

Aus dem Institut für Meereskunde

**Diversität nitratreduzierender Bakteriengemeinschaften in
den Sedimenten der Ostsee und Untersuchungen zur
Phylogenie der respiratorischen Nitratreduktase.**

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von

Ralf Petri

Kiel 2000

Referent: _____

Korreferent: _____

Tag der mündlichen Prüfung: _____

Zum Druck genehmigt: Kiel, den _____

Der Dekan

Zusammenfassung

Auf der Basis verfügbarer Sequenzen wurde ein Primer-System für die spezifische Amplifikation von PCR-Fragmenten der β -Untereinheit der membrangebundenen Nitratreduktase (*narH*) entwickelt und auf die DNA verschiedener Isolate und Referenzorganismen, sowie auf Umwelt-DNA angewendet.

Mit Hilfe phylogenetischer Betrachtungen der erhaltenen Sequenzen konnte gezeigt werden, daß die respiratorische Nitratreduktion eine der ursprünglichsten physiologischen Funktionen prokaryotischen Lebens darstellt, die offenbar zusammen mit weiteren respiratorischen Funktionen wie der Sulfatreduktion bereits in den „Urkaryoten“ vorhanden war. Die weitgehend kongruente evolutionäre Entwicklung im Vergleich zur 16S rDNA erlaubt eine zuverlässige phylogenetische Einordnung von Umweltsequenzen anhand dieses Gens.

Die Orthologie und Sequenzsimilarität der Gene für die respiratorische Nitratreduktase und die Nitrit-Oxidoreduktase eröffnet die Möglichkeit, Diversitätsanalysen sowohl der Nitratreduzierer wie auch der Nitritoxidierer vorzunehmen. Am Beispiel verschiedener Sedimente in der Ostsee konnte gezeigt werden, daß das entwickelte System einen Einblick in die Diversität und die Wechselwirkungen zwischen den Organismen der Standorte zu geben vermag.

Zahlreiche Banden konnten aus DG-DGGE-Gelen extrahiert, sequenziert und in den Stammbaum der Referenzsequenzen eingeordnet werden. Keine der sequenzierten Banden konnte durch einen Vergleich mit der Datenbank der Referenzorganismen eindeutig identifiziert werden, dennoch ließen sich bei vielen Banden Zuordnungen zu den taxonomischen Großgruppen der *Proteobacteria* oder der Gram-positiven Bakterien treffen. Die Diversitätsanalyse mittels molekularer Methoden wurde durch die Kultivierung von nitratreduzierenden Bakterien und ihre Identifizierung durch 16S rDNA-Sequenzierung oder Membranfettsäureanalyse ergänzt.

Sowohl die Ergebnisse der Kultivierung nitratreduzierender Bakterien wie auch die molekularen Untersuchungen zeigten deutliche Unterschiede der verschiedenen Standorte, die auf die vorherrschenden Standortbedingungen zurückgeführt werden konnten. Die küstennahen Sedimente der westlichen Ostsee und des finnischen Meerbusens zeigen in den oberen Sedimentschichten eine starke Kopplung von Nitrifikation und Denitrifikation, die sich auch in der Diversitätsanalyse widerspiegelt. Die sulfidisch geprägten Standorte in den Becken der zentralen Ostsee demonstrieren dagegen die starke Konkurrenz zwischen Sulfat- und Nitratreduzierern um verfügbares organisches Material, was zu einer starken Stratifizierung der Diversität führt.

Abstract

On the basis of available nitrate reductase gene sequences primer pairs were designed to specifically amplify gene stretches of the β -subunit of the membrane-bound nitrate reductase (*narH*) and applied to DNA from new isolates and reference species as well as environmental DNA.

According to phylogenetic calculations the respiratory nitrate reduction is one of the most original physiological functions of prokaryotic life, which was already present in the „arkaryotes“ together with other respiratory functions like sulfate reduction. The highly congruent evolution of the 16S rDNA and *narH* allows the phylogenetic classification of sequences from environmental DNA.

Since the proteins for nitrate reduction (*NarH*) and nitrite oxidation (*NorB*), which may have evolved from one common progenitor, are highly orthologous within bacterial and archaeal species the primer systems can be used for phylogenetic and diversity analysis of both functional groups, nitrate reducers and nitrite oxidizers. Analysis of communities from Baltic Sea sediments revealed information about the diversity and the interactions of the environmental community.

Numerous bands could be extracted from DG-DGGE gels, sequenced and classified within the phylogenetic tree of reference sequences. None of the bands could be identified by comparison to sequences from reference organisms but many of them could be ordered to taxonomic groups like *proteobacteria* or Gram-positive bacteria. The molecular analysis of the Baltic Sea sediments was completed with results from isolation of nitrate reducing bacteria from environmental samples. Both techniques revealed large differences between the various sampling stations which could be discussed due to chemical and physical conditions. The shallow water sediments from the sampling stations „westliche Ostsee“ and „finnischer Meerbusen“ showed a strong coupling of nitrification and denitrification processes within the uppermost sediment layers which could be inferred from diversity analysis as well. The „sulfidic“ sampling stations at deep basins within the central Baltic Sea revealed a competition of nitrate reducers and sulfate reducers on organic material which led to a strong stratification of the bacterial diversity.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Stand der Forschung	4
2.1 Physiologie der Nitratreduktion	4
2.2 Stoffwechselwege bakterieller Nitratreduktion	5
2.3 Enzyme und Gene der Nitratreduktion	8
2.4 Bedeutung der Nitratreduktion	10
2.5 Diversität nitratreduzierender Bakteriengemeinschaften	12
2.6 Ökologie der Nitratreduktion in marinen Sedimenten	14
2.7 Aufgabenstellung und Strategie	17
3. Material und Methoden	19
3.1 Chemikalien und Geräte	19
3.2 Molekulare Methoden	20
3.2.1 Extraktion von Nukleinsäuren aus Kulturen und Umweltproben	20
3.2.1.1 Extraktion von DNA aus Kulturen und Wasserproben	20
3.2.1.2 Extraktion von DNA aus Sedimentproben	21
3.2.1.3 Vorbereitung des Polyvinylpolypyrrolidons (PVPP)	22
3.2.1.4 Extraktion von RNA aus Kulturen	22
3.2.1.5 Elution von DNA aus Agarose- und DGGE-Gelen	23
3.2.2 PCR-Amplifikation von Nukleinsäuren	23
3.2.2.1 PCR-Amplifikation von Fragmenten aus genomischer DNA	24
3.2.2.2 Reamplifikation von eluierten Produkten	24
3.2.2.2 RT-PCR	25
3.2.3 Aufreinigung von PCR-Produkten	25
3.2.4 Restriktion von PCR-Fragmenten	26
3.2.5 Sequenzierreaktionen („Cycle-Sequencing“)	26
3.2.5.1 Sequenzierreaktion für den ALF	27
3.2.5.2 Sequenzierreaktion für den ABI 310	27
3.2.6 Elektrophoretische Methoden	28
3.2.6.1 Agarosegele	28
3.2.6.2 DGGE-Gele	29
3.2.6.3 Elektrophorese der Sequenzieransätze	31
3.2.6.4 SSCP-Gele	32
3.2.6.4 SDS-Proteingele	32
3.3 Dokumentation der Proben	34
3.4 Phylogenetische Berechnungen und Sequenzanalyse	34

3.5	Mikrobiologische und physiologische Methoden	36
3.5.1	Isolierung und Anreicherung von Bakterien	36
3.5.2	Medien und Anzuchtbedingungen	38
3.5.3	Wachstumsversuche	41
3.5.4	Lebendzellzahlen nitratreduzierender Bakterien	42
3.6	Fettsäureanalyse	42
3.7	Nährstoffanalysen	43
3.7.1	Ionenchromatographische Analysen	43
3.7.2	Bestimmung von Ammonium	43
3.8	Probenahmestandorte	44
3.9	Bearbeitung von Umweltproben	46
4.	Ergebnisse	47
4.1	Methodische Entwicklungen	47
4.1.1	Entwicklung von PCR-Primern	47
4.1.2	Doppelgradienten-DGGE	54
4.1.3	T-RFLP	57
4.1.4	Durchführung der T-RFLP	59
4.2	Phylogenetische Betrachtungen	60
4.2.1	Phylogenie des <i>narH</i> -Gens	62
4.2.2	Vergleichende Phylogenie von <i>narH</i> und 16S rDNA	63
4.2.3	Signatur-Sequenzen	70
4.2.4	Vergleichende Phylogenie von <i>narH</i> und <i>norB</i>	71
4.2.5	Orthologie des <i>narH</i> -Gens	72
4.3	Analyse nitratreduzierender Standortgemeinschaften	73
4.3.1	Standort westliche Ostsee	75
4.3.1.1	Analyse und Identifikation der Isolate	76
4.3.1.2	DGGE-Analyse der Standortgemeinschaft	78
4.3.1.3	SSCP-Analyse der Standortgemeinschaft	80
4.3.1.4	T-RFLP-Analyse der Standortgemeinschaft	81
4.3.2	Standort Gotlandsee	83
4.3.2.1	Analyse und Identifikation der Isolate	84
4.3.2.2	DGGE-Analyse der Standortgemeinschaft	85
4.3.2.3	SSCP-Analyse der Standortgemeinschaft	88
4.3.2.4	T-RFLP-Analyse der Standortgemeinschaft	89

4.3.3 Standort finnischer Meerbusen	91
4.3.3.1 Analyse und Identifikation der Isolate	92
4.3.3.2 DGGE-Analyse der Standortgemeinschaft	93
4.3.3.3 SSCP-Analyse der Standortgemeinschaft	96
4.3.3.4 T-RFLP-Analyse der Standortgemeinschaft	97
4.4 Nitratreduktion durch <i>Pseudomonas stutzeri</i> DSM 5190 ^T	100
5. Diskussion	103
5.1 Diskussion methodischer Entwicklungen	103
5.1.1 Primersystem für Nitratreduzierer	103
5.1.2 Diskussion der DG-DGGE	106
5.1.3 Diskussion der T-RFLP	107
5.2 Phylogenie nitratreduzierender Bakterien	109
5.2.1 Phylogenie des <i>narH</i> -Gens und der Vergleich zur 16S rDNA	109
5.2.2 Phylogenie von <i>narH</i> und <i>norB</i>	112
5.3 Diskussion der Standortuntersuchungen	118
5.3.1 Standort westliche Ostsee	119
5.3.2 Standort Gotlandsee	124
5.3.3 Standort finnischer Meerbusen	128
5.3.4 Selektion der Standortgemeinschaften	132
5.4 Nitratreduktion durch <i>Pseudomonas stutzeri</i> DSM 5190 ^T	133
6. Ausblick	134
7. Literatur	136
8. Anhang	149
A1 PCR-Bedingungen	149
A2 Aminosäure-Alignment	150
A3 Sequenzsimilaritätstabelle 1	151
A4 Sequenzsimilaritätstabelle 2	151
A5 Sequenzsimilaritätstabelle 3	152
A6 Chemische und physikalische Parameter der Standorte	153
A7 Zellparameter und Nährstoffe des Nitratverwertungsversuchs	155
A8 Rezepte der Lauf- und Auftragspuffer	156
A9 Abkürzungsverzeichnis	157
A10 Internetadresse verwendeter Netzwerkressourcen	158
A11 Publikationen	159
A12 Präsentationen	160

1. Einleitung

Prokaryoten sind nach der Auffassung der heutigen Wissenschaft Grundlage allen Lebens auf der Erde. Es ist inzwischen eine weitgehend anerkannte Theorie, daß das Leben vor etwa 3.5 bis $3.8 \cdot 10^9$ Jahren mit der Entwicklung von „Urkaryoten“ entstand (Awramik et al. 1983; Holland 1997; Walter et al. 1980). Im Laufe der Erdgeschichte haben sich Bakterien an vielfältige Habitate, Lebensräume einfacher chemischer Zusammensetzung bis hin zu komplexen eukaryotischen Wirtszellen, angepaßt und diese nicht selten mitgestaltet (Trevors 1997a-d, 1996; Guerrero 1998). Bakteriellles Wachstum existiert in einem Temperaturbereich von unter 0 bis weit über 100°C (Blochl et al. 1997; Bowman et al. 1997; Searcy 1986), in extrem sauren wie auch alkalischen pH-Bereichen (Barns et al. 1999; Edwards et al. 2000; Hiraishi et al. 1998; Jones et al. 1998), in anoxischen wie in oxischen Habitaten und unter Bedingungen, die für jede andere Lebensform hochgradig toxisch sind. Diese Anpassungsfähigkeit beruht im wesentlichen auf zwei Faktoren: der Mutationstoleranz ihrer DNA und der hohen Reproduktionsrate der Mikroorganismen. So konnte sich im Laufe der Evolution eine Vielzahl von stoffwechselphysiologischen Leistungen entwickeln, die eine Anpassung an sich ändernde Umweltbedingungen ermöglichten. Mit der Anpassung ging eine Diversifizierung der Mikroorganismen einher, die zu der Artenvielfalt führte, wie wir sie heute kennen.

Bis vor etwa 20 Jahren waren Studien zur Biodiversität weitgehend auf eukaryotische Organismen beschränkt, obwohl die Mikrobiologie an einer Vielzahl fundamentaler Entdeckungen und konzeptioneller Neuorientierungen, wie der Überwindung des dichotomischen Dogmas der Eukaryoten-Prokaryoten Phylogenie, wesentlichen Anteil hatten (Woese & Fox 1977). Grund dafür war die Abhängigkeit physiologischer und taxonomischer Untersuchungen von der Kultivierung und der Kultivierbarkeit der Organismen. Das änderte sich mit der Entwicklung molekularbiologischer Methoden wie der PCR und der Sequenzierung, die den Mikrobiologen ein Werkzeug in die Hand gaben, über die Welt der kultivierten Bakterien hinauszublicken. Die Gen-Sequenzen der ribosomalen RNA erwiesen sich als Schlüssel zu einer wissenschaftlich verwendbaren Phylogenie der Prokaryoten (Hugenholtz et al. 1998; Pace 1997, 1996); bis heute sind die ribosomalen Gene von etwa 4000 Bakterienstämmen sequenziert und eingeordnet worden. Mit der Anwendung molekularer Methoden erfuhr jedoch nicht nur die mikrobielle Phylogenie, sondern auch die mikrobielle Ökologie einen neuen Aufschwung. Klonierungstechniken und elektrophoretische

Methoden führten zu Einblicken in die Diversität und die Dynamik von Bakteriengemeinschaften jenseits der 0.1 bis 1 % bisher kultivierter Organismen (Olson et al. 1994; Palys et al. 1997; DeLong 1997). In den Datenbanken sind heute, neben den Sequenzen kultivierter Bakterien, ca. 10000 Sequenzen ribosomaler Gene von bislang nicht kultivierten Bakterien zu finden.

Die heute weitgehend akzeptierte Phylogenie der Prokaryoten basiert auf Sequenzen des Gens der 16S ribosomalen RNA, allgemein als 16S rDNA bezeichnet. Die 16S rDNA verfügt über hochkonservierte Bereiche, hochvariable Abschnitte sowie Sequenzen mittlerer Variabilität. Dieses Gen eignet sich damit in besonderer Weise zur Ableitung phylogenetischer Beziehungen aus Sequenzvergleichen, da es insgesamt eine intermediäre Nukleotidvariabilität aufweist und somit nicht zu variabel oder zu konserviert für eine Analyse ist.

Die Ergebnisse der sogenannten „Fingerprint“-Methoden in der Molekularbiologie, z.B. RAPD, MLEE, RFLP (de Bruijn 1992; Judd et al. 1993; Liu et al. 1995), stellen jedoch die etablierte Taxonomie der Prokaryoten in dem Maße in Frage, wie für eine zunehmende Zahl von Bakterien Gentransfer und DNA-Austausch als Weg zur Diversifizierung nachgewiesen werden kann (Busse et al. 1996). Deutliche Fortschritte bei den Sequenzierungstechniken bis hin zu Genom-Sequenzierungen erlauben heute eine Erweiterung der phylogenetischen Untersuchungen auf andere ribosomale Gene, wie die 23S rDNA oder die internal transcribed spacer-„ITS“-Region (Gürtler & Stanisich 1996; Leblond-Bourget et al. 1996; Ludwig & Schleifer 1994), und funktionelle Gene wie die β -Untereinheit der RNA-Polymerase (Denton et al. 1998; Gupta 1998; Kim et al. 1999; Yamamoto & Harayama 1998), so daß auch in Fällen nicht-klonaler bakterieller Linien phylogenetische Verwandtschaften bestimmbar sind. Mit Unterstützung dieser neuen Techniken ist die Systematik auf Basis der 16S rDNA Sequenzen ein universelles und entwicklungsfähiges Hilfsmittel bei der Beschreibung der Diversität von Bakteriengemeinschaften geworden.

Die moderne Mikrobiologie beschäftigt sich – ausgerüstet mit taxonomischen und molekularbiologischen Werkzeugen - mit Fragen der Ökologie und der Evolution, der Suche nach Wirkstoffen und nach unbekanntem Organismen, sowie der industriellen und medizinischen Nutzbarkeit von Mikroorganismen. Die Antworten auf zahlreiche ungelöste Fragen sind durch die Anwendung molekularer Techniken näher gerückt, doch sind durch diese Anwendungen auch neue Fragen – wissenschaftlicher und ethischer Art – aufgetreten.

Die mikrobielle Ökologie nutzt die neuen Entwicklungen, um die Diversität der bakteriellen Gemeinschaft an verschiedensten Standorten zu beschreiben, und in interdisziplinärer Arbeit mit chemischen und physikalischen Parametern zu verbinden, um das komplizierte Mosaik des Zusammenwirkens unterschiedlichster Spezies am Standort zusammensetzen. Die Frage, welche Organismen unter welchen Standortbedingungen was zu leisten vermögen, ist aus ökologischen wie aus ökonomischen Gründen immer weiter in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses gerückt.

Einige der wichtigsten Stoffwechsellleistungen sind in einem breiten Spektrum unterschiedlichster bakterieller Gruppen zu finden und daher nicht mittels der 16S rDNA als abgeschlossene funktionelle Einheit zu beschreiben. Solche Stoffwechselgruppen, zu denen z.B. die Nitratreduzierer oder die Schwefeloxidierer zählen, sind auf genetischer Ebene nur über die zentralen Enzyme der entsprechenden Stoffwechselwege erfassbar. Dementsprechend wurden in den letzten Jahren verstärkt funktionelle Gene und Schlüsselenzyme der bedeutenden Stoffwechselwege untersucht, wie die [NiFe]-Hydrogenase der Sulfatreduzierer, die Nitrogenase der Stickstofffixierer oder die Monooxygenasen der Ammonium- und Methanoxidierer (Rosado et al. 1998; Rotthauwe et al. 1997; Shen et al. 1997; Teske et al. 1996; Ueda et al. 1995; Wawer & Muyzer 1996). Nach wie vor sind jedoch zentrale Fragen zur Diversität und Aktivität funktioneller Gruppen der globalen Stoffkreisläufe aufgrund fehlender Techniken unbeantwortet. Eine dieser funktionellen Gruppen ist die der Nitratreduzierer und Denitrifizierer, die den Stickstoffkreislauf schließt und so das globale Stickstoffbudget balanciert.

Die vorliegende Arbeit widmet sich der Phylogenie nitratreduzierender Bakterien, sowie der Erfassung, Beschreibung und Bewertung der natürlichen Diversität nitratreduzierender (denitrifizierender) Bakteriengemeinschaften an verschiedenen Standorten der Ostsee. Unter Einbeziehung verschiedenster Techniken wurde ein von der Kultivierung unabhängiges System zur Erfassung dieser Gemeinschaft entwickelt und an diesen Standorten eingesetzt. Die Ergebnisse der kulturunabhängigen Methoden wurden mit den Resultaten der Kultivierung und der physiologischen Untersuchung nitratreduzierender Bakterien verglichen, zu chemischen und physikalischen Parametern in Beziehung gesetzt und zu einem Gesamtbild der Diversität nitratreduzierender Bakteriengemeinschaften in den Sedimenten der Ostsee entwickelt.

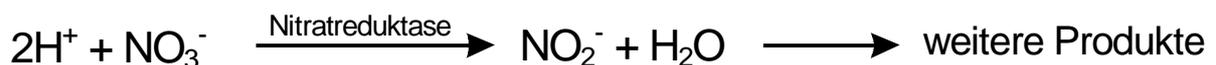
2. Stand der Forschung

Über die Physiologie, Ökologie und Biochemie der Nitratreduktion und insbesondere der Denitrifikation gibt es eine Reihe ausführlicher Übersichtsartikel (z.B. Berks et al. 1995; Tiedje 1988; Zumft 1997), die im folgenden nur in sehr komprimierter Form wiedergegeben werden können.

