassermedium)

Eisen(III)oxide

Alle Eisen(III)oxide wurden nach Anleitung von Schwertmann und Cornell (1991) hergestellt.

Ferrihydrit:

1000 ml einer 0,25 M FeCl₃-Lösung wurden in ein großes Becherglas (5 Liter) gefüllt. Zu der FeCl₃-Lösung wurden dann unter kräftigem Rühren zügig ca. 740 ml einer 1 M NaOH-Lösung gegeben, so daß die Suspension nicht zum Stocken kam. Der pH-Wert wurde unter 7,0 gehalten. Es bildete sich ein rostbrauner Eisenhydroxidschlamm. Der pH-Wert wurde anschließend durch langsame Zugabe von 1 M NaOH auf 7,6 eingestellt und über einen Zeitraum von 60 Minuten nachreguliert. Zum Entfernen der Chlorid- und Natriumionen wurde die Ferrihydritsuspension auf Zentrifugenbecher verteilt und bei 9700 × g (Sorval SLA-3000, DuPont, Bad Homburg) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet wurde in demineralisiertem Wasser resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Dieser Waschprozeß wurde solange wiederholt bis im Überstand kein Chlorid (< 14 mM) mittels Chloridteststäbchen (Merck, Darmstadt) mehr nachgewiesen werden konnte. Nach dem letzten Waschgang wurde das Ferrihydrit in destilliertem Wasser resuspendiert. Um die Ausbeute zu bestimmen, wurde das Trockengewicht von 5 ml dieser Suspension bestimmt.

2.1.2 Komplexmedium # 7

Stamm FAc12 wurde für aerobe Wachstumsversuche sowohl auf Fest-, wie auch in Flüssigkomplexmedium übertragen (Tab. B.2).

Tab. B.1: Komplexmedium # 7

Komponente	Menge [g l H ₂ O ⁻¹]
Glucose	1
Pepton	1
Hefeextrakt	1
Agar	15

2.1.3 CY-Agar (nach Reichenbach und Dworkin, 1993)

Für die Stammhaltung von *Stigmatella aurantiaca* und physiologische Tests mit Stamm FAc12 wurden CY-Agarplatten eingesetzt (Tab. B.3).

Tab. B.3: CY-Agar

Komponente	Menge [g l H ₂ O ⁻¹]
Casiton (Difco, Detroit, Michigan, U.S.A.)	3
Hefeextrakt (Difco, Detroit, Michigan, U.S.A.)	1
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1
Agar	15

Der pH-Wert wird vor dem Autoklavieren mit 1 M NaOH bzw. 1 M HCl auf 7,2 eingestellt.

2.1.4 VY/2-Agar (nach Reichenach und Dworkin, 1993)

Stamm FAc12 wurde auf VY/2-Agarplatten auf bakteriolytische Fähigkeiten (Lyse von Hefezellen mit von Stamm FAc12 synthetisierten und ausgeschiedenen Exoenzymen) überprüft (Tab. B.4)

Tab. B.4: VY/2-Agar

Komponente	Menge [g l H ₂ O ⁻¹]
Bäckerhefe	5
CaCl ₂ · 2 H ₂ O (Basismedium)	1
Cyanocobalamin (Basismedium)	0,0005
Agar (Basismedium)	15

Mit der Bäckerhefe wird eine Stammlösung mit H₂O hergestellt. Diese wird dem noch warmen Basismedium zugefügt und mit diesem vermischt. Das Basismedium wird vor dem Autoklavieren mit steriler 1M NaOH bzw. steriler 1M HCl auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt.

2.1.5 WAT-Agar (nach Reichenbach und Dworkin, 1993)

WAT-Agarplatten wurden eingesetzt, um Stamm FAc12 auf die physiologische Fähigkeit zu überprüfen, unter Substratmangelbedingungen Fruchtkörper bilden zu können (Tab. B.5).

Tab. B.5: WAT-Agar

Komponente	Menge [g l H ₂ O ⁻¹]
CaCl ₂ · H ₂ O	1
Agar	15

Der pH-Wert wird vor dem Autoklavieren mit steriler 1 M NaOH, bzw. steriler 1 M HCl auf 7,2 eingestellt.

2.1.6 R2A-Agar mit 10 mM Fumarat (nach Sanford *et al.*, 2002)

Für die Stammhaltung von „*Anaeromyxobacter dehalogenans*“ wurden R2A-Agarplatten oder R2A-Flüssigmedium (Difco, Detroit, Michigan, U.S.A.) anoxisch hergestellt. Ein Aliquot der zuvor unter anoxischen Bedingungen hergestellten, sterilen Fumaratstammlösung wurde dem noch warmen R2A-Medium zugefügt. Das R2A-Flüssigmedium wurde in 100 ml Serumflaschen unter N₂/CO₂-Atmosphäre mit einer Gasphase von N₂/CO₂ abgefüllt und mit einem Butyrgumistopfen verschlossen.

2.1.7 CT-Medium mit 5 mM Glucose und 0,5 µg ml⁻¹ Vitamin B₁₂ (nach Reichenbach und Dworkin, 1993)

Stigmatella aurantiaca wurde auf die physiologische Fähigkeit dissimilatorisch Eisen(III) reduzieren zu können überprüft. Dafür mußte dieser Mikroorganismus zunächst von Fest- (z.B. VY/2-Agar oder CY-Agar) auf oxisches Flüssigmedium (CT-Medium) übertragen werden (Tab.B.6).

Tab. B.6: CT-Medium

Komponente	Menge
Casiton	2%
MgSO ₄ · 7 H ₂ O (seperat autoklaviert)	8 mM
Kaliumphosphatpuffer, pH-Wert 7,2	10 mM

5 mM Glucose und 0,5 µg ml⁻¹ Vitamin B₁₂ werden dem erkalteten Medium nach dem Autoklavieren aus sterilen Stammlösungen zugegeben.

2.2 Kultivierungstechnik

Stammkulturen und Kulturen für Experimente von Stamm FAc12 wurden stets in 50 ml Schraubdeckelflaschen ohne Gasraum gezogen. War eine Gasphase bei der Kultivierung notwendig, wurde das Medium ebenfalls in 50 ml Schraubdeckelflaschen eingefüllt, aber die Flaschen wurden nur zu 2/3 unter N₂/CO₂-Gasstrom gefüllt. Anschließend wurde die N₂/CO₂-Atmosphäre in der Schraubdeckelflasche durch die entsprechenden Gase ersetzt und die

Flasche bei einem leichten Gasüberdruck mit einem Butylstopfen verschlossen. Anoxische Inkubation von Agarplatten erfolgte in Exsikatoren unter einer N₂/CO₂-Atmosphäre.

Alle Inkubation erfolgten, wenn nicht anders erwähnt, bei 30°C.

2.3 Anreicherung und Isolierung

Die Anreicherung eisenreduzierender Bakterien wurde in 50 ml Schraubdeckelflaschen angesetzt. Die Anreicherungsmedien enthielten entweder 10 mM Acetat, 10 mM Propionat, H₂/CO₂ (80/20) oder keinen Elektronendonator und 30 mM Ferrihydrit.

112 Tage alte Reiswurzeln der Art *Oryza sativa* Variante Koral, Lido oder Roma wurden als Inokulum eingesetzt. Die Reiswurzeln wurden vorher auf zwei unterschiedliche Methoden präpariert: **A)** 5 g Reiswurzeln (gereinigt mit Leitungswasser) wurden 30 Minuten lang in 45 ml 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH-Wert 6,8) mit 50 ml 0,2 mm (Ø) Glasperlen bei 190 rpm auf einem Rotationsschüttler inkubiert. **B)** Die Reiswurzeln werden nach der Reinigung mit Leitungswasser bei –20°C eingefroren und anschließend mit einem ebenfalls –20°C kalten Mörser mit Pistill zerrieben. 5 g dieser Reiswurzelsuspension werden in 45 ml Kaliumphosphatpuffer (pH-Wert 6,8) gegeben. Die Anreicherungsmedien werden mit jeweils 5 ml von A) oder B) angeimpft und anschließend im Dunkeln bei 30°C inkubiert. Insgesamt wurden 18 Anreicherungskulturen angesetzt (1. *Oryza sativa* Variante Koral (Glasperlen) mit Acetat, 2. *Oryza sativa* Variante Lido (Glasperlen) mit Acetat, 3. *Oryza sativa* Variante Roma (Glasperlen) mit Acetat, 4. *Oryza sativa* Variante Koral (Mörser) mit Acetat, 5. *Oryza sativa* Variante Lido (Mörser) mit Acetat, 6. *Oryza sativa* Variante Roma (Mörser) mit Acetat, ..., 16. *Oryza sativa* Variante Koral (Mörser) mit H₂/CO₂, 17. *Oryza sativa* Variante Lido (Mörser) mit H₂/CO₂, *Oryza sativa* Variante Roma (Mörser) mit H₂/CO₂).

Das Wachstum der eisenreduzierenden Bakterien wurde durch Eisen(II)zunahme (mit Teststäbchen von Merck, Darmstadt) und Farbveränderung des Mediums (von braun nach schwarz) durch Magnetitbildung (Mischoxid aus Fe(III) und Fe(II)) im Vergleich zu den substratfreien Kontrollen verfolgt. Vor der Fe(II)bestimmung mit den Teststäbchen wurde eine einstündige Extraktion der Probe (150 µl) mit 150 µl 1 M HCl durchgeführt.

Sobald ein deutliches Wachstum angezeigt war, wurden 10% der Anreicherungskultur in frisches Medium übertragen. Nach mehreren Übertragungen wurden Isolierungsversuche mit der Tiefagar-Verdünnungsreihenmethode (Widdel und Bak, 1992) unternommen. Um die Kolonien besser erkennen zu können, wurde hierbei Fe(III)citrat und nicht Ferrihydrit als Elektronenakzeptor eingesetzt. Nach dem Ausverdünnen des Inokulums (eingesetzt 100 µl)

wurden die 6-8 Agarröhrchen mit Butylstopfen verschlossen und mit N₂/CO₂ oder H₂/CO₂ begast. Die Tiefagar-Verdünnungsreihen wurden bei 30°C inkubiert.

Reinheitskontrollen:

Reinkulturen wurden in 40 mM Fe(III)citratmedium überimpft, welches 10 mM Acetat, 5 mM Pyruvat, 2 mM Glucose und 0,04% Hefeextrakt enthielt, so daß eventuell vorhandene anaerobe Kontaminanten gute Wachstumsbedingungen vorfanden. Die Reinheitskontrolle von Kulturen unter oxidischen Bedingungen wurde in flüssigem Komplexmedium durchgeführt. Bei weiterführenden Versuchen (z.B. Substrattests) wurde stets die Reinheit der Kultur durch mikroskopische Kontrolle überprüft.

2.4 Methoden zur Charakterisierung eisenreduzierender Bakterien

2.4.1 Physiologische Tests

Wachstumsexperimente mit Acetat als Substrat (Energie- und Kohlenstoffquelle) und verschiedenen Elektronenakzeptoren (Fe(III)citrat, Ferrihydrit) wurden in 50 ml Schraubdeckelflaschen mit (80% H₂/ 20% CO₂) oder ohne Gasatmosphäre angesetzt. Alle Flaschen wurden 4-8 Wochen bei 30°C inkubiert und im Vergleich zur substratfreien Kontrolle auf Trübung überprüft.

Wurde Stamm FAc12 auf myxobakterielle physiologische Eigenschaften wie z.B. die Fruchtkörperbildung überprüft, mußte stets gewährleistet sein, daß genügend Zellen (10⁵-10⁶) (Reichenbach, 1999) für die Morphogenese zur Verfügung standen. Dafür wurde entweder aus einer Agarplatte ein stark bewachsenes Stück steril ausgeschnitten oder eine Zellsuspension mit 10¹⁰ Zellen ml⁻¹ hergestellt und z.B. auf Wasseragarplatten übertragen.

2.4.2 Phylogenetische Methoden

Die Methoden, die zur vergleichenden phylogenetischen Analyse der 16S rRNA-Gensequenzen von einzelnen Mikroorganismen angewandt wurden, werden ausführlich unter B. 4 beschrieben.

2.5 Wachstumsversuch mit Stamm FAc12

Um das Wachstum von Stamm FAc12 durch dissimilatorische Eisenreduktion zu dokumentieren, wurde dieser Mikroorganismus in Süßwassermedium (B.2.1.1) mit 5 mM Acetat und 40 mM Fe(III)citrat kultiviert. Zu diesem Zweck wurden gleichzeitig 30 Schraubdeckelflaschen mit je 50 ml Medium gefüllt und mit 10% Stamm FAc12-Vorkultur inokuliert und anschließend bei 30°C inkubiert. Die Fe(II)-, Acetat- und Proteinkonzentration wurde zu jedem Meßpunkt während des Wachstumsversuchs in drei Kulturflaschen bestimmt. Hierfür wurden aus jeder Kulturflasche 3 ml Kulturflüssigkeit entnommen, durch einen 0,2 µm Filter aus regenerierter Zellulose (Sartorius, Göttingen) gefiltert und bis zur Bestimmung der Acetatkonzentration (B.3.1) bei -20°C eingefroren. Zur Extraktion des Eisens in den Kulturen wurde wie unter B.3.2 beschrieben weiter verfahren. Die Proteinkonzentration wurde in 40 ml Kultur mit der Biorad-Microassay-Methode (Biorad-Laboratories, München) bestimmt (B.3.3).

3. Analytische Methoden

3.1 Nachweis von organischen Säuren (Krumböck und Conrad, 1991)

Zur Bestimmung wurde das Verfahren der Ionenausschlußchromatographie mittels eines HPLC-Systems (Sykam, Gilching) verwendet. Das System bestand aus einer Pumpe (S 1000) und einem temperierbaren Säulenofen (S4110). Die Proben wurden durch einen automatischen Probenaufgeber Jasco 851-AS (Jasco, Japan) aufgegeben, durch eine Säule der Firma Biorad (Richmond, U.S.A.) aufgetrennt und mit einem Brechungsindex-Detektor (RI-Detektor Typ Erc-7512, Firma Erma, Tokio) detektiert.

Meßbedingungen:

Säule	Material: Edelstahlsäule Länge: 30 cm, Innendurchmesser: 7,8 mm Trennmaterial: Aminex HPX 87 H
Ofentemperatur	65°C
Fließmittel	1 mM Schwefelsäure mit einem Fluß von 0,8 ml/min
Detektor	Temperatur: 40°C, Meßzellvolumen: 7 µl

Zur Auswertung diente das Computerprogramm Peak Simple (SRI-Instruments, Torrence, U.S.A.). Die Eichung erfolgte mit einem Standard, der folgende Verbindungen in einer Konzentration von jeweils 100 μM enthielt: Lactat, Formiat, Acetat, Butyrat, Valerat und Propionat. Zusätzlich wurde ein Eichstandard mit einer Acetatkonzentration von 50 μM eingesetzt. Zur Identifikation der Peaks wurden die Retentionszeiten der Proben mit denen der Eichstandards verglichen.

3.2 Nachweis von Eisen(II) und Gesamteisen (modifiziert nach Lovley und Phillips, 1987 und Chao und Zhou, 1983)

Zur Bestimmung der Fe(II)konzentration wurde das Reagenz Ferrozin (3-[2-Pyridyl]-5,6-bis(4-phenylsulfonsäure-1,2,3-triazin-Dinatriumsalz)) verwendet. Drei Ferrozinmoleküle reagieren mit einem Fe^{2+} -Ion zu einem farbigen Komplex (Stookey, 1970). Ferrozin reagiert nicht mit Fe^{3+} . Das Ferrozin-Reagenz wurde 0,1%ig (v/v) in 200 mM HEPES-Puffer (N-2-Hydroxyl-ethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure) gelöst und mit NaOH auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt. Zur Extraktion des Eisens wurden die Proben 1 h (Bakterienkulturen) oder 24 h (Boden oder Reisswurzelpflanzen) in 0,5 M HCl (Endkonzentration) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Extraktion wurden 100 μl Probe mit 1 ml Ferrozinreagenz gemischt und die Extinktion dieser Mischung bei 562 nm an einem Photometer (UVIKON Spektrophotometer 930, Kontron-Instruments GmbH, Stuttgart) bestimmt. Bei Umweltproben (100 μl) wurden vor der photometrischen Messung mit 1 ml Ferrozinreagenz in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß gemischt und 5 min bei $680 \times g$ zentrifugiert (Hettich Micro 12-24, Tuttlingen). Von jeder Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Als Blindwert wurde die Extinktion von 100 μl 0,5 M HCl mit 1 ml Ferrozinreagenz genutzt. Die Eichgerade wurde in Doppelbestimmung aus Verdünnungen einer 2 mM FeCl_2 -Lösung (gelöst in 0,5 M HCl) ermittelt. Durch die Steigung der Eichgeraden wurde die Fe(II)konzentration der Proben errechnet.

Bei der Gesamteisenbestimmung wurde das Eisen mit 0,5 M HCl extrahiert. Eine 0,25 M HCl-Lösung des extrahierten Eisens (100 μl) wurde mit 2 ml einer 0,25 M Hydroxylaminhydrochloridlösung (gelöst in 0,5 M HCl) 2 h bei 60°C inkubiert. Dadurch wurde das Fe(III) der Probe zu Fe(II) reduziert. Die Bestimmung des Gesamteisens, das sich nach dieser Reduktion aus dem in der Probe vorhandenen Fe(II) und dem zu Fe(II) reduzierten Fe(III) zusammensetzte, erfolgte mit dem Ferrozinreagenz wie oben beschrieben.

3.2.1 Berechnung der Eisenkonzentrationen in Umweltproben

3.2.1.1 Wurzel

Die mit Hilfe der Eichgeraden ermittelte Mikromolarität [μM] der Proben-HCl-Lösung wurde mit der folgenden Formel in Mikromol pro Gramm Trockensubstanz Wurzel umgerechnet.

$$W = \frac{M}{1000} \cdot \frac{V_{extr}}{G_{wu}} \cdot n$$

W: Mikromol pro Gramm Trockengewicht Wurzel [$\mu\text{mol g Trockengewicht Wurzel}^{-1}$]

M: mit Hilfe der Eichgeraden ermittelte Mikromolarität im Wurzelextrakt

V_{extr}: Volumen der 0,5 M HCl-Lösung, in der das Eisen der Wurzeln extrahiert wurde

G_{wu}: Trockengewicht der Wurzelprobe in Gramm

n: evtl. Verdünnungsfaktor der Wurzelprobe

3.2.1.2 Reisfeldboden

Die mit Hilfe der Eichgeraden ermittelte Mikromolarität wurde mit folgender Formel in Mikromol pro Gramm Trockengewicht Reisfeldboden umgerechnet

$$K = \frac{M}{1000} \left(\frac{(V_{extr} + V_{po})}{(S - G_{po})} \right)^n$$

K: Mikromol pro Gramm Trockengewicht Reisfeldboden [$\mu\text{mol g Trockengewicht Reisfeldboden}^{-1}$]

M: mit Hilfe der Eichgeraden ermittelte Mikromolarität im Reisfeldbodenextrakt

V_{extr}: Volumen der 0,5 M HCl, in der das Eisen des Reisfeldbodens extrahiert wurde

V_{po}: Volumen des Porenwassers in ml (gravimetrisch in einer Referenzprobe bestimmt und anschließend berechnet)

S: Gewicht der Reisfeldboden-Porenwasserprobe

G_{po}: Gewicht des Porenwassers der Probe in Gramm

n: evtl. Verdünnungsfaktor der Reisfeldbodenprobe

3.3 Nachweis von Protein

Die Proteinkonzentration wurde mit dem Biorad-Microassay (Biorad-Laboratories, 1990) nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt. Das Testprinzip beruht hierbei auf einer pH-Verschiebung des Absorptionsmaximums (von 465 nm zu 595 nm) von Coomassie Brilliantblau R250 in saurer Lösung, wenn das Molekül an Protein bindet. Hierfür wurden zunächst 40 ml Zellkultur bei $4000 \times g$ (Sorvall, DuPont, Bad Homburg) 20 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 4 ml 0,1 M HEPES-Puffer (pH-Wert 6,8) resuspendiert. Ein Aliquot (200 μ l) dieser Zellsuspension wurde dann mit 50 μ l 10 M NaOH versetzt und 15 Minuten lang bei 100°C inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei $13000 \times g$ für 5 Minuten wurden 100 μ l des Überstandes mit 0,2 ml Biorad-Proteinfarbstoffreagenz versetzt und die Absorption dieser Lösung nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur bei 595 nm an einem Photometer (UVIKON Spektrophotometer 930, Kontron-Instruments GmbH, Stuttgart) bestimmt. Als Eichstandard wurde Rinderserumalbumin (0-8 μ g pro 100 μ l 0,1 M HEPES-Puffer, pH-Wert 6,8) benutzt. Blindwert (0,1 M HEPES-Puffer, pH-Wert 6,8), Eichgeradenproben und Proben wurden doppelt bestimmt.

4. Molekularbiologische Methoden

4.1 Extraktion von DNA

4.1.1 Extraktion von genomischer DNA

Die Zellen aller in dieser Arbeit verwendeter Reinkulturen wurden durch Hitze aufgeschlossen. Dafür wurde entweder eine Kolonie des betreffenden Mikroorganismus mit einem Zahnstocher von der Agarplatte gepickt und in 60 μ l sterilem Wasser resuspendiert oder es wurden 60-150 μ l einer Flüssigkultur direkt in ein steriles Reaktionsgefäß überführt. Die jeweiligen Zellsuspensionen wurden dann für 10 Minuten aufgeköcht und anschließend bei 4°C und $20800 \times g$ für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend in ein neues steriles Reaktionsgefäß überführt. Ein 1 μ l-Aliquot des Überstands wurde routinemäßig in die PCR eingesetzt.

4.1.2 Extraktion von Umwelt-DNA

5 mg Frischmaterial wurden mit 1 ml Extraktionspuffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 50 mM EDTA, pH 8,0; 500 mM NaCl; 1 mM DTT) in einem sterilen Glashomogenisator (Braun, Melsungen) homogenisiert. Das so „gepotterte“ Frischmaterial wurde in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Danach wurde das Material dreimal einer „Gefrier-Tau“-Prozedur (je 2 min -70°C und 65°C) unterworfen. Nach Zugabe von 2 mg Lysozym wurde die Probe 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden 0,1 mg Proteinase K und 50 μl einer 10%igen SDS-Lösung zugegeben und erneut unter regelmäßigem Mischen bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 150 μl einer 10%igen SDS-Lösung zugegeben, der Ansatz für 10 min bei 65°C inkubiert, mit 400 μl einer 5 M Kaliumacetat-Lösung gemischt und 20 min auf Eis gestellt. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei $13000 \times g$ und 4°C wurde der wässrige, DNA-haltige Überstand abgehoben und in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Zur weiteren Aufreinigung wurde die wässrige Phase je einmal mit gleichen Volumina Chloroform und Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) ausgeschüttelt. Die Umwelt-DNA wurde durch Zugabe von 1 Vol. Isopropanol für 30 min bei Raumtemperatur gefällt, für 15 min bei $13000 \times g$ abzentrifugiert, das DNA-Pellet mit 500 μl 70%igem Ethanol gewaschen (10 min bei $13000 \times g$ und 4°C zentrifugiert), getrocknet und schließlich in 100 μl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl und 1 mM EDTA, pH 8,0 (Sambrook *et al.*, 1989)) aufgenommen.

4.2 DNA-Amplifikation mittels PCR (nach Mullis *et al.*, 1987)

Zur Amplifikation bakterieller 16S rRNA-Gene wurden in dieser Arbeit PCR-Systeme mit unterschiedlichen Spezifitäten genutzt. Die dafür jeweils genutzten Oligonukleotid-Primer sind in Tabelle B.7 aufgelistet. Sämtliche PCR-Ansätze wurden in einem Gesamtvolumen von 100 μl durchgeführt. Die Reaktionsmischung enthielt 0,5-2,0 μl der jeweiligen DNA, 10 μl 10 x PCR-Puffer (GeneAmp®, PE Applied Biosystems (Weiterstadt)), 150 nmol MgCl_2 (GeneAmp®, PE Applied Biosystems (Weiterstadt)), 20 nmol je Desoxynukleotid (NucleicPlus, Amerham Pharmacia Biotech (Braunschweig)), je 30 pmol pro Primer, 2,5 U Taq-Polymerase (AmpliTaq® DNA-Polymerase, PE Applied Biosystems (Weiterstadt)) und 72 μl H_2O dest. Als Negativkontrolle diente bei jeder Amplifikation der jeweilige Reaktionsansatz mit Zugabe von H_2O anstelle von DNA.

Zur Überprüfung einer erfolgreichen PCR-Amplifikation wurden ein 10 μl -Aliquot auf einem 1,5%igen Agarosegel [w/v] kontrolliert.

Tab. B.7: Primer für die PCR-Amplifikation von 16S rRNA-Genen

Primer-Bezeichnung	Primersequenz 5' 3'	Literaturquelle
EUB 9f	GAG TTT GAT CMT GGC TCA G	Lane, 1991
EUB 1492r	ACG GYT ACC TTG TTA CGA CTT	Weisburg <i>et al.</i> , 1991
FAc12 66f	CGA GAA AGC CCG CAA GGG	diese Arbeit
FAc12 432r	CGT CCC TCG CGA CAG TGC	diese Arbeit
M13f	GTT TTC CCA GTC ACG AC	TOPO TM Clonning®
M13r	CAG GAA ACA GCT ATG AC	TOPO TM Clonning®

M = (A/C)

Die Primer-Bezeichnungen entsprechen den korrespondierenden Positionen der 16S rRNA-Gensequenz von *Escherichia coli* (Brosius *et al.*, 1978)

Tab. B.8: Temperaturprofil für die Amplifikation der bakteriellen 16S rRNA-Gene

Nr.	Temperatur	Dauer	Funktion
1	94°C	5 min	anfängliche Denaturierung
2a	48°C	1 min	Primer-Anlagerung
2b	72°C	2 min	DNA-Synthese
2c	94°C	0,5 min	Denaturierung
Schritt 2 wurde 25-45 mal wiederholt (variabel)			
3a	48°C	1 min	Primer-Anlagerung
3b	72°C	7 min	DNA-Synthese
4	4°C		Kühlprogramm

a) Amplifikation bakteriellen 16S rRNA-Gene

Zur Amplifikation der bakteriellen 16S rRNA-Gene wurden Oligonukleotid-Primer eingesetzt, die an hochkonservierte Sequenzabschnitte des 16S rRNA-Gens binden (EUB 9f und EUB 1492r). Diese Primerkombination ermöglicht die PCR-Amplifikation der 16S rRNA-Gene eines phylogenetisch breiten Spektrum der Domäne *Bacteria* (Lane, 1991;

und Weisburg *et al.*, 1991). Das Temperaturprofil dieses PCR-Systems ist in Tabelle B.8 dargestellt.

b) Amplifikation der 16S rRNA-Gene von Stamm FAc12 und Verwandten

Zur PCR-Amplifikation der 16S rRNA-Gene von Stamm FAc12 und Verwandten wurde ein spezifisches PCR-System entwickelt. Die spezifischen Primer FAc12 66f und FAc12 432r binden an einen Bereich des 16S rRNA-Gens mit Nukleotidsignaturen für diese Gruppe. Die Spezifität dieses PCR-Systems wurde mit *Escherichia coli* (drei Basenfehlpaarungen zu der Primersequenz von FAc12 432r) als Negativkontrolle und einer Positivkontrolle (genomische DNA von Stamm Fac12 und die 16S rRNA-Gene von DRc-90tw-25, DRc-90tw-47, DRc-90tw-58, DRc-90tw18, DRc-90tw-12, DRc-45tw-51 und DRc-90tw-55) verifiziert. *E. coli* konnte dabei nicht durch einen Mikroorganismus ersetzt werden, der in seinem 16S rRNA-Gen eine oder zwei Basenfehlpaarungen zu den Primersequenzen von FAc12 66f und FAc12 432r aufweist, da ein solcher Mikroorganismus zur Zeit noch nicht verfügbar ist. Mit Ausnahme der Primer-Anlagerungstemperatur, die für dieses PCR-System 65°C betrug, wurde das PCR-Program genutzt, was für die Amplifikation der bakteriellen 16S rRNA-Gene beschrieben (Tab. B.8) wurde.

c) Amplifikation der 16S rRNA-Gene von Stamm FAc12 und Verwandten II

Zur PCR-Amplifikation der 16S rRNA-Gene von Stamm FAc12 und Verwandten wurde ein zweites spezifisches PCR-System entwickelt. Die Amplifikation von 16S rRNA-Genen von Stamm FAc12 und Verwandten wurde mit den Primern EUB 9f und FAc12 432r durchgeführt. Die Spezifität dieses PCR-Systems wurde mit *Methylosinus sporium* (drei Basenfehlpaarungen zu der Primersequenz von FAc12 432r) als Negativkontrolle, genomischer DNA von Stamm FAc12 und Umwelt-DNA verifiziert. *M. sporium* konnte dabei nicht durch einen Mikroorganismus ersetzt werden, der eine oder zwei Basenfehlpaarungen zur Primersequenz von FAc12 432r aufweist, da ein solcher Mikroorganismus zur Zeit noch nicht verfügbar ist. Mit Ausnahme der Primer-Anlagerungstemperatur, die für dieses PCR-System 61°C betrug, wurde das PCR-Programm genutzt, was für die Amplifikation der bakteriellen 16S rRNA-Gene beschrieben (Tab. B.8) wurde.

d) Amplifikation klonierter 16S rRNA-Gene aus Vektoren

Das Temperaturprofil unterscheidet sich von dem unter Tab. B.8 beschriebenen nur durch eine Primer-Anlagerungstemperatur von 55°C und einer maximalen Amplifikationszyklenanzahl von 25.

4.3 Agarose-Gelelektrophorese

Aliquots (10 µl) aller PCR-Produkte wurden zur Abschätzung der DNA-Konzentrationen auf ein 1,5 %iges [w/v] Agarosegel aufgetragen. Als Längen- und Konzentrationsstandard wurde parallel „Smartladder“ (Eurogentec, Seraing, Belgien) aufgetragen. Nach der Auftrennung wurde das Gel in einer 0,001 % [v/v] Ethidiumbromidlösung gefärbt und mit einer Videokamera (Gel Print 2000i, BioPhotonics Corporation, Ann Arbor, U.S.A.) aufgenommen.

4.4 Erstellung von 16S rRNA-Gen-Klonbibliotheken

Das Amplifikat bakterieller 16S rRNA-Gene aus der Umwelt-DNA wurde mit Hilfe von dem „TOPOTMTA Cloning Kit[®]“ (Invitrogen, de Schelp, Niederlande) nach Herstelleranweisung kloniert. Dieses Klonierungssystem erlaubt eine direkte Ligation der PCR-Produkte in die mitgelieferten Vektor pCRTMII ohne eine Vorbehandlung mit modifizierenden Enzymen. Dabei wird die Eigenschaft der *Taq*-Polymerase ausgenutzt, während der DNA-Synthese Adenin-Überhänge am 3'-Ende der PCR-Produkte zu erzeugen. Diese Überhänge an den PCR-Produkten können dann mit den Thymidin-Überhängen an dem mitgelieferten Vektor ligiert werden. Die Transformation des Vektors erfolgte in ebenfalls mitgelieferte kompetente Zellen des *Escherichia coli* Stammes INV 4F'.

Der verwendete Vektor weist eine Kanamycinresistenz auf und ermöglicht so nur transformierten *E. coli*-Zellen Wachstum in Gegenwart dieses Antibiotikums. Der Einbau von Fremd-DNA in den Vektor wird durch das Reporter-Gen *lac Z* sichtbar. Dessen Genprodukt, die β-Galaktosidase, wird dadurch inaktiviert. Das inaktivierte Enzym kann das chromogene Substrat X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-Galactopyranosid) nicht mehr umsetzen und macht somit eine Farbselektion möglich. Blaue Bakterienkolonien weisen auf eine aktive, weiße Kolonien auf eine inaktive β-Galaktosidase hin. Die *E. coli*-Zellen wurden nach der Transformation auf Luria-Bertani (LB)-Agarplatten (10 g l⁻¹ NaCl, 10g l⁻¹ Trypton, 5 g l⁻¹ Hefeextrakt und 15 g l⁻¹ Agar) mit Kanamycin (50 µg ml⁻¹) ausplattiert.

Die LB-Agarplatten mit Kanamycin wurden dafür zunächst mit 25 µl einer 25mg ml⁻¹ Dimethylformamid X-Gal-Lösung versehen. Die so behandelten Agarplatten wurden dann über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die weißen Kolonien mit sterilen Zahnstochern „gepickt“ und sowohl auf eine LB-Kanamycin-X-Gal-Master-, wie auch auf eine Arbeitsplatte übertragen. Auch diese Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend bei 4°C aufbewahrt.

4.4.1 Analyse der 16S rRNA-Gensequenzen

Um die klonierte 16S rRNA-Gensequenz aus den Klonen zu präparieren, wurde Zellmaterial weißer *E. coli*-Kolonien direkt in eine PCR-Amplifikation eingesetzt. Dabei wurden die klonierten 16S rRNA-Gensequenz-Fragmente entweder mit Primern (M13f und M13b) für die flankierenden Regionen des Vektors oder direkt mit Primern, wie z.B. FAc12 66f und FAc12 324r oder EUB 9f und EUB 1492r, amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden mit QIAquickTM-Säulen (Qiagen GmbH, Hilden) nach Herstelleranweisung aufgereinigt. Ein Aliquot dieser aufgereinigten Amplifikate wurde in die Sequenzierungsreaktion eingesetzt.

4.5 Sequenzierung der 16S rRNA-Gensequenzen

Die DNA wurde nach der Kettenabbruchmethode von Sanger (1977) mit Hilfe des „ABI PRISMTM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit“ (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) sequenziert. Bei dieser zyklischen Sequenzierungs-Methode werden mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Didesoxynukleotide (= Terminatoren) verwendet, die im Gemisch mit unmarkierten Desoxynukleotiden in der PCR-Lösung vorliegen. Während der DNA-Synthese bricht jeweils bei den Didesoxy-Terminatoren die PCR-Reaktion ab. Es entstehen so verschieden lange Fragmente, die am 3'-Ende ein markiertes Nukleotid besitzen. In einem Ansatz können so alle vier markierten Didesoxynukleotide eingesetzt werden, da die vier verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe Emissionsmaxima in unterschiedlichen Wellenlängen bereichen (535-605 nm) besitzen.

Tab. B.9: Oligonukleotid-Primer zur Sequenzierung von 16S rRNA-Genen

Primer-Bezeichnung	Primersequenz 5' 3'	Literaturquelle
9-27f	GAG TTT GAT CMT GGC TCA G	Lane, 1991
343-357f	TAC GGG ASG CAG CAG	Lane, 1991
343-357r	CTG CTG CCT CCC GTA	Lane, 1991
519-536f	CAG CMG CCG CGG TAA TWC	Lane, 1991
519-536r	GWA TTA CCG CGG CKG CTG	Lane, 1991
1100-1115f	CAA CGA GCG AAC CCT	Lane, 1991
1100-1115r	AGG GTT GCG CTC GTT G	Lane, 1991
1492-1512r	ACG GYT ACC TTG TTA CGA CTT	Weisburg <i>et al.</i> , 1991
M13f	GTT TTC CCA GTC ACG AC	TOPO TM Clonning®
M13r	CAG GAA ACA GCT ATG AC	TOPO TM Clonning®

M = (A/C); S = (C/G); W = (A/T); Y = (C/T)

Die Primer-Bezeichnungen entsprechen den korrespondierenden Positionen der 16S rRNA-Gensequenz von *Escherichia coli* (Brosius *et al.*, 1978)

Die Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 20 µl (6 µl „Terminator Ready Reaction Mix“ (thermostabile Pyrophosphatase und AmpliTaq[®] DNA Polymerase, FS, Puffer, Desoxynukleotide und Didesoxynukleotide), 3 pmol des jeweiligen Sequenzierungsprimers (Tab. B.9) und entsprechende Menge an PCR-Produkt und Wasser) angesetzt. Die Sequenzierungsreaktion wurde in einem GeneAmp PCR System 9600 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt (Tab. B.10). Die Sequenzierungsprodukte wurden mit „Microspin G-50“-Säulen (Pharmacia Biotech, Freiburg) aufgereinigt. Die zu sequenzierenden Proben wurden auf ein 5%iges Polyacrylamidgel mit 8 M Harnstoff aufgetragen. Die Fragmentanalyse erfolgte durch eine kombinierte Elektrophorese- und Detektionseinheit (ABI Sequencer Modell 373) bei 16 h Elektrophoresedauer mit 27 W, 2500 V und 40 mA.

Tab. B.10: Temperaturprofil der Sequenzierungs-PCR

Nr.	Temperatur	Dauer	Funktion
1a	96°C	10 sec	Denaturierung der DNA
1b	50°C	5 sec	Primer-Anlagerung
1c	60°C	4 min	DNA-Synthese
Schritt 1 wurde 25x wiederholt			
2	4°C		Kühlprogramm

4.5.1 Phylogenetische Einordnung der 16S rRNA-Gensequenzen

Eine erste phylogenetische Einordnung der 16S rRNA-Gensequenzen wurde mit Hilfe der Datenbank des „Ribosomal Database Project“ (RDP, Maidak *et al.*, 1996) vorgenommen. Das Programm ermittelt die nächstähnliche Sequenz zur Zielsequenz und gibt einen Ähnlichkeitswert (S_{AB} -Wert) an. Die phylogenetische Verrechnung („Sequence Match“ version 2.7) beruht hierbei auf einem Vergleich von Heptameren und ist daher deutlich von der prozentualen Ähnlichkeit zu unterscheiden. Eine genauere phylogenetische Einordnung der 16S rRNA-Gensequenzen und deren Darstellung in Stammbäumen wurde computerunterstützt (SUN Ultra 1, Sun Microsystems, Grasbrunn) mit Hilfe der ARB-Software (Strunk und Ludwig, 1996) durchgeführt. Dafür wurden zunächst die Primär- und Sekundärstrukturen der 16S rRNA-Gensequenzen mit denen der nächstähnlichen verglichen (Ludwig, 1995; Maidak *et al.*, 1996; Van de Peer *et al.*, 1996), indem die jeweils homologen Nukleotidpositionen in Spalten angeordnet wurden (= „Alignment“). Die Sequenzdaten wurden anschließend in einen bereits bestehenden Stammbaum, der einen Großteil der derzeit verfügbaren 16S rRNA-Gensequenzen enthält, integriert. Dies erfolgte unter Anwendung der „Maximum Parsimony“-Kriterien (Fitch, 1971). Das bedeutet, daß die zu analysierende Sequenz derjenigen Sequenz in der Datenbank zugeordnet wurde, zu der die geringste Anzahl an Nukleotidsubstitutionen berechnet wurde. Für eine genauere phylogenetische Einordnung wurden weitere Stammbäume erstellt, um nur das nähere phylogenetische Umfeld der Klonsequenzen wiederzugeben. Diese Stammbäume wurden mit dem „Neighbor-Joining“-Algorithmus oder dem „Maximum-Likelihood“-Verfahren (Felsenstein, 1981) konstruiert. Das „Maximum-Likelihood“-Verfahren beruht auf dem Vergleich der einzelnen

Nukleotidpositionen und berechnet die Wahrscheinlichkeiten verschiedener phylogenetischer Verwandtschaftsverhältnisse auf der Basis vorgegebener Evolutionsmodelle. Diese Methode ist rechnerisch sehr aufwendig, hat sich aber für den Vergleich eng verwandter Sequenzen bewährt (Großkopf, 1998b). Dagegen liegt der „Neighbor-Joining“-Methode (Saitou und Nei, 1987) ein mathematischer Algorithmus zugrunde, welcher die Phylogenie der Sequenzen im paarweisen Vergleich berechnet. In diese Berechnungen („Neighbor-Joining“) geht, um eventuell aufgetretene multiple Basensubstitutionen zu berücksichtigen, ein evolutionärer Korrekturfaktor (Jukes und Cantor, 1969) ein. Die Knotenpunkte der „Neighbor-Joining“-Stammbäume wurden zusätzlich mit Hilfe einer „bootstrap“-Analyse (Efron, 1979; Felsenstein, 1985) überprüft. Hierbei werden von einem vorgegebenen Sequenzdatensatz beliebig viele (hier: 100-1000) Stammbäume (Replikate) konstruiert, wobei für jeden berechneten Stammbaum die Sequenzdaten zufallsmäßig leicht verändert werden. Prozentangaben drücken die statistische Häufigkeit aus, mit der die Knotenpunkte beim Vergleich aller errechneten Stammbäume an der entsprechenden Stelle rekonstruiert worden sind. Für die phylogenetische Verrechnung wurden weiterhin auf Basis der nächstähnlichen Sequenzen Filter konstruiert. Diese stellen sicher, daß in der Verrechnung hochvariable Bereiche ausgeschlossen werden. Die Berechnung solcher Filter erfolgte mit einem Invarianzkriterium von 50%, d.h. durch die Wahl der entsprechenden Filter wurden nur diejenigen Nukleotidpositionen zwischen besetzten homologen Positionen berücksichtigt, die bei 50% aller Sequenzen, auf denen die Filterberechnung beruht, das gleiche Nukleotid besitzen. Durch getrennte Verrechnungen der 5'- und 3'- Partialsequenzen wurden alle 16S rRNA-Gensequenzen auf mögliche Chimären, d.h. Sequenzen, die sich aus zwei verschiedenen Sequenztypen zusammensetzen (Liesack *et al.*, 1991; Koczynski *et al.*, 1994; Wang und Wang, 1996), getestet.

4.6 ARDRA-Analysen

„ARDRA“ („amplified ribosomal DNA restriction analysis“, Vaneechoutte *et al.*, 1992) ist eine DNA- Fingerabdruckmethode, die es ermöglicht, bakterielle Gattungen und Arten ohne Sequenzierung zu identifizieren. Hierfür werden zunächst entweder die 16S rRNA-Gene, 23S-rRNA Gene oder der gesamte rRNA- Genort mittels PCR amplifiziert. Die amplifizierten ribosomalen Gene (rDNA) werden dann mit einer Restriktionsendonuklease (mit tetramerer Erkennungsstelle) verdaut und auf einem Agarosegel aufgetrennt. Die dadurch erhaltenen Restriktionsmuster können dann als Fingerabdruck zur Identifizierung benutzt werden.

Zunächst wurden zwei Klonbibliotheken mit DNA, die aus 90 Tage alten Wurzeln zweier unterschiedlicher Reispflanzen extrahiert wurde, erstellt. Die hierfür genutzte DNA wurde unter Standardbedingungen mit universellen bakteriellen Primern (EUB 9f und EUB 1492r (Tab. B.7)) amplifiziert. Die entstandenen Umweltklone wurden nach abgeschlossener Blau-Weißselektion mit M13-Primern (Tab. B.7) reamplifiziert. Die entstandenen PCR-Produkte wurden auf ein 0,7%iges Agarosegel aufgetragen. In den Restriktionsverdau wurden nur DNA-Fragmente von 1500 Bp-Länge eingesetzt. Waren die Fragmente nur 200-600 Bp lang, wurden sie aufgrund einer nicht korrekt verlaufenden Transformation verworfen. Auch DNA-Fragmente von 1700 Bp wurden verworfen. Hierbei handelte es sich um mitochondriale DNA der Reispflanze. Die 1500 Bp langen 16S rRNA-Gensequenz-Fragmente wurden dann mit dem Restriktionsenzym *Hpa* II verdaut. Dieses Enzym wurde vorher durch den Verdau von acht Referenzklonen, die der FAc12-Gruppe zugehören (DR 90-25, DR 90-47, DR 90-58, DR 90-18, DR 90-12, DR 45'51, DR 90-55 und FAc12 (geklont)), ausgewählt. Außerdem wurden die Restriktionsendonukleasen *Hae* III und *Hinf* I auf ihr Auflösungsvermögen getestet. In den dreistündigen Restriktionsverdau bei 37°C wurden 14 µl PCR-Produkt, 2 µl Puffer B, 2 µl Wasser und 2 µl *Hpa* II eingesetzt. Dies entspricht einem Gesamtvolumen von 20 µl. Die gesamten 20 µl der geschnittenen DNA wurden anschließend auf ein 3,8%iges „Nusieve“-Agarosegel (Biozym Diagnostik, Oldendorf) aufgetragen und für 2,5 h bei 90 mV aufgetrennt. Als Längen- und Konzentrationsstandard wurde parallel eine „20 Bp ladder“ (Promega, Mannheim) aufgetragen. Auf jedem dieser Agarosegele befanden sich jeweils zwei Spuren mit dem „20 Bp ladder“-Größenmarker, vier Spuren mit den verdauten Referenzklonen aus der FAc12-Gruppe und acht Spuren mit den verdauten 16S rRNA-Gensequenz-Fragmenten der zu prüfenden Umweltklone. Nach einer Färbung in einer Ethidiumbromidlösung (4.3) wurden die erhaltenen Restriktionsfragmentmuster analysiert. Dies geschah über direkten Vergleich der Restriktionsmuster der Umweltklone mit denen der Referenzen. Als der FAc12-Gruppe zugehörig wurden die Umweltklone gewertet, die drei für diese Gruppe typische Banden aufwiesen, die allen Referenzen gemein waren.

4.7 T-RFLP-Analysen

Die „T-RFLP“-Analyse („terminal restriction fragment length polymorphism“, Liu *et al.*, 1997)) ermöglicht einen Vergleich komplexer mikrobieller Gemeinschaften über eine Restriktionsfragmentanalyse von PCR-vermittelten 16S rRNA-Gen-Amplifikaten. Für die T-RFLP-Analyse wurde der FAc12 66f Primer mit Carboxyfluorescein (FAM) markiert. Das durch die spezifische Amplifikation mit diesem FAM-markierten und dem FAc12 432r

Primer erhaltene Produkt wurde mit einer oder mehreren Restriktionsendonukleasen mit tetramerer Erkennungsstelle verdaut. Zunächst mußten aber Restriktionsendonukleasen gesucht werden, die die FAc12-Gruppe in möglichst viele unterschiedliche terminale Fragmente (=T-RFs) auftrennen können. Getestet wurden hierfür 9 verschiedene Restriktionsenzyme (*Alu* I, *Cfo* I, *Hae* III, *Hpa* II, *Hsp92* II, *Mbo* I, *Rsa* I, *Taq* I und *Tru9* I) in einem theoretischen Verdau von 8 bereits analysierten FAc12-Sequenzen (DR 90-25, DR 90-47, DR 90-58, DR 90-18, DR 90-12, DR 45'51, DR 90-55 und FAc12 (geklont)).

Um die Verteilung der FAc12-Gruppe in den Umweltproben zu untersuchen, wurden die FAM-markierten spezifischen Produkte mit den vorher theoretisch ermittelten Enzymen *Alu* I und *Rsa* I verdaut. Dazu wurde zunächst die extrahierte DNA aus den verschiedenen Umweltproben (wurden freundlicherweise von verschiedenen Mitarbeitern zur Verfügung gestellt, Tab. B.11) mit den spezifischen Primern FAc12 66f und FAc12 432b in 28 Zyklen unter PCR-Standardbedingungen amplifiziert. Nach Aufreinigung der spezifischen PCR-Produkte mit QIAquickTM-Säulen nach Herstelleranweisung, wurde in drei Zyklen mit dem FAM-markierten FAc12 66f und dem FAc12 432b Primer amplifiziert. Anschließend wurden wiederum die PCR-Produkt aufgereinigt (s. oben) und in den Restriktionsverdau eingesetzt. Hierfür wurden ca. 200 ng des jeweiligen PCR-Produktes mit jeweils 5 U *Alu* I und 5 U *Rsa* I (Promega, Mannheim), 1 µl Puffer B (Promega, Mannheim) und der entsprechenden Menge H₂O in einem Gesamtvolumen von 10 µl für drei h bei 37°C inkubiert. Nach dem Verdau wurden 2,5 µl der geschnittenen 16S rRNA-Gene mit 0,63 µl eines internen Längenstandards (Genescan-1000TMRox, PE Applied Biosystems, Weiterstadt) und 1,87 µl Formamid gemischt, für 3 min bei 100°C denaturiert und auf Eis gestellt. Anschließend wurden 5 µl dieser Mischung auf ein 6%iges Polyacrylamidgel mit 8,3 M Harnstoff aufgetragen. Die Restriktionsfragmente wurden auf einem DNA-Sequenziergerät (373A DNA-Sequenzer, PE Applied Biosystems, Weiterstadt) für 6 h bei 2500 V und 40 mA aufgetrennt. Das Fragmentmuster wurde mit der Genescan-Software (Version 2.1, PE Applied Biosystems, Weiterstadt) ausgewertet.