2.1 Physiologie der Nitratreduktion

Nitrat ist eine potentielle Quelle für Stickstoff, der in der Zelle in Form von Ammonium als Bestandteil beispielsweise von Proteinen oder Nukleotiden benötigt wird. Durch die Reduktion von Nitrat können alle Pflanzen, die meisten Pilze und eine Vielzahl von Bakterien ihre Ammonium-Versorgung sicherstellen. Nitrat ist aber auch ein starkes Oxidationsmittel, welches speziell im bakteriellen Stoffwechsel auf zusätzlichen Wegen reduziert und zur Gewinnung von Wachstumsenergie genutzt werden kann. Allgemein werden zu der Gruppe der nitratreduzierenden Organismen solche gezählt, die Nitrat als terminalen Elektronenakzeptor nutzen und dabei aus der Reduktion von Nitrat zu Nitrit Energie gewinnen können, sowie jene Organismen, die Nitrat zu Ammonium reduzieren, um dieses entweder auszuscheiden oder zum Zellwachstum verwenden (Betlach 1982).

Der weitaus größte Teil der globalen Nitratreduktion wird von Prokaryoten geleistet, wobei die Bedeutung der *Archaea* am Gesamtumsatz bisher nicht geklärt ist. Nitratreduzierende Bakterien sind in der Natur in einer Vielzahl von Sedimenten, Gewässern und Böden, in Abwassersystemen, im Gastrointestinaltrakt von Tieren und in vielen anderen Habitaten anzutreffen (Tiedje 1988). Die Nitratreduktion ist eine fakultative Eigenschaft, die in Abhängigkeit vom Stoffwechselweg unter anoxischen oder oxischen Bedingungen abläuft und durch verschiedene Umweltfaktoren wie die Verfügbarkeit von Nitrat induziert wird. Die grundlegende chemische Reaktion kann wie folgt beschrieben werden:



Als Elektronendonatoren können dabei neben reduzierten anorganischen Substanzen wie zum Beispiel Schwefelwasserstoff verschiedene organische Substrate verwertet werden, die von einfachen Kohlenstoffverbindungen wie Acetat oder Methanol bis zu höheren Fettsäuren oder aromatischen Verbindungen selbst anthropogenen Ursprungs reichen (Taylor et al. 1979; Williams & Evans 1975). Viele nitratreduzierende Bakterien können neben Nitrat auch andere

anorganische Elektronenendakzeptoren, wie Sulfat (Dalsgaard & Bak 1994; Seitz & Cypionka 1986), Nitrit, N₂O (Zumft 1997) oder Chlorat (Bell et al. 1990) reduzieren.

2.2 Stoffwechselwege bakterieller Nitratreduktion

Im Verlauf der relativ langen Evolution reduktiver Umsetzungen von Nitrat haben sich im bakteriellen Stoffwechsel verschiedene Mechanismen entwickelt, die von einer Reihe nicht-homologer Enzymsysteme katalysiert werden, diversen Regulationsmustern unterliegen und den unterschiedlichsten Zwecken dienen. Angesichts der Vielfalt der Stoffwechselwege hat sich eine ebenso mannigfaltige Nomenklatur etabliert, um die verschiedenen Möglichkeiten begrifflich voneinander zu unterscheiden (Moreno-Vivián & Ferguson 1998). In diesem Begriffsfeld lassen sich in der bakteriellen Nitratreduktion prinzipiell drei Reduktionssysteme unterscheiden (Abbildung 2.1).

Zunächst unterscheidet man Oxidoreduktasen, die mit dem Elektronentransportsystem der cytoplasmatischen Membran verbunden sind, von denen, die NAD(P)H als Elektronenquelle nutzen. Diese letztgenannte Gruppe von Enzymen wird allgemein als *assimilatorisch* bezeichnet, da die primäre Rolle in der Generierung von Zellbestandteilen besteht. Prinzipiell können assimilatorische Enzyme aber auch Elektronen direkt aus einem Elektronentransfer-System an Membranen beziehen (Jouanneau et al. 1998).

Einige Bakterien besitzen eine lösliche, cytoplasmatische Nitratreduktase, die speziesspezifisch Ferredoxin, Flavodoxin oder NADH als Elektronendonator nutzt (Blasco et al. 1997; Gangeswaran & Eady 1996). Dieses Enzym wird nach den kodierenden *nas*-Genen benannt und zeigt eine typisch *assimilatorische* Funktion, die der Zelle die Verwendung von Nitrat als Stickstoffquelle für Proteine und andere N-haltige Bausteine der Zelle ermöglicht.

Im Gegensatz dazu werden Enzyme, deren Reaktionsprodukte nicht als Zellbausteine verwendet werden, als *dissimilatorisch* bezeichnet. Bezieht ein reduktives Enzym zudem Elektronen aus einer Elektronentransportkette mit elektrochemischem Gradienten an Membranen, so wird das Enzym in der Literatur darüberhinaus als *respiratorisch* bezeichnet.

Aus der Gruppe der dissimilatorischen Oxidoreduktasen sind zwei Nitratreduktasen bekannt. Eine dieser Nitratreduktasen ist ein membrangebundener Komplex aus drei Untereinheiten (*Nar*), der Elektronen aus dem Ubiquinol/Menaquinol-Pool der Membran erhält. Die Reduktion von Nitrat durch das *Nar*-System findet im cytoplasmatischen Raum statt, während die Reduktion des Enzyms durch Ubiquinol auf der periplasmatischen Seite der

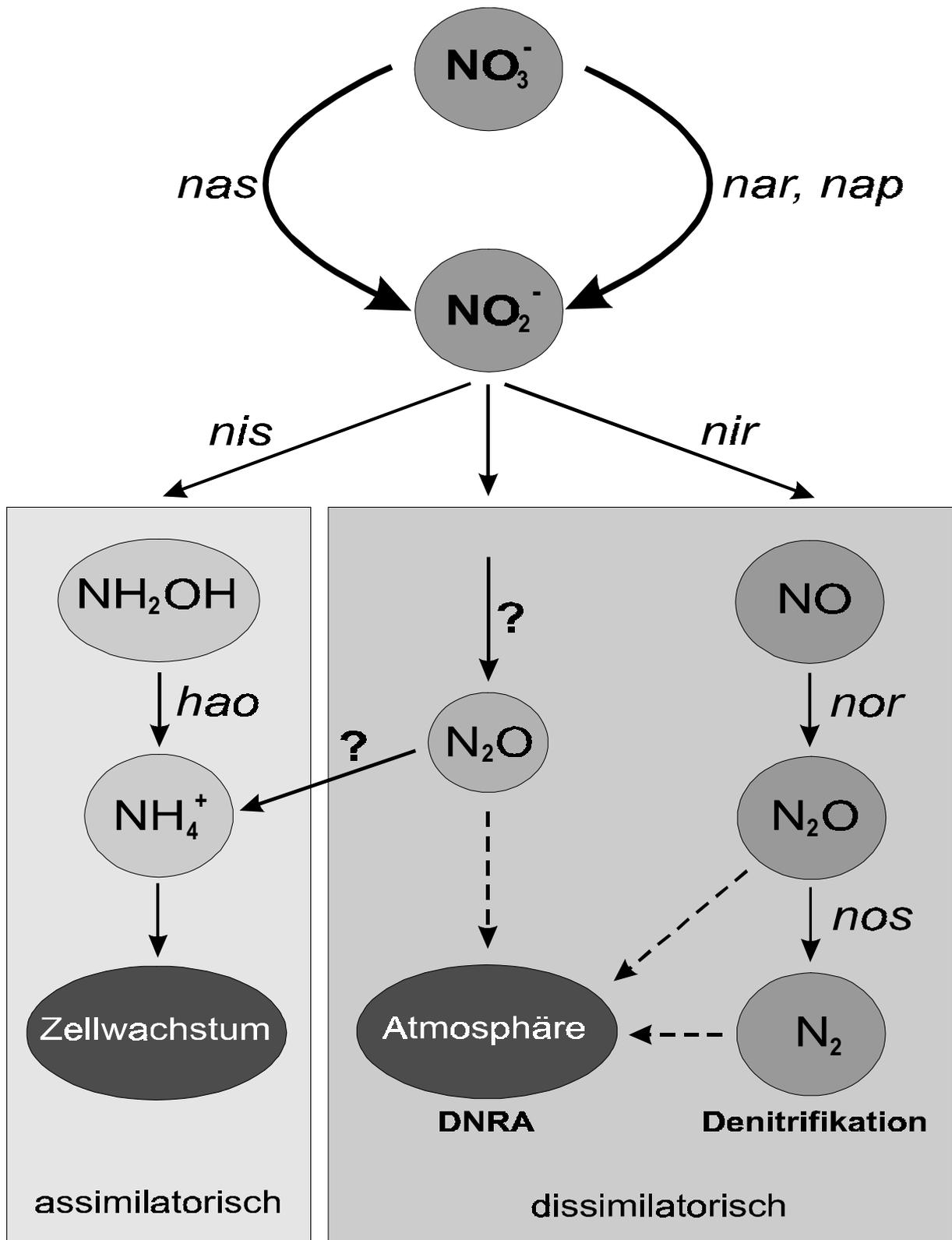


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der drei Nitratreduktionswege und ihrer Folgeprodukte

Membran stattfindet. Das führt zum Freisetzen von Protonen in das Periplasma und damit zum aktiven Aufbau eines Protonengradienten (Berks et al. 1995b). Daher kann dieses Enzym als *respiratorisch und dissimilatorisch* bezeichnet werden.

Die andere Nitratreduktase wird als *Nap* bezeichnet, ist periplasmatisch lokalisiert und bezieht die Elektronen über ein lösliches, periplasmatisches und ein membrangebundenes Cytochrom C aus dem Ubiquinol/Menaquinol-Pool (Berks et al. 1995c; Reyes et al. 1996). *Nap* kann durch die Lokalisation im periplasmatischen Raum nicht direkt am Aufbau eines Protonengradienten beteiligt sein und ist daher als *dissimilatorisch, nicht aber als respiratorisch* zu bezeichnen. Es kann sich jedoch eine *indirekt respiratorische* Funktion ergeben, wenn die Elektronen für die Reduktion des Enzyms aus NADH stammen und durch die einen Protonengradienten aufbauende NADH-Dehydrogenase übertragen wurden (Moreno-Vivián & Ferguson 1998).

Darüberhinaus kann gerade die periplasmatische Nitratreduktase auch weitere Funktionen erfüllen, wie am Beispiel des Enzyms von *Rhodobacter capsulatus* DSM 158, einem phototrophen Bakterium, der weder zu assimilatorischer noch zu respiratorischer Nitratreduktion befähigt ist, gezeigt werden konnte. Nitrat stimuliert das phototrophe Wachstum dieses Stammes, der das *Nap*-System *dissipativ* nutzt, um einen Überschuß an Reduktionsäquivalenten aus dem phototrophen Wachstum auszugleichen (Moreno-Vivián et al. 1994).

Das Produkt der Nitratreduktion ist in allen Fällen Nitrit, das im assimilatorischen Stoffwechselweg über Hydroxylamin zum Ammonium reduziert wird. Die dissimilatorische Reduktion kann zu zwei verschiedenen Endprodukten führen: auf dem sogenannten DNRA-Weg, der **d**issimilatorischen **N**itrat-**R**eduktion, zu Ammonium und auf dem Denitrifikationsweg zu gasförmigen Stickstoffverbindungen wie NO, N₂O und N₂ (Tiedje 1988).

Im Rahmen dieser Arbeit waren ausschließlich die *dissimilatorische und respiratorische Reduktion von Nitrat* und deren Folgeprozesse Gegenstand der Untersuchungen. Somit wird im folgenden lediglich die assimilatorische Reduktion dezidiert als solche bezeichnet.

2.3 Enzyme und Gene der dissimilatorischen Nitratreduktion

Trotz der weiten Verbreitung der membrangebundenen Nitratreduktase gibt es von nur wenigen Arten substantielle Untersuchungen zur Biochemie, Enzymologie und Bioenergetik dieses Proteins. In der Majorität der Publikationen zur Nitratreduktion wurde *Escherichia coli* als Modellorganismus gewählt, der, genauso wie obligat anaerobe Bakterien und Gram-positive Bakterien (mit Ausnahme einiger *Bacilli*), zwar Nitrat dissimilatorisch über Nitrit zu Ammonium reduzieren kann, jedoch nicht über die Fähigkeit zur Denitrifikation verfügt.

Untersuchungen zu Enzymen der Denitrifikation stützen sich dagegen vorwiegend auf Vertreter der *Pseudomonaden* und verwandter Gattungen, die zahlreiche denitrifizierende Vertreter aufweisen, recht einfach zu kultivieren und zudem ubiquitär sind.

Die membrangebundene Nitratreduktase besteht aus drei Untereinheiten mit molekularen Massen von 140 kDa (α), 60 kDa (β) und 25 kDa (γ), die vom *narGHJI* Operon kodiert werden, welches auf dem *E. coli*-Chromosom bei 27 min positioniert ist. Das Operon, das schematisch in Abbildung 2.2 dargestellt ist, umfaßt zudem das Gen eines Nitrat/Nitrit-Antiport-Systems (*narK*) und das eines Nitrat/Nitrit-sensitiven Regulationssystem (*narXL*), (Bonney & DeMoss 1994, DeMoss & Hsu 1991, Noji et al. 1989; Schröder et al. 1993; Stewart et al. 1989).

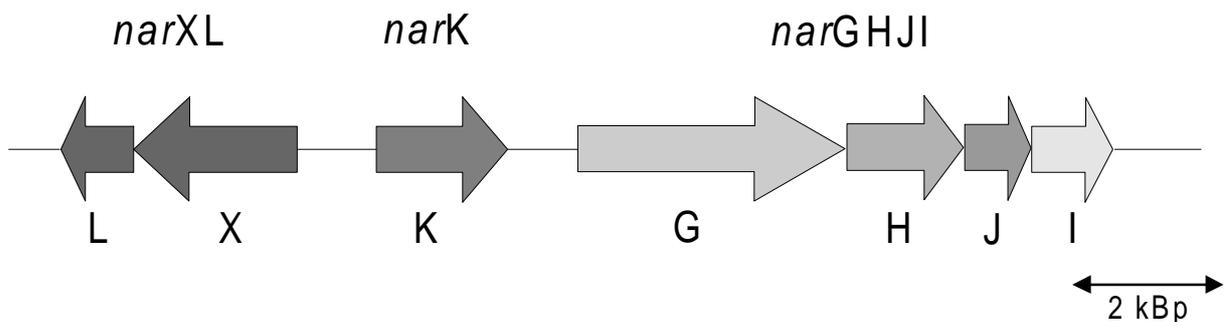


Abbildung 2.2: Operon-Struktur der membrangebundenen Nitratreduktase von *Escherichia coli*

Bei Position 32.5 min des *E. coli*-Chromosoms befindet sich ein weiteres Operon einer homologen Nitratreduktase (*NarVWYZ*) mit identischer Struktur und einer DNA-Sequenzsimilarität der Untereinheiten zwischen 69 bis 86 % (Blasco et al. 1990).

Die katalytische Reduktion von Nitrat findet an der α - und β -Untereinheit statt, die γ -Untereinheit ist für die Oxidation von Ubiquinol und den Elektronentransport zur β -Untereinheit notwendig (Ballard & Ferguson 1988; Enoch & Lester 1974, Morpeth & Boxer 1985, Stewart & MacGregor 1982).

Die α -Untereinheit gehört zu den Proteinen, die MGD (**M**olybdo-**G**uanin-**D**inukleotid) als prosthetische Gruppe binden, während die β -Untereinheit vier Eisen-Schwefel-Cluster trägt. Der molekulare Mechanismus der Reduktion ist noch nicht vollständig geklärt, ein weitgehend akzeptiertes Modell beschreibt einen gekoppelten Elektronen- und Protonentransfer (Stiefel 1973). Das Molybdän(IV)atom der α -Untereinheit gibt zwei Elektronen an das Nitrat ab und geht in den Oxidationszustand Mo(VI) über. Ein Donor-Atom des prosthetischen Pterinrings, der Redox-Zustände vom oxidierten Zustand bis zur vollständig reduzierten Tetrahydroform annehmen kann, transferiert ein Proton auf das Nitrat, welches in ein Nitrit- und ein Hydroxid-Ion gespalten wird. Durch Elektronenübertragung der Eisen-Schwefel-Cluster der β -Untereinheit wird das Molybdän(IV)atom wieder regeneriert (Abbildung 2.3).

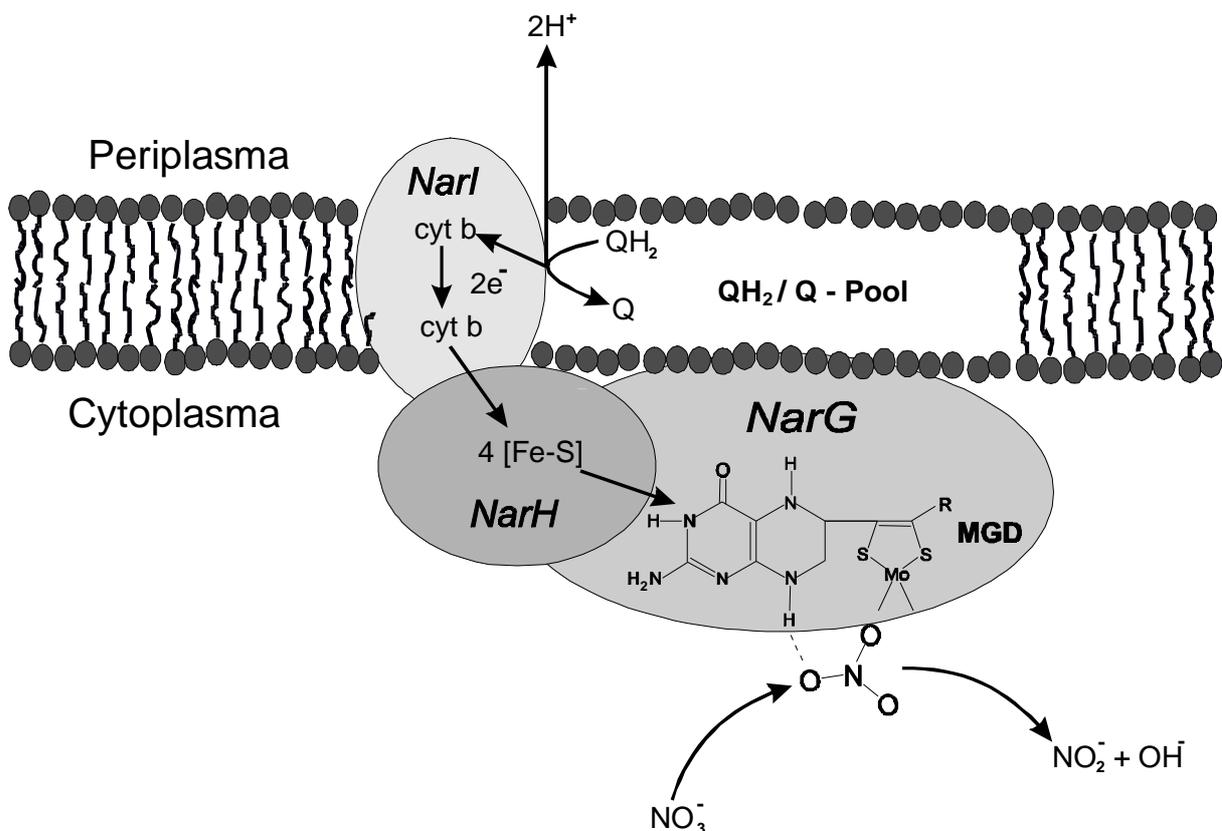


Abbildung 2.3: Molekularer Mechanismus der Nitratreduktion durch die Nitratreduktase (*narGHIJ*)

Die periplasmatische Nitratreduktase ist ein äqui-stöchiometrisches Heterodimer von *NapA*, einem MGD-bindenden Protein, und *NapB*, einem Dihäm-Cytochrome c-552. Die *nap*-Genloci enthalten bis zu 7 Gene, *nap(F)DA(GH)BC*, wobei die Zahl der Gene artspezifisch variiert (Berks et al. 1995). Während bei *Escherichia coli* die *nap*-Gene chromosomal lokalisiert sind, befinden sich diese bei *Ralstonia eutropha* H16 Plasmid-kodiert zusammen mit anderen Genen der Denitrifikation auf dem Megaplasmid pHG1 (Römermann & Friedrich 1985; Schneider et al. 1988). Die *nap*-Gene konnten bislang nur bei relativ wenigen Spezies nachgewiesen werden, obwohl der horizontale Gentransfer als Verbreitungsmechanismus plasmid-kodierter *nap*-Gene möglich erscheint (Bell et al. 1990; Siddiqui et al. 1993). Für die periplasmatische Nitratreduktase wird eine Funktion als aerobe Nitratreduktase postuliert. Desweiteren scheint nach neuesten Untersuchungen an *Escherichia coli* K 12-Mutanten die periplasmatische Nitratreduktase einen Wachstumsvorteil bei niedrigen Nitratgehalten zu bieten (Potter et al. 1999).

2.4 Bedeutung der Nitratreduktion

Die beiden Ammonium-generierenden Wege sind auf molekularer Ebene bisher wenig untersucht worden. So sind Informationen über die beteiligten Enzyme und die Intermediate der Reaktion nur fragmentarisch vorhanden. Beide Stoffwechselwege werden unabhängig voneinander reguliert und somit durch unterschiedliche Enzyme katalysiert. Der dissimilatorische Weg wird durch Sauerstoff inhibiert, bleibt aber durch Ammonium unbeeinflusst; das Umgekehrte gilt für den assimilatorischen Weg (Betlach 1982).