Tab. B.11: Mit T-RFLP-Analyse untersuchte DNA-Extrakte und ihre Quelle

DNA-Extrakt	Quelle
Reisfeldboden I	diese Arbeit
Reisfeldboden II; 1,5 mm	Thilo Henckel ^{a)}
Reisfeldboden II; 7,5 mm	Thilo Henckel ^{a)}
Wiesenboden I	Manigee Derakshani ^{a)}
Wiesenboden II	Peter Dunfield ^{a)}
Wiesenboden III	Manigee Derakshani ^{a)}
Kartoffelackerboden #6	Manigee Derakshani ^{a)}
Kartoffelackerboden #8	Manigee Derakshani ^{a)}
Waldboden; 0 cm	Manigee Derakshani ^{a)}
Waldboden; 0-5 cm	Manigee Derakshani ^{a)}
Waldboden; 5-10 cm	Manigee Derakshani ^{a)}
90 Tage alte Reiswurzeln (<i>Oryza sativa</i> Variante Roma)	diese Arbeit
112 Tage alte Reiswurzeln (<i>Oryza sativa</i> Variante Koral)	diese Arbeit
112 Tage alte Reiswurzeln (<i>Oryza sativa</i> Variante Lido)	diese Arbeit
112 Tage alte Reiswurzeln (<i>Oryza sativa</i> Variante Roma)	diese Arbeit

^{a)} MPI für terrestrische Mikrobiologie, Marburg

5. Reismikrokosmosversuch

5.1 Experimenteller Aufbau

Um den Einfluß des Reispflanzenwachstums auf die Population von Stamm FAc12 und Verwandte im Reisfeldboden und an der Reiswurzel zu untersuchen, wurden 15 kompartimentierte Mikrokosmen (3 Parallelen pro Probenahme) angesetzt. Dazu wurden zunächst Reiskörner (*Oryza sativa* Variante Koral) zum Vorkeimen auf feuchtes Fließpapier gelegt und für 8-10 Tage im Dunkeln bei 25°C inkubiert. Die weitere Anzucht der Reispflanzen erfolgte in PE-Plastikgefäßen (Länge 30 cm, Breite 15 cm und Höhe 15 cm). In diese wurden 4 kg trockener Reisfeldboden eingefüllt, und dieser wurde anschließend mit deionisiertem Wasser bis zur Sättigung gemischt. Die so präparierten Mikrokosmen wurden vor der Auspflanzung der Reiskeimlinge 7 Tage in der Phytokammer unter gefluteten Bedingungen (Wasserstand 2-5 cm über dem Boden) vorinkubiert. Drei Reiskeimlinge wurden in eine bodenfreie Nylon-Gazetüte (25 µm Maschengröße), die in der Mitte der Plastikgefäße angebracht war, gepflanzt. Für die Angabe des Pflanzenalters wurden die Tage ab dieser Pflanzung der Reiskeimlinge in die Gazetüte (d = 0) gezählt. Es wurden am 28.,

45., 75. und 95. Tag Proben genommen (3 Mikrokosmen pro Probenahme). Während des gesamten Experimentes wurde das verdunstete deionisierte Wasser ersetzt und „Unkraut“ entfernt. In der Phytokammer wurde die Temperatur und die Lichtintensität auf einen alternierenden Tag- (6-20 Uhr) und Nachtrhythmus (20-6 Uhr) eingestellt. Die Temperatur betrug in der Tagphase 25°C (mit Lichtintensitäten von 0,22-0,55 mmol m⁻² s⁻¹) und in der Nachtphase 20°C. Die Beleuchtung erfolgte über Leuchtstoffröhren (Sylvania, Cool White, 215 W). Die Luftfeuchtigkeit betrug 70 %.

5.2 Biomassebestimmung der Reispflanzen

Für die Biomassebestimmung wurde die Anzahl der Sprosse und Blätter pro Reis-pflanze bestimmt.

5.3 Porenwasserproben (Acetatbestimmung)

Zur Gewinnung von Porenwasser von der Reisswurzel wurden vor der Auspflanzung der Reiskeimlinge Sammlerelemente in die Gazetüten gelegt. Die Sammlerelemente bestanden aus Membranröhrchen (Porengröße 0,2 µm, X-Flow; Holland), die über Stahlkapillaren und „Iso Versinic“-Schlauch mit einer Kanüle über der Wasseroberfläche verbunden waren (Krüger, 2000). Für die Entnahme der Porenwasserproben wurden evakuierte Vakuurröhrchen verwendet. Noch in der Phytokammer wurde mit einem Röhrchen das noch im Sammler verbliebene Porenwasser entfernt und dann erst mit einem weiteren Röhrchen das Porenwasser für die Acetatbestimmung gesammelt. Das so gesammelte Porenwasser wurde durch einen 0,2 µm Filter aus regenerierter Zellulose (Sartorius, Göttingen) gegeben und bis zur Acetatbestimmung bei -20°C eingefroren.

Für die Acetatbestimmung im Bodenporenwasser wurden zunächst die Reis-pflanzen und Reiss-wurzeln aus den Mikrokosmen entfernt. Anschließend wurde das über dem Boden stehende Wasser vorsichtig dekantiert und eine Gesamtbodenprobe entnommen. Diese wurde vorsichtig gemischt. Ein Aliquot wurde in ein 1,5 ml Plastikreaktionsgefäß gegeben und in einer Tischzentrifuge (Type 5415, Eppendorf; Hamburg) bei 680 × g für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde durch einen 0,2 µm Filter aus regenerierter Zellulose (Sartorius, Göttingen) gegeben und bis zur Acetatbestimmung bei -20°C eingefroren.

5.4 Eisenbestimmung

Für die Gesamt- und Eisen(II)bestimmung wurden ca. 2 g Reiswurzeln oder 2 g schwere Reisfeldboden (Gesamtboden gemischt) aus den Mikrokosmen entnommen. Sofort nach der Entnahme wurden ca 0,5 g dieser Proben in ein mit 4,5 ml 0,5 M HCl gefülltes verschließbares Plastikreagenzröhrchen gegeben. Das Gewicht dieser mit HCl gefüllten Röhrchen wurde vor und nach der Zugabe der Probe bestimmt. Somit konnte errechnet werden, wieviel feuchte Reiswurzeln oder feuchter Reisfeldboden in die HCl-Lösung überführt wurde. Gleichzeitig wurden ca. 1,5 g der jeweiligen Probe in Aluschalen zur Trockengewichtsbestimmung überführt. Nach der Trocknung der Proben bei 80°C konnte somit der Anteil an Porenwasser in der jeweiligen in 0,5 M HCl befindlichen Probe bestimmt werden.

Um das in 0,5 M HCl lösliche Gesamt- und Eisen(II) vollständig zu extrahieren, wurden die Plastikreagenzröhrchen bei Raumtemperatur 24 h lang inkubiert. Ein Aliquot (0,1 ml) der HCl-Porenwasser-Reiswurzel-oder Reisfeldbodenproben wurde bei $6450 \times g$ (Zentrifuge Hettich) für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und Gesamteisen- und Eisen(II) wurden mit der Ferrozinmethode bestimmt. Die gemessenen Werte (μM) wurden anschließend in μmol pro Gramm trockene Reiswurzel oder trockener Reisfeldboden umgerechnet (3.2.1).

5.5 Quantifizierung von Stamm FAc12 und Verwandten

Die Anzahl der 16S rRNA-Gensequenzen von Stamm FAc12 und Verwandten pro Gramm Trockengewicht Reisfeldboden oder Reiswurzeln wurde über Verdünnungsreihen-PCR bestimmt. Dazu wurde die extrahierte DNA in Zehnerschritten mit Wasser verdünnt und je 1 μl der verdünnten DNA-Lösungen in die PCR-Reaktion eingesetzt. Es wurde die Anzahl der 16S rRNA-Gensequenzen in den einzelnen Proben sowohl mit dem PCR-System FAc12 II (4.2 a), wie auch mit dem PCR-System für Mitglieder der Domäne *Bacteria* (4.2 b) bestimmt. Für eine erfolgreiche PCR-Amplifikation mit 45 Amplifikationszyklen wird eine minimale Anzahl von 50 16S rRNA-Zielgenen benötigt (Innis und Gelfand, 1990), deswegen kann von 50 16S rRNA-Zielgenen in 1 μl als Detektionsgrenze für die PCR-Reaktionen ausgegangen werden. Die Anzahl der 16S rRNA-Gensequenzen pro Gramm Trockengewicht Reisfeldboden oder Reiswurzeln wurde folgendermaßen bestimmt:

$$\frac{A \cdot (50 \cdot 16S \text{ rRNA} - \text{Genzielsequenzen}) \cdot V}{T}$$

- A = Volumen der Pufferlösung, in die DNA nach der Extraktion aus x g Trockengewicht Reisfeldboden oder Reiswurzeln aufgenommen wurde angegeben in [μ l]
- V = Verdünnungsfaktor bei dem alle Parallelen positiv getestet wurden
- T = Trockengewicht der Reisfeldboden- oder Reiswurzelprobe, aus der die DNA extrahiert wurde [g]

C. Ergebnisse

1. Bakteriologische Experimente

1.1 Charakterisierung von Stamm FAc12

Die phylogenetische Analyse der kompletten 16S rRNA-Gensequenz von Stamm FAc12 zeigte, daß dieser der Ordnung *Myxococcales* zugeordnet werden muß. Myxobakterien waren bisher als strikt aerobe Bakterien charakterisiert worden (Reichenbach, 1999). Die physiologische Fähigkeit von Stamm FAc12, anaerob durch Eisen(III)reduktion wachsen zu können, stand im Widerspruch zu seiner phylogenetischen Charakterisierung. Aus diesem Grund wurde die physiologische Fähigkeit von Stamm FAc12 dissimilatorisch Eisen reduzieren zu können, bewiesen. Außerdem wurde überprüft, ob Stamm FAc12 charakteristische physiologische Eigenschaften der Myxobakterien besitzt.

1.1.1 Wachstumsversuch

Stamm FAc12 wurde für diese Untersuchung in Süßwassermedium mit 40 mM Eisen(III)citrat und 5 mM Acetat als Elektronendonator kultiviert. Dieses Medium wurde gewählt, um Wachstum von Stamm FAc12, ermöglicht durch Reduktion von Eisen(III) zu Eisen(II), zu beobachten. Hierfür wurde sowohl der Verbrauch von Acetat, wie auch die gleichzeitige Zunahme von Eisen(II) bestimmt. Zusätzlich wurde auch die Zunahme von Zellprotein in den Kulturflaschen gemessen.

Nach einer lag-Phase von 6 Stunden reduzierte Stamm FAc12 innerhalb von 50 Stunden 22,24 mM \pm 0,22 Eisen(III). Gleichzeitig nahm die Acetatkonzentration um 3,24 mM \pm 0,07 ab und die Proteinkonzentration um 16,27 $\mu\text{g ml}^{-1}$ \pm 1,48 zu (Abb. C.1).

Wurde Stamm FAc12 ohne Acetat mit 40 mM Eisen(III)citrat kultiviert, konnte weder eine Zunahme der Eisen(II)konzentration, noch eine Zunahme der Zellproteinkonzentration beobachtet werden.

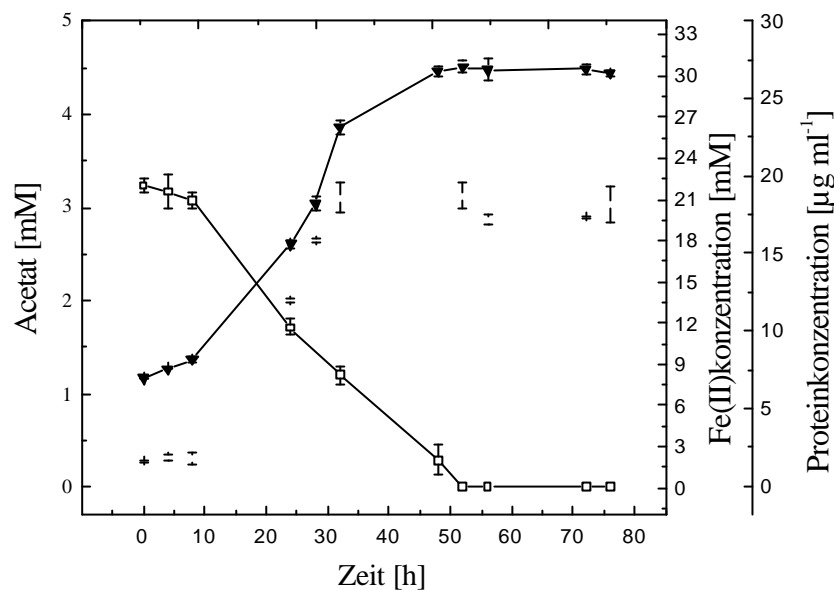


Abb. C.1: Wachstumsversuch mit Stamm FAc12. Die Zellen wuchsen in Süßwassermedium mit 40 mM Eisen(III)citrat und 5 mM Acetat als Elektronendonator. Gemessen wurde die Abnahme der Acetatkonzentration (□), bei gleichzeitiger Zunahme der Eisen(II)konzentration (▲). Zusätzlich wurde auch bei jeder Probenahme die Konzentration von Zellprotein (+) bestimmt. Die Inkubation erfolgte bei 30°C. Es wurden Mittelwerte (n=3) ± SE aufgetragen.

1.1.2 Überprüfung von Stamm FAc12 auf charakteristische mykobakterielle Eigenschaften

Stamm FAc12 ist ein fakultativ anaerobes Bakterium. Daher wurde er für alle unter 1.1.2 erwähnten physiologischen Tests aerob kultiviert. *Stigmatella aurantiaca* ist unter den „klassischen“ Mykobakterien der nächst Verwandte (Sequenzähnlichkeit von 89,8%) von Stamm FAc12. Daher wurden alle Untersuchungen auch mit diesem Mikroorganismus als Referenz durchgeführt. Es wurden außerdem stets Doppelansätze untersucht.

1.1.2.1 Fruchtkörperbildung

Da die Fruchtkörperbildung durch Substratmangel ausgelöst wird (Reichenbach, 1999; Dawid, 2000) wurde Stamm FAc12 zunächst von Eisen(III)citrat-, CY- und Komplexmedium #7 auf Wasseragarplatten (WAT-Medium) übertragen. Nach 9 Tagen konnten auf den Wasseragarplatten, die mit Kulturen von Stamm FAc12 von Komplexmedium #7 beimpft

worden waren, gelblich-orange globuläre Strukturen mit bloßem Auge festgestellt werden. Das mikroskopische Bild dieser Strukturen zeigte dünne Stäbchen ($3,5 - 4,5 \mu\text{m} \times 0,5 \mu\text{m}$) und Sphäroblasten. Um sicher zu sein, daß es sich bei den globulären Strukturen nicht um Fruchtkörper handelt, wurden einige dieser Strukturen in sterilem Kaliumphosphatpuffer (pH 6,8) resuspendiert und 10, 20 oder 30 Minuten lang bei 58°C erhitzt. Während alle vegetativen Zellen durch diese Hitzebehandlung abgetötet werden, halten die Myxosporen diese aus. Anschließend wurden die jeweiligen Suspensionen wieder auf CY- und Komplexmedium #7-Agarplatten überimpft. Außerdem wurden die resuspendierten Strukturen auch auf Komplexmedium #7-Agarschichten in feuchten Kammern gebracht. Dies wurde durchgeführt, um zu sehen ob Teile der Strukturen, wie Myxosporen wenn sie wieder auf Komplexmedien gebracht werden, auskeimen würden. Sowohl die Komplexmediumagarplatten, wie auch die feuchten Kammern wurden bei 30°C inkubiert. Die feuchten Kammern wurden alle zwei Tage mikroskopisch untersucht. Ein Auskeimen von vermeintlichen Myxosporen konnte nach einer Inkubationszeit von 2 Wochen weder auf den getesteten Agarplatten, noch in den feuchten Kammern beobachtet werden.

St. aurantiaca wurde von CY-, und VY/2-Medium auf Wasseragarplatten überimpft. Dabei zeigte sich, daß auch dieser Mikroorganismus innerhalb der 2 Wochen keine Fruchtkörper auf den Wasseragarplatten bilden konnte.

1.1.2.2 Gleiten

Stamm FAc12 zeigte niemals eine Schwarmbildung auf Komplexmedium #7-, und CY-Agarplatten. Auch auf VY/2-Agarplatten konnte kein Schwarm beobachtet werden.

St. aurantiaca hingegen zeigte eine deutliche Schwarmbildung bei Wachstum auf CY- und VY/2-Agarplatten.

1.1.2.3 Bakteriolytische Eigenschaften

Stamm FAc12 wuchs nicht auf VY/2-Agarplatten (mit Hefezellen). *St. aurantiaca* hingegen zeigte nicht nur deutliche Schwarmbildung, sondern auch Lysehöfe im VY/2-Agar.

1.2 Überprüfung von *Stigmatella aurantiaca* auf dissimilatorische Eisenreduktion

Um herauszufinden, ob auch andere, bereits beschriebene Myxobakterien die Fähigkeit besitzen unter anoxischen Bedingungen Eisen zu reduzieren, wurde beispielhaft *Stigmatella aurantiaca* untersucht. Hierfür mußte der Mikroorganismus zunächst von festem

(VY/2-Agar) auf flüssiges (CT-Medium mit 5 mM Glucose und $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ Vitamin B₁₂) Medium übertragen werden. Die Inkubation erfolgte hierbei oxisch. Innerhalb von vier Tagen wuchs *St. aurantiaca* in dem flüssigen Medium zu einer dichten Kultur heran. 10% dieser Kultur wurden dann in Süßwassermedium mit 5 mM Acetat und 40 mM Eisen(III)citrat übertragen und anoxisch inkubiert. Diese Kulturen zeigten auch nach 8 Wochen kein Wachstum und keine Entfärbung des grügefärbten Süßwassermediums mit Eisen(III)citrat und Acetat. Somit konnte festgestellt werden, dass *St. aurantiaca* mit dem Elektronendonator Acetat Eisen nicht dissimilatorisch reduzieren kann. Während der gesamten Experimente diente das mikroskopische Bild als Reinheitskontrolle. Außerdem wurden stets Doppelsätze durchgeführt.

1.3 Überprüfung von „*Anaeromyxobacter dehalogenans*“ auf dissimilatorische

Eisenreduktion

Der phylogenetisch nächst Verwandte von Stamm FAc12 ist, mit einer Sequenzsimilarität von 99,5%, das fakultativ anaerobe Bakterium „*Anaeromyxobacter dehalogenans*“. Auf die physiologische Fähigkeit, dissimilatorisch Eisen reduzieren zu können, wurde „*Anaeromyxobacter dehalogenans*“ bisher noch nicht untersucht. Zwei Stämme von „*Anaeromyxobacter dehalogenans*“ (2CP-1 und 2CP-2) wurden hierfür zunächst von dem empfohlenen Stammhaltungsmedium (R2A mit 5 mM Fumarat) in Süßwassermedium mit 1 mM Acetat und 5 mM Fumarat übertragen. Dies sollte zeigen, ob die zwei Stämme in dem von uns standardmäßig verwendeten Süßwassermedium wachsen können. Nach 5 Tagen konnte eine deutliche Trübung in den Kulturflaschen festgestellt werden. Dann wurde Süßwassermedium mit 5 mM Acetat und 40 mM Eisen(III)citrat mit den auf Acetat und Fumarat gewachsenen Kulturen von beiden Stämmen von „*Anaeromyxobacter dehalogenans*“ 10%ig angeimpft. Nach 5 Tagen war das grügefärbte Eisen(III)citratmedium bereits vollständig entfärbt. Sowohl Stamm CP-1, wie auch Stamm CP-2 wuchsen sehr gut mit 40 mM Eisen(III) als Elektronenakzeptor.

Während der gesamten Experimente diente das mikroskopische Bild als Reinheitskontrolle. Dabei wurde eine morphologische Veränderung der beiden „*Anaeromyxobacter dehalogenans*“-Stämme bemerkt. Zellen, die in Stammhaltungsmedium wuchsen, waren $0,25 \mu\text{m}$ breit und $4-8 \mu\text{m}$ lang. Nach der Übertragung in Eisen(III)citratmedium wurde eine Verbreiterung ($0,4 \mu\text{m}$) und Verkürzung ($2-5 \mu\text{m}$) der Zellen festgestellt. Zurückgeimpft auf

Stammhaltungsmedium war jedoch die ursprüngliche Morphologie zu erkennen. Es wurden bei allen Versuchen Doppelansätze durchgeführt.

1.4 Anreicherung und Isolation eisenreduzierender Bakterien von Reiswurzeln

Stamm FAc12 wurde aus Reisfeldboden isoliert. Die Umweltsequenzen, die mit Stamm FAc12 eng verwandt sind, wurden hingegen aus Klonbibliotheken gewonnen, die mit aus Reiswurzeln extrahierter DNA generiert wurden. Um zu untersuchen, ob Stamm FAc12 und verwandte Bakterien auch von Reiswurzeln isoliert werden können, wurden Anreicherungen mit 112 Tage alten Wurzeln von *Oryza sativa* (Varianten Koral, Lido, und Roma) durchgeführt. Die Reiswurzeln wurden, bevor sie als Inokulum dienten, auf zwei unterschiedliche Arten vorbehandelt. Entweder wurden die Wurzeln mit Glasperlen abgerieben oder mit dem Mörser zermahlen. Ferrihydrit wurde bei allen angesetzten Anreicherungskulturen als alleiniger Elektronenakzeptor eingesetzt. Acetat, Propionat und H_2/CO_2 wurden jeweils als Elektronendonator verwendet.

Um das Wachstum von eisenreduzierenden Bakterien in den Kulturen zu überprüfen, wurden diese auf Magnetitbildung untersucht.

1.4.1 Anreicherung und Isolierung

Die Anreicherungen mit Ferrihydrit und Acetat als Elektronendonator zeigten nach drei bis vier Wochen eine deutliche Magnetitbildung. Dies war durch die Schwarzfärbung der Kulturflaschen durch das sich gebildete Magnetit sichtbar. In den Anreicherungskulturen, die mit Wurzeln der Varianten Lido und Roma der Reispflanzen inokuliert wurden, war eine nahezu vollständige Ferrihydrit Reduktion bereits nach fünf bis sechs Wochen sichtbar. Dabei konnte kein zeitlicher Unterschied zwischen den Kulturen festgestellt werden, die mit unterschiedlich vorbehandelten Reiswurzeln (Mörser oder Glasperlen) einer Variante angeimpft wurden. War das Ferrihydrit einer Anreicherung weitestgehend durch eisenreduzierende Bakterien reduziert, wurden 10% dieser Kultur in frisches Medium übertragen. In den folgenden Passagen wuchsen die vier Anreicherungskulturen mit Acetat als Elektronendonator und Reiswurzeln der Varianten Lido (Mörser und Glasperlen) und Roma (Mörser und Glasperlen) als Inokulum innerhalb einer Woche. Nach mehreren Übertragungen waren die eisenreduzierenden Bakterien aus dem jeweiligen Inokulum stark angereichert. Daraufhin wurden Tiefagar-Verdünnungsreihen mit Acetat als Elektronendonator zur Isolierung von Reinkulturen angelegt. In den Agarröhrchen wuchsen nach ein bis zwei Wochen weiße, klar begrenzte Kolonien. Diese verfärbten sich nach einer weiteren Woche

Wachstum von weiß nach dunkelrot. Insgesamt wurden aus den vier verschiedenen Tiefagar-Verdünnungsreihen 11 dunkelrote Kolonien jeweils über weitere Verdünnungsreihen vereinzelt. Aus diesen Verdünnungsreihen wurden 11 eisenreduzierende Bakterien isoliert (Stamm LGA, Stamm LGAI, Stamm LMA, Stamm LMAII, Stamm LMAIII, Stamm RGA, Stamm RGAI, Stamm RGAI, Stamm RMA, Stamm RMAII, Stamm RMAIII). Das mikroskopische Bild zeigte bei allen 11 Isolaten Stäbchen, die morphologisch an Stamm FAc12 erinnerten.

Eine Isolierung eisenreduzierender Bakterien aus den Anreicherungen mit Ferrihydrit und Propionat oder H_2/CO_2 konnte bisher nicht abgeschlossen werden.

1.4.2 Charakterisierung der Isolate

1.4.2.1 Morphologie

Die Zellmorphologie aller 11 Stämme war identisch. Es waren dünne bewegliche Stäbchen von 3,0-5,0 μm Länge und 0,5 μm Breite.

1.4.2.2 Physiologie

Alle 11 neu isolierten Stämme reduzierten dissimilatorisch neben Ferrihydrit auch Eisen(III)citrat mit Acetat als Elektronendonator. Außerdem zeigten alle 11 Isolate auch gutes aerobes Wachstum. Dies wurde in flüssigem Komplexmedium #7 überprüft.