Die assimilatorische Nitratreduktion gewinnt dort an Bedeutung, wo ausreichend organisches Substrat vorhanden ist, die Zellen aber nicht ausreichend mit Ammonium versorgt werden. Dieser assimilatorische Reduktion kostet Energie, während die dissimilatorischen Prozesse Energie generieren.

Die Bedeutung des DNRA-Weges für die Zelle ist neben der Detoxifizierung des akkumulierten Nitrits primär die Funktion als Elektronenfalle zur Reoxidation von NADH. Die hohe Zahl von 8 Elektronen, die für die Reduktion benötigt werden, machen diesen Weg für Anaerobier unter Elektronenakzeptor-Mangelbedingungen interessant (Tiedje 1988).

Das zentrale Forschungsthema innerhalb des reduktiven Stickstoffkreislaufes war und ist jedoch die Denitrifikation, dessen Bedeutung sich in zahlreichen ökologischen und ökonomischen Gründen manifestiert. Die Denitrifikation ist verantwortlich für einen großen Teil der Düngerverluste in der Landwirtschaft, die ca. 20 – 30 %, in Extremfällen bis zu 70 %, des aufgebrauchten Düngers betreffen können. Denitrifizierende Bakterien spielen eine große Rolle bei der Aufbereitung nitratbelasteter Abwässer aus privaten Haushalten oder industriellen Anwendungen, wie z.B. der Aquakultur. Aus ökologischer Sicht wurde die Denitrifikation (zu einem geringeren Anteil auch der DNRA-Weg) in den letzten Jahren als Distickstoffmonoxid-Quelle für den Treibhauseffekt mitverantwortlich gemacht. Seine zentrale Bedeutung verdankt die Denitrifikation nicht zuletzt der Tatsache, daß diese Reaktion als einziger reduktiver Prozess die weltweite Stickstofffixierung balanciert und so den Stickstoffkreislauf schließt (Tiedje 1988; Zumft 1997).

Die Denitrifikation ist ein anaerober Prozeß, der primär durch Sauerstoff und Nitrat reguliert wird. Es gibt jedoch auch Nachweise denitrifizierender Aktivität unter oxischen Bedingungen, deren Bedeutung bisher allerdings nicht bewertet werden konnte (Lloyd 1993; Page et al. 1990).

Auch das Verhältnis der dissimilatorischen Reduktionswege zueinander ist weiterhin ungeklärt. Entscheidend für die Selektion zwischen denitrifizierenden und DNRA-Populationen ist das Verhältnis von verfügbarem organischem Substrat und Elektronenakzeptor. Die DNRA-Aktivität ist dort am höchsten, wo ausreichend organisches Substrat, aber wenig Elektronenakzeptoren zu finden sind, während bei umgekehrtem Verhältnis die Denitrifikation bevorzugt wird, die der Zelle die größte Energieausbeute pro Nitratmolekül liefern kann. Letztlich wird aber die Art der Nitratreduktion durch eine Vielzahl verschiedener physikalischer und chemischer Standortfaktoren beeinflusst, daher ist die Bedeutung der diversen Nitratreduktionswege für den Standort nur mit Einschränkungen zu bewerten.

2.5 Diversität nitratreduzierender Bakteriengemeinschaften

Aus nahezu allen phylogenetischen Gruppen sind Vertreter bekannt, die die Fähigkeit zur Nitratreduktion aufweisen (Tabelle 2.1). Unter den wenigen Gattungen ohne diese Eigenschaft finden sich viele phototrophe Bakterien, wie Vertreter der *Chromatiaceae*, der *Chlorobiaceae* oder der *Chloroflexaceae* (Betlach 1982). Bisher konnte nur bei phototrophen *Rhodobacter*-Arten und den verwandten Taxa *Roseobacter* und *Rhodoplanes* die Fähigkeit zur Nitratreduktion nachgewiesen werden (Hiraishi et al. 1994; Sabaty et al. 1994; Shiba 1991).

Auch in der physiologischen Gruppe der Nitrifizierer sind Denitrifizierer und Nitratreduzierer zu finden (Richardson 1998; Tsay, 1997; Zart & Bock 1998), die in Abhängigkeit von den Umweltbedingungen die vorhandenen Stickstoffkomponenten reduktiv oder oxidativ nutzen können. Bisher ist allerdings ungeklärt, ob die enzymatische Ausstattung für beide Stoffwechselwege unabhängig voneinander existiert oder ob oxidative und reduktive Prozesse, z.B. bei der Oxidation von Nitrit zu Nitrat und bei der Reduktion von Nitrat zu Nitrit, durch die gleichen Enzyme katalysiert werden.

Auch in der Linie der *Archaea* sind Nitratreduzierer und Denitrifizierer zu finden, die vorwiegend zu den *Halobacteria* zu zählen sind, auch wenn in jüngster Zeit zwei hyperthermophile Organismen, *Pyrobaculum aerophilum* (Völkl et al. 1993) und *Aeropyrum pernix* (Kawarabayasi et al. 1999; Sako et al. 1996), als Denitrifizierer bzw. Nitratreduzierer identifiziert werden konnten (Tabelle 2.1). Bei den thermoacidophilen *Archaea* sind dagegen keine Nitratreduzierer zu erwarten, da das mutagene Potential der Reaktionsprodukte unter den Lebensbedingungen dieser Organismen zu groß wäre. Die folgende Tabelle 2.1 bietet einen Überblick über die Vielfalt dissimilatorisch nitratreduzierender Bakterien; assimilatorische Nitratreduzierer wurden nicht in die Tabelle aufgenommen, da über die Verbreitung dieser Stoffwechselfunktion keine ausreichenden Informationen verfügbar sind.

Tabelle 2.1: Übersicht über die Gruppen nitratreduzierender Prokaryoten

Bacteria		Nitrifizierende Bakterien	
Aerobe Bakterien	<i>Pseudomonas</i> <i>Alcaligenes</i> <i>Flavobacterium</i> <i>Achromobacter</i> <i>Paracoccus</i> <i>Corynebacterium</i> <i>Flexibacter</i> <i>Cytophaga</i> <i>Neisseria</i>		<i>Nitrosomonas</i> <i>Nitrobacter</i>
Oligocarbophile Bakterien	<i>Hyphomicrobium</i> <i>Aquaspirillum</i>	Schwefelbakterien	<i>Thiobacillus</i> <i>Thiomicrospira</i> <i>Thiosphaera</i> <i>Beggiatoa</i>
Fermentative Bakterien	<i>Azospirillum</i> <i>Bacillus</i> <i>Wolinella</i>	Phototrophe Bakterien	<i>Rhodobacter</i> <i>Roseobacter</i> <i>Rhodospseudomonas</i>
Halophile Bakterien	<i>Halobacterium</i> <i>Paracoccus</i>	Mikroaerophile Bakterien	<i>Campylobacter</i>
Thermophile Bakterien	<i>Bacillus</i> <i>Thermus</i>	Obligat anaerobe Bakterien	<i>Clostridium</i> <i>Veillonella</i> <i>Desulfovibrio</i> <i>Wolinella</i> <i>Selenomonas</i>
Sporenbildende Bakterien	<i>Bacillus</i>	Pathogene Bakterien	<i>Neisseria</i> <i>Kingella</i> <i>Wolinella</i>
Magnetotaktische Bakterien	<i>Aquaspirillum</i>	Enterobakterien	<i>Escherichia</i> <i>Citrobacter</i> <i>Salmonella</i> <i>Klebsiella</i> <i>Enterobacter</i> <i>Serratia</i> <i>Erwinia</i>
N₂-fixierende Bakterien	<i>Rhizobium</i> <i>Bradyrhizobium</i> <i>Azospirillum</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Rhodobacter</i> <i>Agrobacterium</i>		
H₂-oxidierende Bakterien	<i>Paracoccus</i> <i>Alcaligenes</i> <i>Bradyrhizobium</i> <i>Pseudomonas</i>		
		Archaea	
		Halophile Archaea	<i>Haloferax</i> <i>Haloarcula</i> <i>Halobacterium</i>
		Thermophile Archaea	<i>Aeropyrum</i> <i>Pyrobaculum</i>

2.6 Ökologie der Nitratreduktion in marinen Sedimenten

In Schelfmeeren wie z.B. der Ostsee wird ein großer Teil des organischen Materials in den Sedimenten abgebaut, da dieses Material dort akkumuliert und durch die enge räumliche Kopplung verschiedener Abbauprozesse effektiv verwertet wird (Fenchel & Jørgensen 1977). Die Mineralisation wird durch fermentative und respiratorische bakterielle Prozesse katalysiert, wobei die bakterielle Sauerstoff-, Nitrat- und Sulfatrespiration quantitativ bedeutend sind (Sørensen et al. 1979). Die Abbaureaktionen werden durch eine Reihe thermodynamischer und kinetischer Faktoren kontrolliert, die ein kompliziertes regulatorisches Netzwerk bilden.

Im allgemeinen sind die respiratorischen Prozesse vertikal streng zoniert. Diese Stratifizierung des Sediments ist das Ergebnis spezifischer Bedürfnisse der verschiedenen taxonomischen und physiologischen Bakteriengruppen im Hinblick auf Redox-, Substrat- und Nährstoffverhältnisse. Auch führen die unterschiedliche Energieausbeute der respiratorischen Prozesse und verschiedene kinetische Faktoren hinsichtlich der Verwertung von Substraten zur Selektion physiologischer Gruppen in distinkten Horizonten. Nach einem allgemein akzeptierten Schema wird das Sediment in erster Näherung in die drei Tiefenbereiche der *Sauerstoff-, Nitrat- und Sulfatrespiration* eingeteilt (Sørensen 1984).

Die beschriebene Einteilung des Sediments in die drei Tiefenbereiche der Sauerstoff-, Nitrat- und Sulfatrespiration basiert auf der Vorstellung einer Idealverteilung von Nährstoffen und Elektronenendakzeptoren und gilt für Sedimente mit oxischer Wassersäule. Dabei werden jedoch lokale Heterogenitäten und Mikrohabitate, wie sie z.B. durch Bioturbation entstehen, vernachlässigt, die zu lokalen Veränderungen im Vertikalprofil bakterieller Diversität und Aktivität führen können. Dennoch stellen diese Ausnahmen das grundsätzliche Konzept der Sedimentstratifizierung nicht in Frage.

Die Zone der Sauerstoffrespiration ist an der Sedimentoberfläche lokalisiert. Die Sauerstoffzehrung in dieser Zone beruht häufig auf der Aktivität von Nitrifizierern, die in dieser Schicht durch eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff und Ammonium aus der Wassersäule optimale Wachstumsbedingungen vorfinden (Hansen et al. 1981).

Das bei der Nitrifikation erzeugte Nitrat gelangt über Diffusionsprozesse in die unter der Sauerstoffrespirationszone liegende Nitratrespirationszone, die sich typischerweise im Sedimentbereich zwischen 1 und 5 cm befindet. Die Nitratkonzentration erreicht Höchstwerte direkt unterhalb der Nitrifikationszone (Sørensen 1984); in eutrophierten Gewässern kann

diese Zone aus der Wassersäule zusätzlich mit Nitrat versorgt werden und noch höhere Nitratkonzentrationen akkumulieren. Die Gesamtreduktion des Nitrats teilt sich in Abhängigkeit von den Standortparametern auf die drei in Abschnitt 2.2 beschriebenen Nitratreduktionswege auf. In den Sedimenten, die eine Kopplung mit der Nitrifikation erlauben, besitzt die Denitrifikation die weitaus größte Bedeutung, doch können z.B. in Sedimenten hohen Sulfatgehalts die NH_4^+ -generierenden Stoffwechselwege bis zu 100% der Nitratreduktion ausmachen (Sørensen 1978).

Unterhalb der Nitratreduktionszone befindet sich die Sulfatrespirationszone. Sulfatreduzierende Bakterien haben im Vergleich zu Nitratreduzierern den Vorteil, daß im marinen Sediment eine erheblich größere Menge Sulfat (1-30 mM) zur Verfügung steht, das als Bestandteil des Meerwassers nicht limitierend ist. Dagegen ist das Spektrum der organischen Komponenten, die als Energiequellen für sulfatreduzierende Bakterien dienen können, im wesentlichen auf Wasserstoff und kurzkettige Fettsäuren beschränkt (Laanbroek & Pfennig 1981; Sørensen et al. 1981), da das Oxidationspotential von Sulfat vergleichsweise niedrig ist.

In jeder der drei angesprochenen Zonen ist eine spezifische nitratreduzierende Bakteriengemeinschaft zu finden, deren Diversität und Aktivität neben den physikalisch-chemischen Faktoren (Temperatur, Sedimentation, Sauerstoffverhältnisse etc.) durch verschiedene physiologische Eigenschaften der Nitratreduzierer bestimmt wird.

Da die Nitratreduktion ein anaerober (mikroaerober) Prozess ist, der durch Sauerstoff inhibiert wird (Tiedje 1988), sollte in oxischen Sedimentschichten keine Nitratreduktion nachweisbar sein. Dennoch werden gerade an der Sedimentoberfläche oxischer Küstensedimente sehr hohe Denitrifikationsraten gemessen, die auf der Kopplung von Nitrifikation und Denitrifikation beruhen. Diese enge räumliche Kopplung ermöglicht eine deutlich erhöhte Aktivität beider Bakteriengruppen (Kähler 1990, Brettar 1991, Seitzinger 1990). So haben Messungen der Denitrifikationsraten ergeben, daß denitrifizierende Bakterien an Standorten hoher nitrifizierender Aktivität etwa die 5-fache Menge an Nitrat umsetzen wie an vergleichbaren Standorten ohne Nitrifizierer (Tuominen et al. 1998, Kähler 1990).

Da durch die Aktivität nitrifizierender Bakterien in oxischen Sedimentschichten Nitrat in ausreichender Menge zur Verfügung steht, ist also weniger die Fähigkeit zur Nitratreduktion, als vielmehr die effiziente Konkurrenz um verfügbares organisches Material ein entscheidender Selektionsvorteil. In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, daß gerade Denitrifizierer in der Konkurrenz um organisches Material sogar in Nitratmangelsituationen

erfolgreich sind (Myrold & Tiedje 1985; Smith & Tiedje 1980; Terai & Yoshioka 1983), ohne auf die Fähigkeit zur Denitrifikation angewiesen zu sein. Daher sind in oxischen Sedimenthorizonten eher Denitrifizierer zu finden, als Bakterien, die Nitrat dissimilatorisch oder assimilatorisch zu Ammonium reduzieren. Die denitrifizierenden Bakteriengemeinschaften werden dabei von Vertretern der Gattungen *Pseudomonas* und *Alcaligenes* dominiert (Sugahara et al. 1986; Terai 1979).

In der Nitratreduktionszone, die im Übergangsbereich zwischen oxischen und anoxischen Verhältnissen lokalisiert ist, treten die Denitrifizierer in Konkurrenz zu Bakterien, die Nitrat assimilatorisch oder dissimilatorisch auf dem DNRA-Weg zu Ammonium reduzieren. Wie für die Denitrifizierer scheint auch für die „DNRA“-Bakterien die Verfügbarkeit von Nitrat ein eher sekundärer Faktor zu sein. Entscheidend für die Selektion dieser fermentativen Nitratreduzierer in der Konkurrenz zu Denitrifizierern ist vielmehr das Mengenverhältnis zwischen organischem Material und Elektronenendakzeptoren. In Sedimenten hohen Kohlenstoffgehaltes und geringer Konzentration an Elektronenendakzeptoren bietet die hohe Zahl von acht Elektronen, die auf Nitrat übertragen werden können, einen entscheidenden Selektionsvorteil für anaerobe „DNRA“-Bakterien (Tiedje 1988). In marinen Sedimenten wurden hauptsächlich Vertreter der Gattungen *Aeromonas*, *Vibrio* und *Klebsiella* gefunden, während die Vertreter der Gattungen *Clostridium* und *Desulfovibrio*, die in marinen Sedimenten erwartet werden könnten, bisher kaum gefunden wurden (Cole & Brown 1980). Die assimilatorische Nitratreduktion tritt vor allem dann auf, wenn wenig Ammonium für das Zellwachstum vorhanden ist; dies ist in marinen Sedimenten allerdings eine Ausnahme.

Die Lage der Sulfatreduktionszone im Sediment wird in erster Linie durch die Konkurrenzsituation von Nitrat- und Sulfatreduzierern bestimmt. In dieser vollständig anoxischen Sedimentschicht wird neben der Verfügbarkeit organischen Materials auch die Konzentration des Elektronenendakzeptors zum wesentlichen Faktor in der Konkurrenz von nitrat- oder sulfatreduzierenden Bakterien (Sørensen et al. 1979). Die im Vergleich erheblich höhere Sulfatkonzentration führt zur Selektion von Sulfatreduzierern oder von Bakterien, die beide respiratorischen Funktionen nutzen können (z.B. *Desulfovibrio* sp.).

2.7 Aufgabenstellung und Strategie

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war über die Diversität nitratreduzierender Bakterien in ihren natürlichen Lebensräumen und Habitaten wenig bekannt. Ein wesentlicher Grund dafür war das Fehlen adäquater Methoden zur Erfassung der natürlichen Lebensgemeinschaft. Alle Arbeiten auf diesem Gebiet waren auf bisher auf die Kultivierung der Bakterien angewiesen und damit auf die Selektivität der gewählten Medien beschränkt. Daher war eine zentrale Aufgabenstellung dieser Arbeit die Entwicklung eines kultivierungsunabhängigen, auf der Standort-DNA basierenden Systems zur Evaluierung der Artenvielfalt nitratreduzierender Bakteriengemeinschaften im natürlichen Umfeld.

Als Ziel der genetischen Untersuchungen wurden die Gene der dissimilatorischen Nitratreduktasen gewählt, da diese Enzyme eine zentrale Rolle in der Nitratreduktion einnehmen, den ersten Schritt der ökologisch wichtigen Denitrifikation und des DNRA-Weges katalysieren und bei den Prokaryoten weit verbreitet sind. Dabei bildete die membrangebundene Nitratreduktase den Schwerpunkt der Arbeiten, da dieses Enzym chromosomal kodiert ist und sich folglich besser für phylogenetische Untersuchungen eignet, und da über die Verbreitung und Bedeutung des periplasmatischen Enzyms keine gesicherten Erkenntnisse verfügbar waren.

Der erste Schritt dieser Arbeit war die Etablierung von Primer-Systemen und die Erstellung einer Datenbank von Nitratreduktase- und korrespondierenden 16S rDNA-Sequenzen mit Hilfe von Isolaten und Referenzstämmen. Auf der Basis dieser Daten sollte die Phylogenie der Nitratreduzierer ermittelt werden. Zudem sollte die Sequenzinformation zur phylogenetischen Einordnung und idealerweise zur Identifizierung von *narH*-Amplifikaten aus Umweltproben verwendet werden. Zur Gewinnung von Diversitätsmustern und Sequenzinformation aus komplexen natürlichen Gemeinschaften sollte darüberhinaus ein System der denaturierenden Gradientengelelektrophorese, sowie weitere molekularbiologische Methoden etabliert und eingesetzt werden.

Nach der Entwicklung der Methoden war ihre Anwendung auf Standortmaterial der zweite zentrale Punkt dieser Arbeit. Im Mittelpunkt stand dabei die Diversität nitratreduzierender Bakterien im natürlichen Umfeld und die Frage, ob und welche Verbindungen sich zwischen der Diversität der Gemeinschaft und den am Standort vorherrschenden chemischen und physikalischen Bedingungen herstellen lassen. Dazu sollten die Standortparameter bestimmt und zu den Ergebnissen aus den genetischen wie aus den parallel durchzuführenden Kultivierungsversuchen in Beziehung gesetzt werden.

Abbildung 2.4 zeigt die grundlegende Strategie der vorliegenden Arbeit in Form eines Fließschemas.

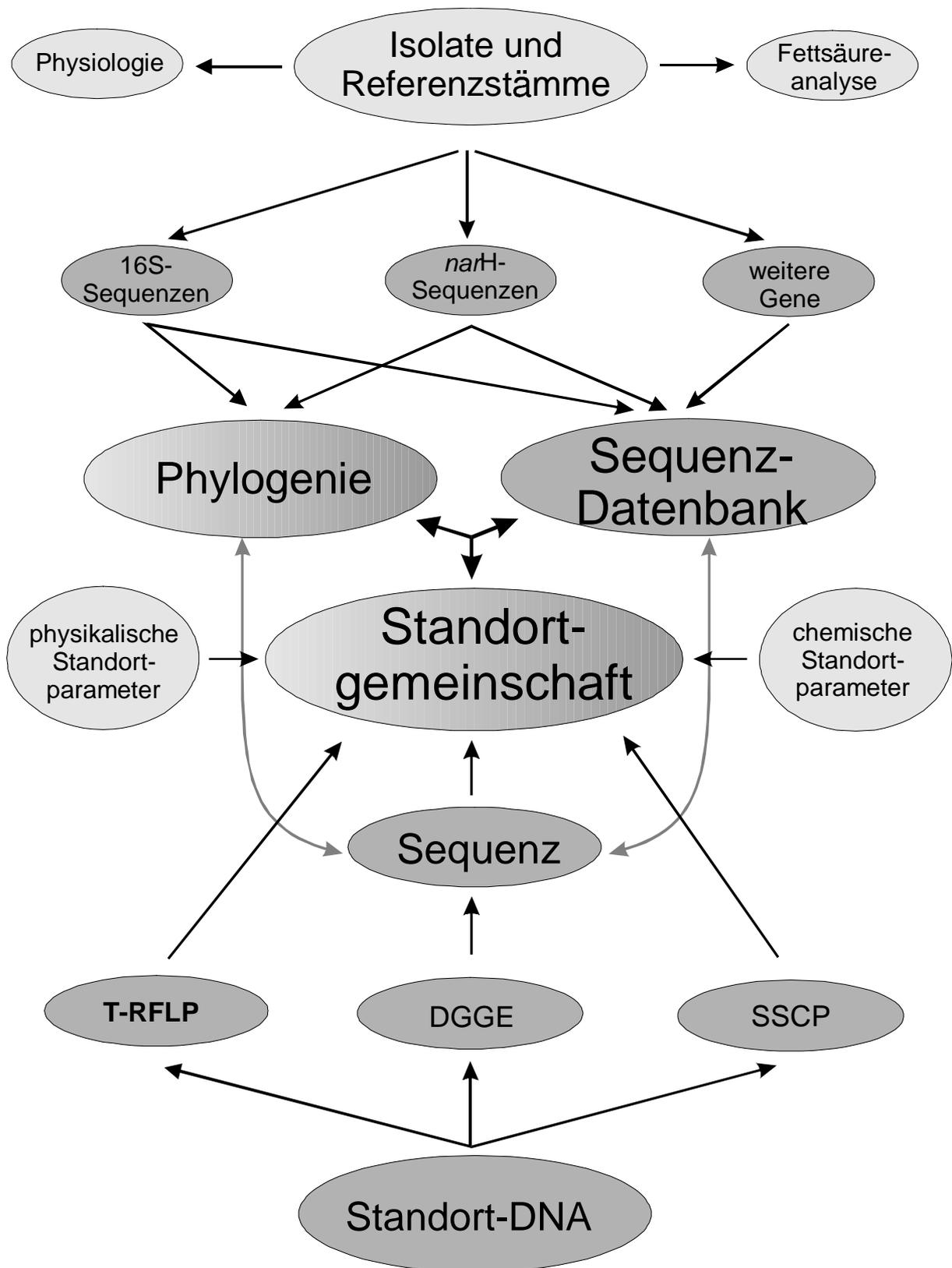


Abbildung 2.4: Fließschema der wissenschaftlichen Vorgehensweise im Rahmen dieser Arbeit

3. Material und Methoden

3.1 Chemikalien und Geräte

Allgemein wurden für Analysen und Medien Chemikalien vom höchsten verfügbaren Reinheitsgrad eingesetzt. Diese wurden von den Firmen Walter (Kiel), Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt) und Roth (Karlsruhe) bezogen. Die Bestandteile der Komplexmedien stammten von Difco (Bacto-Agar, TSB, Pepton, Bactotrypton) und Merck (Fleischextrakt). Die verwendeten Gase (N_2 , synthetische Luft, H_2) wurden von der Firma Messer-Griesheim (Osterholz-Scharmbeck) bezogen.

Die Reagenzien für die molekularbiologischen Arbeiten stammten von Boehringer, Mannheim (dNTP'S, DNA-Längenmarker X), Biozym, Hameln (Sequenzierkits, Agarose, AmpliTherm Optimization Kit für RAPD), Appligene (Acrylamid, Paraffin), Qiagen, Hilden (Reinigungskits), Amersham-Pharmacia, Freiburg (DNase), MWGBiotech, Ebersberg (Primer), FMC (Acrylamid für ALF-Gele, über Biozym), NewEngland Biolabs, Schwalbach (Restriktionsenzyme), Perkin-Elmer, Weiterstadt (Sequenzier-Kit für ABI 310).

Als DNA-Polymerasen wurde das TaqPlus Long PCR-System von Stratagene (Heidelberg) und die RTG-PCR-Beads von Pharmacia (Freiburg) eingesetzt. Für die RT-PCR kamen die RTG-RT-PCR-Beads von Pharmacia zur Anwendung. Die den Reinigungskits für Nukleinsäuren beiliegenden Puffer und Lösungen sind in der Regel nicht spezifiziert und werden daher bei der Beschreibung der Methoden mit der Bemerkung „im Lieferumfang“ gekennzeichnet. Alle anderen Puffer sind im Anhang aufgeführt.

Medien wurden in der Regel mit MilliQ-Wasser (Millipore, Eschborn) angesetzt, alle Lösungen, die in der PCR oder in Sequenzierungsreaktionen eingesetzt wurden, wurden mit DNA-freiem Wasser der Firma Fluka (Buchs, Schweiz) angesetzt.

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurden folgende Großgeräte eingesetzt: Die DGGE-Analysen wurden in einem DGGE 2000-Gerät von CBS Scientific (Del Mar, Kalifornien, USA) durchgeführt. Als Geräte für die Sequenzierungen standen der ALF-Sequencer von Pharmacia (Freiburg) und der ABI-310 von Perkin-Elmer (Weiterstadt) mit zugehöriger Auswertesoftware zur Verfügung. Auf dem ALF-System wurden zusätzlich die T-RFLP- und die SSCP-Analysen durchgeführt. Als PCR-Cycler wurden Techne-Geräte der Firma Thermodux (Wertheim) eingesetzt. Die Fettsäureanalyse der Isolate erfolgte über einen

Kapillargaschromatographen HP 5890m Serie II, mit 25m 5% Phenyl-Methylsilicon-kapillarsäule von Hewlett-Packard (Waldbronn), die anschließende Identifizierung der Isolate wurde durch das „Microbial Identification System“ (MIDI Incorp., Newark, Delaware, USA) gewährleistet. Die ionenchromatographischen Analysen wurden mittels eines Dionex DX-300 HPLC-Gerätes (Dionex, Idstein) durchgeführt. Photometrische Bestimmungen erfolgten über das Lambda 2-System von Perkin-Elmer (Weiterstadt). Die Gele wurden mit Hilfe des BIODOC II-Systems von Biometra (Göttingen) dokumentiert. Die für die phylogenetischen Analysen verwendeten Programme sind in Abschnitt 3.4 detailliert aufgeführt.

3.2 Molekulare Methoden

Im Kapitel molekulare Methoden sind alle Techniken vereinigt, die bei der Extraktion, Aufreinigung, Amplifikation, Sequenzierung oder elektrophoretischen Trennung von DNA und RNA sowie von DNA- und RNA-Fragmenten eingesetzt wurden. Die Rezepte aller verwendeten Puffer sind soweit nicht im Text angegeben in Tabelle A8 im Anhang spezifiziert.

3.2.1 Extraktion von Nukleinsäuren aus Kulturen und Umweltproben

Die Extraktion von DNA wurde unabhängig von der Art der Probe nach dem gleichen Prinzip durchgeführt. Zunächst wurde das Material einer Lyse unterzogen um die Zellbestandteile freizusetzen, dann wurde die DNA aufgrund ihrer speziellen Eigenschaften von den übrigen Zellbestandteilen getrennt und schließlich über Zentrifugationssäulen aufgereinigt. Nukleinsäuren aus Sedimentproben, die in hohem Maße mit Huminstoffen belastet sind, wurden zusätzlich durch Behandlung mit PVPP (Polyvinylpolypyrrolidon) aufgereinigt.

3.2.1.1 Extraktion von DNA aus Kulturen und Wasserproben

Für die DNA-Extraktion aus Kulturen wurden je ca. 0.5 ml der Kultur bei 4°C mit 5000*g für 10 min abzentrifugiert. Danach wurde der Überstand vorsichtig vom Pellet abpipettiert.

Wasserproben der Standorte wurden durch ein 0.2µm Polycarbonat-Filter filtriert, in 1 ml DNA-freiem Wasser aufgenommen und kräftig gemischt*. Von dieser Lösung werden 200µl für die DNA-Extraktion eingesetzt

* auf diese Weise im Fließtext gekennzeichnete Mischvorgänge wurden mit Hilfe eines Vortex-Gerätes durchgeführt

Zu jedem Probengefäß werden 180 µl Lysispuffer (20 mg/ml Lysozym; 20 mM Tris-HCl [pH 8.0], 2 mM EDTA; 1.2 % Triton) zugesetzt, sorgfältig resuspendiert, gemischt* und 30 min bei 37 °C inkubiert. Danach werden zu jedem Ansatz 200 µl Puffer AL (im Lieferumfang) und 25 µl Proteinase K-Lösung (17.8 mg/ml) zugesetzt, gründlich vermischt und mindestens 30 min bei 70 °C inkubiert. Während dieser zweiten Inkubation wird DNA-freies Wasser für die Elutionsschritte auf 70 °C vorgewärmt. Ferner wird pro Probe eine QIAamp-Minisäule in ein 2 ml-Auffangröhrchen eingesetzt. Nach Beendigung der 70 °C-Inkubation wird jeder Ansatz mit 210 µl Ethanol (96 % ig) versetzt, gemischt*, auf die QIAamp-Minisäule aufgetragen (inkl. eventuell aufgetretener Niederschläge), geschlossen und für 1 min bei RT mit 6000*g zentrifugiert. Anschließend wird die QIAamp-Minisäule in ein neues Auffangröhrchen überführt, 500 µl Puffer AW (im Lieferumfang) zugesetzt und mit maximaler Geschwindigkeit bei RT für 1 min zentrifugiert. Zur Elution der DNA von der Säule wird die QIAamp-Minisäule in ein 1.5 ml Eppendorfggefäß überführt, mit 200 µl DNA-freiem H₂O von 70 °C 1 min inkubiert und die QIAamp-Minisäule mit der gelösten DNA 1 min mit 6000*g bei RT zentrifugiert. Dieser Vorgang wird einmal mit weiteren 200 µl DNA-freiem Wasser wiederholt.

3.2.1.2 Extraktion von DNA aus Sedimentproben

Bei Sedimentproben werden 200 mg in einem 2 ml Eppendorfggefäß mit 37 µl DNA-freiem Wasser versetzt und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden nacheinander 1.4 ml Extraktionspuffer und 0.1 ml GITC Lösung (Guanidinisothiocyanat, s. Anhang A8) zugegeben und jeweils nach der Zugabe 15 s intensiv gemischt*. Die Mischung wird 10 min bei 68 °C im Wasserbad inkubiert, 3 min im Ultraschallbad behandelt und erneut 1 h bei 68 °C im Wasserbad inkubiert. Dabei wird alle 15 min für ca. 15 s gemischt*. Nun zentrifugiert man 15 min bei Raumtemperatur (10000*g), pipettiert den Überstand in ein neues Eppendorfggefäß ab und fügt 1.5 ml Isopropanol hinzu. Wieder wird 30 min (10000*g, Raumtemperatur) zentrifugiert, das Pellet mit 0.5 ml eiskaltem 70 % igem Ethanol gewaschen, nochmals 5 min zentrifugiert (10000*g, Raumtemperatur) und der Alkohol abdekantiert. Man läßt das Pellet 10 min trocken und nimmt die extrahierte DNA in 100 µl TE-Puffer auf.

Die Hälfte des Rohextraktes wird mit 200 µl säuregewaschenem PVPP in einem 1.5 ml Eppendorfggefäß kräftig gemischt*, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und erneut gemischt*. Man überführt die Mischung in eine Micropur-Filtereinheit und zentrifugiert 60 s bei 10000*g (Raumtemperatur). Das Filtrat wird mit MOPS-Puffer (siehe Anhang A8) auf ein Endvolumen von 1.0 ml verdünnt, auf eine äquilibrierte Qiagen-Minisäule aufgetragen und

7 mal mit jeweils 2 ml Puffer QC (siehe Anhang) gewaschen. Die DNA wird in zwei Fraktionen mit jeweils 1 ml Puffer QF (siehe Anhang) eluiert, durch Zugabe von je 0.6 ml Isopropanol ausgefällt, 30 min bei 10000*g (Raumtemperatur) zentrifugiert und anschließend mit 100 µl eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen. Es wird 5 min bei 10000*g (Raumtemperatur) zentrifugiert, der Alkohol wird abdekantiert, die gereinigte DNA wird 10 min bei Raumtemperatur getrocknet und zuletzt in 50 µl TE-Puffer resuspendiert.

3.2.1.3 Vorbereitung des Polyvinylpyrrolidons (PVPP)

75 g PVPP werden in 1 Liter 3 M HCL aufgenommen und 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das PVPP über eine Glasfilternutsche abfiltriert, in 1 Liter 20 mM Kaliumphosphat-Puffer [pH 7.4], aufgenommen und erneut 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Man stellt den pH-Wert mit 10 M KOH auf 7.0 ein, nutschts wiederum ab, und nimmt das PVPP in 1 Liter TE-Puffer auf. Nach dem Autoklavieren wird die Suspension mit sterilem TE-Puffer im Verhältnis 1:4 verdünnt, um eine pipettierbare Konsistenz zu bekommen.

3.2.1.4 Extraktion von RNA aus Kulturen

Gesamt-RNA aus dem Kulturversuch mit *Pseudomonas stutzeri* DSM 5190^T wird mit Hilfe des RNA-Extraktionskits (RNeasy) von Qiagen gewonnen. Die Zellen werden durch Zentrifugation von 10 ml Kulturflüssigkeit bei 5000*g (4°C, 5 min) geerntet. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 100 µl eines TE-Puffers aufgenommen, der 400 µg/ml Lysozym enthält. Nach einer Inkubationszeit von 5 min werden 350 µl RTL-Puffer (im Lieferumfang) hinzugefügt, stark gemischt* und 2 min bei 14000*g (4°C) zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgezogen, in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit 250 µl 96%igem Ethanol versetzt und mittels einer Pipette durchmischt. Der gesamte Ansatz wird auf die RNeasy-Minisäulen gegeben und 15 s bei 8000*g, 4°C zentrifugiert. Man gibt 700 µl Puffer RW1 (im Lieferumfang) auf die Säulen, zentrifugiert erneut 15 s bei 8000*g, 4°C, überführt die Säule in ein weiteres 2 ml-Auffangröhrchen und fügt 500 µl Waschpuffer RPE hinzu. Wieder wird 15 s wie angegeben zentrifugiert, das Filtrat verworfen und die Säule für 2 min bei 14000*g zentrifugiert, um die Säulenmembran zu trocknen. Man überführt die Säule in ein RNase-freies 1.5 ml Eppendorfgefäß, gibt 50 µl RNase-freies Wasser hinzu, läßt kurz einwirken und zentrifugiert dann 1 min bei 8000*g, um die RNA zu ernten.

Damit die Reaktion nach der Erststrang-Synthese nicht zu falsch positiven Ergebnissen führt, wird die enthaltene DNA durch DNase-Behandlung entfernt. Dazu werden 20 µl der RNA-Lösung in ein 0.5 ml Eppendorfgefäß überführt, mit 2.5 µl 10*DNase Puffer (400 mM

Tris-HCl [pH 8.0], 100 mM NaCl, 60 mM CaCl₂) und 2.0 µl (2 Units) versetzt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Reaktion wird die DNase durch Wärmebehandlung (10 min, 95 °C) inaktiviert.

3.2.1.5 Elution von DNA aus Agarose- und DGGE-Gelen

Die Isolierung von PCR-Fragmenten aus Agarosegelen oder aus DGGE-Gelen erfolgt nach einer einfachen Zentrifugationsmethode. Nach dem Färben der Gele mit Ethidiumbromid oder SYBR-Green werden die Gele auf dem UV-Transilluminator dokumentiert und anhand der Fotos die zu eluierenden Banden bestimmt. Für jede auszuschneidende Bande wird ein 0.5 ml Eppendorfgefäß mittels einer sterilen Kanüle mit einem Bodenloch versehen, mit ein wenig silikonisierter Glaswolle gestopft und in ein 1.5 ml Eppendorfgefäß überführt. Anschließend werden die Banden auf dem Transilluminator mit einem Skalpell oder entsprechend präparierten Spitzen ausgeschnitten bzw. ausgestanzt und in die ineinandergestellten Eppendorfgefäße überführt. Um UV-Schädigung der DNA zu minimieren und ein Verblässen der Banden zu verhindern, sollte dieser Vorgang so schnell wie möglich durchgeführt werden. Durch Zentrifugation (5 min, 10000*g RT) werden die geernteten Gelstückchen in der Glaswolle zersprüht, die Gelreste verbleiben im kleinen Eppendorfgefäß während die restliche Flüssigkeit inklusive der DNA in das 1.5 ml-Eppendorfgefäß zentrifugiert wird.

3.2.2 PCR-Amplifikation von Nukleinsäuren

Für die PCR wurden im wesentlichen zwei Polymerasen eingesetzt, die „Taq Long Plus“ von Stratagene und die „Ready-To-Go“ PCR-Beads von Pharmacia. Bei der Stratagene-Polymerase handelt es sich um eine Kombination aus *Taq*-Polymerase (aus *Thermus aquaticus*) und einer *Pfu*-Polymerase (aus *Pyrococcus furiosus*) die über eine „Proof-Reading“ Funktion verfügt. Aufgrund der Reinheit der Polymerase und der ausgezeichneten Qualität der PCR-Produkte wurde dieses Enzym für die Amplifikation mit eubakteriellen Primern, sowie für die Gewinnung von sequenzierfähigen Produkten eingesetzt.

Die PCR-Beads (Pharmacia) beinhalten neben der *Taq*-Polymerase bereits alle Bestandteile für die PCR (dNTP's, Puffer, „Enhancer“ wie BSA und Triton, MgCl₂) außer der Template-DNA und den Primern, und stellen damit ein in sich geschlossenes System zur einfachen PCR-Amplifikation selbst von schwierigen Templates mit hoher Ausbeute dar. Da die PCR-Beads durch das einbringen der PCR-Bestandteile in Zuckerkügelchen bei Raumtemperatur stabil sind, wurden Routine-PCR's und die Amplifikation von Produkten für die DGGE mit diesem Polymerase-System durchgeführt.

Generell wurden alle Polymeraseketten-Reaktionen als „Touchdown“-PCR durchgeführt, d.h. die Reaktion beginnt mit einer initiativen Denaturierung von 2 min bei 94 °C. Im nächsten Teilschritt wird der komplette Zyklus von Denaturierung, Annealing und Elongation durchgeführt, allerdings liegt die Annealing-Temperatur zunächst deutlich über der errechneten Schmelztemperatur der Primer. Durch ein schrittweises Absenken der Annealing-Temperatur in den Bereich der Bindungstemperatur der Primer (-1.0 °C pro Zyklus) werden im Verlauf der ersten Zyklen nur Produkte erhalten, die eine hohe Similarität ihrer Primer-Bereiche zu den eingesetzten Primern aufweisen. Dadurch wird die Spezifität erhöht und die Bildung unerwünschter Nebenprodukte minimiert. Im dritten Teil der Reaktion wird der Denaturierungs-Annealing-Elongations-Zyklus in einem niedrigeren Temperaturbereich durchgeführt, um eine hohe Ausbeute zu erzielen. Im letzten Schritt werden durch ein Annealing bei sehr tiefer Temperatur (40 °C) und eine lange Elongationsphase (5 min) eventuell abgebrochene Produkte aufgefüllt (finale Extension).

3.2.2.1 PCR-Amplifikation von Fragmenten aus genomischer DNA

Die PCR mit dem TaqPlus Long-System wird mit den folgenden Bestandteilen in einem Gesamtvolumen von 20 µl angesetzt: 2 µl 10*PCR-Puffer (im Lieferumfang der Polymerase), 125 µmol eines jeden Desoxyribonucleotid-Triphosphats (dNTP's, 125 µmol per µl), 0.5 Units der Polymerase (5.0 U per µl), 10 pmol von jedem Primer (10 pmol per µl), Template-DNA (10-100 ng) und DNA-freies Wasser ad 20 µl.

Die Reaktionen mit dem Pharmacia-System wird in einem Gesamtvolumen von 25 µl durchgeführt, wobei lediglich die Primer und das Template in der oben angeführten Konzentration zugegeben und auf das Endvolumen mit DNA-freiem Wasser aufgefüllt wird. Als Negativkontrolle aller PCR-Reaktionen dient ein unter gleichen Bedingungen mitgeführter Ansatz ohne Template-DNA. Die für die diversen Anwendungen eingesetzten PCR-Programme sind in Tabelle A1 im Anhang zusammengefaßt.

3.2.2.2 Reamplifikation von eluierten Produkten

Da eluierte DNA-Fragmente grundsätzlich mit Fremd-DNA kontaminiert sind (aus dem Gelmaterial, aus dem Puffer, Glaswolle etc.) wurde bei der Reamplifikation von Gel-eluierten Produkten besondere Vorsichtsmaßnahmen getroffen. Für die Reamplifikation ausgeschnittener DGGE-Banden wurde ein Primer entworfen, der am 3'-Ende der GC-Klammer bindet (siehe Tabelle 4.1), damit auf genomischer DNA keine komplementäre Sequenz besitzt und folglich bei entsprechend hoher Annealing-Temperatur nicht an Fremd-

DNA bindet. Auf diese Weise kann ausgeschlossen werden, daß DNA-Stücke, die keine GC-Klammer aufweisen, mitamplifiziert werden.