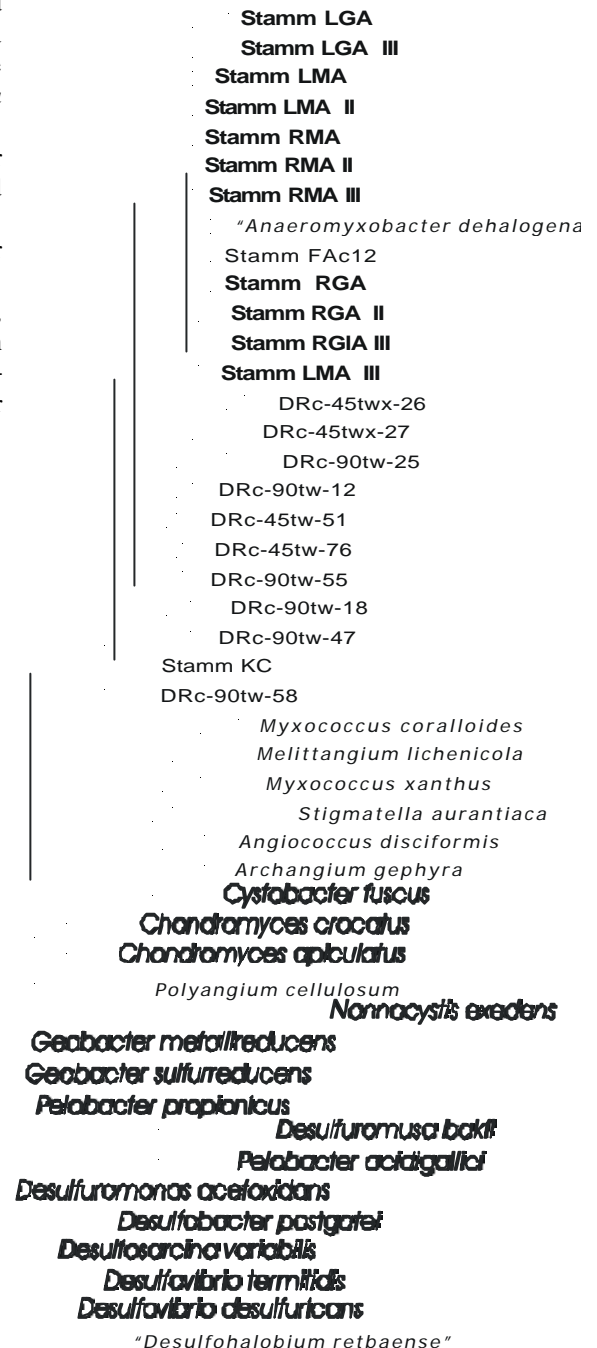
Bei diesen physiologischen Wachstumstests wurden stets Doppelansätze durchgeführt. Eine Verbindung galt nur dann als verwertbar, wenn im Vergleich mit dem Kontrollansatz ohne Substrat ein sichtbares Wachstum festgestellt werden konnte. Stete mikroskopische Kontrolle diente als Reinheitstest. Kontaminanten wurden hierbei niemals festgestellt.

1.4.2.3 Phylogenetische Verwandtschaft

Für die phylogenetische Charakterisierung der 11 neu isolierten Stämme wurde deren jeweilige komplette 16S rRNA-Gensequenz analysiert. Nach Sequenzierung und phylogenetischer Verrechnung der ca. 1500 Bp langen 16S rRNA-Gensequenzen, konnten alle Isolate der Ordnung der *Myxococcales* innerhalb der α -Proteobakterien zugeordnet werden (Abb. C.2). Innerhalb dieser Ordnung zeigte sich eine enge Verwandtschaft zwischen den neu isolierten Bakterien, Stamm FAc12, „*Anaeromyxobacter dehalogenans*“ und Stamm KC. Die 16S rRNA-Gensequenz der drei Isolate Stamm RGA, Stamm RGAI, und Stamm RGAI war identisch mit der 16S rRNA-Gensequenz von Stamm FAc12.

Die Unterschiede zwischen den 16S rRNA-Gensequenzen der übrigen 8 Stämme (LGA, LGAI, LMA, LMAII, LMAIII, RMA, RMAII, RMAIII) und der 16S rRNA-Gensequenz von Stamm FAc12 lagen zwischen 0,4 % und 1,0 %. Die allgemeine Sequenzidentität zwischen der 16S rRNA-Gensequenz der 11 Isolate und der 16S rRNA-Gensequenz von „*Anaeromyxobacter dehalogenans*“ (Stamm 2CP-1) betrug 98,7 % (Stamm LMA) bis 99,4 % (Stamm RGA, Stamm RGAI, und Stamm RGAI). Keine der 16S rRNA-Gensequenzen der Isolate war allerdings identisch mit der von „*A. dehalogenans*“ (Stamm 2CP-1). Auch zu Stamm KC fand sich innerhalb der 11 Isolate keine identische 16S rRNA-Gensequenz. Innerhalb der isolierten Bakterien wies Stamm RMA die höchste allgemeine Sequenzidentität (97,5%) zu Stamm KC auf.

Abb. C.2: Dendrogramm, das die phylogenetische Verwandtschaft basierend auf 16S rRNA-Gen-Sequenzanalyse zwischen den 11 neu isolierten zur dissimilatorischen Eisenreduktion fähigen Stämmen (fett gedruckt), „*Anaeromyxobacter dehalogenans*“, Stamm FAc12 und Stamm KC, Umweltsequenzen, die von Reiswurzeln gewonnen wurden (DRc), und Referenzorganismen aus der Ordnung der *Myxococcales* und der delta-Proteobakterien zeigt. Die phylogenetische Analyse erfolgte über einen Konsensusfilter für delta-Proteobacteria mit einem Invarianzkriterium von 50%. Die Topologie des evolutionären Entfernungsdiagramms basiert auf einer Distanz-Matrix (berechnet nach Jukes und Cantor, 1969) und wurde nach dem „Neighbor-Joining“-Algorithmus (Saitou und Nei, 1987) berechnet. Das Verzweigungsmuster innerhalb des Dendrogrammes wurde in Übereinstimmung mit „Maximum-Likelihood“-Berechnungen (Felsenstein, 1981) korrigiert. Um die Wurzel des phylogenetischen Baumes zu bestimmen, wurde in die Analyse die 16S rRNA-Gensequenz von *Escherichia coli* miteinbezogen. Der Maßstab entspricht 10% Nukleotidaustausch.



2. Molekularbiologische Untersuchungen

2.1 ARDRA-Analyse

Die Umweltsequenzen, die von Reiswurzeln gewonnen wurden und mit Stamm FAc12-
verwandt waren, sollten ergänzt werden. Zunächst wurden dafür zwei Klonbibliotheken mit
DNA, die aus zwei verschiedenen 90 Tage alten Reiswurzeln extrahiert wurden, hergestellt.
Die hierfür nötige vorausgehende Amplifikation der DNA wurde mit Primern durchgeführt,
die alle Mikroorganismen der Domäne *Bacteria* erfassen sollten. In der ARDRA-Analyse
wurden insgesamt 160 Umweltklone untersucht.

Die transformierten Umweltsequenzen wurden mit M13-Primern reamplifiziert. Aliquots der
so entstandenen PCR-Produkte wurden dann zur Kontrolle der Länge der Fragmente auf
Agarosegele aufgetragen. Nur 95 der 160 Klonsequenzen wiesen die erwartete Länge von ca.
1500 Bp auf. Die übrigen 65 Fragmente besaßen Längen von 200-600 oder 1700 Bp (Abb.
C.3) und wurden vom Restriktionsverdau mit dem Enzym *Hpa* II ausgeschlossen. Die gleiche
Länge aller Fragmente mußte vor dem Restriktionsverdau gewährleistet sein, da ansonsten
eine korrekte Identifikation von Stamm FAc12 und Verwandten nicht möglich gewesen wäre.
Als Positivkontrolle wurden die bereits bekannte und auch verfügbaren FAc12-verwandten
Sequenzen (DRc-90tw-25, DRc-90tw-47, DRc-90tw-58, DRc-90tw-18, DRc-90tw-12, DRc-
45tw-51, DRc-90tw-55, und Stamm FAc12) eingesetzt. Die Positivkontrollen wie die 95 1500
Bp langen Umweltsequenzen von den Reiswurzeln, wurden mit *Hpa* II verdaut (Abb. C.4).
Nach erneutem Auftragen auf Agarosegele zeigten vier der untersuchten Klone drei
unterschiedlich lange Fragmente nach dem Restriktionsverdau. Diese vier Klone wurden
sequenziert und phylogenetisch analysiert. Die Verrechnung ergab, daß nur eine, der vier
Umweltsequenzen mit Stamm FAc12 verwandt war. Diese eine 16S rRNA-Gensequenz war
identisch mit der Sequenz des Umweltklons DRc-90tw-25.

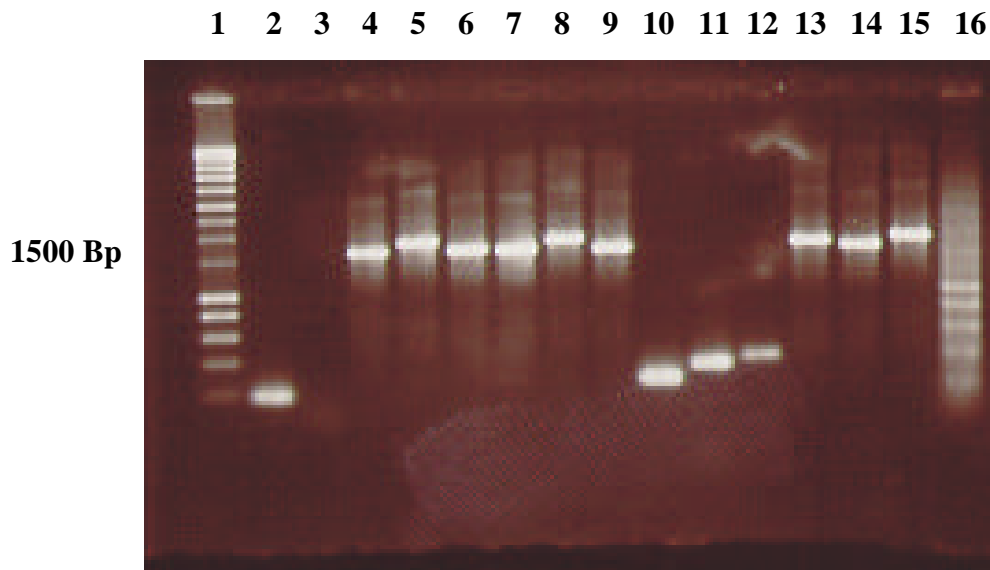


Abb. C.3: ARDRA-Analyse: PCR-vermittelte Amplifikation der 16S rRNA-Genen verschiedener Umweltklone mit dem M13-Primerset. Die DNA wurde zuvor aus 90 Tage alten Reiswurzeln extrahiert. Diese Umwelt-DNA wurde dann mit einem universellen Primerset für *Bacteria* mittels PCR amplifiziert und anschließend kloniert. Spur 2-15: verschiedene Umweltklone (Klon 54-58 und 60, 66, 67, 68, 70, 71, und 72 aus Klonbibliothek II) und Spur 1 und 16: DNA-Längenstandard („Smart Ladder“; Eurogentec).

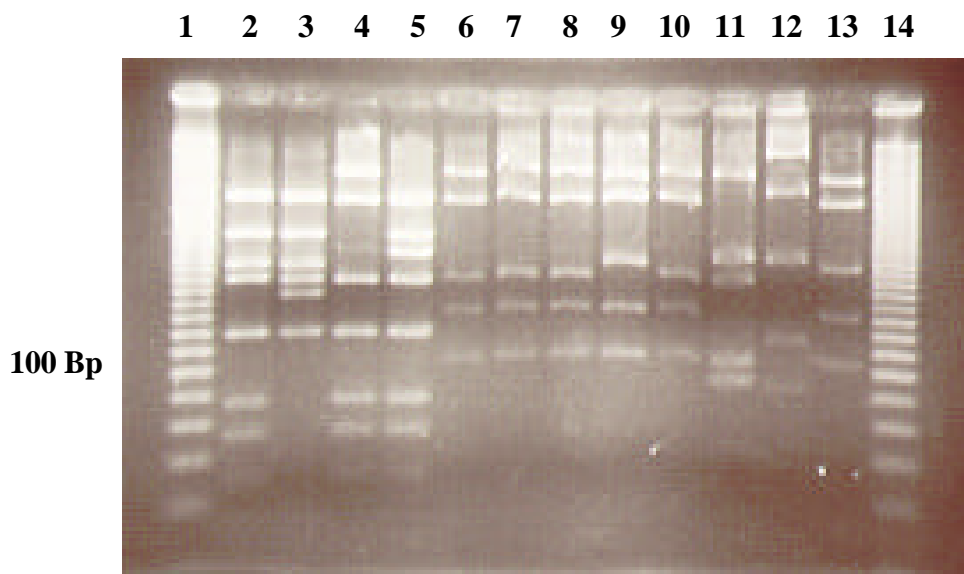


Abb. C.4: ARDRA-Analyse: Mit dem Restriktionsenzym *Hpa* II verdaute DNA verschiedener Umweltklone. Die DNA wurde zuvor aus 90 Tage alten Reiswurzeln extrahiert. Diese Umwelt-DNA wurde dann mit einem universellen Primerset für *Bacteria* mittels PCR amplifiziert und anschließend kloniert. Vor dem enzymatischen Verdau der 1500 Bp langen 16S rRNA-Gensequenzen wurden diese mit dem M13-Primerset reamplifiziert. Spur 2-5: Positivkontrolle (Stamm FAC12, DRc-90tw-55, DRc-90tw-47, und DRc-90tw-18), Spur 6-13: verschiedene Umweltklone (Klon 25-34 aus Klonbibliothek II), und Spur 1 und 14: DNA-Längenstandard („20 bp-Ladder“; Promega).

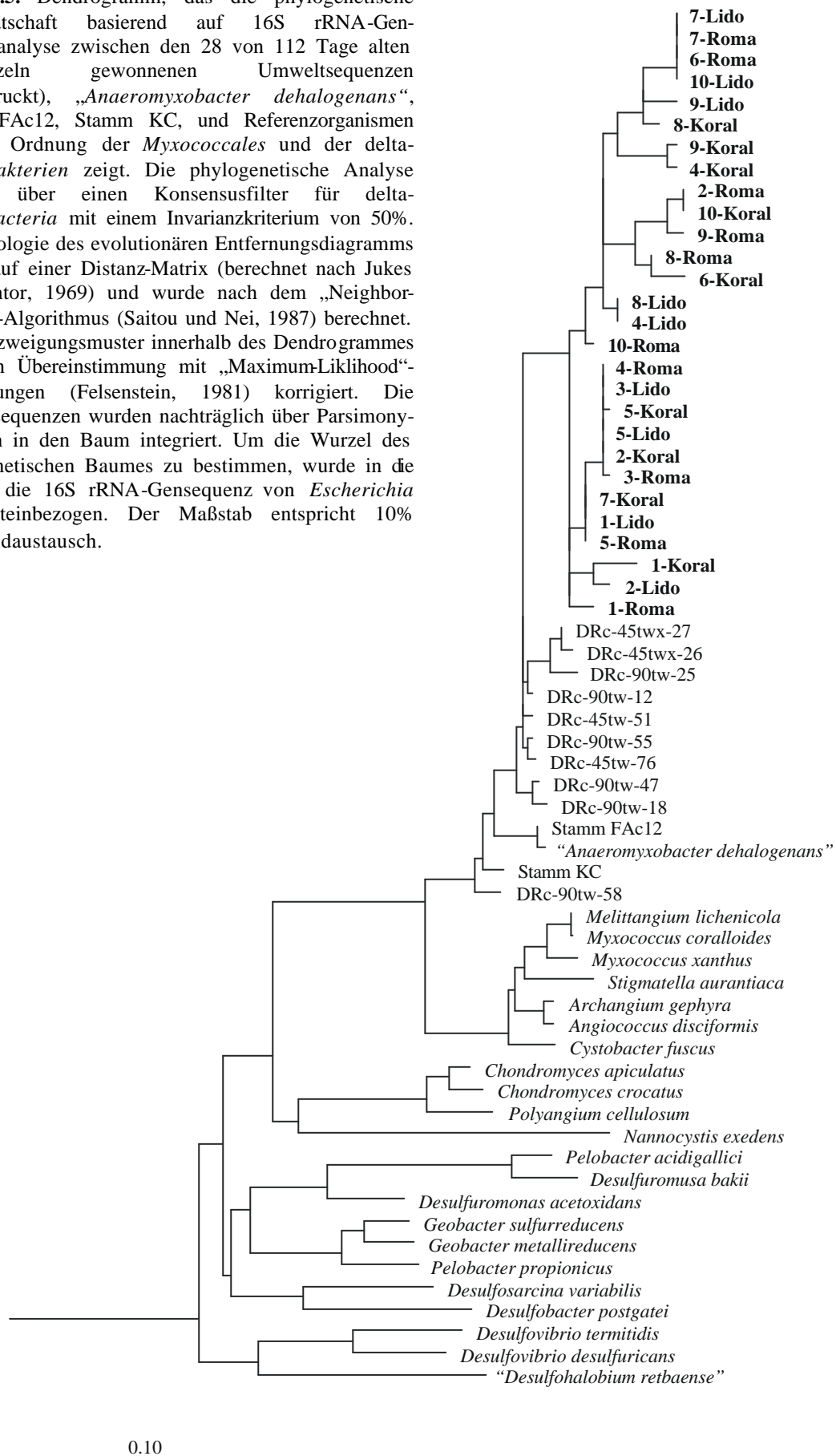
2.2 Entwicklung eines spezifischen PCR-Systems zur Amplifikation von 16S rRNA-Genen von Stamm FAc12 und Verwandten

Um spezifisch das 16S rRNA-Gen von Stamm FAc12 und Verwandten aus Umweltproben amplifizieren zu können, wurde sowohl ein spezifischer 5'-Primer (FAc12 66f), als auch ein spezifischer 3'-Primer (FAc12 432b) mit dem „ARB Software Paket“ (Strunk und Ludwig, 1996) entwickelt. Grundlage hierfür waren die bereits bekannten 16S rRNA-Gensequenzen von Stamm FAc12 und Verwandten. Eine Basenfehlpaarung zu der korrespondierenden Sequenz der beiden Primer (FAc12 66f und FAc12 432b) wurde bei keiner dieser spezifischen 16S rRNA-Gensequenzen festgestellt. Alle anderen in der „ARB“-Datenbank vorhandenen 16S rRNA-Gensequenzen wiesen mindestens zwei Basenfehlpaarungen zu den hier entwickelten spezifischen Primern auf.

Zur Optimierung des für Stamm FAc12 und Verwandte spezifischen Nachweissystems mußten auch stringende PCR-Bedingungen ermittelt werden. Hierfür wurde bei verschiedenen Primeranlagerungstemperaturen, sowohl eine Positiv-, als auch eine Negativkontrolle mit den beiden spezifischen Primern (FAc12 66f und FAc12 432b) amplifiziert. Die Positivkontrolle bestand aus genomischer DNA von Stamm FAc12 und der DNA der verwandten Umweltklone (DRc-90tw-25, DRc-90tw-47, DRc-90tw-58, DRc-90tw-18, DRc-90tw-12, DRc-45tw-51, und DRc-90tw-55). Die Negativkontrolle war hingegen genomische DNA von *E. coli*. Die Primeranlagerungstemperatur wurde schrittweise von 65°C auf 75°C erhöht. Eine Primeranlagerungstemperatur von 70°C führte zu einem PCR-Produkt von ca. 400 Bp. Diese Länge kam der errechneten Größe von 366 Bp nahe. 16S rRNA-Gene von *E. coli* wurden mit dem spezifischen PCR-Nachweissystem bei keiner der gewählten Primeranlagerungstemperaturen amplifiziert. Zukünftig wird das entwickelte PCR-Nachweissystem in dieser Arbeit als PCR-System FAc12 bezeichnet.

Um die Spezifität des PCR-Systems FAc12 zu überprüfen, wurde zunächst DNA aus 3 verschiedenen 112 Tage alten Reisswurzeln Variante Koral, Variante Lido und Variante Roma extrahiert. Die jeweilige DNA wurde mit dem PCR-System FAc12 amplifiziert und anschließend kloniert. Insgesamt 28 Umweltklone wurden phylogenetisch analysiert. Alle 366 Bp-langen 16S rRNA-Gensequenzen der 28 Klone konnten als Verwandte von Stamm FAc12 identifiziert werden (Abb. C.5).

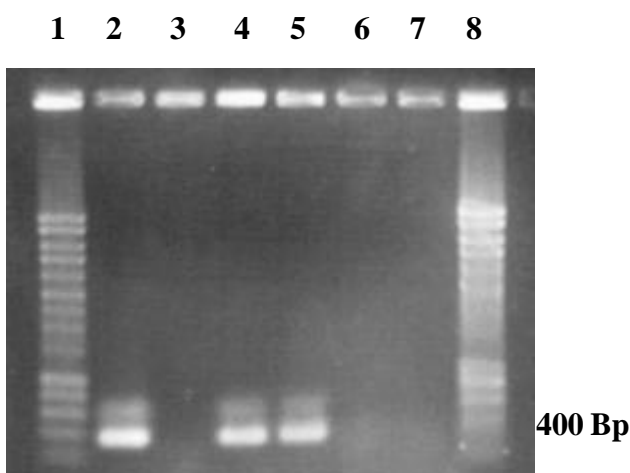
Abb. C.5: Dendrogramm, das die phylogenetische Verwandtschaft basierend auf 16S rRNA-Gen-Sequenzanalyse zwischen den 28 von 112 Tage alten Reiswurzeln gewonnenen Umweltsequenzen (fett gedruckt), „*Anaeromyxobacter dehalogenans*“, Stamm FAc12, Stamm KC, und Referenzorganismen aus der Ordnung der *Myxococcales* und der delta-*Proteobakterien* zeigt. Die phylogenetische Analyse erfolgte über einen Konsensusfilter für delta-*Proteobacteria* mit einem Invarianzkriterium von 50%. Die Topologie des evolutionären Entfernungsdigramms basiert auf einer Distanz-Matrix (berechnet nach Jukes und Cantor, 1969) und wurde nach dem „Neighbor-Joining“-Algorithmus (Saitou und Nei, 1987) berechnet. Das Verzweigungsmuster innerhalb des Dendrogrammes wurde in Übereinstimmung mit „Maximum-Likelihood“-Berechnungen (Felsenstein, 1981) korrigiert. Die Umweltsequenzen wurden nachträglich über Parsimony-Optionen in den Baum integriert. Um die Wurzel des phylogenetischen Baumes zu bestimmen, wurde in die Analyse die 16S rRNA-Gensequenz von *Escherichia coli* miteinbezogen. Der Maßstab entspricht 10% Nukleotidaustausch.



2.3 Überprüfung der Ergebnisse der ARDRA-Analyse mit Hilfe des PCR-Systems FAc12

Die für die ARDRA-Analyse erzeugten 160 Umweltklone wurden zunächst in Gruppen von je 20-30 Klone eingeteilt. Die 16S rRNA-Gensequenz aller Klone einer Gruppe wurde dann mit dem spezifischen PCR-System FAc12 amplifiziert. Wurde nach der anschließenden Agarosegelelektrophorese ein PCR-Produkt mit einer Größe von ca. 400 Bp festgestellt, wurde die entsprechende Klongruppe genauer untersucht. Dafür wurde jede 16S rRNA-Gensequenz der einzelnen Klone dieser Gruppe mit dem PCR-System FAc12 amplifiziert, um herauszufinden welcher/welche Klone Stamm FAc12 und Verwandten phylogenetisch zugeordnet werden muß/müssen. Insgesamt wurden 10 Klongruppen auf diese Weise untersucht. Von zwei dieser zehn Gruppen ließ sich ein spezifisches Produkt amplifizieren (Abb. C.6). Nur die 16S rRNA-Gensequenz von zwei der 44 Umweltklone, die in den zwei Klongruppen enthalten waren, ließen sich mit dem PCR-System FAc12 amplifizieren. Einer der beiden Klone wurde bereits bei der ARDRA-Analyse positiv getestet (Umweltklon DRc-90tw-25). Der andere war Klon 19 (Abb. C.7). Dieser Klon konnte bei der ARDRA-Analyse nicht erfasst werden, weil die transformierten 16S rRNA-Gensequenz keine 1500 Bp aufwies und somit nicht in den Restriktionsverdau mit dem Enzym *Hpa* II eingesetzt wurde (s. 2.1).

Klonbibliothek I



Klonbibliothek II

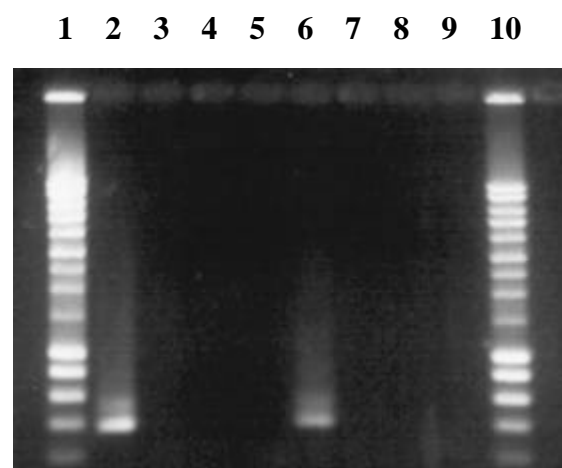


Abb. C.6: ARDRA-Analyse Überprüfung: PCR-vermittelte Amplifikation der 16S rRNA-Gene aller bereits in der ARDRA-Analyse untersuchten Umweltklone mit dem PCR-System FAc12. Dafür wurden die Umweltklone vor der Amplifikation in Gruppen von je 20-30 Klone eingeteilt. Klonbibliothek I: Spur 2: Positivkontrolle, Spur 3: H₂O, Spur 4: Klone 1-28, Spur 5: Klone 1-28, Spur 6: Klone 29-51, Spur 7: Klone 52 und 53, und Spur 1 und 8: DNA-Längenstandard („Smart Ladder“; Eurogentec). Klonbibliothek II: Spur 2: Positivkontrolle, Spur 3: H₂O, Spur 4: Klone 1-22, Spur 5: Klone 23-58 (ohne Klon 27), Spur 6: Klone 23-58 (mit Klon 27), Spur 7: Klon 59-80, Spur 8: Klon 81-102, Spur 9: Klon 103-107, und Spur 1 und 10: DNA-Längenstandard („Smart Ladder“; Eurogentec).