Die Reamplifikation von Fragmenten aus Agarosegelen, die z.T. keine GC-Klammer tragen, wurde weitestgehend vermieden, wenn keine hochspezifischen Primer eingesetzt werden konnten. Zusätzlich zu den Standard-Blindproben wurden Blindproben mitgeführt, in denen ein Stück Agarosegel ohne sichtbare DNA-Spuren ausgeschnitten, die Flüssigkeit eluiert und als Template in die Reaktion eingesetzt wurde.

3.2.2.3 RT-PCR

Für die RT-PCR wurden „Ready-To-Go“ RT-PCR-Beads von Pharmacia eingesetzt. Die RT-PCR-Beads enthalten neben der Taq-Polymerase zur Amplifikation des cDNA-Stranges eine reverse Transkriptase aus M-MuLV (Moloney Murin Leukämie Virus), sowie alle weiteren Bestandteile zur DNA-Amplifikation und die entsprechenden Puffer. Die Gesamtreaktion aus cDNA-Synthese und Amplifikation wird in einem Schritt durchgeführt. Zunächst gibt man die beiden PCR-Primer, den Erststrang-Primer (im Lieferumfang) und die gewünschte Menge Template-RNA in das Reaktionsgefäß, füllt mit DEPC-behandeltem Wasser auf 50µl auf und inkubiert zunächst 5 min bei Raumtemperatur. Anschließend wird zu jedem Gefäß 25µl Paraffin hinzugegeben und die Ansätze bei 42°C für 15-30 min inkubiert. In dieser Zeit wird der cDNA-Strang synthetisiert. Die reverse Transkriptase wird nun durch fünfminütige Behandlung bei 95°C deaktiviert, gleichzeitig wird das Template vollständig denaturiert. Die cDNA wird dann mit 32 Zyklen unter folgenden Bedingungen amplifiziert: 1 min bei 95°C (Denaturierung), 1 min bei 55°C (Annealing), 1 min bei 72°C (Elongation).

3.2.3 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung der PCR-Ansätze erfolgt mittels des QIAquick-Aufreinigungskits. Hierbei werden zu jedem der 20µl PCR-Ansätze 100µl des Puffers PB (im Lieferumfang) zugesetzt und vermischt. Für jeden zu reinigenden PCR-Ansatz wird eine Reinigungseinheit in ein 2.0ml Auffangröhrchen gestellt und mit dem gesamten Ansatz inkl. Paraffin (> 150µl) beladen. Die so vorbereiteten Einheiten werden in der Tischzentrifuge für 1 min bei maximaler Drehzahl zentrifugiert. Der Durchlauf wird verworfen. Nun werden 750µl Puffer PE (im Lieferumfang) auf die Säule gegeben und wie oben zentrifugiert. Der Durchlauf wird verworfen und zur Entfernung letzter Reste Waschpuffer erneut zentrifugiert. Anschließend wird die QIAquick Säule in ein neues 1.5 ml Eppendorfgefäß gestellt, mit 50µl DNA-freiem H₂O versetzt, 1 min inkubiert und dann durch Zentrifugation (1 min, 10000*g) die DNA

eluiert. Die eluierte DNA wird in ein steriles 0.5 ml Eppendorfgefäß überführt und sofort weiterverwendet oder bei -20°C gelagert.

3.2.4 Restriktion von PCR-Fragmenten

Die Restriktionen für die T-RFLP wurde mit dem Restriktionsenzym Dpn II durchgeführt, welches den Sequenzbereich ▼GATC als Rekognitionssequenz besitzt. Jeweils 5µl des QIAquick-aufgereinigten, mit einem Fluorescein-markierten und einem nicht-markierten Primer amplifizierten PCR-Fragments werden in einem 0.5 ml Eppendorfgefäß vorgelegt und mit 2µl 10* Dpn II-Puffer (100 mM NaCl, 50 mM Bis Tris-HCl [pH 6.0], 10 mM MgCl₂, 1 mM Dithiothreitol, im Lieferumfang) versetzt und mit DNA-freiem Wasser auf 19µl aufgefüllt. Der Reaktionsmix wird mit 15µl Paraffin überschichtet. Dann gibt man 1µl des Restriktionsenzym (5U) in den Deckel des Reaktionsgefäßes, zentrifugiert kurz und inkubiert 2h bei 37°C im PCR-Cycler. Anschließend wird das Enzym durch 20minütige Behandlung bei 65°C inaktiviert und der Reaktionsmix mit 8µl ALF Stop-and-loading-Buffer (96% Formamid, 10 mM EDTA [pH 9.5], 10 mM NaOH, 6 mg/ml Dextran Blau) versetzt. Von dem Gesamtansatz werden 50% (14µl) auf das denaturierende Gel aufgetragen.

3.2.5 Sequenzierreaktionen („Cycle-Sequencing“)

Für die Sequenzierungsreaktion wurde die Methode des Cycle-Sequencings angewendet, die in einer PCR-Reaktion nach Sanger (1977) zur Erzeugung von Abbruchfragmenten führt. Grundlage ist die oben beschriebene zyklische Amplifikation der Template-DNA. In der Sequenzierreaktion wurden neben den Desoxyribonucleotid-Triphosphaten (dNTP's) zusätzlich zu einem geringen Prozentsatz (1%) Di-Desoxyribonukleotid-Triphosphate (ddNTP's), die für einen Kettenabbruch bei der Reaktion sorgen und somit zu unterschiedlich langen Fragmenten führen, zugesetzt. Die Fragmente können elektrophoretisch nach ihrer Länge aufgetrennt und durch eine laseroptische Einrichtung detektiert werden. Für die elektrophoretische Auftrennung kamen zwei Geräte zum Einsatz, die auf unterschiedlichen Prinzipien beruhen: ein Gel-basiertes System (ALF, Pharmacia) und ein Kapillargerät (ABI 310, Perkin-Elmer). Die Cycle-Sequencing-Ansätze für beide Geräte unterscheiden sich dadurch, daß beim ALF Fluorescein-markierte Primer in vier getrennten Reaktionsansätzen eingesetzt werden, die auf dem Sequenziergel getrennt aufgetragen werden müssen, während beim ABI 310 die ddNTP's mit vier unterschiedlichen Farbstoffen markiert sind, die ein paralleles Auftragen aller vier Spuren auf eine Kapillare ermöglichen.

3.2.5.1 Sequenzierreaktion für den ALF

Für jede Reaktion wird pro Spur (A, C, G und T) ein farblich kodiertes Eppendorfgefäß mit 2.0µl des entsprechenden Terminationsmixes (im Lieferumfang des Sequenzierkits) und 15µl Paraffin befüllt und kühl gestellt. Dann wird ein „Mastermix“ hergestellt, der folgende Bestandteile enthält:

- 1µl Template
- 1µl Sequenzierprimer (1.5 pmol/µl)
- 2.5µl Sequenzierpuffer (SequiTherm Cycle-Sequencing-Kit)
- 1µl 10% Triton X 100
- 12µl steriles DNA-freies Wasser

Man gibt 1µl der SequiTherm DNA-Polymerase (Biozym) hinzu, mischt den Gesamtansatz mit einer Pipette intensiv und verteilt jeweils 4µl auf die farbigen Eppendorfgefäße. Der Reaktionsverlauf ist in Tabelle A1 im Anhang detailliert aufgeführt. Nach dem Ende der Reaktion wird der Reaktionsmix mit 6µl eines kombinierten Stop- und Auftragspuffers versetzt (ALF-Stop and loading buffer, siehe 3.2.4).

3.2.5.2 Sequenzierreaktion für den ABI 310

Für den ABI-Sequencer werden 5µl der Template-DNA mit 6µl 2.5*Sequenzierpuffer (200mM Tris-HCl [pH 9.0], 5mM MgCl₂) und 1µl des unmarkierten Sequenzierprimers (3.2pmol) in einem 0.5 ml Eppendorfgefäß vermischt. Mit DNA-freiem Wasser wird auf ein Volumen von 18µl aufgefüllt und der Reaktionsmix mit 15µl Paraffin überschichtet. Zuletzt werden 2µl des Terminationsmixes in den Deckel pipettiert, durch Zentrifugation mit dem Reaktionsmix vereinigt und in den PCR-Cycler gestellt. Das Cycle-Sequencing Programm ist in Tabelle A1 im Anhang detailliert dargestellt.

Nach Beendigung des Programms werden die erzeugten Fragmente durch Fällung aufgereinigt. Dazu überführt man den Reaktionsmix ohne das Paraffin in ein neues 0.5 ml Gefäß, gibt 80µl 80%igen Ethanol hinzu und fällt die DNA 15 min bei Raumtemperatur. Man zentrifugiert 20 min bei 14000*g (4°C) mit definierter Orientierung der Eppendorfgefäße. Der Überstand wird vorsichtig abpipettiert, dann wird 250µl 70%igen Ethanol hinzugegeben, sehr vorsichtig gemischt* und erneut 10 min bei 14000*g (4°C) zentrifugiert. Nach diesem Reinigungsschritt wird der Alkohol abgezogen und das Pellet ca. 1 min im Cycler bei 90°C getrocknet. Anschließend gibt man 25µl TSR-Puffer („Template suppressor reagent“, im

Lieferumfang des ABI-Kits) hinzu, erhitzt den Ansatz im Cycler 2min auf 95°C und überführt ihn für die Elektrophorese in ein vorbereitetes 0.5 ml Gefäß mit Septum.

Die 16S rDNA wurde mit den beiden Primern 5'-Start und 3'-1387 amplifiziert. Für die Cycle-Sequencing Reaktionen wurden die in der folgenden Tabelle aufgeführten Primer eingesetzt.

Tabelle 3.1: Name, Sequenz, Position und Schmelztemperatur der für Amplifikation und Sequenzierung verwendeten eubakteriellen 16S rDNA Primer

Primer	Sequenz ^a	Position ^b	T _m ^c
5'-Start	5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'	9-27	56.3°C
5'-341	5'-TAC GGG AGG CAG CAG-3'	341-356	52.1°C
3'-341	5'-CTG CTG CCT CCC GTA-3'	356-341-	52.1°C
5'-534	5'-CCA GCA GCC GCG GTA AT-3'	534-551	57.6°C
3'-534	5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3'	551-534	57.6°C
5'-907	5'-AAA CTC AAA GGA ATT GAC-3'	907-922	46.9°C
3'-907	5'-GTC AAT TCC TTT GAG TTT-3'	922-907	46.9°C
5'-1124	5'-TCC CGC AAC GAG CGC AAC CC-3'	1094-1114	71.0°C
3'-1124	5'-GGG TTG CGC TCG TTG CGG GA-3'	1114-1094	71.0°C
3'-1387	5'-CCG GGC GGT GTG TAC AAG G-3'	1387-1386	63.1°C

3.2.6 Elektrophoretische Methoden

Für die Kontrolle von DNA-Extraktionen und PCR-Amplifikationen wurden ausschließlich Agarosegele verwendet, während für analytische Zwecke (Sequenzierung, T-RFLP, DGGE etc.) Polyacrylamidgele in unterschiedlicher Ausführung eingesetzt wurden.

3.2.6.1 Agarosegele

Für Kontrollgele wird 1 g Agarose in einen Erlenmeyerkolben mit 100ml 1**TBE* versetzt (1%iges Gel), kurz aufgekocht, vollständig gelöst und dann gegossen. Das erkaltete Gel wird mit dem Gelträger in die Elektrophoresekammer gelegt und mit Laufpuffer (1**TBE*) überschichtet. Es werden 10-20% des Gesamtvolumens mit 1-2µl Farbmaler (Bromphenolblau) vermischt und aufgetragen. Ferner werden noch 5µl des vorbereiteten DNA-Standards (1µl DNA-Standard X, 1µl Farbmaler und 3µl dest. H₂O) auf einer freien Spur aufgetragen.

^a Die Bezeichnung der zweideutigen Nukleotide folgt der allgemeinen IUPAC-Nomenklatur

^b Die Position der Primer bezieht sich auf die 16S rDNA von *Escherichia coli*

^c Die Schmelztemperatur wurde thermodynamisch berechnet

Die Elektrophorese wird mit einer Spannung von 300V durchgeführt. Der Lauf wird beendet, wenn die Bromphenolblaufront ca. 1 cm vom Ende des Gels entfernt ist (ca. 20 min). Das Gel wird entnommen, 10 min mit Ethidiumbromid gefärbt (0.5 mg/l), kurz gewässert (10s) und mittels eines UV-Transilluminators betrachtet und dokumentiert.

3.2.6.2 DGGE-Gele

Die denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE) beruht auf einer Trennung verschiedener PCR-Fragmente nach ihrem Denaturierungsverhalten, welches sich aus der Basensequenz der Fragmente ergibt. In ein vertikales Acrylamidgel wird ein linearer Gradient denaturierender Agentien (Harnstoff und Formamid) eingebettet, der in Kombination mit einer Temperatur von 60°C dafür sorgt, daß die Fragmente im Verlauf der Elektrophorese in Abhängigkeit von der Basenzusammensetzung aufschmelzen und so in ihrer Mobilität eingeschränkt werden (Muyzer, 1995, Muyzer 1999 und die darin zitierte Literatur). Definitionsgemäß wird eine Lösung als 100%ig denaturierend angesehen, wenn sie 42 g Harnstoff und 40 ml Formamid enthält.

Für ein DGGE-Gel von 20*20cm werden zwei Platten entsprechender Größe zunächst mit SDS-Lösung und dann mit Ethanol gereinigt, getrocknet und mit 100µl Repel-Silan silanisiert. Die Platten wurden paßgenau, durch 1mm-Abstandshalter getrennt, aufeinandergelegt, verklammert und in den Gießstand eingesetzt.

Für ein Gel dieser Größe werden ca. 34 ml denaturierende Acrylamidlösung benötigt, so daß jeweils 18 ml der hoch- und der niedrig-denaturierenden Komponente angesetzt wird. Standardmäßig wurde in der vorliegenden Arbeit ein Doppelgradientengel gegossen, bei dem dem zugrundeliegenden Denaturierungsmittelgradienten (40-64 %) ein Acrylamidgradient in gleicher Orientierung (6-8 %) überlagert ist. Für ein solches Doppelgradientengel (DG-DGGE) sind folgende Lösungen notwendig:

A Niedrig-denaturierende Stammlösung (0% Denaturierungsmittel, 6% Acrylamid):

Acrylamid/Bis-Acrylamid 37.5:1	15 ml
50*TAE	1 ml
Aqua dest.	ad 100 ml

B Hoch-denaturierende Stammlösung (80% Denaturierungsmittel, 6% Acrylamid):

Acrylamid/Bis-Acrylamid 37.5:1	15 ml
Harnstoff	34 g
Formamid	32 ml
50*TAE	1 ml
Aqua dest.	ad 100 ml

C Niedrig-denaturierende Stammlösung (0% Denaturierungsmittel, 8% Acrylamid):

Acrylamid/Bis-Acrylamid 37.5:1	20 ml
50*TAE	1 ml
Aqua dest.	ad 100 ml

D Hoch-denaturierende Stammlösung (80% Denaturierungsmittel, 8% Acrylamid):

Acrylamid/Bis-Acrylamid 37.5:1	20 ml
Harnstoff	34 g
Formamid	32 ml
50*TAE	1 ml
Aqua dest.	ad 100 ml

Die Lösungen wurden filtriert, aber nicht entgast. Aus diesen vier Stammlösungen lassen sich beliebige Gradienten zwischen 0 und 80% Denaturierungsmittel und 6 bis 8% Acrylamid aus einer Mischung der Stammlösungen in definierten Verhältnissen herstellen. Für ein Standardgel von 40 bis 64% (6 – 8%) werden jeweils 9 ml der Lösungen A und B für die niedrig-denaturierende, sowie 3.6 ml von Lösung C und 14.4 ml von Lösung D für die hochdenaturierende Komponente gemischt.

Der lineare Gradient wird im Verlauf des Gießvorgangs durch einen Gradientenmischer aus zwei kommunizierenden Röhren erzeugt. Unmittelbar vor dem Gießen wird beiden Komponenten jeweils 6 μ l TEMED und 140 μ l 20%iges (w/v) APS zugegeben, kurz geschüttelt und die beiden zunächst voneinander getrennten Röhren des Gradientenmischer befüllt. Der Hahn zwischen beiden Kammern wird geöffnet und das Gel mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe gegossen. Am Ende des Gießvorgangs wird ein Kamm in den oberen Teil der Platten eingesetzt und das Gel bis zum Rand der Platten aufgefüllt; ein zusätzliches Sammelgel im oberen Teil des Gels wurde nicht gegossen. Nach ca. 2 Stunden ist die Polymerisation abgeschlossen.

Zur Temperaturanpassung wurde das Gel nach dem Reinigen der Geltaschen in die auf 60°C vorgeheizte und mit 0.5*TAE befüllte Laufkammer eingesetzt. Die PCR-Fragmente (22.5 µl) wurden mit jeweils 6 µl DGGE-Ladepuffer (siehe Anhang A8) versetzt und das Gel mit dem gesamten Reaktionsmix beschickt. Die Elektrophorese dauerte bei konstanter Stromstärke von 50 mA (100 V) 18 Stunden. Nach dem Ende des Laufs wurden die Platten voneinander getrennt, das Gel auf eine vorbereitete Kopierfolie transferiert und 30 min im Ethidiumbromidbad gefärbt. Nach einer weiteren halben Stunde im Entfärbebad (Aqua dest.) konnte das Gel im UV-Licht betrachtet und dokumentiert werden.

3.2.6.3 Elektrophorese der Sequenzieransätze

Die denaturierenden Polyacrylamidgele für die Auftrennung der Cycle-Sequencing Produkte auf dem ALF, sowie für die T-RFLP wurden in gleicher Weise hergestellt.

Zunächst werden die Glasplatten auf eine Schaumstoffunterlage gelegt und gründlich mit einer SDS-Lösung gewaschen, dann kurz mit Aqua dest. gespült und getrocknet. Die Spacer, der Quarzglas-Lichtkoppler und der Kamm werden in gleicher Weise gereinigt. Beide Platten werden auf ihren Innenseiten mit Ethanol entfettet und die obersten 2 cm der gravierten Glasplatte mit je ca. 100 µl Silanisierungslösung (200 µl Ethanol, 57 µl Aqua dest., 5.7 µl Eisessig, 0.9 µl Bind-Silan) silanisiert. Die Spacer und der Lichtkoppler werden auf der Thermostatisierplatte positioniert, und mit der zweiten Platte verklammert. Das Gel setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen:

25.2 g Harnstoff

30.0 ml 2.5*TBE

10.8 ml „Long Ranger“-Gellösung

Nach dem Mischen dieser Komponenten wird bis zur völligen Auflösung des Harnstoffs gerührt, mit Aqua dest. auf 60 ml aufgefüllt und die Lösung durch einen 0.8 µm-Filter filtriert. Die Lösung wird nicht entgast. Zur Polymerisation werden 34 µl TEMED und 160 µl 20% ige APS-Lösung hinzugegeben und vermischt. Die Gellösung wird in einer 60 ml Spritze ohne Kanüle aufgezogen und blasenfrei zwischen die horizontal positionierten Platten gegeben. Am Ende der Zugabe wird der Kamm ebenfalls blasenfrei an den Markierungen zwischen die Platten geschoben. Die Polymerisation ist nach etwa 2 h beendet. Als Laufpuffer wird 0.6*TBE verwendet. Die Elektrophorese wird bei 1200 V, 40 mA (Laserstärke 3 mW) mit einem auf 40°C temperierten Gel durchgeführt. Ein Sequenzierlauf dauert 600 min mit einem

Detektionsintervall von 2s. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte über die ALFwin-Auswertesoftware mit manueller Kontrolle der Rohdaten.

Die Auftrennung der Abbruchfragmente auf dem ABI-Kapillargerät erfolgt über das POP6-Polymer in einer 50µm-Kapillare von 66cm Länge. Ein Lauf dauert ca. 3h und wird unter Standardbedingungen mit 12.2kV, 4.5mA, 50°C und einer Laserstärke von 9mW durchgeführt. Die Datenauswertung erfolgt über das systemeigene Software-Paket, die manuelle Kontrolle über die Chromas-Software.

3.2.6.4 SSCP-Gele

Das Trennprinzip der SSCP („single strand conformation polymorphism“) beruht auf der Erzeugung von einzelsträngiger DNA, die in Verlauf einer nativen Polyacrylamidgelelektrophorese durch ihre unterschiedliche Konformation getrennt werden. Diese Konformation wird durch Sekundärstrukturelemente bedingt, die abhängig von der Sequenz des Einzelstrangs und damit Spezies-spezifisch sind. Durch die Amplifikation mit einem Fluorescein-markierten Primer konnten die Fragmente über eine Laser-Anregung detektiert werden. Die Elektrophorese wurde auf dem ALF-Sequencer durchgeführt. Das native Gel setzt sich aus 12.0ml MDE-Acrylamidlösung, 24ml 2.5*TBE und 23.6ml Aqua dest. zusammen, die Polymersiation wird mit 17µl TEMED und 170µl 20% igem APS (w/v) gestartet. Für die Denaturierung werden 1.5µl des Amplifikates mit 4.5µl Formamid, welches 0.01% (w/v) Dextran Blau enthält, 4min bei 95°C äquilibriert und anschließend sofort in ein Eiswasserbad gestellt. Nach einigen Minuten Abkühlzeit werden die Proben möglichst schnell aufgetragen. Die Laufbedingungen für ein SSCP-Gel sind: 1200V, 40mA und 35W bei 600min Laufzeit und 2s Aufzeichnungsintervall. Als Laufpuffer wird 1*TBE eingesetzt. Das Gel wird während der Elektrophorese auf 10°C gekühlt.