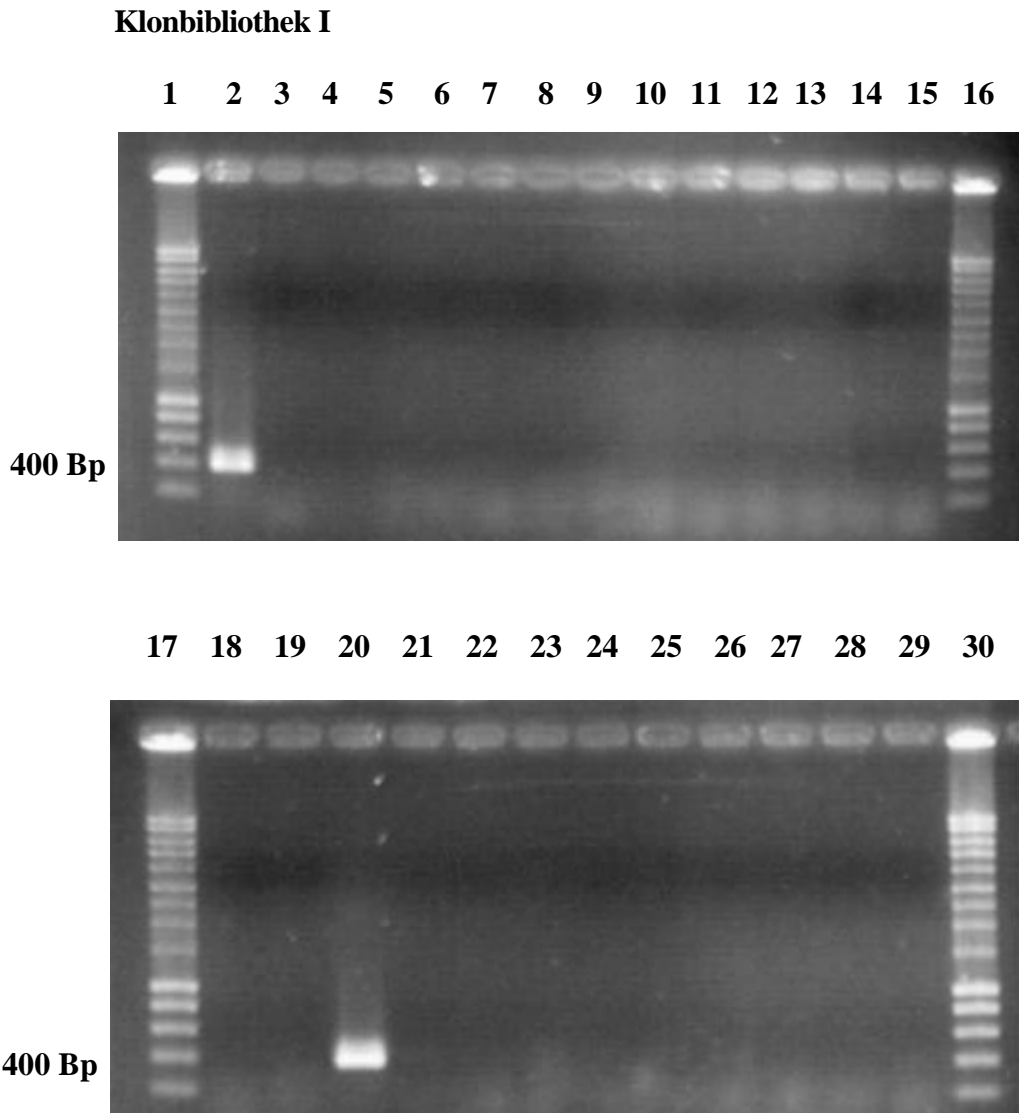


Abb. C.7: ARDRA-Analyse Überprüfung: PCR-vermittelte Amplifikation der 16S rRNA-Gene der Umweltklone 1-28, aus der bereits mit dem PCR-System FAc12 positiv getesteten Gruppe (s. Abb. C.6), mit dem PCR-System FAc12. Spur 2: Positivkontrolle, Spur 3: H₂O, Spur 4-15: Klon 1-4 und Klon 6, 7, 10, 11, 12, 13, 15, und 16, Spur 18-29: Klon 17-28, Spur 1, 16, 17, und 30: DNA-Längenstandard („Smart Ladder“; Eurogentec) und Spur 3: H₂O.

2.4 Nachweis von Stamm FAc12 und Verwandten in verschiedenen Habitaten

Mit dem PCR-System FAc12 wurde die 16S rRNA-Gensequenz von folgenden Umweltproben amplifiziert: 90 und 112 Tage alten Reiswurzeln von vier verschiedenen Pflanzen, zwei unterschiedlichen Reisfeldböden, drei unterschiedlichen Wiesenböden, einem Waldboden, oder einem Kartoffelackerboden. Der Aufschluß der Bakterienzellen, sowie die Extraktion der jeweiligen DNA wurde nach unterschiedlichen Protokollen von verschiedene

Mitarbeitern durchgeführt (s. Material und Methoden, Tab. B.11). Vor der spezifischen Amplifikation mit dem PCR-System FAc12 wurde zunächst sichergestellt, daß die bakteriellen 16S rRNA-Zielgene aus den verschiedenen Umweltproben amplifizierbar sind. Das war bei allen getesteten Proben der Fall.

Ein spezifisches PCR-Produkt von ca. 400 Bp wurde nach der Amplifikation mit den Primern FAc12 66f und FAc12 432b von der DNA, die aus drei unterschiedlichen Reisfeldböden extrahiert wurde, erzielt. Dabei war kein Unterschied zwischen den zwei untersuchten Tiefen (1,5 mm und 7,5 mm) des einen Reisfeldbodens feststellbar. Auch die Reiswurzelpollen wurden positiv getestet. Ein spezifische PCR-Produkt war auch aus der DNA, die entweder aus zwei verschiedenen Bereichen (# 6 und # 8) eines Kartoffelackers oder zwei der drei Wiesenböden extrahiert wurde, amplifizierbar. Keine spezifische Amplifikation gelang mit der 16S DNA der Waldbodenproben (alle getesteten drei Tiefen von 0 mm, 5 mm, und 10 mm) und der dritten Wiesenbodenprobe (Abb. C.8).

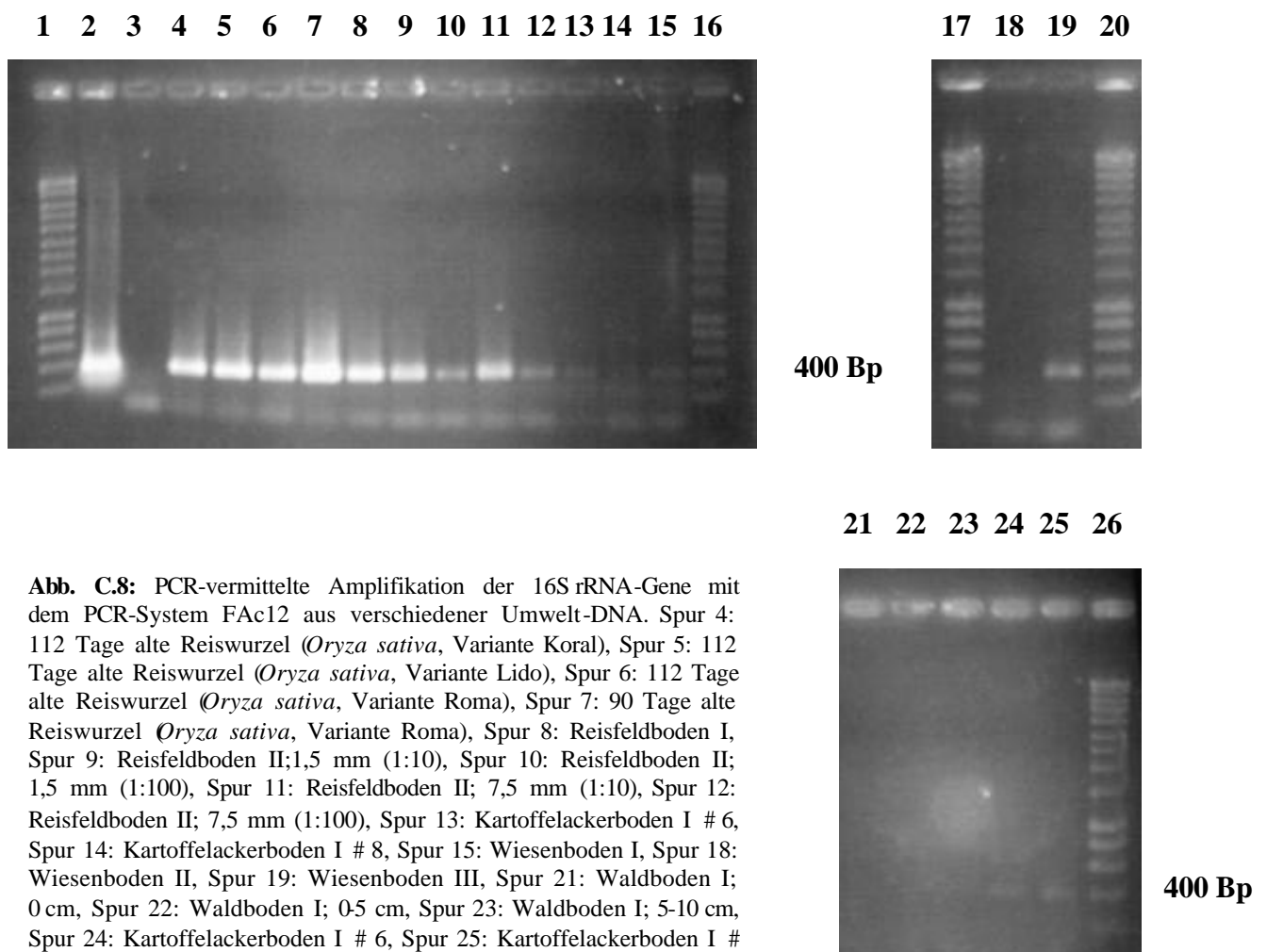


Abb. C.8: PCR-vermittelte Amplifikation der 16S rRNA-Gene mit dem PCR-System FAc12 aus verschiedener Umwelt-DNA. Spur 4: 112 Tage alte Reiswurzel (*Oryza sativa*, Variante Koral), Spur 5: 112 Tage alte Reiswurzel (*Oryza sativa*, Variante Lido), Spur 6: 112 Tage alte Reiswurzel (*Oryza sativa*, Variante Roma), Spur 7: 90 Tage alte Reiswurzel *Oryza sativa*, Variante Roma), Spur 8: Reisfeldboden I, Spur 9: Reisfeldboden II; 1,5 mm (1:10), Spur 10: Reisfeldboden II; 1,5 mm (1:100), Spur 11: Reisfeldboden II; 7,5 mm (1:10), Spur 12: Reisfeldboden II; 7,5 mm (1:100), Spur 13: Kartoffelackerboden I # 6, Spur 14: Kartoffelackerboden I # 8, Spur 15: Wiesenboden I, Spur 18: Wiesenboden II, Spur 19: Wiesenboden III, Spur 21: Waldboden I; 0 cm, Spur 22: Waldboden I; 0-5 cm, Spur 23: Waldboden I; 5-10 cm, Spur 24: Kartoffelackerboden I # 6, Spur 25: Kartoffelackerboden I # 8, und Spur 1, 16, 17, 20, und 26: DNA-Längenstandard („Smart Ladder“; Eurogentec).

2.5 T-RFLP-Analyse von Stamm FAc12 und Verwandten

Die 16S rRNA-Gensequenz der bereits mit dem PCR-System FAc12 positiv getesteten Umweltproben (s. 1.4 und 2.4) wurde für die T-RFLP-Analyse erneut mit den Primern FAc12 66f und FAc12 432b amplifiziert. Der Primer FAc12 66f war bei diesen Amplifikationen allerdings Carboxyfluorescein (FAM) markiert. Die markierten PCR-Produkte wurden nach Aufreinigung mit den Restriktionsenzymen *Alu* I und *Rsa* I verdaut. Alle nach diesem enzymatischen Verdau entstandenen gleichlangen FAM-markierte Fragmente werden in den hier gezeigten Elektropherogrammen (Abb. C.9 und C.10) als ein Peak (identisches terminales Restriktionsfragment (T-RF)) dargestellt. Die Höhe der jeweiligen Peaks zeigt dessen berechnete relative Fluoreszenzsignalintensität. Die identischen T-RFs eines bestimmten Peaks können einem oder mehreren Bakterien zugeordnet werden.

In einer theoretischen Überprüfung mit Hilfe des ARB Programm Pakets (Strunk und Ludwig, 1996) konnte die Gruppe von Stamm FAc12 und Verwandten durch die Restriktionsenzyme *Alu* I und *Rsa* I in maximal drei T-RFs aufgetrennt werden. Die T-RFs besaßen entweder eine Länge von 118, 150, oder 157 Bp. Die Fragmentlänge wurde dabei von der ersten Position des markierten Primers FAc12 66f bis zur theoretischen Schnittstelle berechnet.

Bei praktischen Versuchen mit Stamm FAc12 und verschiedenen Umweltklonen wurden diese theoretischen Erwartungen bestätigt. Stamm FAc12 zeigte dabei einen TRF bei 118 Bp, während Umweltklon DRc-90tw-25 ein T-RF bei 150 Bp und Umweltklon 7-Lido ein TRF bei 157 Bp zeigte.

Das durch T-RFLP-Analyse entstandene Elektropherogramm, der aus einer 90 Tage alten Reiwurzel (s. 2.4) extrahierten DNA-Probe, zeigte alle drei TRFs (118, 150, und 157 Bp), wobei das T-RF mit 150 Bp sowohl das TRF mit 118 Bp wie auch das TRF mit 157 Bp Länge überragte (Abb. C.9). Auch die DNA, die entweder aus drei verschiedenen 112 Tage alten Reiwurzeln (s. 1.4), oder drei verschiedenen Reisfeldböden extrahiert wurde, ließ sich durch die Enzyme *Alu* I und *Rsa* I in diese drei unterschiedlich langen FAM-markierten Fragmente verdauen. Die entsprechenden Elektropherogramme glichen dem bereits oben erwähnten (Abb. C.9). Das Restriktionsfragmentmuster der Probe, dessen DNA aus einem der zwei getesteten Wiesenböden extrahiert wurde, zeigte ebenfalls diese drei FAM-markierten Fragmente (Abb. C.10). Allerdings überragte in dem entsprechenden Elektropherogramm das T-RF mit 118 Bp Länge sowohl das T-RF mit 150 Bp Länge, wie auch das T-RF mit 157 Bp Länge (Abb. C.10). Das Restriktionsfragmentmuster der Probe, deren DNA aus dem zweiten hier untersuchten Wiesenboden extrahiert wurde, wich von dem bereits oben erwähnten

deutlich ab. Es zeigte von den drei erwarteten Fragmenten nur das T-RF mit 118 Bp Länge und das T-RF mit 150 Bp Länge und ein unerwartetes 86 Bp langes terminales Restriktionsfragment (Abb. C.10). Im Elektropherogramm überragte hierbei das T-RF mit 86 Bp Länge sowohl das TRF mit 150 Bp Länge wie auch das T-RF mit 118 Bp Länge. Die T-RFLP-Analyse der zwei aus verschiedenen Bereichen eines Kartoffelackers (# 6 und # 8) extrahierten DNA-Probe führte ebenfalls zu unerwarteten Elektropherogrammen. In der Kartoffelackerprobe # 6 fehlte von den drei erwarteten das TRF mit 150 Bp Länge. Das T-RF mit 118 Bp Länge besaß dabei eine höhere Signalintensität als das T-RF mit 157 Bp Länge (Abb. C.10). Das Elektropherogramm der Kartoffelackerprobe # 8 zeigte neben den drei erwarteten T-RFs noch zusätzlich T-RFs mit 86 Bp und bei 132 Bp Länge (Abb. C.10).

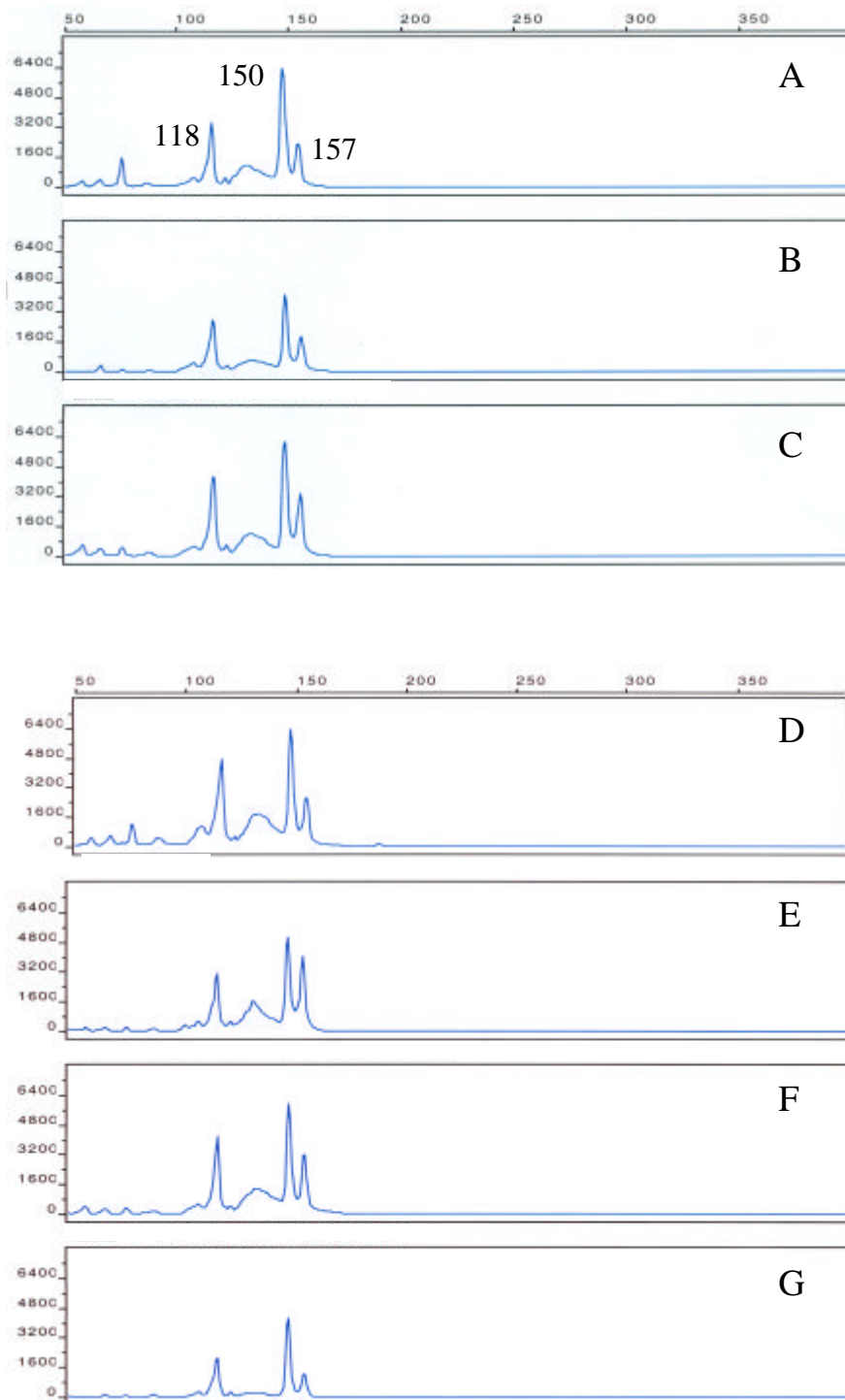


Abb. C.9: Durch T-RFLP-Analyse der mit dem PCR-System FAc12 amplifizierten 16S rRNA-Gene verschiedener Umweltproben erhaltene Restriktionsfragmentmuster. Die mit dem PCR-System FAc12 amplifizierten PCR-Produkte wurden mit den Enzymen *Alu* I und *Rsa* I verdaut. Die X-Achse in den Elektropherogrammen gibt die Fragmentlänge in Bp und die Y-Achse die Signalintensität der jeweiligen Fragmente an. Zur Orientierung wurden einzelne Peaks (terminale Restriktionsfragmente) mit ihrer entsprechenden Länge beschriftet. A) 112 Tage alte Reiswurzel (*Oryza sativa* Variante Koral), B) 112 Tage alte Reiswurzel (*Oryza sativa* Variante Lido), C) 112 Tage alte Reiswurzel (*Oryza sativa* Variante Roma), D) 90 Tage alte Reiswurzel (*Oryza sativa* Variante Roma), E) Reisfeldboden I, F) Reisfeldboden II (1,5 mm Tiefe), G) Reisfeldboden II (7,5 mm Tiefe).

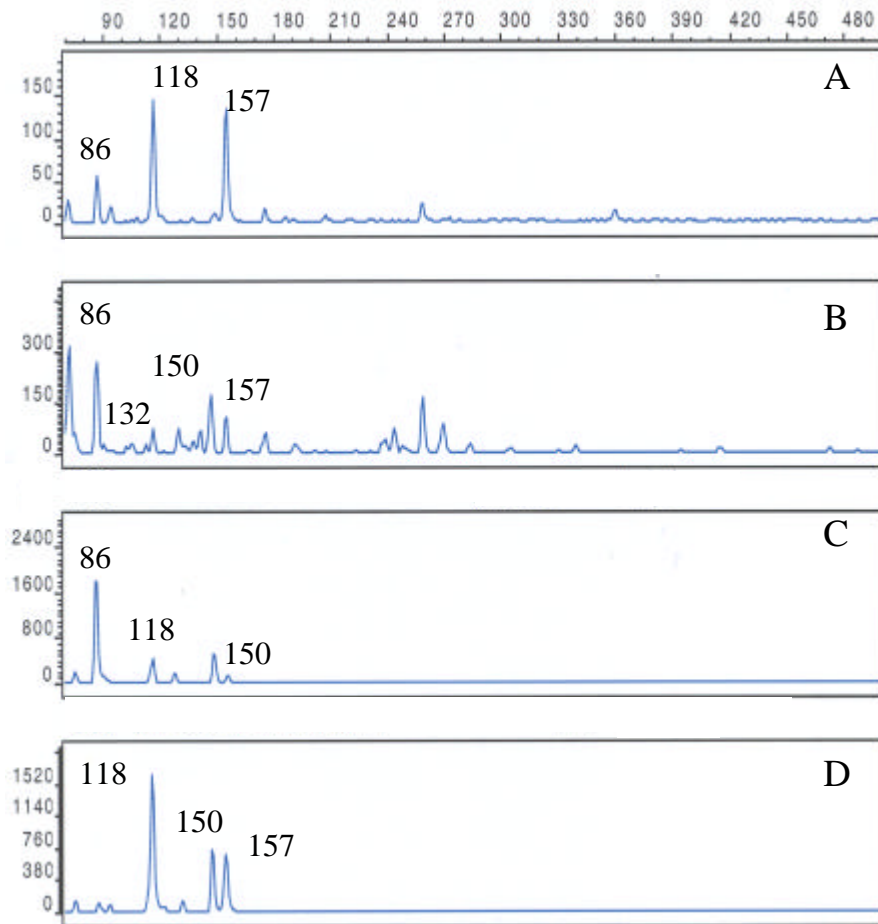


Abb. C.10: Durch T-RFLP-Analyse der mit dem PCR-System FAc12 amplifizierten 16S rRNA-Gene verschiedener Umweltproben erhaltene Restriktionsfragmentmuster. Die mit dem PCR-System FAc12 amplifizierten PCR-Produkte wurden mit den Enzymen *Alu* I und *Rsa* I verdaut. Die X-Achse in den Elektropherogrammen gibt die Fragmentlänge in Bp und die Y-Achse die Signalintensität der jeweiligen Fragmente an. Zur Orientierung wurden einzelne Peaks (terminale Restriktionsfragmente) mit ihrer entsprechenden Länge beschriftet. A) Kartoffelackerboden # 6, B) Kartoffelackerboden # 8, C) Wiesenboden I; D) Wiesenboden III

3. Reismikrokosmosexperiment

Stamm FAc12 und Verwandte konnten sowohl aus Reisfeldboden wie auch von der Reiswurzeln isoliert werden. In Mikrokosmosexperimenten sollten nun diese fakultativ anaeroben Myxobakterien in Abhängigkeit zum Wachstum der Reispflanzen in beiden Kompartimenten mit dem PCR-System FAc12 II nachgewiesen werden. Ergänzend wurden im Reisfeldboden und an der Reiswurzel die Konzentrationen von Acetat, Fe(II), und Gesamteisen bestimmt, um deren möglichen Einfluß auf Stamm FAc12 und Verwandte zu überprüfen.

3.1 Wachstum der Reispflanzen

Um das Wachstum der Reispflanzen in den Mikrokosmen während des Experimentes zu dokumentieren, wurde die Anzahl der Blätter pro Reispflanze und die Anzahl der Sprosse pro Reispflanze bestimmt (Abb. C.11). Die Blätteranzahl pro Pflanze nahm vom 29. Tag ($5 \pm 0,2$ Blätter Pflanze⁻¹) bis zum 95. Tag (11 ± 1 Blätter Pflanze⁻¹) kontinuierlich zu. Tag 0 entspricht dabei dem Tag, an dem die Reispflanzenkeimlinge in die Mikrokosmen gesetzt wurden.

Auch die Anzahl der Sprosse pro Pflanze nahm vom 29. Tag an kontinuierlich zu. Der Maximalwert wurde hier allerdings mit $7 \pm 0,5$ Sprosse Pflanze⁻¹ bereits am 75. Tag erreicht. An diesem Tag begannen auch einige der Reispflanzen zu blühen.

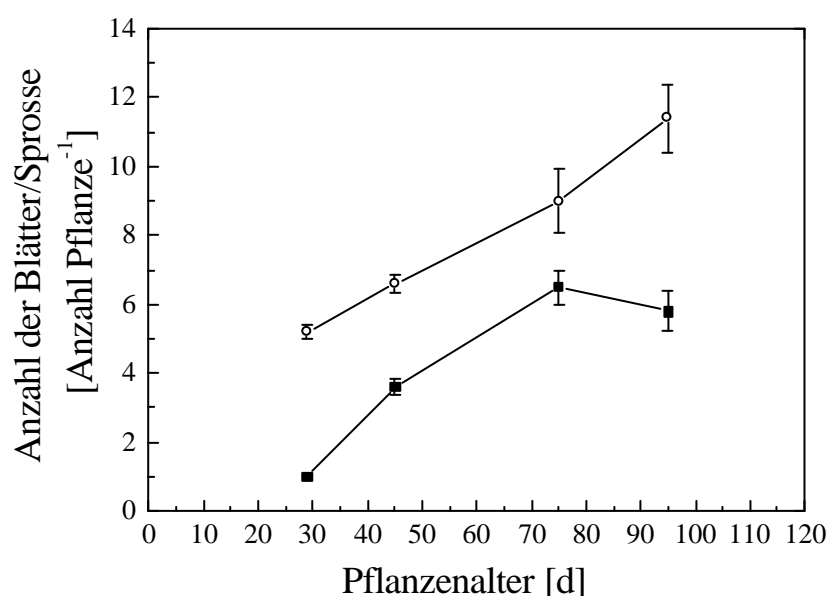


Abb. C.11: Anzahl der Blätter pro Reispflanze (○) und der Sprosse pro Reispflanze (■) in Abhängigkeit zur Vegetationsperiode der Reisplanzen in den Mikrokosmen. Es wurden Mittelwerte ($n=3$) \pm SE aufgetragen.

3.2 Acetatkonzentration

Porenwasserproben wurden am 29., 45., 75., und 95. Tag aus dem Reisfeldboden und aus der, die Reiswurzeln eng umgebenden Gazetüte, gewonnen. Anschließend wurde die Acetatkonzentration in diesen Proben mit dem Ionenchromatographen bestimmt.

Vom 29. Tag bis zum 45. Tag erreichte die Konzentration von Acetat im Boden und an der Wurzel Werte von $42 \pm 5 \mu\text{M}$, bzw. $24 \pm 2 \mu\text{M}$ (Abb. C.12). Im Boden erreichte sie im Porenwasser am 75. Tag ihren Maximalwert von $53 \pm 12 \mu\text{M}$ Acetat und sank dann am 95. Tag wieder unter die Nachweisgrenze ab. An der Wurzel hingegen wurden am 75. Tag bereits $102 \pm 20 \mu\text{M}$ Acetat nachgewiesen. Am 95. Tag wurde immer noch eine Acetatkonzentration von $113 \pm 8 \mu\text{M}$ im die Wurzel direkt umgebendem Porenwasser festgestellt.

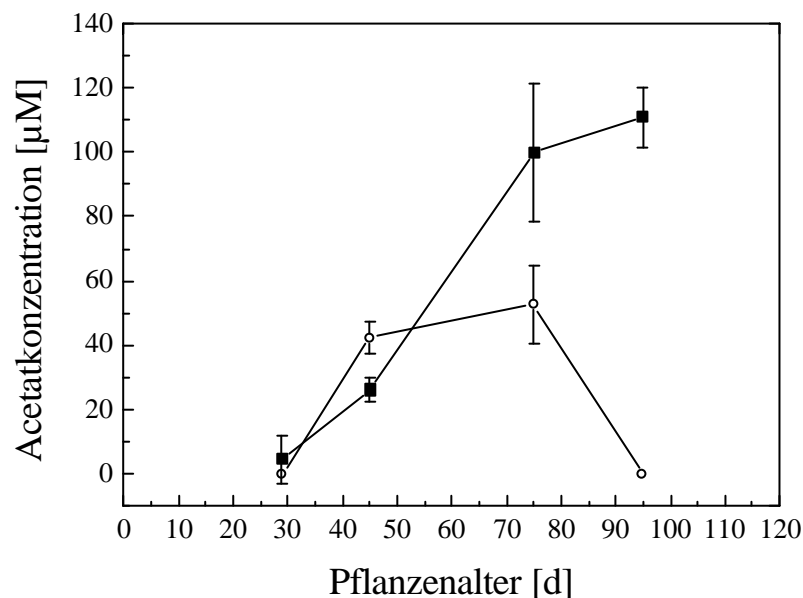


Abb. C.12: Acetatkonzentration im Porenwasser, das aus Reisfeldboden (○) oder von der Reiswurzel (■) zu verschiedenen Zeitpunkten während der Vegetationsperiode der Reispflanzen in den Mikrokosmen gewonnen wurde. Es wurden Mittelwerte ($n=3$) \pm SE aufgetragen.

3.3 Eisenkonzentration

Zur Bestimmung der Konzentration von Gesamteisen und Eisen(II) im Boden und an der Reiswurzel wurde die Ferrozin-Methode (Stookey, 1970) angewandt. Im Boden lag das mit 0,5 M HCl extrahierte Gesamteisen zu allen Meßzeitpunkten fast vollständig reduziert vor (Abb. C.13).

An der Wurzel lagen die Werte der Gesamteisenkonzentrationen bei $145 \pm 32 \mu\text{mol}$ am 29. Tag und $164 \pm 15 \mu\text{mol g Wurzel}^{-1}$ am 95. Tag (Abb. C.14). Am 75.Tag wurden allerdings nur $78 \mu\text{mol g Wurzel}^{-1}$ festgestellt. Die Eisen(II)konzentrationen stiegen von $35 \mu\text{mol} \pm 4 \mu\text{mol g Wurzel}^{-1}$ am 29. Tag bis $52 \pm 7 \mu\text{mol g Wurzel}^{-1}$ am 45.Tag an. Am 95.Tag konnte eine Eisen(II)konzentration von $51 \pm 7 \mu\text{mol g Wurzel}^{-1}$ gemessen werden. Auch die Eisen(II)konzentration war am 75. Tag an der Wurzel geringer ($41 \mu\text{mol} \pm 5 \mu\text{mol g Wurzel}^{-1}$) als an den Vergleichstagen. Der Anteil von Fe(II) am Gesamteisen war an der Reisswurzel zu allen Probenahmeterminen deutlich geringer als im Reisfeldboden.

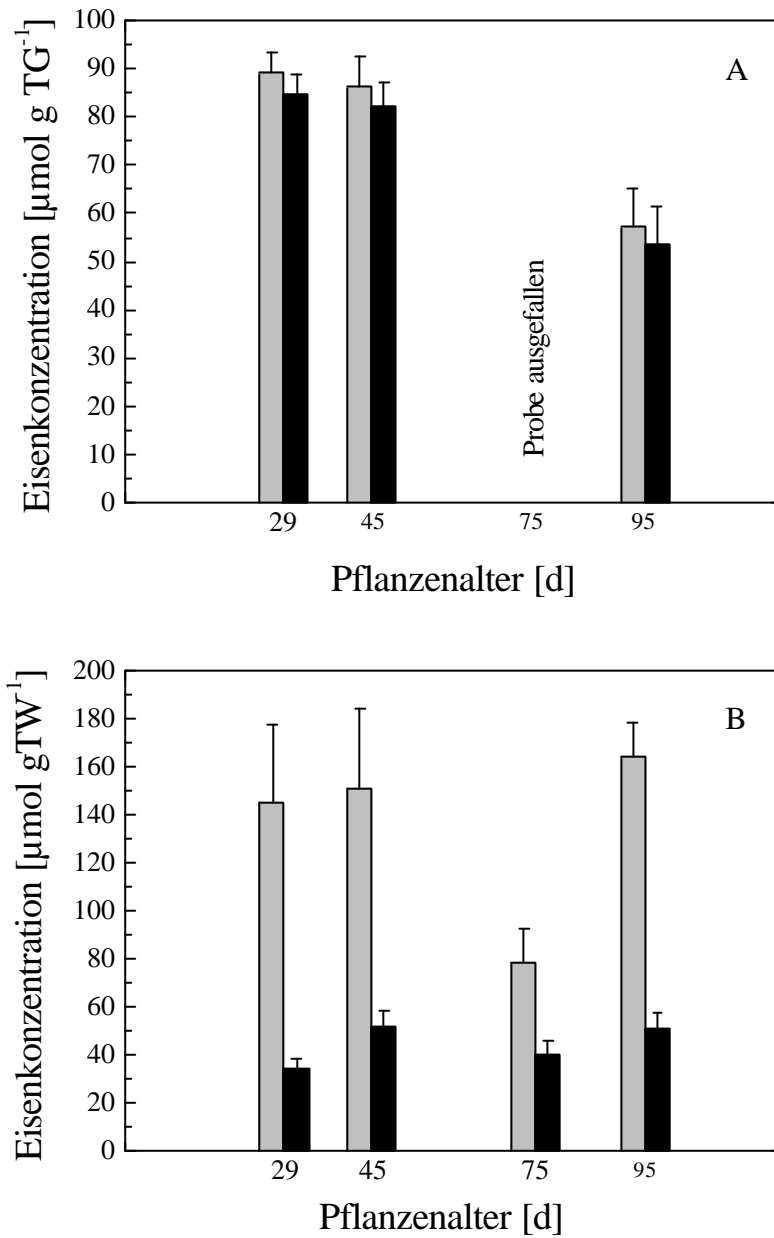


Abb. C.13: Gesamteisenkonzentration (graue Balken) und Eisen(II)konzentration (schwarze Balken) im Reisfeldboden (A) und an der Reiwurzel (B) in Abhängigkeit zur Vegetationsphase der Reispflanzen in den Mikrokosmen. Es wurden Mittelwerte ($n=3$) \pm SE aufgetragen.

Tab. C.1: Die Anzahl der 16S rRNA-Gene g Trockengewicht⁻¹ von Stamm FAc12 und Verwandten im Reisfeldboden und an der Reisswurzel während der Vegetationsperiode von Reis. Alle angegebenen Werte wurden über PCR-abhängige Verdünnungsreihen ermittelt. Wenn nicht anders erwähnt, wurden Mittelwerte (n=3 Mikrokosmen) ± SE aufgetragen.

	Stamm FAc12 und Verwandte [Anzahl 16S rRNA-Gene g Tg ⁻¹]	Bacteria [Anzahl 16S rRNA-Gene g Tg ⁻¹]	Prozent FAc12 und Verwandte/Bacteria [%]
Reisfeldboden			
29. Tag	nicht detektiert	0,15 ± 0,00 x 10 ⁷	0
45. Tag	0,6 ± 0,59 x 10 ⁵	0,7 ± 0,53 x 10 ⁷	0,9
75. Tag	2,5 ± 0,02 x 10 ⁵	0,2 ± 0,02 x 10 ⁷	13
95. Tag	3,8 x 10 ⁵ (n=1)	1,47 ± x 10 ⁷ (n=1)	2,6
Reissurzeln			
29. Tag	0,34 x 10 ⁶ (n=1)	0,13 x 10 ⁸ (n=1)	2,6
45. Tag	1,65 ± 0,32 x 10 ⁶	1,64 ± 0,32 x 10 ⁸	1
75. Tag	1,33 ± 0,24 x 10 ⁶	1,33 ± 0,24 x 10 ⁸	7
95.Tag	1,47 ± 0,45 x 10 ⁶	1,47 x 10 ⁸ (n=1)	1

3.4 Reispflanzenwachstums abhängige Quantifizierung von Stamm FAc12 und Verwandten mit PCR-abhängigen Verdünnungsreihen

Um die Abundanz von Stamm FAc12 und Verwandten in Abhängigkeit zum Reispflanzenwachstum zu bestimmen, wurde DNA aus beiden Kompartimenten am 29., 45., 75. und 95. Tag nach Aussaat extrahiert. Die jeweiligen DNA-Lösungen wurden mit Sigma-Wasser (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) in 1:10-Schritten verdünnt und mit dem PCR-System FAc12 II amplifiziert. Es wurden 45 Zyklen durchgeführt, da 50 Zyklen erst bei dieser Zyklenanzahl zu einem sichtbaren PCR-Produkt führen (Innis und Gelfand, 1990). Parallel wurden alle Umweltproben auch mit einem für *Bacteria* universellen PCR-System (Lane, 1991 und Weisburg, 1991) unter den gleichen Bedingungen amplifiziert.

Stamm FAc12 und Verwandte wurden in beiden Kompartimenten zu jedem Probezeitpunkt mit dem spezifischen PCR-System nachgewiesen (Tab. C.1 und Abb. C.14). In einigen Mikrokosmen konnten die 16S rRNA-Gene allerdings nur mit Premix F (MasterAmp 2 x PCR PreMixes, Biozym) amplifiziert werden (Abb. C.14). Diese Proben wurden bei der

Quantifizierung als nicht nachweisbar (=0) mit einbezogen. An der Reiswurzel stieg die Anzahl der 16S rRNA-Gene von Stamm FAc12 und Verwandten stieg vom 29. Tag ($0,34 \times 10^6$) bis zum 45. Tag an und blieb dann relativ stabil (ca. $1,5 \times 10^6$ 16S rRNA-Gene $g\ TG^{-1}$). Der prozentuale Anteil von Stamm FAc12 und Verwandten an den 16S rRNA-Genen der *Bacteria* sank vom 29. Tag (2,6%) bis zum 45. Tag (1%) und blieb dann konstant.

Im Reisfeldboden war Stamm FAc12 und Verwandte am 29. Tag und am 45. Tag (2 von drei Mikrokosmen) mit dem für die Quantifizierung benutzten PCR-System nicht oder nur schwach nachweisbar. Am 75. Und 95. Tag blieb die detektierbare Anzahl der 16S rRNA-Gene stabil und wies ca. 10^5 auf. Der prozentuale Anteil von Stamm FAc12 und Verwandten an den 16S rRNA-Genen der *Bacteria* nahm vom 29. Tag (0%) bis zum 75. Tag (13%) zu. Am 95. Tag konnten nur noch 2,6% aller *Bacteria* als Mitglieder von Stamm FAc12 und Verwandten identifiziert werden.

			29. Tag Reisfeldboden						45. Tag Reisfeldboden					
			I		II		III		I		II		III	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15

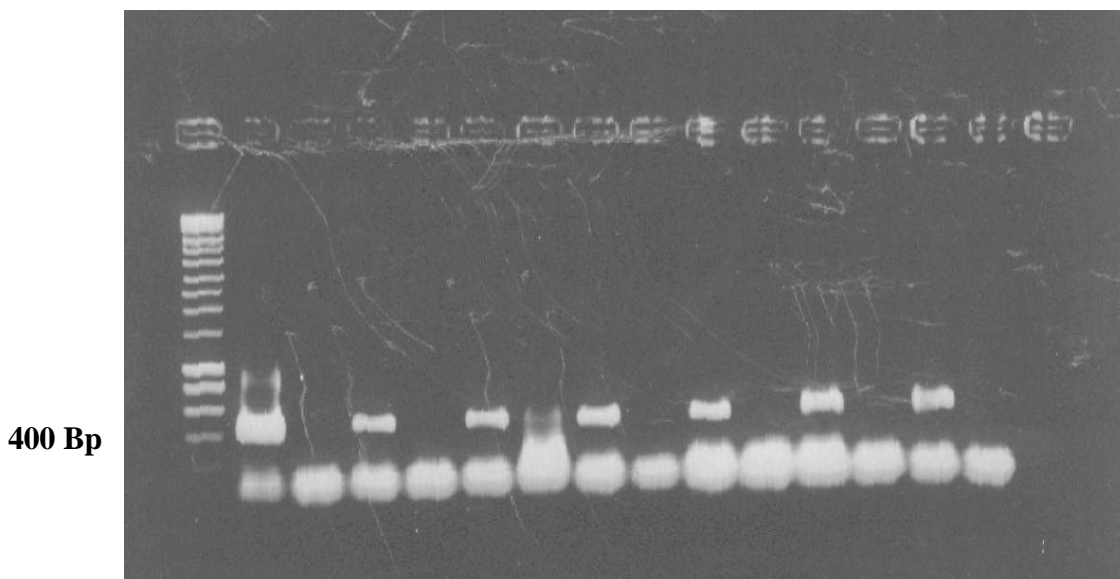


Abb. C.14: PCR-vermittelte Amplifikation der 16S rRNA-Gene aus Umwelt-DNA mit dem modifizierten PCR-System FAc12. Die Umwelt-DNA wurde zu verschiedenen Zeitpunkten der Vegetationsphase der Reispflanzen in den Mikrokosmen aus Reisfeldboden extrahiert. Spur 1: Längenstandard („Smart Ladder“; Eurogentec), Spur 2: Positivkontrolle, Spur 3: H_2O , Spur 4-9: Reisfeldboden; Probe am 29. Tag nach Aussaat entnommen, Spur 4: Mikrokosmos I; unverdünnt, Spur 5: Mikrokosmos I, 1:10 verdünnt, Spur 6: Mikrokosmos II; unverdünnt, Spur 7: Mikrokosmos II, 1:10 verdünnt, Spur 8: Mikrokosmos III; unverdünnt, Spur 9: Mikrokosmos III, 1:10 verdünnt, Spur 10-15: Reisfeldboden, Probe am 45. Tag nach Aussaat entnommen, Spur 10: Mikrokosmos I; unverdünnt, Spur 11: Mikrokosmos I, 1:10 verdünnt, Spur 12: Mikrokosmos II; unverdünnt, Spur 13: Mikrokosmos II, 1:10 verdünnt, Spur 14: Mikrokosmos III; unverdünnt und Spur 15: Mikrokosmos III, 1:10 verdünnt.

D. Diskussion

1. Vergleich von Stamm FAc12 mit „*Anaeromyxobacter dehalogenans*“, Stamm KC und den Myxobakterien

Stamm FAc12 wurde aus Reisfeldboden mit Acetat und Ferrihydrit unter strikt anoxischen Bedingungen angereichert und isoliert. Anaerob wächst Stamm FAc12 auch mit den Elektronenakzeptoren Nitrat und Fumarat. Aerobes Wachstum wurde in Mineralsalzmedium mit entweder Acetat, Citrat oder Glucose oder in Komplexmedium beobachtet. Phylogenetisch gehört Stamm FAc12 zur Ordnung der *Myxococcales*. Die strikt aeroben Vertreter dieser Ordnung sind durch die Fähigkeit charakterisiert, unter Nährstoffmangel Fruchtkörper mit Myxosporen bilden zu können (Schlegel, 1992 und Dawid, 2000). Auf Basis vergleichender 16S rRNA-Gensequenzanalysen bildeten die Myxobakterien bisher drei Entwicklungslinien. Vertreter der Gattungen *Chondromyces* und *Polyangium* bilden eine Entwicklungslinie, während Vertreter der Gattungen *Myxococcus*, *Stigmatella*, *Melittangium* und *Cystobacter* eine weitere Entwicklungslinie darstellen. In der dritten Entwicklungslinie findet sich ausschließlich das Bakterium *Nannocystis exedens*. Stamm FAc12 bildet mit „*Anaeromyxobacter dehalogenans*“ (Sanford *et al.*, 2002), Stamm KC (Coates *et al.*, 2002) und den von D. Rosencrantz (1998) von 45- und 90 Tage alten Reiwurzeln gewonnenen Umweltsequenzen (mindestens 1000 Bp lang) einen eigenen, vierten Entwicklungsast innerhalb der Ordnung der *Myxococcales*. Dabei beträgt der 16S rRNA-Gensequenzunterschied zwischen Stamm FAc12 und „*A. dehalogenans*“ maximal 0,5%, während Stamm KC eine 16S rRNA-Gensequenzähnlichkeit von 97,2% mit Stamm FAc12 teilt. Die 16S rRNA-Gensequenzunterschiede zwischen den von Reiwurzeln gewonnenen Umweltsequenzen und Stamm FAc12 betragen 3,3 - 4,4%.

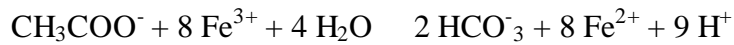
Fünf Stämme von „*A. dehalogenans*“ (2CP-1, 2CP-2, 2CP-3, 2CP-5 und 2CP-C) (Sanford *et al.*, 2002) wurden unabhängig voneinander aus einem Flußsediment, einem Teichsediment, einem Regenwaldboden und einem Gartenkompost unter strikt anoxischen Bedingungen angereichert und isoliert. Das Anreicherungsmedium (Mineralsalzmedium) enthielt Acetat und 2-Chlorphenol. „*A. dehalogenans*“ ist Gram-negativ. Die Zellen von „*A. dehalogenans*“ sind 0,25 µm breite und 4-8 µm lange, bewegliche Stäbchen. Neben verschiedenen Chlorverbindungen kann „*A. dehalogenans*“ auch Nitrat, Fumarat und Sauerstoff als Elektronenakzeptoren nutzen. Aerobes Wachstum konnte allerdings nur unter

mikroaerophilen Bedingungen ($< 1 \text{ mM}$) festgestellt werden. „*A. dehalogenans*“ bildet unter anoxischen Bedingungen auf Agarplatten Fruchtkörper und bewegt sich auf der Agaroberfläche gleitend.

Stamm KC wurde aus einem mit Perchlorat verunreinigtem Sediment isoliert (Coates *et al.*, 2002). Das Anreicherungsmedium (Mineralsalzmedium) enthielt als Elektronendonator 2,6-Anthrachinon, Acetat als Kohlenstoffquelle und Nitrat als Elektronenakzeptor. Die Zellen von Stamm KC sind Gram-negative, unbewegliche $0,3 \text{ }\mu\text{m}$ breite und $5,3 \text{ }\mu\text{m}$ lange Stäbchen. Stamm KC kann ausschließlich Nitrat als Elektronenakzeptor nutzen und ist somit strikt anaerob. Neben Acetat werden von Stamm KC auch Wasserstoff, Fumarat und andere Kohlenstoffquellen und Elektronendonatoren genutzt.

Trotz der engen phylogenetischen Verwandtschaft unterscheiden sich Stamm FAc12, „*A. dehalogenans*“ und Stamm KC physiologisch deutlich voneinander. Zwar besitzen alle bisher isolierten Bakterien des vierten Entwicklungsastes dieselbe Zellmorphologie, unterscheiden sich aber hinsichtlich der Beweglichkeit (Tab. D.1). Stamm KC nutzt, wie Stamm FAc12 und „*A. dehalogenans*“ Nitrat als Elektronenakzeptor. Während Stamm FAc12 und „*A. dehalogenans*“ auch Fumarat reduzieren können, bleibt Stamm KC auf den Elektronenakzeptor Nitrat beschränkt. Auch konnte nur bei Stamm FAc12 und „*A. dehalogenans*“ (nur unter mikroaerophilen Bedingungen) aerobes Wachstum festgestellt werden. Der Befund, daß „*A. dehalogenans*“ unter anoxischen Bedingungen Fruchtkörper bildet und Stamm FAc12 und Stamm KC nicht, ist durch die unterschiedlichen Anreicherungswege erklärbar. „*A. dehalogenans*“ wurde bereits nach wenigen Passagen in Flüssigmedium zur Isolation in eine Tiefagarverdünnungsreihe gebracht und anschließend auf Agarplatten kultiviert, während Stamm FAc12 und Stamm KC zur Anreicherung mehrfach in Flüssigmedium überimpft, und auch nach der Isolation in Flüssigmedium kultiviert wurden. Diese unterschiedlichen Vorgehensweisen mögen der Grund für eine Degeneration jener myxobakteriellen Eigenschaften gewesen sein, da für eine Fruchtkörperbildung eine Oberfläche notwendig ist. Anaerobes Wachstum mit dem Elektronenakzeptor Fe(III) wurde zunächst nur bei Stamm FAc12 beobachtet. In einem Wachstumsexperiment reduzierte Stamm FAc12 $22,24 \pm 0,22 \text{ mM}$ Fe(III)citrat und oxidierte gleichzeitig $3,24 \pm 0,07 \text{ mM}$ Acetat. Parallel stieg die Zellproteinkonzentration um $16,27 \pm 1,48 \text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$ an (Abb. C.1). Somit betrug das Verhältnis zwischen entstandenen Mol Fe(II) zu verbrauchten Mol Acetat 6,86. Wenn davon ausgegangen wird, das Acetat zum Teil für den Baustoffwechsel benötigt

wird, erfolgt die Oxidation von Acetat mit dem Elektronenakzeptor Fe(III) in Stamm FAc12 nach folgender Reaktionsgleichung:



Stamm KC zeigte dagegen kein Wachstum mit dem Elektronenakzeptor Fe(III)NTA (Coates *et al.*, 2002). „*A. dehalogenans*“ wurde bisher noch nicht von Sanford *et al.* (2002) auf die Fähigkeit, dissimilatorisch Eisen reduzieren zu können überprüft. In dieser Arbeit konnte aber gezeigt werden, daß dieses fakultativ anaerobe Myxobakterium sehr gut in anoxischem Minimalmedium mit 5 mM Acetat und 40 mM Fe(III)citrat wächst.