3.2.6.5 SDS-Proteingele

Für die SDS-Proteingele werden zuerst Proteinextrakte hergestellt. Zellen aus 10ml einer Bakterienkultur werden durch Zentrifugation bei 4°C, 5000*g, 10min geerntet, in 1ml SSC (siehe Anhang A8) resuspendiert und die Suspension in ein 2ml Eppendorfgefäß überführt. Anschließend wird 5min mit 10000*g (4°C) zentrifugiert, der Überstand verworfen, die Zellen in 20µl Auftragspuffer (siehe Anhang A8) gründlich resuspendiert und 10min im siedenden Wasserbad inkubiert. Die Extrakte werden bei -20°C bis zur Verwendung gelagert.

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgt in einem Vertikalelektrophorese-System nach Lämmli (1970). Um eine möglichst große Auflösung zu erreichen, wurde die SDS-PAGE in einem Biorad DCode-System mit einem Gel der Größe 20*20*0.05 cm durchgeführt. Zunächst wird das Trenngel bis ca. 2 cm unterhalb der Probestaschen gegossen. Dazu werden 6.0 ml Acrylamidlösung (Acrylamid:Bisacrylamid 37.5:1) mit 5.0 ml 1.5 M Tris-HCl [pH 8.8], 8.8 ml Aqua dest. und 0.1 ml 20% (w/v) SDS vermischt, entgast, mit 10.0 µl TEMED und 50 µl 20% (w/v) APS versetzt und das Gel gegossen. Nach einer Polymerisationszeit von 2 h wird die Lösung für das Sammelgel aus 0.6 ml Acrylamidlösung (37.5:1), 1.25 ml 0.5 M Tris-HCl [pH 6.8], 50 µl 20% (w/v) SDS und 3.1 ml Aqua dest. hergestellt und entgast. Nach Zugabe von 5 µl TEMED und 15 µl 20% (w/v) APS wird das Sammelgel gegossen und der Kamm eingesetzt. Das Sammelgel polymerisiert erneut zwei Stunden, dann wird der Kamm entfernt, das Gel in die Laufkammer eingesetzt und die Taschen mit Elektrophoresepuffer gespült. Der Elektrophoresepuffer wird 10-fach konzentriert angesetzt und für die Durchführung entsprechend verdünnt:

10*Elektrophoresepuffer:	0.25 M Tris
	1.92 M Glycin
	1.0% (w/v) SDS

Die Proteinextrakte (20 µl) werden mit 1 µl Auftragspuffer versetzt (4% (w/v) SDS, 10% (w/v) Glycerin, 0.002% (w/v) Bromphenolblau, 0.4% (v/v) 2-Mercaptoethanol, 100 mM Tris-HCl [pH 6.8]) und 10 min im siedenden Wasserbad inkubiert. Nach einem Vorlauf von 10 min bei 50 V (ca. 7 mA) wird das Gel beschickt. Die Auftrennung erfolgt bei zunächst 100 V (ca. 11 mA) für 45 min und dann bei 250 V (25 mA) für 240 min.

Das Gel wird auf eine vorbereitete Kopierfolie transferiert und 30 min lang mit Coomassie Blau R250 (0.2% (w/v) in 40% (v/v) Methanol / 10% (v/v) Essigsäure) gefärbt und anschließend mehrere Stunden in 40% (v/v) Methanol / 10% (v/v) Essigsäure entfärbt. Gefärbte Gele werden auf einen Leuchttisch betrachtet und digital und photographisch dokumentiert.

3.3 Dokumentation der Proben

Die Dokumentation der Gele erfolgte auf zwei Wegen. Für Standardanwendungen wurde das Agarose- oder DGGE-Gel nach dem Färben auf den UV-Transilluminator transferiert und mittels einer CCD-Kamera als Bestandteil des BioDoc II Systems von Biometra digital dokumentiert. Die Bilder wurden entweder über einen integrierten Thermosublimationsdrucker ausgedruckt oder als File in einem Bildbearbeitungsprogramm (Corel Photo Paint) geöffnet und von dort über einen Laserdrucker ausgedruckt.

Für Bilder höherer Auflösung wurde zusätzlich bei ausgewählten Gelen ein Polaroid-Foto mit einem Negativ-Polaroidfilm (Typ 667) aufgenommen.

3.4 Phylogenetische Berechnungen und Sequenzanalyse

Alle softwareseitig erstellten Sequenzen wurden zunächst manuell mit den Originaldaten abgeglichen und nachbearbeitet. Anschließend wurden die einzelnen Teilsequenzen desselben Gens mit DNASTAR oder mit CLUSTALW gegen eine vollständige Datenbanksequenz aligned und überlappende Bereiche auf doppeldeutige Nukleotide („ambiguity bases“) untersucht. Anschließend wurden die Teilsequenzen zu einer Gesamtsequenz zusammengefügt und erneut ein Alignment erstellt. Alle Sequenzen wurden dann mit Hilfe des FastA Programms mit der EMBL-Datenbank in Heidelberg verglichen um zu einer Identifizierung der unbekanntenen Isolate zu kommen. Mit den so bearbeiteten Daten wurden alle weitergehenden phylogenetische Berechnungen durchgeführt.

Die 16S rDNA-Sequenzen wurden in ARB importiert und einer Sekundärstrukturanalyse unterzogen. Für den Vergleich mit den narH-Sequenzen aus identischen Stämmen wurden phylogenetische Berechnungen mit DNADIST, DNAPARS und DNAML aus dem PHYLIP-Programmpaket durchgeführt. Den Programmen liegen verschiedene Rechenalgorithmen (distance, parsimony und maximum-likelihood) zugrunde, die sich als Näherungslösungen zu einem konsistenten Gesamtbild fügen sollten. Bootstrap-Analysen wurden mit 500 Wiederholungen (bei maximum-likelihood aufgrund des Rechenaufwandes nur 100 Wiederholungen) mittels des Programms PAUP durchgeführt.

Die Sequenzen der β -Untereinheit der respiratorischen Nitratreduktase (*narH*) wurden zunächst translatiert und im folgenden als vier korrespondierende Datensätze analysiert:

- als Aminosäuresequenz
- als Vollängen-Nukleotidsequenz,
- als eine auf die ersten beiden Kodon-Positionen reduzierte Nukleotidsequenz
- als Kodon-korrigierte Nukleotidsequenz, bei der jede Aminosäure durch genau ein Kodon repräsentiert ist

Alle *narH*-Nukleotidsequenzen wurden mit den gleichen Programmen analysiert wie die 16S rDNA-Sequenzen. Die Aminosäuresequenz wurde nach der Distance-Methode (PROTDIST) und der Parsimony-Methode (PROTPARS) aus dem PHYLIP-Programmpaket, sowie der maximum-likelihood-Methode (PROTML) aus MOLPHY 2.2 und PUZZLE 4.0 analysiert. Die Bootstrap-Analysen wurden mit PHYLIP, mit den Programmteilen SEQBOOT, PROTDIST bzw. PROTPARS, FITCH und CONSENSE durchgeführt. Die maximum-likelihood-Bootstraps wurden mit MOLPHY 2.2 berechnet.

Phylogenetische Bäume wurden mit Hilfe von DRAWGRAM/DRAWTREE aus PHYLIP und TREEVIEW erzeugt.

Kodon-Verwendungstabellen wurden mittels WWW-Interface berechnet:

<http://www.kazusa.or.jp/codon/countcodon.html>

Für weitere editorische Sequenzbearbeitungen wurde das Programm BBSEQ verwendet oder eigene Makros unter WORD 7.0 programmiert.

3.5 Mikrobiologische und physiologische Methoden

Dieser Teilbereich umfaßt die Arbeit mit Kulturen, das heißt die Anreicherung, Isolierung und physiologische Untersuchungen von Bakterien.

3.5.1 Isolierung und Anreicherung von Bakterien

Die in dieser Arbeit verwendeten Referenzstämme wurden von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) bezogen und nach Maßgabe der entsprechenden DMSZ-Medienrezepturen kultiviert. Weitere Stämme stellten die Kooperationspartner in Oldenburg zur Verfügung; diese wurden auf TSB 30- oder TSB 3-Agarplatten (5 mM Nitrat) kultiviert und sind in der nachfolgenden Tabelle 3.2 entsprechend ihrer Herkunft (OL) gekennzeichnet. Isolate mit der Stammbezeichnung „Ki“ stammen von einem Versuchsfeld der landwirtschaftlichen Fakultät der Universität Kiel und wurden von A. Lauer zur Verfügung gestellt. Der *Pseudomonas stutzeri* „Makran“ wurde aus dem Sediment des Makran-Beckens in Indischen Ozean von M. Drews isoliert. Der *Pseudomonas stutzeri*-Stamm BTH 922 wurde von A. Schneider aus dem Küstensediment von Bottsand (Kieler Bucht) isoliert, der Stamm *Paenibacillus* sp. A 234 stammt von S. Nissen (1999) und wurde aus Standortmaterial von Boknis Eck isoliert.

Alle anderen Isolate wurden im Rahmen dieser Arbeit kultiviert und stammen von den in Abschnitt 3.8 beschriebenen Standorten. Die folgende Tabelle 3.2 zeigt die exakte Beschreibung der Herkunft und die Angabe der Medien, auf denen die Isolate gewonnen wurden; aufgeführt sind die Isolate, die in die phylogenetischen Berechnungen oder die Entwicklung des Primer-Systems eingegangen sind. Die weiteren ca. 500 Isolate, die aus den kulturtechnischen Untersuchungen der Ostseestandorte hervorgegangen sind, wurden hier nicht einzeln spezifiziert. Die Identifikation aller obengenannten Isolate erfolgte über die Sequenzierung der 16S rDNA und/oder die Fettsäureanalyse (Tabellen 4.4).

Tabelle 3.2: Isolate und Referenzstämme der phylogenetischen Analyse

Stammbezeichnung	Herkunft	Identifikation	Medium
Referenzstämme			
<i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13 ^T	DSM	-	DSM 1
<i>Chlorobium limicola</i> DSM 249 ^T	DSM	-	DSM 29
<i>Chlorobium phaeovibrioides</i> DSM 269 ^T	DSM	-	DSM 29
<i>Flexibacter canadensis</i> DSM 3403	DSM	-	DSM 357
<i>Haloferax denitrificans</i> DSM 4425	DSM	16S rDNA	DSM 372
<i>Nitrobacter winogradsky</i> DSM 10237 ^T	DSM	-	DSM 756c
<i>Paracoccus denitrificans</i> DSM 2944 ^T	DSM	Fettsäureanalyse	DSM 356
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO	DSM	16S rDNA	- ^a
<i>Pseudomonas fluorescens</i> DSM 50090 ^T	DSM	Fettsäureanalyse	TSB 3
<i>Pseudomonas stutzeri</i> DSM 5190 ^T	DSM	16S rDNA	TSB 3
<i>Ralstonia eutropha</i> DSM 531 ^T	DSM	-	DSM 1
<i>Thiomicrospira denitrificans</i> DSM 1251 ^T	DSM	-	DSM 113
<i>Zoogloea ramigera</i> DSM 287 ^T	DSM	-	DSM 1
<i>Paenibacillus</i> sp. LO161	OL	16S rDNA / Fettsäureanalyse	TSB 30
<i>Paracoccus aminophilus</i> LO 182	OL	16S rDNA / Fettsäureanalyse	TSB 30
<i>Pseudomonas alcaligenes</i> DSM 50237 ^T	OL	16S rDNA	TSB 3
<i>Pseudomonas asplenii</i> DSM 50254	OL	-	TSB 30
<i>Pseudomonas stutzeri</i> LO 187	OL	16S rDNA / Fettsäureanalyse	TSB 30
Isolate			
<i>Bacillus mycoides</i> KB 1-1-4	Kieler Bucht	16S rDNA / Fettsäureanalyse	DSM 1
<i>Burkholderia</i> sp. KB 3-1-1	Kieler Bucht	16S rDNA / Fettsäureanalyse	DSM 1
<i>Carnobacterium</i> sp. KB 3-3-1	Kieler Bucht	16S rDNA / Fettsäureanalyse	TSB 3
<i>Erwinia</i> sp. KB 30-7	Kieler Bucht	16S rDNA / Fettsäureanalyse	TSB 30
<i>Kluyvera</i> sp. LL 152	LL 17	Fettsäureanalyse	LB
<i>Methylobacterium</i> sp. Bok 15-D-5	Boknis Eck	16S rDNA	D
<i>Methylobacterium</i> sp. Bok 3-8	Boknis Eck	16S rDNA	TSB 3
<i>Methylobacterium</i> sp. Bok 30-9	Boknis Eck	16S rDNA	TSB 30
<i>Pseudomonas</i> sp. KB 1-3-4	Kieler Bucht	16S rDNA / Fettsäureanalyse	TSB 3
<i>Pseudomonas</i> sp. AL 1L4	AL 93	16S rDNA / Fettsäureanalyse	LB
<i>Pseudomonas</i> sp. KB 1-3-1	Kieler Bucht	16S rDNA / Fettsäureanalyse	TSB 3
<i>Pseudomonas stutzeri</i> Bok 10-D-1	Boknis Eck	16S rDNA	D
<i>Pseudomonas stutzeri</i> Bok 25-30-1	Boknis Eck	16S rDNA	TSB 30
<i>Serratia proteamaculans</i> JML 182	JML	16S rDNA / Fettsäureanalyse	TSB 3
<i>Serratia</i> sp. KB 3-30-2	Kieler Bucht	16S rDNA / Fettsäureanalyse	TSB 30
<i>Shewanella</i> sp. KB 3-30-1	Kieler Bucht	16S rDNA / Fettsäureanalyse	TSB 30
<i>Shewanella</i> sp. Bok 1-30-2	Boknis Eck	16S rDNA	TSB 30
<i>Sphingomonas</i> sp. Bok 30-10	Boknis Eck	16S rDNA	TSB 30
<i>Sphingomonas</i> sp. Bok 20-3-6	Boknis Eck	16S rDNA	TSB 3
<i>Bacillus cereus</i> Ki 2l	A. Lauer	16S rDNA / Fettsäureanalyse	D
<i>Cytophaga</i> sp. Ki 4y	A. Lauer	16S rDNA / Fettsäureanalyse	D
<i>Paenibacillus</i> A 234	S. Nissen	16S rDNA / Fettsäureanalyse	TSB 3
<i>Paenibacillus</i> sp. Ki 586	A. Lauer	16S rDNA / Fettsäureanalyse	D
<i>Pseudomonas</i> sp. Ki 1z	A. Lauer	16S rDNA / Fettsäureanalyse	D
<i>Pseudomonas</i> sp. Ki 559	A. Lauer	16S rDNA / Fettsäureanalyse	D
<i>Pseudomonas</i> sp. Ki 723	A. Lauer	16S rDNA / Fettsäureanalyse	D
<i>Pseudomonas</i> sp. Ki 1w	A. Lauer	16S rDNA / Fettsäureanalyse	D
<i>Pseudomonas stutzeri</i> BTH 922	A. Schneider	16S rDNA / Fettsäureanalyse	TSB 30
<i>Pseudomonas stutzeri</i> „Makran“	M. Drews	16S rDNA / Fettsäureanalyse	TSB 30

^a *Pseudomonas aeruginosa* PAO wurde aufgrund seiner Pathogenität nicht kultiviert, sondern als DNA bezogen.

3.5.2 Medien und Anzuchtbedingungen

Für die Isolierung und Anreicherung nitratreduzierender Bakterien wurden verschiedene Medien ausgewählt, die nachstehend tabellarisch aufgeführt sind. Die Nitratlösung wurde als 1 M Kaliumnitrat-Stammlösung angesetzt, sterilfiltriert und den Medien nach dem Autoklavieren bis zu einer Endkonzentration von 20 mM Nitrat hinzugefügt. Sämtliche autoklavierbaren Medienbestandteile wurden bei 121 °C 20 min autoklaviert. Festmedien zur Isolierung und Kulturhaltung von Bakterien wurden mit 15 g Bacto-Agar pro Liter Medium versetzt. Bei der Anreicherung und Isolierung von Bakterien aus Standortmaterial wurden Medien eingesetzt, deren Salinität durch ein entsprechendes Mengenverhältnis von künstlichem Meerwasser „KM“ und Aqua dest. standortspezifisch eingestellt wurde. Die Anzucht erfolgte unter anaeroben Bedingungen bei einer Temperatur von 4 °C, um den am Standort vorherrschenden Bedingungen Rechnung zu tragen. Festmedien wurden dabei in Anaerobentöpfen unter Stickstoffatmosphäre inkubiert, Flüssigmedien für Anreicherungen wurden in 100 ml-Kulturflaschen vorgelegt, mit 1 cm³ Sediment inokuliert, mit Stickstoff begast und anschließend gasdicht verschlossen. Folgende Medien kamen im Verlauf der Arbeiten zum Einsatz:

- 1) Künstliches Meerwasser „KM“ (30 ‰): Die Komponenten des künstlichen Meerwassers wurden nacheinander in 1000 ml Aqua dest. gelöst und bei 120 °C 20 min autoklaviert. Für die Medien wurde die Salzkonzentration des künstlichen Meerwassers entsprechend der Salinität des Ostseewassers und in Abhängigkeit vom Probenahmestandort (7-20 ‰, siehe Abschnitt 3.8) mit Aqua dest verdünnt.

NaCl	16.8 g
MgCl ₂ *6 H ₂ O	3.6 g
MgSO ₄ *7 H ₂ O	4.2 g
KCl	0.6 g
CaCl ₂ *2H ₂ O	1.2g
KBr	0.06 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

- 2) Trypticase Soja Bouillon–Medium: Dieses Medium wurde in der Konzentration 3 g TSB/l („TSB3“) für Anreicherung und Isolierung von Bakterien eingesetzt. Für die Fettsäure-Analyse wurde als standardisiertes Medium ein TSB-Medium mit einer Konzentration von

30 g/l („**TSB30**“) eingesetzt, um Vergleiche mit den Einträgen der MIDI-Datenbank zu ermöglichen. Allen TSB-Medien wurde 1 ml/l der Spurenelemente-Lösung SL6 zugefügt.

3) Denitrifikanten-Medium „**D**“ (Bach 1996)

Glycerin	1.0 g
Glucose	1.0 g
Tri-Natriumcitrat	1.0 g
Hefeextrakt	1.0 g
Pepton (Casein)	5.0 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

4) ZoBell-Medium „**DSM 1**“

Peptone	5.0 g
Fleischextrakt	3.0 g
Aqua dest.	1000 ml
	pH 7.0

5) LB-Medium „**LB**“

NaCl	10.0 g
Hefeextrakt	5.0 g
Bactotrypton	10.0 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

6) Medium für Kulturversuch mit *Pseudomonas stutzeri* DSM 5190^T (siehe 3.2.3)

A:	MgCl ₂ *6 H ₂ O	0.1 g/l
	CaCl ₂ *2H ₂ O	0.1 g/l
B:	Natriumacetat	10 mM
C:	Kaliumnitrat	5 mM
D:	K ₂ HPO ₄	0.8 g/l
	KH ₂ PO ₄	0.15 g/l
E:	Vitaminlsg. VA mit Vitamin B ₁₂ , sterilfiltriert	1 ml/l
F:	TET 2 Spurenelemente-Lsg.	1 ml/l

7) Vitaminlösung VA: Die Komponenten der Vitamin-Stammlösung VA wurden nacheinander in 100ml MilliQ-Wasser gelöst und sterilfiltriert. Die Konzentration von Vitamin B₁₂ wurde im Vergleich zum Originalrezept (Imhoff & Trüper1977) von 5 auf 20mg erhöht.