Auch Sass *et al.* (1998) beschrieben, daß phylogenetisch eng verwandte Bakterien physiologisch deutlich voneinander abweichen können und voneinander unterscheidbare Stämme einer Art sind. Obwohl die 16S rRNA-Gensequenzen der isolierten Sulfatreduzierern identisch waren, wichen ihre physiologischen Eigenschaften und die Muster ihrer jeweiligen ERIC-PCR deutlich voneinander ab. Stamm FAc12 weist eine 16S rRNA-Gensequenzähnlichkeit von 97,2 % zu Stamm KC auf und ist somit ein eigener Stamm. Durch ein DNA-DNA-Rehybridisierungsexperiment könnte eindeutig gezeigt werden, ob Stamm FAc12 und „*A. dehalogenans*“ trotz ihrer hohen 16S rRNA-Gensequenzähnlichkeit unterschiedliche Stämme einer Art sind.

Tab. D.1: Vergleich der physiologischen Fähigkeiten von Stamm FAc12 mit denen von „*A. dehalogenans*“ und Stamm KC

Physiologische Charakteristika	„ <i>A. dehalogenans</i> “	Stamm KC	Stamm FAc12
Charakteristika der Myxobakterien:			
Gleitende Bewegung auf festen Oberflächen	+	-	-
Bildung von Fruchtkörpern mit Sporen	+	-	-
Morphologie	lange Stäbchen 0,25 x 4-8 µm	lange Stäbchen 0,3 x 5,3 µm	lange Stäbchen 0,4 x 2,1 –5 µm
Beweglichkeit	+	-	-
Elektronenakzeptoren:			
Sauerstoff	mikroaerophil	-	+
Nitrat	+	+	+
Eisen(III)	+	-	+
Chlorverbindungen	+	n. b.	n. b.
Elektronendonatoren:			
Acetat	+	+	+
Wasserstoff	+	+	-

n. b. nicht bestimmt

2. Anreicherung und Isolation von eisenreduzierenden Bakterien

In Experimenten mit unbepflanzten Mikrokosmen wurde gezeigt, daß im Reisfeldboden überwiegend die Eisenoxide Ferrihydrit und Lepidokrokit mikrobiell reduziert werden (Ratering, 1999). Ferrihydrit wird mikrobiell schneller reduziert als Lepidokrokit, weil es ein Eisenoxid mit einer relativ großen Oberfläche ist (200-300 m²g⁻¹ gegenüber 70-80 m² g⁻¹) (Schwertmann und Cornell, 1991; Weber *et al.*, 1979 und Roden und Zachara, 1996). Aus diesen Gründen wurde für die Anreicherung von dissimilatorischen Eisenreduzieren von Reiswurzeln, Ferrihydrit als Elektronenakzeptor eingesetzt. Als Elektronendonator wurde

entweder Acetat, Propionat oder H_2 verwendet. Diese Elektronendonatoren sind wichtige Intermediate des anaeroben Abbaus im Reisfeldboden (Achnich *et al.*, 1995; Chin und Conrad, 1995). Acetat, Propionat, Lactat und H_2 sind auch bekannte Substrate/Elektronendonatoren der bereits beschriebenen dissimilatorischen Eisenreduzierer der α - und β -Subklasse der *Proteobacteria* (Lovley *et al.*, 1997). Lactat wurde in den hier beschriebenen Anreicherungskulturen nicht als Substrat eingesetzt, weil es auch von gärenden Bakterien zusammen mit methanogenen *Archaea* verwertet werden kann, wodurch Formiat, Acetat und Propionat gebildet wird. Propionat kann dann z.B. syntroph durch *Synthrophobacter wolinii* verwertet werden (Schink *et al.*, 1991). Die Produkte der syntrophen Substratvergärung sind Wasserstoff und Acetat, die durch hydrogenotrophe und acetoclastische Methanogene verwertet werden. Außerdem wurde in unbepflanzten Mikrokosmen gezeigt, daß Lactat in der Zone der aktiven Eisenreduktion (Bodentiefe von 48 mm) akkumuliert (Ratering, 2000). Dies könnte darauf hindeuten, daß Lactat von eisenreduzierenden Bakterien im Reisfeldboden nicht als Kohlenstoffquelle und Elektronendonator genutzt wird.

Aus den Anreicherungskulturen mit 112 Tage alten Reiswurzeln und Ferrihydrit und H_2 wurde dissimilatorische Eisenreduzierer angereichert, aber bisher noch nicht in Reinkultur gebracht. Dies gilt auch für die Anreicherungskulturen von Reiswurzeln mit Ferrihydrit und Propionat. Mit Acetat und Ferrihydrit wurden elf Stämme von dissimilatorischen Eisenreduzierern von Reiswurzeln isoliert (Stamm LGA, Stamm LGAIII, Stamm LMA, Stamm II, Stamm LMAIII, Stamm RGA, Stamm RGAI, Stamm RGAIII, Stamm RMA, Stamm RMAII und Stamm RMAIII). Diese elf Stämme wurden in vier verschiedenen Anreicherungskulturen angereichert. Diese Anreicherungskulturen unterschieden sich lediglich im Inokulum (112 Tage alte Reiswurzeln der Varianten Lido oder Roma) und der Bearbeitung des Inokulums (mit dem Mörser zerrieben oder mit Glasperlen abgerieben). Das aus den Anreicherungskulturen mit 112 Tage alten Reiswurzeln der Variante Koral und Ferrihydrit und Acetat bisher noch kein dissimilatorischer Eisenreduzierer in Reinkultur gebracht werden konnte, mag durch die von den einzelnen Varianten abgegebenen Exsudaten (z.B. Zucker, Aminosäuren oder organische Säuren) begründet sein. Die Quantität und Art dieser Verbindungen variiert nicht nur zwischen verschiedenen Pflanzenarten, sondern auch zwischen verschiedenen Alterstufen und Bereichen von Reiswurzeln (Whipps, 1990; Rosencrantz, 1998). Somit ist es auch möglich, daß die Inokulation verschiedener Reiswurzelsbereiche zu unterschiedlichen Anreicherungen geführt haben könnte.

Die elf isolierten Stämme gehören phylogenetisch alle zu der neuen, vierten Entwicklungslinie der *Myxococcales*. Sie sind eng verwandt mit „*A. dehalogenans*“, Stamm KC und Stamm FAc12 (16S rRNA-Gensequenzunterschiedlichkeit zwischen Stamm FAc12 und den elf Stämmen liegt zwischen 0,4 – 1,0%). Die Charakterisierung zeigte, daß diese elf Isolate, Stamm FAc12 nicht nur phylogenetisch, sondern auch morphologisch und physiologisch gleichen. Alle elf Stämme sind 0,5 µm breite und 3-5 µm lange dünne, bewegliche Stäbchen. Sie wachsen anarob mit Ferrihydrit oder Eisen(III)citrat und Acetat, sowie aerob in flüssigem Komplexmedium. Ein DNA-DNA-Rehybridisierungsexperiment und weitere physiologische Tests könnten zeigen, ob die einzelnen Isolate abweichende Stämme einer Art sind.

Weitere Vertreter der α -*Proteobacteria* wurden bisher noch nicht von 112 Tage alten Reiswurzeln in Reinkultur gebracht, obwohl die strikt anaeroben Mitglieder der Familie der *Geobacteraceae*, wie z.B. *Geobacter metallireducens* (Lovley und Phillips, 1998) Acetat, Propionat und H₂ als Elektronendonator während der dissimilatorischen Eisenreduktion verwerten können und bereits mit diesen Substraten bereits von vielen verschiedenen Standorten angereichert und isoliert wurden (Lovley *et al.*, 1997). Auch die fakultativ anaeroben Eisenreduzierer der α -*Proteobacteria*, wie z.B. *Shewanella putrefaciens* (Meyers und Nealson, 1988) wurden bisher noch nicht aus den Anreicherungskulturen mit 112 Tage alten Reiswurzeln und entweder Acetat, Propionat oder H₂ in Reinkultur gebracht. Das mag darin begründet sein, daß dissimilatorische Eisenreduzierer der α -*Proteobacteria* überwiegend Lactat als Substrat verwerten (Lovley *et al.*, 1997). Aus Reisfeldboden wurden hingegen andere Eisenreduzierer der α -, β - und γ -*Proteobacteria* isoliert (Schnell, persönliche Mitteilung).

3. Stamm FAc12 und Verwandte im Reisfeldboden und an der Reiswurzel

3.1 Diversität von Stamm FAc12 und Verwandten an der Reiswurzel

D. Rosencrantz (1998) generierte mit Umwelt-DNA, die von 45- und 90 Tage alten Reiswurzeln extrahiert wurde, zwei Klonbibliotheken. Die Umweltsequenzen wurde vor der Klonierung mit den Primern EUB 9f und EUB 1492r amplifiziert. Die 56 in den zwei Klonbibliotheken enthaltenen Umweltsequenzen wurden vergleichend phylogenetisch charakterisiert. Die überwiegende Anzahl der Umweltsequenzen wurden hierbei den α und β

Proteobacteria zugeordnet. Zehn der Umweltsequenzen gehörten allerdings zu dem neuen, vierten Entwicklungsast der Ordnung *Myxococcales*. Die Sequenzunterschiede zwischen den zehn von Reiswurzeln gewonnenen Umweltsequenzen betragen bis zu 4,4%. Die 16S rRNA-Gensequenzunterschiede zwischen Stamm FAc12 und den zehn Umweltsequenzen betragen zwischen 3,3 – 4,4%.

In dieser Arbeit sollten weitere Umweltsequenzen von Reiswurzeln gewonnen werden, die dem neuen, vierten Entwicklungsast der *Myxococcales* zugeordnet sind. Hierfür wurde DNA aus 90- und 95 Tage alten Reiswurzeln extrahiert und mit den Primern EUB 9f und EUB 1492r amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden anschließend kloniert. Die so erzielten 160 Klone wurden mit ARDRA („Amplified ribosomal DNA restriction analysis“) untersucht. ARDRA ist eine DNA-Fingerabdruckmethode, die es ermöglicht bakterielle Gattungen und sogar Spezies ohne Sequenzierung zu identifizieren (Vanechoutte *et al.*, 1992). Durch ARDRA und anschließende Sequenzierung, der mit ARDRA positiv getesteten Umweltsequenzen, wurde keine 16S rRNA-Gensequenz von Stamm FAc12 und Verwandten gefunden, die nicht schon von D. Rosencrantz ermittelt wurde. Somit wurde auch keine 16S rRNA-Gensequenz gefunden, die einen höhere Sequenzunterschied zu Stamm FAc12 aufweist als 4,4%. Untersucht wurden insgesamt 216 (56 Umweltsequenzen erzielt von D. Rosencrantz und 160 Umweltsequenzen erzielt in dieser Arbeit), von drei unterschiedlichen Reiswurzeln erzielten, Umweltsequenzen.

3.2 Struktur von Stamm FAc12 und Verwandten an der Reiswurzel und im Reisfeldboden

Mit T-RFLP-Analysen (Liu *et al.*, 1997) wurde die 16S rRNA-Gensequenzheterogenität von Stamm FAc12 und Verwandten an der Reiswurzel und im Reisfeldboden untersucht. Bei dieser Methode gibt die Anzahl der fluoreszenzmarkierten terminalen Restriktionsfragmente Hinweise auf die Komplexität der mit dem PCR-System FAc12 erfaßten Mikroorganismusgruppe. Im Idealfall entspricht ein terminales Restriktionsfragment einer bestimmten Länge einem Mikroorganismus (Liu *et al.*, 1997). Die Auflösung ist jedoch in der Praxis immer geringer (Phelps *et al.*, 1998). Allerdings ist die Wahrscheinlichkeit, daß phylogenetisch nahe Verwandte die selbe terminale Fragmentlänge aufweisen, aufgrund ihrer 16S rRNA-Gensequenzähnlichkeit höher als bei weniger nahe verwandten Bakterien. In dieser Arbeit wurde die aus Reisfeldboden und von Reiswurzeln extrahierte DNA zunächst mit dem PCR-System FAc12 amplifiziert. Mit den Restriktionsenzymen *Rsa* I und *Alu* I konnte das ca. 400 Bp lange spezifische PCR-Produkt in maximal drei terminale Fragmente

unterschiedlicher Länge verdaut werden. Die drei terminalen Fragmente besaßen die Längen 118 Bp, 150 Bp und 157 Bp. Das Elektropherogramm aller untersuchten Reisfeldboden- und Reiswurzelpollen zeigte diese drei Peaks. Wobei stets das TRF mit einer Länge von 150 Bp die höchste relative Signalintensität aufwies.

Die von D. Rosencrantz von 45- und 90 Tage alten Reiswurzeln erzielten Umweltsequenzen (D. 3.1), die dem neuen, vierten Entwicklungsast der *Myxococcales* zugehören, wurden auf ihre theoretische Restriktionsschnittstellen von *Rsa* I und *Alu* I untersucht. Dabei wurde die theoretische Amplifikation der Umweltsequenzen mit den Primern FAc12 66f und FAc12 432r vorausgesetzt. Diese theoretische Überprüfung ergab, daß die zehn untersuchten Umweltsequenzen alle entweder ein terminales Fragment von 118 Bp, 150 Bp oder 157Bp aufweisen. Hierbei wies die Mehrzahl der Umweltsequenzen (DRc 90tw-12, DRc 45twx-27, DRc 45twx-26, DRc 90tw-25 und DRc 45twx-51) ein 150 Bp langes T-RF auf. D. Rosencrantz amplifizierte die von 45- und 90 Tagen alten Reiswurzeln extrahierte DNA mit den Primern EUB 9f und EUB 1492r. Die in dieser Arbeit mit T-RFLP analysierte, von Reisfeldboden und Reiswurzeln erzielte Umwelt-DNA, wurde zuvor mit den Primern FAc12 66f und FAc12 432r amplifiziert. Somit wurde (basierend auf zwei unterschiedlichen PCR-Systemen) an der Reiswurzel und im Reisfeldboden keine 16S rRNA-Gensequenz oder kein T-RF erzielt, die/der einen höheren Sequenzunterschied zu dem 16S rRNA-Gen von Stamm FAc12 aufweist als 4,4%.

Alle bereits in Reinkultur vorliegenden Bakterien (Stamm FAc12, „*Anaeromyxobacter dehalogenans*“, Stamm KC und alle in dieser Arbeit von der Reiswurzel isolierten Bakterien (D.2)), die dem neuen, vierten Entwicklungsast der *Myxococcales* angehören, wurden ebenfalls theoretisch auf Schnittstellen der Enzyme *Rsa* I und *Alu* I überprüft. Auch hier wurde die theoretische Amplifikation der jeweiligen 16S rRNA-Gensequenz mit den Primern FAc12 66f und FAc12 432r vorausgesetzt. Dieser Test ergab, daß alle untersuchten Reinkulturen nach einer T-RFLP-Analyse, ein T-RF von 118 Bp Länge aufweisen würden. Dieses Ergebnis zeigt, daß bisher noch nicht Bakterien des neuen, vierten Entwicklungsastes der *Myxococcales* isoliert wurden, die nach einer T-RFLP-Analyse (der mit dem spezifischen PCR-System FAc12 erzielten PCR-Produkte) ein TR-F von 150 Bp oder 157Bp Länge aufweisen würden. Der maximale 16S rRNA-Gensequenzunterschied zwischen Stamm FAc12, „*A. dehalogenans*“, Stamm KC und den in dieser Arbeit erzielten Isolaten beträgt 2,8%. Trotz dieser nahen Verwandtschaft unterscheiden sich diese Bakterien physiologisch deutlich voneinander (D. 1). So sind Stamm FAc12 und „*A. dehalogenans*“ z.B. fakultativ anaerob und wachsen unter anoxischen Bedingungen mit Eisen(III) als Elektronenakzeptor,

während Stamm KC strikt anaerob ist und nicht dissimilatorisch Eisen reduzieren kann. Der 16S rRNA-Gensequenzunterschied zwischen allen bereits erzielten Umweltsequenzen beträgt maximal 4,4%. Da schon bei einem 16S rRNA-Gensequenzunterschied von 2,8% deutliche physiologische Unterschiede zwischen zwei Mikroorganismen des neuen, vierten Entwicklungsastes der *Myxococcales* bestehen können, muß die physiologische Beschreibung dieser Gruppe als noch nicht abgeschlossen betrachtet werden.

3.3 Vorkommen von Stamm FAc12 und Verwandten in Abhängigkeit der Vegetationsphase von Reispflanzen

Da Stamm FAc12 und verwandte Mikroorganismen wiederholt aus Reisfeldboden und von Reiswurzeln isoliert wurden, sollte die Abundanz dieser Bakterien über die Wachstumsperiode von Reispflanzen untersucht werden. Dazu wurde das spezifische PCR-System FAc12 II verwendet. Mit diesem spezifischen PCR-System wurden Stamm FAc12 und Verwandte am 29., 45., 75. und 95. Tag nach Setzung der Reispflanzen in kompartimentierte Mikrokosmen sowohl im Reisfeldboden, wie auch an der Reiswurzel nachgewiesen und quantifiziert. Da Stamm FAc12 fakultativ anaerob ist, könnte er in beiden Kompartimenten vorkommen. Die Acetat-, Gesamteisen- und Eisen(II)konzentration wurde zu jedem Probenahmezeitpunkt bestimmt, um evtl. Zusammenhänge zwischen der Anzahl der FAc12-spezifischen 16S rRNA-Gensequenzen und diesen für Stamm FAc12 relevanten Substrate und Produkte herauszufinden. Die hier angewandte Quantifizierungsmethode (Verdünnungsreihen-PCR mit PCR-System FAc12 II) ist nur für eine Abschätzung der Populationsgröße von Stamm FAc12 und Verwandte geeignet. Die hier erzielten Ergebnisse können somit nur einen ersten Eindruck vermitteln.

An der Reiswurzel wurde Stamm FAc12 und Verwandte am 29., 45., 75. und 95. Tag nachgewiesen. Die Anzahl der 16S rRNA-Gensequenzen von Stamm FAc12 und Verwandten stieg vom 29. Bis zum 45. Tag an und blieb dann konstant bei ca. $1,5 \times 10^6$ 16S rRNA-Gensequenzen $g\ TG^{-1}$. Der maximale Anteil der FAc12-spezifischen 16S rRNA-Gensequenzen an der Anzahl der allg. bakteriellen 16S rRNA-Gensequenzen betrug 2,6%. An der Reiswurzel stieg die Acetatkonzentration vom 29. – 95. Tag an. Durch die Diffusion von Sauerstoff aus dem Aerenchym kommt es an der Reiswurzel zu einer Reoxidation von Fe(II) zu Fe(III) (Green und Etherington, 1977; Ando *et al.*, 1983; Trolldenier, 1988; Begg *et al.*, 1994; Kirk und Bajita, 1995). Sauerstoff tritt überwiegend direkt hinter der Wurzelspitze der Reiswurzel aus dem Aerenchym, ältere Wurzelabschnitte (Trolldenier, 1988; Gilbert und

Frenzel, 1998) bieten somit anoxische Mikrohabitate, die Wachstum von strikt anaeroben Mikroorganismen wie z.B. Methanogenen ermöglichen (Großkopf, 1998). Stamm FAc12 wächst aerob wie anaerob (durch dissimilatorische Eisenreduktion) gut mit dem Elektronendonator Acetat. Stamm FAc12 kann an der Reiswurzel also aerob mit Acetat wachsen oder anaerob in den anoxischen Mikrohabitaten mit Eisen(III) und Acetat. Die Reduktion von Sauerstoff (O_2/H_2O : $E^{\circ} = 810 \text{ mV}$) führt allerdings zu einem vergleichsweise besserem Wachstum, als die Reduktion von Eisen(III) ($Fe(OH)_3 + HCO_3^-/FeCO_3$: $E^{\circ} = 200 \text{ mV}$). Dies könnte eine Begründung dafür sein, daß Stamm FAc12 an der oxischen Reiswurzel zahlreicher (ca. 10^6 16S rRNA-Gensequenzen $g \text{ TG}^{-1}$) als im anoxischen Boden war (ca. 10^5 16S rRNA-Gensequenzen $g \text{ TG}^{-1}$).

Im Reisfeldboden war Stamm FAc12 und Verwandte am 29. Tag in allen drei Mikrokosmen nicht und am 45. Tag nur in zwei von drei Mikrokosmen mit dem PCR-System FAc12 II nachweisbar. Am 75. und 95. Tag blieb die ermittelte Anzahl der FAc12-spezifischen 16S rRNA-Zielgene konstant bei ca. 3×10^5 16S rRNA-Gensequenzen $g \text{ TG}^{-1}$. Der maximale Anteil der FAc12-spezifischen 16S rRNA-Gensequenzen an der gesamten Anzahl der 16S rRNA-Gensequenzen aller detektierbarer *Bacteria* betrug dabei im Boden 13%. Die Acetatkonzentration schwankte zwischen $34 \mu\text{M}$ - $42 \mu\text{M}$ (Tag 45. und Tag 75) und der Nachweisgrenze (Tag 29. und Tag 95.) Die ermittelten Gesamteisen- und Eisen(II)konzentrationen im Reisfeldboden zeigen, daß Eisen(III) nur bis zum 29. Tag im Gesamtboden zu Eisen(II) reduziert wurde. Das wird auch von Untersuchungen von Ratering *et al.* (2000) bestätigt. In unbepflanzten Mikrokosmen konnte nach sechs Wochen eine Eisenreduktion nur noch in einer Bodentiefe von 4-8 mm festgestellt werden. Die Zunahme der Anzahl der FAc12-spezifischen 16S rRNA-Gensequenzen $g \text{ TG}^{-1}$ kann somit nicht durch Wachstum von Stamm FAc12 und verwandten Mikroorganismen durch dissimilatorische Eisenreduktion erklärt werden. Da nach der thermodynamischen Theorie Nitrat vor Eisen reduziert wird (Ponnamperuma, 1972, Zehnder und Stumm, 1988) ist der Anstieg der Anzahl der FAc12-spezifischen 16S rRNA-Gensequenzen auch nicht durch Wachstum von Stamm FAc12 und verwandten Mikroorganismen durch Nitratreduktion erklärbar. Auch die Sulfatreduktion kann als Erklärung für den Anstieg der Anzahl der FAc12-spezifischen 16S rRNA-Gensequenzen ausgeschlossen werden, da in Experimenten mit anoxisch inkubiertem Reisfeldboden bewiesen wurde, daß dieser anaerobe Stoffwechselweg eine untergeordnete Rolle am anaeroben Abbau spielt (Jäckel Schnell, 2000). Im anoxischen Reisfeldboden wird sechs Wochen nach Flutung CO_2 zu CH_4 (durch Methanogene) oder

Acetat (Acetogene) reduziert (Rothfuss und Conrad, 1993). Stamm FAc12 und verwandte Mikroorganismen sind somit möglicherweise acetogen. Acetogene Bakterien können chemoorganotroph (Fermentation von verschiedenen Zuckern) oder chemolithotroph (Reduktion von CO₂ mit H₂) wachsen. CO₂ wird dabei über den Acetyl-CoA Weg fixiert. Acetogene Bakterien sind strikt anaerob und Gram-positiv oder Gram-negativ. Vertreter dieser physiologischen Gruppe sind viele Clostridien wie z.B. *Clostridium aceticum* oder *Clostridium thermoaceticum*, aber auch *Eubacterium limosum* oder *Treponema* sp. (Maidak, 2003). Im Reisfeldboden und in anderen anoxischen Habitaten mit einem niedrigen Redoxpotential nutzen neben acetogenen Bakterien auch chemolithotrophe Methanogene H₂ und CO₂ (Brock, 2003, Fritsche, 1999 und Conrad, 1989). Aus Reisfeldboden wurden z.B. H₂ und/oder Formiat verwertende Methanogene der Gattungen *Methanobacterium* (Rajagopal *et al.*, 1988, Conrad *et al.*, 1989 und Fetzer *et al.*, 1993) und *Methanobrevibacter* (Asakawa *et al.*, 1993) isoliert. Im Reisfeld wurden dagegen bisher lediglich chemolithotrophe acetogene Bakterien der Gattung *Sporomusa* an der Reiswurzel mit einer Zellzahl von 10⁸ detektiert (Rosencrantz, 1998).

Stamm FAc12, „*Anaeromyxobacter dehalogenans*“ und der strikt anaerobe Stamm KC wurden bisher noch nicht auf acetogenes Wachstum überprüft. Auch wenn diese Vertreter des vierten Entwicklungsastes der *Myxococcales* nicht quantitativ abundant (T-RFLP-Analysen: 150 Bp-Peak) sind, könnte die Fähigkeit zum acetogenem Wachstum die physiologischen Eigenschaften dieser Gruppe erweitern.

4. Vorkommen von Stamm FAc12 und Verwandten in anderen Böden

Um einen ersten Eindruck über die Verbreitung von Stamm FAc12 und Verwandten zu erhalten, wurden verschiedene DNA-Umweltproben mit dem PCR-System FAc12 amplifiziert. Wurden Proben positiv getestet, folgte eine TRFLP-Analyse mit den Enzymen *Rsa* I und *Alu* I. Dies sollte Einblicke in die Diversität und Struktur von Stamm FAc12 und Verwandten in anderen Habitaten vermitteln. Insgesamt wurden acht Proben untersucht: drei verschiedene Wiesenböden (Wiese I-III), zwei Bereiche eines Kartoffelackers und drei Waldbodenproben aus verschiedenen Tiefen (0 cm, 0,5 cm und 5-10 cm). Mit dem PCR-System FAc12 wurde positiv getestet: Wiese I, Wiese II und die zwei Kartoffelackerproben. Der Waldboden wurde in der Nähe von Marburg gesammelt. Der pH-Wert lag bei 3,8. Myxobakterien sind ubiquitär in Böden zu finden. Die Verbreitung ist allerdings pH-Wert abhängig ((zwischen pH 5,0 und 8,0) Dawid, 2000).

Die terminalen Restriktionsfragmentmuster der einzelnen mit dem PCR-System FAc12 positiv getesteten Habitate unterschieden sich deutlich von den T-RFLP-Mustern von Reiswurzeln oder Reisfeldboden. Neben den drei schon aus den T-RFLP-Mustern von Reisfeldboden und der Reiswurzel bekannten T-RFs (118, 150 und 157 Bp) wurden weitere mit 86 Bp und mit 132 Bp detektiert. Das bedeutet, daß die Diversität des vierten Entwicklungsastes der *Myxococcales* zwar im Reisfeld, aber noch nicht ubiquitär vollständig erfaßt wurde. Außerdem unterschieden sich die Signalintensitäten der einzelnen T-RFs in den verschiedenen Umweltproben deutlich von denen im Reisfeldboden und an der Reiswurzel festgestellten. So waren in der Wiesenbodenprobe III zwar, wie in den Reisfeldbodenproben, die drei T-RFs mit 118, 150 und 157 Bp detektierbar, aber hier war das T-RF mit 118 Bp das mit der höchsten Signalintensität und nicht das T-RF mit 150 Bp. In einer Kartoffelackerprobe fehlte das T-RF mit 150 Bp vollständig. Dies bestätigt die Vermutung, daß die einzelnen T-RFs unterschiedliche physiologische Gruppen repräsentieren. Die phylogenetische und physiologische Charakterisierung der Vertreter des vierten Entwicklungsastes der *Myxococcales* ist somit noch nicht abgeschlossen.

E. Literaturverzeichnis

Achtnich C., Bak, F., and Conrad, R. (1995) Competition for electron donors among nitrate reducers, ferric iron reducers, sulfate reducers, and methanogens in anoxic paddy soil. *Biol. Fertil. Soils* **19**: 65-72

Ando T., S. Yoshida, and I. Nishiyama (1983) Nature of oxidizing power of rice roots. *Plant and soil* **72**: 57-71

Asakawa S., H. Morii, M. Akagawa-Matsushita, Y. Koga, and K. Hayano (1993) Characterization of *Methanobrevibacter arboriphilicus* SA isolated from paddy field soil and DNA-DNA hybridization among *M. arboriphilicus* strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**: 683-686

Begg C. B. M., G. J. D. Kirk, A. F. Mackenzie, and H.-U. Neue (1994) Root-induced iron oxidation and pH changes in the lowland rice rhizosphere. *New Phytol.* **128**: 469-477

Boone D. R., Y. Liu, Z.-J. Zhao, D. L. Balkwill, G. R. Drake, T. O. Stevens, and H. C. Aldirch (1995) *Bacillus infernus* sp. nov., an Fe(III)- and Mn(IV)-reducing anaerob from the deep terrestrial subsurface. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**: 441-448

Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254

Bueresh R. J., and J. T. Moraghan (1976) Chemical reduction of nitrate by ferrous iron. *J. Environ. Qual.* **5**: 320-325

Chao T. T., and L. Zhou (1983) Extraction techniques for selective dissolution of amorphous iron oxides from soils and sediments. *Soil Sci. Soc.* **47**: 225-232

Childs C. W. (1992) Ferrihydrite: a review of structure, properties and occurrence in relation to soils. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* **155**: 441-448

Chin K.-J., and R. Conrad (1995) Intermediary metabolism in methanogenic paddy soil and the influence of temperature. *FEMS Microbiology Ecol.* **18**: 85-102

Chin K.-J., Rainey, F. A., Janssen, P. H., and Conrad, R. (1998) Methanogenic degradation of polysaccharides and the characterization of polysaccharolytic clostridia from anoxic rice field soil. *System. Appl. Microbiology* **21**: 185-200

Coates J. D., K. A. Cole, R. Chakraborty, S. m. O'Connor, and L. A. Achenbach (2002) Diversity and ubiquity of bacteria capable of utilizing humic substances as electron donors of anaerobic respiration. *Appl. Environ. Microbiology* **68**: 2445-2452

Conrad R. (1989) Control of Methane Production in Terrestrial ecosystems, 39-58. In: Exchange of trace gases between terrestrial ecosystems and the atmosphere. Andreae O. and D. S. Schimel (eds.). John Wiley and Sons, Chichester, Großbritannien

Cummings D. E., F. Caccavo Jr., S. Spring, and R. F. Rosenzweig (1999) *Ferribacterium limneticum*, gen. nov., sp. nov., an Fe(III)-reducing microorganism isolated from mining-impact freshwater lake sediments. *Arch. Microbiology*. **171**: 183-188

Dawid W. (2000) Biology and distribution of myxobacteria in soils. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**: 403-427

Drechsel H., and G. Winkelmann (1997) Iron chelation and siderophores, 1-49. In: Transition Metals in Microbial Metabolism. Winkelmann, G. and C. J. Carrano (eds.). Harwood Academic Publishers, Amsterdam

Efron B. (1979) Bootstrapping methods: Another look at the jackknife. *Ann. Stat.* **7**: 1-26

Felsenstein J. (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* **17**: 368-376

Felsenstein J. (1985) Confidence limits on phylogenies : An approach using the bootstrap. *Evolution*. **39**: 783-791

- Fetzer S., F. Bak, and R. Conrad** (1993) Sensitivity of methanogenic bacteria from paddy soil to oxygen and desiccation. *FEMS Microbiol. Ecol.* **12**: 107-115
- Fitch W.** (1971) Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Syst. Zool.* **20**: 406-416
- Frenzel P., F. Rothfuss, and R. Conrad** (1992) Oxygen profiles and methane turnover in a flooded rice microcosm. *Biol. Fertil. Soils* **14**: 84-89
- Fritsche W.** (1999) Methanogene Archaea und Methanogenese, 90-96. In: *Mikrobiologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg und Berlin
- Fuchs G.** (1999) Assimilation of macroelements and microelements. In: *Biology of the Prokaryotes*. Lengeler, J. W., G. Drews, and G. Schlegel (eds.). Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- Gilbert B., and P. Frenzel** (1988) Rice roots and CH₄ oxidation: the activity of bacteria, their distribution and the microenvironment. *Soil Biol. Biochem.* **30**: 1903-1916
- Green M. S., and J. R. Etherington** (1977) Oxidation of ferrous iron by rice (*Oryza sativa* L.) roots: a mechanism for waterlogging tolerance? *J. Experi. Bot.* **28**: 678-690
- Großkopf R.** (1998) Molekulare Diversität von *Archaea* im Boden und an Wurzeln überfluteter Reis-Mikrokosmen. Dissertation. Phillips-Universität Marburg
- Großkopf R., P. H. Janssen, and W. Liesack** (1998b) Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval. *Appl. Environ. Microbiology.* **64**: 960-969
- Jäckel U., and S. Schnell** (2000) The role of microbial iron reduction in anaerobic degradation of organic matter in rice soil. In: *Non-CO₂ Greenhouse Gases: Scientific Understanding, Control and Implementation* (pp. 143-144). VanHam J., A.P.M. Baede, L.A. Meyer, and R. Ybema (eds.). Kluwer, Dordrecht (NL)

Jukes T. H., and C.R. Cantor (1969) Evolution of protein molecules, 21-132. In: Munro, H. N. (eds.). Mammalian protein metabolism. Academic Press Inc., New York

Kaufmann F., and D. R. Lovley (2001) Isolation and Characterization of a Soluble NADPH-Dependent Fe(III) Reductase from *Geobacter sulfurreducens*. J. Bacteriol. **183**: 4468-4476

Kirk G. J. D., and J. B. Bajita (1995) Root-induced iron oxidation, pH changes and zinc solubilization in the rhizosphere of lowland rice. New Phytol. **131**: 129-137

Klüber H. D., and R. Conrad (1998) Effects of nitrate, nitrite, NO, and N₂O on methanogenesis and other redox processes in anoxic rice field soil. FEMS Microbiol. Ecol. **25**: 301-318

Kopczynski E. D., M. M. Bateson, and D. M. Ward (1994) Recognition of chimeric small ribosomal DNAs composed of genes from uncultivated microorganisms. Appl. Environ. Microbiology. **60**: 746-748

Krumböck M., and R. Conrad (1991) Metabolism of position-labelled glucose in anoxic methanogenic paddy soil and lake sediment. FEMS Microbiol. Ecol. **85**: 247-256

Krüger M. (2000) Mikrobielle Regulation der CH₄-Emission aus Reisfeldern. Dissertation. Philipps-Universität Marburg

Krüger M., P. Frenzel, and R. Conrad (2001) Microbial processes influencing methane emission from rice fields. Glob. Change Biol. **7**:49-63

Krylova N. I., Janssen, P. H., and Conrad, R. (1997) Turnover of propionate in methanogenic paddy soil. FEMS Microbiology Ecol. **23**: 107-117

Lane D. J. (1991) 16S/23S rRNA-Sequencing, 205-248. In: Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. Stackebrandt E. and M. Goodfellow (eds.). 1st edition John Wiley and SonsLtd., Chichester, West Sussex

Laverman A. M., J. Switzer Blum, J. K. Schaefer, E. J. P. Phillips, D. R. Lovley, and R. S. Oremland (1995) Growth of strain SES-3 with arsenate and other diverse electron acceptors. *Appl. Environ. Microbiology* **61**: 3556-3561

Lee K. K., T. W. Holst, I. Watnabe, and A. Arp (1981) Gas transport through rice. *Soil Sci. Plant Nutr.* **27**: 151-158

Liesack W., H. Weiland, and E. Stackebrandt (1991) Potential risks of gene amplification by PCR as determined by 16S rDNA analysis of a mixed-culture of strict barophilic bacteria. *Microb. Ecol.* **21**: 191-198

Liesack W., S. Schnell, and N. P. Revsbech (2000) Microbiology of flooded rice paddies. *FEMS Microbiol. Reviews* **24**: 625-645

Lindau C. W., Jr. W. H. Patrick, R. D. DeLaune, and K. R. Reddy (1990) Rate of accumulation and emission of N₂, N₂O and CH₄ from flooded rice soil. *Plant and Soil* **129**: 269-276

Lonergan D. J., H. L. Jenter, J. D. Coates, E. J. P. Phillips, T. M. Schmidt, and D. R. Lovley (1996) Phylogenetic analysis of dissimilatory Fe(III)-reducing bacteria. *J. of Bacteriol.* **178**: 2402-2408

Lovley D. R., and E. J. P. Phillips (1987) Rapid assay for microbially reducible ferric iron in aquatic sediments. *Appl. Environ. Microbiology* **53**: 1536-1540

Lovley D. R., and E. J. P. Phillips (1988) Novel mode of microbial energy metabolism: Organic carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese. *Appl. Environ. Microbiology* **54**: 1472-1480

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

Lovley D. R., J. D. Coates, D. A. Saffarini, and D. J. Lonergan (1997) Dissimilatory iron reduction. In: Transition metals in microbial metabolism. Winkelmann, G. and C. J. Carrano (eds.). Harwood Academic Publishers, Amsterdam

Lovley D. R. (2000) Fe(III)- and Mn(IV)-reducing prokaryotes. In: The Prokaryotes. Dworkin, M. S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, and E. Stackebrand (eds.). Springer-Verlag, New York

Lüdemann H. (1999) Bakterielle Besiedlung des Rhizosphärenbodens und der Flutwasser/Boden-Grenzschicht von Reisfeldbodensystemen. Dissertation. Philipps-Universität Marburg

Ludwig W. (1995) Sequence Databases. In: Molecular microbial ecology manual. Akkermans A. D. L., J. D. van Elsas, and F. J. de Bruijn (eds.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande

Ludwig W., S. H. Bauer, M. Bauer, I. Held, G. Kirchhof, R. Schulze, I. Huber, S. Spring, A. Hartmann, and K.-H. Schleifer (1997) Detection and in situ identification of representatives of a widely distributed new bacterial phylum. FEMS Microbiol. Letters **153**: 181-190

Lueders T., and M. Friedrich (2000) Archaeal population dynamics during sequential reduction processes in rice field soil. Appl. Environ. Microbiology **66**: 2732-2742

Lui W. T., T. L. Marsh, H. Cheng, and L. J. Forney (1997) Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiology **63**: 4516-4522

Magnuson T. S., A. L. Hodges-Meyerson, and D. R. Lovley (2000) Characterization of a membran-bound NADH-dependent Fe³⁺ reductase from the dissimilatory Fe³⁺-reducing bacterium *Geobacter sulfurreducens*. FEMS Microbiology Letters **185**: 205-211

- Maidak M. T., J. M. Martinko, and J. Parker.** (1997) Brock. Biology of microorganisms. Truehart C., C. Pritchard-Martinez, D. Thong, A. Stull, P. Burns, A. Velthaus, and J. Loftus (eds.) Pearson Education, New York, U.S.A.
- Maidak M. T., J. M. Martinko, and J. Parker.** (2000) Brock. Biology of microorganisms. Truehart C., C. Pritchard-Martinez, D. Thong, A. Stull, P. Burns, A. Velthaus, and J. Loftus (eds.) Pearson Education, New York, U.S.A.
- Meyers C. R., and K. N. Nealson** (1988) Bacterial manganese reduction and growth with manganese oxide as sole electron acceptor. *Science* **240**: 1319- 1321
- Mullis K. B., and F. A. Falooa** (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction. *Meth. Enzymol.* **155**: 335-350
- Munch J. C. und J. C. G. Ottow** (1982) Einfluß von Zellkontakt und Eisen(III)-Oxidform auf die bakterielle Eisenreduktion. *Z. Pflanzen. Bodenk.* **145**: 66-77
- Neue H. U.** (1993) Methane emissions from rice fields. *Bioscience* **43**: 466-474
- Newmann D. K., and R. Kolter** (2000) A role for excreted quinones in extracellular electron transfer. *Nature* **405**: 94-97
- Phelps C. D., L. Kerkhof, and L. Y. Young** (1998) Molecular characterization of sulfate-reducing bacteria isolated from senegal ricefields. *FEMS Microbiol. Ecol.* **27**: 269-279
- Ponnamperuma F. N.** (1972) The chemistry of submerged soils. *Adv. Agron.* **24**: 29-96
- Rajagopal B. S., N. Belay, and L. Daniels** (1988) Isolation and characterization of methanogenic bacteria from rice paddies. *FEMS Microbiol. Ecol.* **53**: 153-158
- Ratering S.** (1999) Eisenzyklus in italienischem Reisfeldboden: Lokalisierung der Redoxprozesse und Charakterisierung der beteiligten Mikroorganismen. Dissertation. Philipps-Universität Marburg

Ratering S., and S. Schnell (2000) Localization of iron-reducing activity in paddy soil by profile studies. *Biogeochemistry* **48**: 341-365

Ratering S., and S. Schnell (2001) Nitrate-dependent iron(II) oxidation in paddy soil. *Environ. Microbiology* **3**: 100-109

Reichenbach H. (1993) Biology of the myxobacteria: Ecology and taxonomy. In: *Myxobacteria II*. Dworkin, M. and D. Kaiser (eds.). American Society for Microbiology, Washington

Reichenbach H. (1999) The ecology of the myxobacteria. *Environ. Microbiology* **1**: 15-21

Rhoden E. E., and J. M. Zachara (1996) Microbial reduction of crystalline iron(III) oxides: Influence of oxide surface area and potential for cell growth. *Environ. Sci. Technol.* **30**: 1618-1628

Roselló-Mora R. A., W. Ludwig, P. Kämpfer, R. Amann, and K.-H. Schleifer (1995) *Ferrimonas balearica* gen. nov., spec. nov., a new marine facultative Fe(III)-reducing bacterium. *System. Appl. Microbiology* **18**: 196-202

Rosencrantz D. (1998) Diversität und strukturelle Zusammensetzung der wurzellosoziierten Bakteriengemeinschaft von Reispflanzen. Dissertation. Philipps-Universität Marburg

Rothfuss F., and R. Conrad (1993) Vertical profiles of CH₄ concentrations, dissolved substrates and processes involved in CH₄ production in a flooded Italian rice field. *Biogeochem.* **18**: 137-152

Saitou N., and M. Nei (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 405-425

Sambrook J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis (1989) *Molecular cloning*. Cold Spring Harbour Laboratory Press. Cold Spring Harbour New York, U.S.A.

- Sanford R. A., J. R. Cole, and M. Tiedje** (2002) Characterization and description of *Anaeromyxobacter dehalogenans* gen. nov., sp. nov., an aryl-halorespiring facultative anaerobic Myxobacterium. *Appl. Environ. Microbiology* **68**: 893-900
- Sanger F., S. Nicklen, and A. R. Coulson** (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**: 5463-5467
- Sass R. L., F. M. Fisher, S. T. Lewis, M. F. Jund, and F. T. Turner** (1994) Methane emissions from rice fields – effect of soil properties. *Glob. Biogeochem. Cycles* **8**: 135-140
- Sass H., E. Wieringa, H. Cypionka, H.-D. Babenzien, and J. Overmann** (1998) High genetic and physiological diversity of sulfate-reducing bacteria isolated from an oligotrophic lake sediment. *Arch. Microbiology* **170**: 143-251
- Schink B.** (1991) Syntrophism among prokaryotes. In: *The prokaryotes*. Balows A., Trüper H. G., Dworkin M., Harder W., and Schleifer K.H. (eds). Springer, New York: 276-299
- Schlegel H. G. und C. Zaborosch** (1992) Die Gruppen der Prokaryonten, 89-143. In: *Allgemeine Mikrobiologie*. Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- Schütz H., W. Seiler, and R. Conrad** (1989) Processes involved in formation and emission of methane in rice paddies. *Biogeochemistry* **7**: 33-53
- Schwertmann U., and R. M. Cornell** (1991) The iron oxides and hydroxides, 1-18. In: *Iron oxides in the laboratory. Preparation and characterization*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim
- Schwertmann U., and R. M. Taylor** (1977) In: *Minerals in Soil Environments*. Dixon, J. B. and S. B. Weed (eds.) Soil Science Society of America: 145-180
- Stookey L. L.** (1970) Ferrozine – a new spectrophotometric reagent for iron. *Anal. Chem.* **42**: 779-781
- Straub K. L., M. Benz, B. Schink, and F. Widdel** (1996) Anaerobic, nitrate-dependent microbial oxidation of ferrous iron. *Appl. Environ. Microbiology* **62**: 1458-1460

Strunk O., and W. Ludwig (1996) ARB: a software environment for sequence data. Technische Universität München, Deutschland

Torsvik V., J. Goksøyr, and F. L. Daae (1990) High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiology* **56**: 782-787

Treude N. (1999) Mikrobielle Reduktion von verschiedenen Eisenoxiden. Diplomarbeit. Philipps-Universität Marburg

Treude N., D. Rosencrantz, W. Liesack, and S. Schnell (2003) Strain FAc12, a dissimilatory iron-reducing member of the *Anaeromyxobacter* subgroup of *Myxococcales*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **1502**: 1-9

Trollidenier G. (1988) Visualisation of oxidizing power of rice roots and of possible participation of bacteria in iron deposition. *Z. Pflanzen Bodenk.* **151**: 117-121

Tugel J. B., M. E. Hines, and E. G. Jones (1986) Microbial iron reduction by enrichment cultures isolated from estuarine sediments. *Appl. Environ. Microbiology* **52**: 1167-1172

Van de Peer Y., S. Nicolai, P. Rijk, and R. De Wachter (1996) Databases on the structure of small ribosomal subunit RNA. *Nucl. Acids.* **24**: 86-91

Vanechoutte M., R. Rossau, P. De Vos, M. Gillis, D. Janssens, N. Paepe, A. De Rouck, T. Fiers, G. Claeys, and K. Kersters (1992) Rapid identification of bacteria of the *Comamonadaceae* with amplified ribosomal DNA-restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiol. Letters* **93**: 227-234

Wang G. C.-Y., and Y. Wang (1996) The frequency of chimeric molecules as a consequence of PCR co-amplification of 16S rRNA genes from different bacterial species. *Microbiology.* **142**: 1107-1114

Wassmann R., H. U. Neue, R. S. Lantin, L. V. Buendia, and H. Rennenberg (2000) Characterization of methane emissions from rice fields in Asia.

I. Comparison among field sites in five countries. *Nutr. Cycl. Agroecosyst.* **58**: 1-12

Weber J. R., J. C. Munch, und J. C. G. Ottow (1979) Einfluß der Teilchengröße auf die bakterielle Reduzierbarkeit pedogener Eisenoxide. *Mitteilgn. Dtsch. Bodenkundl. Gesellsch.* **29**: 465-272

Weisburg W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier, and D. J. Lane (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* **173**: 679-703

Whipps J. M. (1990) Carbon Economy, 59-98. In: *The rhizosphere.* Lynch J. M. (eds.) Wiley and Sons Ltd., Chichester, England

Widdel F. and F. Bak (1992) Gram-negative mesophile sulfate-reducing bacteria, 3352-3378. In: *The Prokaryotes.* A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K.-H. Schleifer (eds.), Springer Verlag, New York, Berlin

Zehnder A. J. B. and W. Stumm (1988) Geochemistry and biogeochemistry of anaerobic habitats, 1-38. In: *Biology of anaerobic microorganisms.* (Hrsg. Zehnder, A. B. J.). Wiley Interscience Publications, New York

Dank

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ralf Conrad für die hilfreiche Unterstützung dieser Arbeit.

Frau Prof. Dr. Sylvia Schnell und Herrn PD Dr. Werner Liesack danke ich für die Überlassung des Themas und die hilfreichen Diskussionen und Anregungen während meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Buckel danke ich für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Allen Mitarbeitern und ehemaligen Mitarbeitern der Abteilung Biogeochemie, besonders Sharon Avrahami, Svetlana N. Dedysh, Manigee Derakshani, Markus Drescher, Peter Frenzel, Andrea Graf, Melanie Klose, Steffen Kolb, Daniel Scheid und Julian Schwarz möchte ich für die sehr gute Zusammenarbeit danken.

Besonders danke ich „meinen“ ehemaligen Arbeitsgruppenmitgliedern: Jürgen Heyer, Udo Jäckel, Claudia Knief, Stefan Ratering und Nina Ringliff für Ihre stets gewährte Hilfe in allen Fragen.

Bleibt noch der herzliche Dank für die moralische Unterstützung während der letzten drei Jahre an: Constantin Bannert, Tobias Happ, Katja Meißner, Barbara Pomper, Heike Reuter, Uwe Steinberger, Jean Stodden und an Frauke, Mechthild und Arnold Völkel.

Erklärung

Ich versichere, daß ich meine Dissertation

Charakterisierung von fakultativ anaeroben Myxobakterien im Reisfeld

selbständig verfaßt, keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet und sämtliche Stellen, die im Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Werken entnommen sind, mit Quellenangaben kenntlich gemacht habe. Die Versicherung schließt Zeichnungen und Skizzen mit ein.

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

Marburg, den