Biotin	10 mg
Niacin	35 mg
Thiamindichlorid	30 mg
p-Aminobenzoesäure	20 mg
Pyridoxoliumhydrochlorid	10 mg
Calciumpanthothenat	10 mg
Vitamin B ₁₂	20 mg

8) Spurenelemente-Lösung SL 6 (Pfennig 1972)

ZnSO ₄ *7 H ₂ O	0.1 g
MnCl ₂ *4 H ₂ O	0.03 g
H ₃ BO ₃	0.3 g
CoCl ₂ *6 H ₂ O	0.2 g
CuCl ₂ *6 H ₂ O	0.01 g
NiCl ₂ *6 H ₂ O	0.02 g
Na ₂ MoO ₄ *2 H ₂ O	0.03 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

9) Spurenelemente-Lösung TET 2 (Podgorsek 1998)

EDTA	50.0 g
ZnCl ₂	0.4 g
MnCl ₂ *4 H ₂ O	3.0 g
FeCl ₂ *4 H ₂ O	4.0g
FeCl ₃ *6 H ₂ O	10.0 g
Na ₂ MoO ₄ *2 H ₂ O	0.4 g
CuCl ₂ *2 H ₂ O	0.04 g
CoCl ₂ *6 H ₂ O	0.24 g
H ₃ BO ₃	0.4 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

3.5.3 Wachstumsversuche

Der Wachstumsversuch mit *Pseudomonas stutzeri* DSM 5190^T wurde in einem 5l-Fermenter durchgeführt. 4l des oben angeführten Mediums 5 wurden im Fermenter autoklaviert, mit einer flüssigen Vorkultur ($OD_{588} = 0.3$) beimpft und zunächst zur Initiierung des Wachstums 4h aerob bei 37°C, unter steriler Einleitung von künstlicher Luft inkubiert. Nach dieser Zeit wurde die Kultur ein Stunde lang mit Stickstoff begast, um anaerobe Verhältnisse zu erzeugen. Zum Zeitpunkt T_0 wurde über einen Tropftrichter soviel sterile 1 M KNO_3 -Lösung zugetropft, bis die Endkonzentration von 5 mM erreicht war. Anschließend wurde im Abstand von 10 Minuten ca. 30ml der Kultur steril entnommen und für Proteinextraktion, Zellzählungen, RNA-Extraktion, OD-, pH- und Nährstoffmessungen bearbeitet oder eingefroren. Nach einer Stunde wurde die Probenahmefrequenz auf eine stündliche Entnahme reduziert. Nach ca. 24h lagen die Konzentrationen oxidierter Stickstoffkomponenten in den Nährstoffprofilen unterhalb der Nachweisgrenze und der Versuch wurde beendet.

Die optische Dichte wurde im Versuchsverlauf ständig gegen einen Blindwert mit unbeimpftem Medium photometrisch bei 588 nm kontrolliert, der pH-Wert wurde direkt nach der Entnahme bestimmt. Die Nährstoffkonzentrationen wurden am folgenden Tag gemessen, alle Proben wurden direkt nach der Entnahme bis zur Lagerfähigkeit bei -20°C weiterverarbeitet. Die Einzelheiten der Probenbehandlung sind in späteren Abschnitten dargelegt.

Die Gesamtbakterienzahl wurde als Wachstumsparameter aufgenommen und mit Hilfe der Epifluoreszenz-Mikroskopie bestimmt. Alle Proben wurden im Verhältnis 1:20 verdünnt und jeweils 1 ml davon durch 0.2µm Cellulosenitratfilter filtriert. Anschließend wurde mit 1 ml Acridinorange-Lösung gefärbt und der Filter ausgezählt. Zudem wurde aus diesen Proben das mittlere Zellvolumen, die mittlere Biomasse und das mittlere Gesamtgewicht der Zellen sowie die Zahl der sich teilenden Zellen bestimmt.

3.5.4 Lebendzellzahlen nitratreduzierender Bakterien

Aus definierten Tiefenbereichen wurden in doppelten Ansätzen 0.5 cm³ Sediment in 4.5 ml künstliches Meerwasser entsprechender Salinität überführt, sorgfältig homogenisiert und in Dezimalschritten bis auf 10⁻⁷ verdünnt. Jeweils 0.1 ml aus 3-5 Verdünnungsstufen wurden auf Agarplatten mit speziellem Nährmedium ausplattiert. Nitratreduzierende Bakterien wurden 7-14 Tage auf TSB-Agar (3 g/l, 20 mM Nitrat) dunkel und anaerob (unter N₂-Athmosphäre) inkubiert. Die Inkubationstemperatur betrug 4°C. Nach der Inkubation wurden die Agarplatten mit Zellzahlen zwischen 20 und 200 Bakterien ausgezählt.

3.6 Fettsäureanalyse

Für die Identifizierung und Klassifizierung von eigenen Isolaten wurde neben der Sequenzierung der 16S rDNA die Analyse der Fettsäuremuster der Bakterien herangezogen. Die Fettsäureprofile unbekannter Isolate werden einer Similaritätsanalyse mit der zur Verfügung stehenden Standardfettsäurebibliothek unterzogen und auf diese Weise taxonomisch eingeordnet.

Die Bakterien wurden zunächst auf Agarplatten unter Standardbedingungen (30 g TSB/l, 15 g Agar/l, 24 h Inkubation bei 28°C, Reinigungsausstrich 4 Quadranten) kultiviert. 40 mg der Zellen wurden in ein Pyrex-Röhrchen abgeerntet, mit 1 ml Reagenz 1 (40.5 g NaOH in 135 ml Methanol/135 ml Aqua dest.) versetzt und kräftig gewirbelt. Die Suspension wurde 5 min im siedenden Wasserbad erhitzt, erneut geschüttelt und weitere 25 min gekocht. Anschließend wurden die Röhrchen im Wasserbad abgekühlt, mit 2 ml Reagenz 2 (146.25 ml 6N HCl in 123.75 ml Methanol) versetzt und 10 min bei 80°C inkubiert. Nach dem erneuten Abkühlen im Wasserbad wurde 1.5 ml Reagenz 3 (Hexan/tert-Butylether 1:1) hinzugefügt, 10 min im Überkopf-Schüttler geschüttelt und 3 min bei 4500 rpm zentrifugiert. Die wäßrige Unterphase wurde verworfen, die organische Phase wurde mit 3 ml Reagenz 4 (6.48 g NaOH in 540 ml Aqua dest.) und 0.4 ml 30% (w/v) NaCl versetzt und erneut 5 min geschüttelt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt von 5 min (4500 rpm) wurde ca. 2/3 der organischen Phase entnommen und in vorbereitete Probenröhrchen mit Septum überführt und durch einen Stickstoffstrom auf ein Probenvolumen von 300 µl aufkonzentriert.

Die Analyse der Fettsäuremethylester erfolgte über einen HP5890 (II) Gaschromatographen mit Flammenionisationsdetektion unter Verwendung einer 5%-Phenyl-Methylsiliconkapillarsäule (25 m), H₂ als Trägergas und H₂/synthetische Luft als Brenngase. Die gesamte Prozeßsteuerung erfolgte über das Microbial Identification System (MIS).

3.7 Nährstoffanalysen

Die für nitratreduzierende und denitrifizierende Bakterien wesentlichen chemischen Standortparameter (NO_3^- -, NO_2^- -, NH_4^+ -, Acetat- und PO_4^{3-} -Konzentrationen) wurden aus dem zentrifugierten Porenwasser (5000*g, 4°C, 10 min) der Sedimentkerne bestimmt.

3.7.1 Ionenchromatographische Analysen

Das Porenwasser wurde mit 0.2µm Celluloseacetatfiltern sterilfiltriert und bis zur ionenchromatographischen Analyse (HPLC-Gerät: Dionex DX 300) tiefgefroren. Vor der Messung wurde das Porenwasser mit suprareinem Wasser (MilliQ) 1:20 verdünnt, um eine Überlagerung der Nitrit- und Nitratpeaks aufgrund der hohen Chloridionen-Beladung zu unterbinden. Nitrat, Nitrit, Acetat und Phosphat wurden in einer Anionenaustauschersäule (Dionex Ionpack-AS4A, 250/4 mm, Vorsäule: AG4A) mit einer Flußrate von 2ml/min separiert und über einen UV- und einen PED-Detektor detektiert. Als Eluenten wurden zwei heliumbegaste Lösungen mit 1.7mM NaHCO_3 / 1.8mM Na_2CO_3 (Eluent 1) und 17mM NaHCO_3 / 18mM Na_2CO_3 (Eluent 2) in MilliQ-Wasser eingesetzt.

3.7.2 Bestimmung von Ammonium

Die Ammoniumkonzentrationen wurden photometrisch nach Koroleff (1983) bestimmt. Dazu wurden folgende Reagentien angesetzt:

1) Phenolreagenz: 8 g Phenol wurden in 30 ml Ethanol gelöst, 60 mg Dinatriumnitroprussid wurden in 10 ml MilliQ-Wasser gelöst. Beide Lösungen wurden vereinigt und auf ein Volumen von 100 ml mit MilliQ-Wasser aufgefüllt.

2) Citratreagenz: 24 g tri-Natriumcitrat wurden in 50 ml MilliQ gelöst und mit 1 ml NaOH (1M) versetzt. Die Lösung wurde zur Entfernung eventuell vorhandenen Ammoniums aufgeköcht und bis zur Verwendung wieder abgekühlt.

3) Hypochlorit-Reagenz: 0.5 g Trion (Dichlor-s-triazin-2,4,6(1H,3H,5H)-trion) wurden in 100 ml einer 1 M NaOH-Lösung gelöst, die vorher durch Verdünnung mit MilliQ auf einen pH-Wert von 11 eingestellt wurde (ca. 0.8M).

Zur Bestimmung des Ammoniumgehaltes im Porenwasser wurde 1 ml der Probe mit 40µl Phenolreagenz, 20µl Citratreagenz und 40µl Hypochloritreagenz versetzt und zunächst 30 min bei 37°C inkubiert. Nach einer weiteren halbe Stunde Inkubationszeit bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde die Extinktion bei 630nm gegen MilliQ gemessen und die Konzentration nach einer Blindwert-Korrektur über entsprechende Eichkurven bestimmt.

3.8 Probenahmestandorte

Mit Ausnahme von zwei Standorten befinden sich alle Stationen, die im Rahmen dieser Arbeit beprobt wurden, an geographischen Positionen, die im Zuge der HELCOM-Vereinbarungen als internationale Probenahmestellen festgelegt wurden. Die beiden Ausnahmen betreffen die Stationen AL 93 im Gotlandbecken, die seit Jahren ein fester Probenahmestandort des Instituts für Meereskunde ist, sowie die Station Boknis Eck, die im Verlauf der Jahre 1997 und 1998 als Teil langfristiger Monitoring-Projekte in der Kieler Bucht monatlich beprobt wurde.

Die Stationen der Gotlandsee, des finnischen Meerbusens und der Kieler Bucht wurden im Rahmen einer Ausfahrt mit FS „Heincke“ vom 05.10. bis 20.10.1998 beprobt.

An allen Standorten wurden die gleichen Nährstoffprofile und die gleichen physikalischen Parameter gemessen. Die Werte wurden sowohl im Überstandswasser, wie auch im Sediment bis zu einer Tiefe von 6 cm gemessen.

Als Standorte für die Populationsanalysen wurden drei Zonen der Ostsee ausgewählt (westliche Ostsee, Gotlandsee und finnischer Meerbusen), die durch jeweils zwei Einzelstandorte repräsentiert sind. Vier weitere Standorte, die im Rahmen der Heincke-Fahrt angelaufen wurden, wurden nicht in die genetische Analyse der Standortgemeinschaft miteinbezogen und sind in der folgenden Tabelle 3.3 mit einem (*) gekennzeichnet:

Station	Seegebiet	Position
Boknis Eck	Eckernförder Bucht	55° 00' 01" N, 13° 18' 10" E
Kieler Bucht	Kieler Bucht	54° 36' 41" N, 10° 27' 08" E
BY 1B*	Bornholmbecken	55° 00' 01" N, 13° 18' 10" E
BY 4B*	Arkonabecken	55° 22' 01" N, 15° 20' 15" E
AL 93	Gotlandbecken	57° 18' 61" N, 20° 06' 92" E
BY 15*	Gotlandbecken	57° 19' 95" N, 20° 03' 05" E
F 80	Farø-Tief	57° 59' 95" N, 19° 53' 75" E
LL 17*	Nördliche Gotlandsee	59° 02' 07" N, 21° 05' 16" E
JML	Finnischer Meerbusen	59° 35' 22" N, 23° 37' 94" E
GF 2	Finnischer Meerbusen	59° 50' 29" N, 25° 51' 67" E

Tabelle 3.3: Name, Seegebiet und Position der Probenahmestandorte

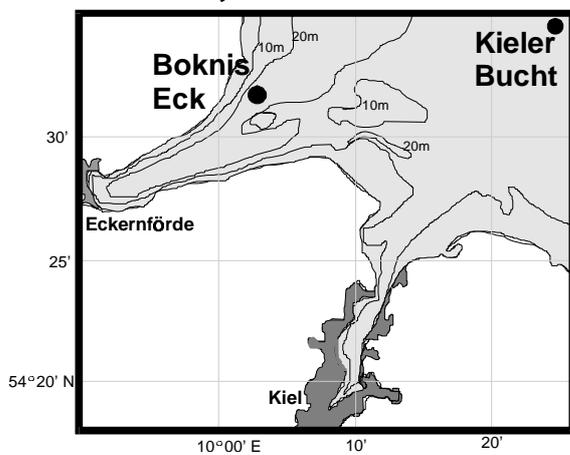
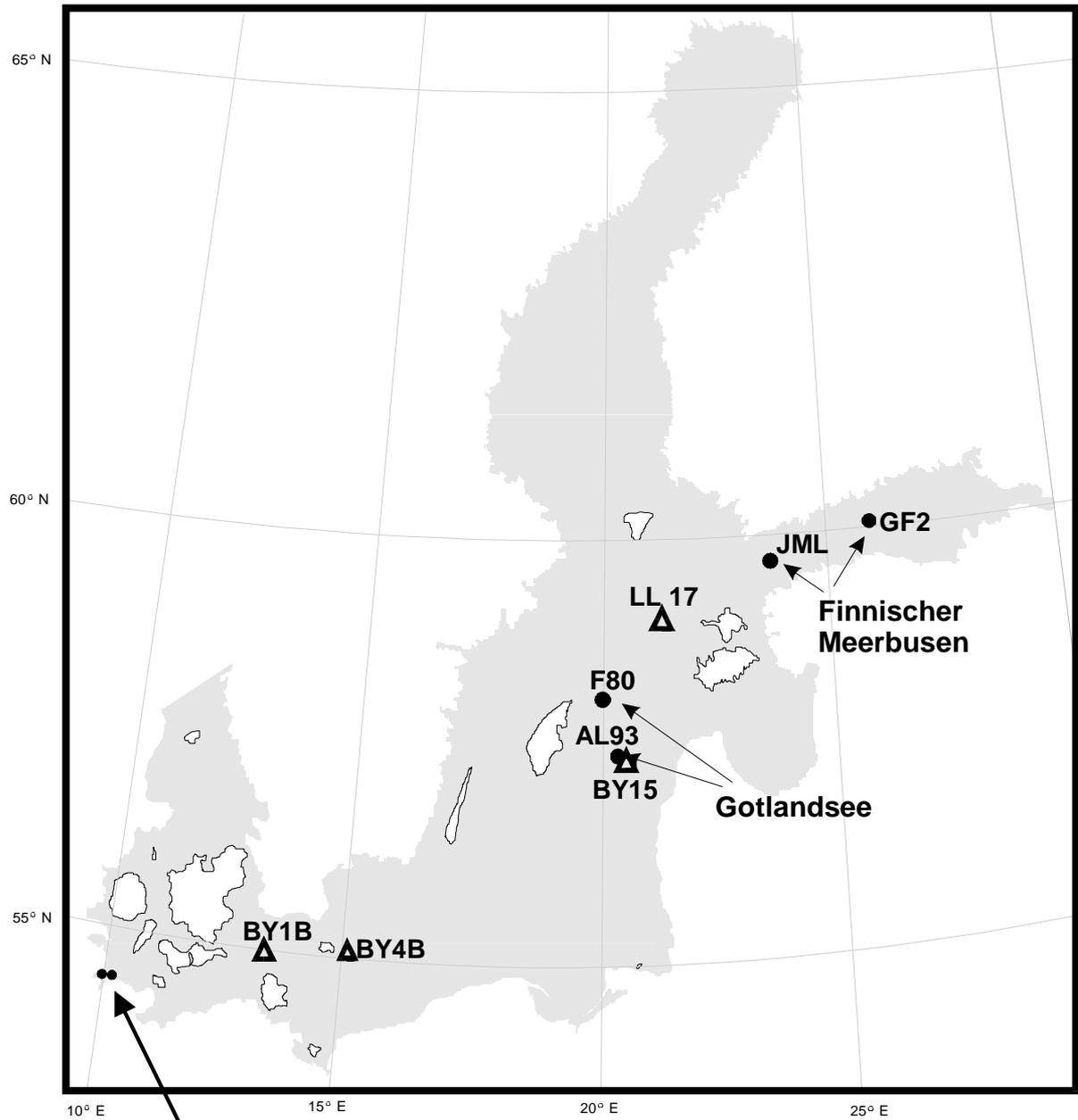


Abbildung 3.1:

Kartographische Darstellung der Ostsee mit der Angabe der Probenahmestationen für die genetischen Analysen (●) und die zusätzlichen Stationen (Δ). Die Stationen der westlichen Ostsee (Kieler Bucht und Boknis Eck) sind in der Ausschnittskarte dargestellt.

3.9 Bearbeitung von Umweltproben

Alle Sedimentkerne wurden mittels eines Zwillingsstechrohres („Gemini-Corer“) gewonnen. Einer der beiden Kerne wurde als Referenzkern für die Messung physikalischer und chemischer Parameter eingesetzt, der andere Kern wurde für die Anreicherung und Isolierung von Bakterien, die Gewinnung von Porenwasser und die Probenahme für die DNA-Extraktion verwendet.

Der Referenzkern wurde sofort nach dem Hieven in die Entnahmevorrichtung eingespannt und durch vorsichtigen Druck von unten her aus dem Rohr gedrückt, bis die obere Kante des Stechrohres erreicht war. Mit Hilfe von Arretiereinrichtungen wurden nacheinander das Redox-Profil und das pH-Profil aufgezeichnet und der Kern anschließend verworfen. Der zweite Kern wurde direkt im Anschluß bearbeitet und bis zu diesem Zeitpunkt bei 4 °C gelagert. Zunächst wurde der Kern eingespannt, das Überstandswasser abgezogen, das Sediment aus dem Rohr gedrückt und dann in 1 cm-Sedimentscheiben geschnitten. Aus diesen Sedimentabschnitten wurden zuerst Proben für die Bakterienkulturen entnommen und diese mit dem Probenmaterial beimpft. Anschließend wurden 10 cm³ Sediment in Polypropylen-Röhrchen zur Gewinnung von Porenwasser für die Nährstoffanalysen zentrifugiert und Proben für die DNA-Extraktion abgefüllt. Auf diese Weise konnte die Zeit zwischen Probenahme und den weiteren Schritten minimiert werden.

4. Ergebnisse

Der Ergebnisteil ist in die Bereiche methodische Weiterentwicklungen, phylogenetische Betrachtungen auf der Basis funktioneller und ribosomaler Gene, die Analyse nitratreduzierender Standortgemeinschaften und die Ergebnisse der physiologischen Untersuchungen eingeteilt.

4.1 Methodische Entwicklungen

Bei der Bearbeitung des Themas der vorliegenden Arbeit wurden zunächst neue Techniken entwickelt und bereits bestehende Techniken etabliert und weiterentwickelt. Diese Vorgehensweise entstand aus der Problematik, die zugrundeliegende Fragestellung nicht mit den bisher bekannten Methoden beantworten zu können. In erster Linie handelt es sich dabei um die Verbesserung der denaturierenden Gradientengelelektrophorese (DGGE) hinsichtlich der Trennleistung der Gele und die Methode der T-RFLP, die zeitgleich in einer weiteren Arbeitsgruppe (Liu et al. 1997) entwickelt wurde.

4.1.1 Entwicklung von PCR-Primern

Bei der Entwicklung von Primern für die Amplifikation funktioneller Gene sind eine Reihe von Faktoren zu berücksichtigen, die für das Design von Primern für ribosomale Gene oder untranslatierte Bereiche nicht zum Tragen kommen. Wesentlich ist hierbei die Berücksichtigung der kodierenden Funktion der Nukleotidsequenzen. Daher ist für eine erfolgreiche Primer-Suche zunächst eine ausführliche Analyse der Sekundär-/Tertiärstruktur des Proteins auf der Basis der Aminosäuresequenz notwendig. Primer für funktionelle Gene sind nur dann universell, wenn sie in Bereichen greifen, die sowohl auf Nukleotid- wie auf Proteinebene konserviert sind. Das trifft bei den meisten funktionellen Genen für nur wenige Sequenzbereiche zu. Im allgemeinen handelt es sich dabei um das funktionelle Zentrum und Bereiche, die für die Sekundär-, Tertiär- oder Quartärstruktur des Proteins von Bedeutung sind. Daher sollte jeder Primer-Suche eine intensive Analyse aller verfügbarer Informationen über die verschiedenen Strukturebenen des Proteins vorausgehen.

Über die respiratorische, membrangebundene Nitratreduktase war vor Beginn der Arbeiten wenig bekannt. Lediglich vier Sequenzen waren in der EMBL-Datenbank verfügbar, von denen zwei demselben Organismus entstammten (*Escherichia coli*, Stamm TG1). Tertiärstrukturen aus der Proteinkristallographie sind bisher nicht bekannt, obwohl das Interesse an diesem Protein sehr groß ist und Versuche in dieser Richtung bereits angelaufen

sind. Für die β -Untereinheit (*narH*) ist ein System aus vier Eisen-Schwefel-Clustern als prosthetische Gruppe identifiziert worden, die durch vier Cystein-Bindemotive im funktionellen Protein fixiert wird. In der Sequenz der α -Untereinheit sind fünf Consensus-Sequenzen homologer Molybdoproteine bekannt. Die einzelnen Aminosäuren dieser Sequenzbereiche sind jedoch nicht benachbart und weisen zudem eine signifikante Variabilität auf (Blasco et al. 1990). Daher wurde *narH* als Ziel der genetischen Untersuchungen ausgewählt. In der folgenden Sequenz des *narH*-Gens von *Escherichia coli* TG1 (Abbildung 4.1) sind die vier Cystein-Bindestellen, sowie die späteren Primer-Bindestellen dargestellt, die Primer-Bindestellen sind mit den entsprechenden **Namen** bezeichnet.

Eine Similaritätsanalyse (Alignment) der vorhandenen Primärsequenzen zeigte auf, daß die funktionellen Cysteine (und das Tryptophan in der dritten Bindungseinheit) hochkonserviert sind, daß jedoch mit Ausnahme der ersten FeS-Bindestelle die intermediären Aminosäuren zwischen diesen Cysteinen eine große Variabilität aufweisen. Damit ließen sich diese funktionellen Bereiche nicht als Primer-Bindestellen nutzen. Eine ausführliche Sekundärstrukturanalyse eröffnete jedoch weitere Möglichkeiten, die schließlich erfolgreich für das Primer-Design und die Amplifikation genutzt werden konnten. Vier der fünf Primer-Bindestellen außerhalb der funktionellen Cystein-Motive (*narH170*, *narH300*, *narH430* und *narH1040B*) zeichnen sich durch einen hohen Gehalt an sauren Aminosäuren (Asparaginsäure D, Glutaminsäure E, Tyrosin Y) aus, denen in der Faltung des Proteins eine entscheidende Rolle durch die Ausbildung von Salzbrücken zukommen könnte. An drei dieser Primer-Bindestellen ist jeweils ein Prolin lokalisiert, welches ein wichtiges Strukturelement α -helikaler Bereiche ist. So ist die Bindestelle des Primers *narH430* Bestandteil eines sogenannten „Helix-Turn-Helix“-Bereiches; innerhalb dieser Struktursysteme kommt dem Prolin die Funktion eines „Helixbrechers“ zur Umkehrung der helikalen Fortsetzungsrichtung zu. Aus diesen strukturellen Bedingungen erklärt sich der hohe Konservierungsgrad der gewählten Sequenzbereiche. Abbildung 4.1 zeigt neben der Aminosäure- und der Nukleotidsequenz die entsprechenden Bereiche der Sekundärstruktur: die rot markierten Aminosäuren liegen innerhalb von α -Helices, die blau markierten Aminosäuren stellen Helixbrecher („Turns“) dar und die grün markierten Aminosäuren sind Bestandteile von β -Faltblattstrukturen.

narH-Gensequenz von *Escherichia coli* TG 1



 ATGAAAATTCGTTCCACAAGTCGGCATGGTGCTGAATCTCGATAAGTGCATCGGCTGCCACACCTGTTTCAGTTACCTGTAAA

 M K I R S Q V G M V L N L D K C I G C H T C S V T C K

narH50F

 AACGTCTGGACCAGCCGTGAAGGCGTGAATATGCGTGGTTCAACAACCTGGAAACCAAGCCGGGCCAGGGCTTCCCGACT

 N V W T S R E G V E Y A W F N N V E T K P G Q G F P T

 GACTGGGAAAACAGGAAAATACAAAGGCGGCTGGATCCGTAATAACACGGCAAACGCAGCCGCGCATGGGTAACCGT

 D W E N Q E K Y K G G **W I R K I N G K L Q P R M G N R**

 GCCATGCTGCTGGGTAATAATCTTCGCTAACCCGCATCTGCCGGGGATC**GACGATTATTACGAGCC**GTTTCGATTTTGACTAT

A M L L G K I F A N P H L P G I D D Y Y E P F D F D Y

narH300

 CAGAACCTGCATACCGCGCCGAAGGCAGCAAATCGCAGCCGATTGCCCGTCCCGGTTGCTGATTACCGGGAACGGATG

 Q N L H T A P E G S K S Q P I A R P R S L I T **G E R M**

 GCGAAAATCGAAAA**GGGCCGAACGGGAAG**ATGACCTGGGCGGTGAGTTTGACAAACTGGCGAAAGACAAGAACTTCGAC

A K I E K G P N W E D D L G G E F D K L A K D K N F D

narH430

 AACATCCAGAAGGCGATGTATAGCCAGTTCGAAAACACCTTCATGATGTATTTGCCGCGCCTGTGCGAACACTGCCTGAAC

N I Q K A M Y S Q F E N T F M M Y L P R L C E H C L N

 CCGGCATGTGTGGCGACCTGCCCGAGC**GGTGCATTTACAAGC**TGAAGAAGATGGCATCGTCTGATCGACCAGGATAAA

P A C V A T C P S G A I Y K R E E D G I V L I D Q D K

narH590

 TGCCGTGGCTGGCGTATGTGCATCACTGGATGCCCGTACAAAAAATCTACTTCAACTGGAAGAGCGGTAAGTCTGAGAAG

C R G W R M C I T G C P Y **K K I Y F N W K S G K S E K**

 TGCATCTTCTGCTATCCGCGTATTGAAGCGGGTCAGCCGACCGTGTGCTCAGAAACCTGTGTCGGTCTATCCGTTATCTT

C I F C Y P R I E A G Q P T V C S E T C V G R I R Y L

 GCGTGTCTGTTGTACGATGCCGACGCTATTGAACGTGCAGCCAGCACCAGAGAACGAGAAAGATCTTTACCAGCGTCAGCTG

G V L L Y D A D A I E R A A S T E N E K D L Y Q R Q L

 GACGTGTTCTCGATCCGAAACGATCCGAAAGTCATCGAGCAGCGATTAAAGACGGTATTCGGCTGAGCGTTATTGAAGCC

 D V F L D P N D P **K V I E Q A I K D G I P L S V I E A**

 GCACAGCAGTCGCCGTTTATAAAATGGCAATGGAATGAAAACCTGGCGTGCAT**CCGGAATATCGCAC**ACTGCCG

 A Q Q S P V Y **K M A M E W K L A L P L H P E Y R T L P**

narH1040B

 ATGGTCTGGTACGTGCCGCTCTGTCTCCGATTTCAGTCTGCAGCAGACGCGGGTGAGCTGGGTAGCAACGGCATTCTGCCA

 M V W Y V P P L S P I Q S A A D A G E L G S N G I L P

 GACGTCGAAAGCCTGCGTATTCCGGTACAGTATCTGGCGAATCTGCTGACCGCCGGTGATACCAAACCGTACTGCGCGCA

 D V E S L R I P **V Q Y L A N L L T A G D T K P V L R A**

 CTGAAACGTATGCTGGCGATGCGTCATTACAAACGTGCTGAAACCGTTGACGGTAAAGTTGATACCCGTGCGCTGGAAGAG

L K R M L A M R H Y K R A E T V D G K V D T R A L E E

 GTCGGTCTGACCGAAGCCAGGCACAGGAGATGTACCGTTATCTGGCGATTGCTAACTACGAAGATCGCTTTGTTGGTGCCG

V G L T E A Q A Q E M Y R Y L A I A N Y E D R F V V P

 AGTAGTCATCGTGAACCTGGCACGGGAAGCCTTCCCGGAGAAAAATGGCTGCGGCTTTACCTTTGGTGATGGCTGCCACGGT

 S S H R E L A R E A F P E K N G C G F T F G D G C H G

 TCAGATACCAAATTCAATCTGTTCAACAGCCGTCGTATCGATGCCATCGATGTGACCAGCAAACCGGAGCCGCATCCATGA

 S D T K F N L F N S R R I D A I D V T S K T E P H P STOP

Abbildung 4.1: Darstellung der Nukleotid- und Aminosäuresequenz des *narH*-Gens von *Escherichia coli* TG 1. In der Sequenz sind die vier Cystein-Bindestellen und die Primer-Bindestellen hervorgehoben. Ferner sind die α -helikalen Bereiche **rot**, die Helixturns **blau** und die β -Faltblattstrukturen **grün** gekennzeichnet.

Desweiteren weisen diese Primerbereiche eine geringe Zahl von Aminosäuren auf, die durch sechs Kodons kodiert werden. Solche Aminosäuren, zu denen Serin, Arginin und Leucin gehören, können neben der Variabilität in der dritten kodierenden Position auch Basenaustausche in der ersten oder sogar in allen drei Nukleotiden aufweisen und eignen sich daher nicht als Bestandteil einer konservierten Primerbindestelle.

In gleicher Weise wie für das *narH*-Gen beschrieben wurden Primer für weitere funktionelle Gene des Stickstoffkreislaufs (*narG*, *nirS*, *nirK*, *napA*) entwickelt. Alle im Verlauf der Arbeit entworfenen und getesteten Primer sind in der Tabelle 4.1 auf der folgenden Seite aufgeführt.

Die verwendeten Primer wurden durch einen Datenbankvergleich (FastA-Programm) validiert. Die Spezifität der Primer wurde durch die vergleichende Amplifikation von genomischer DNA aus Bakterien, die die entsprechenden Gene besitzen, und solchen, die diese Gene nicht aufweisen, bestätigt. Die Ergebnisse der Amplifikationen aus Referenzstämmen sind in Tabelle 4.2 angegeben, die Resultate der Amplifikationen von genomischer DNA aus den Isolaten finden sich in Tabelle 4.3.

Tabelle 4.1: Name, Sequenz, Position und Schmelztemperatur der für die Amplifikation und Sequenzierung von funktionellen Genen des reduktiven Stickstoffkreislaufs verwendeten Primer

Primer	Sequenz ^a	Position ^b	T _m [°C]
Primer für <i>narH</i>			
<i>narH50F</i>	5'-AAR TGY ATC GGY TGC CA-3'	43-59	51.6
<i>narH300F</i>	5'-GAC GAT TAT TAC GAG CC-3'	292-308	52.1
<i>narH300F</i>	5'-GGC TCG TAA TAA TCG TC-3'	308-292	52.1
<i>narH430F</i>	5'-GGN CCN AAC TGG GAN GA-3'	421-437	51.6
<i>narH430B</i>	5'-TCN TCC CAG TTN GGN CC-3'	437-421	51.6
<i>narH590F</i>	5'-GGI GCI ATI TAC AAR CG-3'	595-611	49.2
<i>narH590B</i>	5'-CGY TTR TAW ATW GCI CC-3'	611-595	49.2
<i>narH1040B</i>	5'-GTN CGR TAY TCN GG-3'	1047-1029	54.0
Primer für <i>narG</i>			
<i>narG150F</i>	5'-CAY GGN GTN AAY TGY AC-3'	144-161	51.6
<i>narG660F</i>	5'-TTY TAY GAY TGG TA-3'	648-662	37.0
<i>narG1750B</i>	5'-TCY TGN CCN ACR TAR TG-3'	1744-1727	51.6
<i>narG2370B</i>	5'-TTY TCR TAC CAN GTN GC-3'	2378-2364	50.4
Primer für <i>napA</i>			
<i>napA160F</i>	5'-TTY TGY GGS ACN GGN TGY GG-3'	148-167	62.4
<i>napA550B</i>	5'-GCC GAN GCC ATG CA-3'	554-541	47.0
<i>napA1130B</i>	5'-TGR TTR AAN CCC ATN GTC CA-3'	1137-1117	55.3
Primer für <i>nirS</i>			
<i>nirS870F</i>	5'-TAC CAC CCS GAR CCG CGC GT-3'	856-875	74.6
<i>nirS1310F</i>	5'-TTC RTC AAG ACS CAY CCG AA-3'	1303-1322	60.0
<i>nirS1310B</i>	5'-TTC GGR TGS GTC TTG AYG AA-3'	1322-1303	60.0
<i>nirS1630B</i>	5'-CGT TGA ACT TNC CGG TSG G-3'	1636-1618	65.5
Primer für <i>nirK</i>			
<i>nirK540F</i>	5'-ATG GTN CCN TGG CAY GT-3'	529-545	57.1
<i>nirK900B</i>	5'-GAA CTT GCC GGT KYC CAG AC-3'	918-898	63.9
<i>nirK1030B</i>	5'-GCC TCG ATN AGR TTR TG-3'	1040-1024	52.2
Primer für die Reamplifikation von DGGE-Banden			
<i>narH-Reamp</i>	5'-GGG GGC ACG GGG GGA A-3'	-	62.0

^a die Sequenzbezeichnung folgt dem IUPAC-Code

^b für die Bestimmung der Primerposition wurden bei *narH* und *narG* die Sequenz von *Escherichia coli*, bei *napA* und *nirS* die Sequenz von *Ralstonia eutropha* (*Alcaligenes eutrophus*) und bei *nirK* die Sequenz von *Alcaligenes faecalis* zugrunde gelegt

^c die Schmelztemperatur beruht auf Herstellerangaben (MWG-Biotech)

Tabelle 4.2: PCR Amplifikation genomischer DNA aus Referenzstämmen

Referenzstämmen	Stammbezeichnung	PCR Resultate der Primerkombinationen für die Gene										Länge der Dpn II-Restriktionsfragmente
		narH				narG		napA		nirS	nirK	
		50-300	50-430	50-590	50-1040	150-1750	150-2370	160-590	160-1130	870-1630	540-900	
<i>Bacillus licheniformis</i>	DSM 13 ^T	+	+	(+)	-	+	+	-	-	n.d.	n.d.	246 bp
<i>Flexibacter canadensis</i>	DSM 3403	-	-	-	-	n.d.	n.d.	-	-	n.d.	n.d.	-
<i>Haloferax denitrificans</i>	DSM 4425	+	+	(+)	-	+	+	-	-	-	-	180 bp
<i>Nitrobacter winogradsky</i>	DSM 10237 ^T	+	+	+	+	n.d.	+	-	-	-	-	55 bp
<i>Paracoccus denitrificans</i>	LMD 82.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	249 bp
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PAO	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	30 bp
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	DSM 50090 ^T	+	+	(+)	-	+	+	-	-	n.d.	n.d.	30 bp
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	DSM 5190 ^T	+	+	+	+	+	+	n.d.	-	+	-	30 bp
<i>Ralstonia eutropha</i>	DSM 531 ^T	+	+	(+)	-	-	-	+	+	+	-	210 bp
<i>Thiomicrospira denitrificans</i>	DSM 1251 ^T	-	(+)	(+)	-	n.d.	n.d.	(+)	-	+	-	-
<i>Zoogloea ramigera</i>	DSM 287 ^T	-	-	-	-	-	-	n.d.	n.d.	+	-	-
<i>Paenibacillus</i> sp.	LO161	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	120 bp
<i>Paracoccus aminophilus</i>	LO 182	-	-	-	-	-	-	+	+	n.d.	-	-
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	DSM 50237 ^T	+	+	(+)	-	+	+	-	-	n.d.	n.d.	180 bp
<i>Pseudomonas asplenii</i>	DSM 50254	-	-	-	-	-	-	+	+	n.d.	n.d.	-
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	LO 187	+	+	+	+	+	+	n.d.	n.d.	+	-	30 bp
<i>Chlorobium limicola</i>	DSM 249 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Chlorobium phaeovibrioides</i>	DSM 269 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Datenbank-Sequenzen*												
<i>Aeropyrum pemix</i>	K 1	-	-	+	-	+	+	Zu den angeführten Datenbankstämmen ist keine Sequenz dieses Gens verfügbar		Zu den angeführten Datenbankstämmen ist keine Sequenz dieser Gene verfügbar		330 bp
<i>Bacillus subtilis</i>	JH 642	+	+	+	+	+	+					391 bp
<i>Escherichia coli</i>	TG 1	+	+	+	+	+	+					159 bp
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Hv 37R	+	-	+	+	+	+					133 bp
<i>Nitrobacter hamburgensis</i>	X 14	+	+	+	+	n.d.	n.d.					55 bp
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	AK 15	+	+	+	+	+	+					30 bp
<i>Staphylococcus carnosus</i>	TM 300	+	+	+	+	+	+					433 bp
<i>Thermus thermophilus</i>	HB 8	+	+	+	+	+	+					342 bp

+: eine Bande der erwarteten Länge

-: keine Amplifikationsprodukte

(+: unspezifische Amplifikation mehrerer Produkte oder abweichender Länge

n.d.: nicht durchgeführt

*: die Amplifikations- und Restriktionsresultate sind aus den verfügbaren Sequenzen abgeleitet

Tabelle 4.3: PCR Amplifikation genomischer DNA aus Standortisolaten

Spezies oder Isolat	Stamm- bezeichnung	PCR Resultate der Primerkombinationen für die Gene										Länge der Dpn II- Restriktions- fragmente
		<i>narH</i>				<i>narG</i>		<i>napA</i>		<i>nirS</i>	<i>nirK</i>	
		50-300	50-430	50-590	50-1040	150-1750	150-2370	160-590	160-1130	870-1630	540-900	
<i>Bacillus</i> sp.	KB 1-1-4	+	+	(+)	+	+	+	-	-	n.d.	n.d.	235 bp
<i>Burkholderia</i> sp.	KB 3-1-1	+	+	(+)	-	n.d.	n.d.	-	-	-	-	30 bp
<i>Carnobacterium</i> sp.	KB 3-3-1	+	+	(+)	-	+	+	-	-	-	-	558 bp
<i>Erwinia</i> sp.	KB 30-7	+	+	+	+	+	+	+	+	n.d.	-	159 bp
<i>Kluyvera</i> sp.	LL 152	+	+	+	+	n.d.	n.d.	-	-	-	-	133 bp
<i>Methylobacterium</i> sp.	Bok15-D-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Methylobacterium extorquer.</i>	Bok 3-8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Methylobacterium zatmanii</i>	Bok 30-9	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> sp.	KB 1-3-4	+	+	+	+	+	+	n.d.	-	+	-	30 bp
<i>Pseudomonas</i> sp.	AL 1L4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30 bp
<i>Pseudomonas</i> sp.	KB 1-3-1	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	30 bp
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Bok10-D-1	+	+	+	+	+	+	n.d.	-	+	-	30 bp
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Bok 25-30-1	+	+	+	+	+	+	n.d.	-	+	-	30 bp
<i>Serratia</i> sp.	KB 3-30-2	-	+	+	+	+	+	+	+	n.d.	-	133 bp
<i>Serratia proteamaculans</i>	182	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	133 bp
<i>Shewanella</i> sp.	KB 3-30-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	238 bp
<i>Shewanella</i> sp.	Bok1-30-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	238 bp
<i>Sphingomonas</i> sp.	Bok 30-10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Sphingomonas</i> sp.	Bok 20-3-6	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	Ki 2I	-	+	(+)	+	+	+	-	-	-	-	235 bp
<i>Cytophaga</i> sp.	Ki 4y	n.d.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Paenibacillus</i> sp.	Bok A234	n.d.	+	+	+	+	+	-	-	-	-	210 bp
<i>Paenibacillus</i> sp.	Ki 586	n.d.	+	(+)	-	+	+	n.d.	n.d.	-	-	210 bp
<i>Pseudomonas</i> sp.	Ki 1Z	+	+	+	+	+	+	n.d.	-	+	-	30 bp
<i>Pseudomonas</i> sp.	Ki 559	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	159 bp
<i>Pseudomonas</i> sp.	Ki 723	+	+	+	+	+	+	n.d.	-	+	-	30 bp
<i>Pseudomonas</i> sp.	Ki 1W	+	+	+	+	+	+	n.d.	-	+	-	159 bp
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	BTH922	+	+	+	+	+	+	n.d.	-	+	-	30 bp
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	"Makran"	+	+	+	+	+	+	n.d.	-	+	-	30 bp

+': eine Bande der erwarteten Länge

-': keine Amplifikationsprodukte

(+)': unspezifische Amplifikation mehrerer Produkte oder abweichender Länge

n.d.: nicht durchgeführt

4.1.2 Doppelgradienten-DGGE

Eines der größten Probleme der Untersuchung mikrobieller Diversität ist die Trennung verschiedener Spezies aus einer Umweltprobe voneinander. Derzeit sind zwei DNA-basierte Techniken verfügbar: das Klonieren von PCR-Produkten zum Aufbau einer Klon-Bibliothek sowie die elektrophoretische Trennung über denaturierende Gele (DGGE). Beide Techniken sind sowohl für die 16S rDNA, wie auch für funktionelle Gene zugänglich.

Die Trennung von PCR-Amplifikaten über die DGGE basiert auf dem unterschiedlichem, Sequenz-abhängigem Schmelzverhalten der DNA-Fragmente. In Polyacrylamidgelen, die einen linearen Gradienten eines Denaturierungsmittels (Formamid und Harnstoff bei 60 °C) enthalten, schmelzen die Fragmente in Abhängigkeit von der Position und der Schmelztemperatur der sogenannten Schmelzdomänen – die wiederum von der Sequenz abhängen - auf und werden so in ihrer Mobilität eingeschränkt. Ein vollständiges Aufschmelzen der PCR-Produkte wird durch die GC-Klammer, eine GC-reiche Sequenz von 30 bis 50 Basenpaaren verhindert. Eine solche GC-reiche Region wird durch die Oligonukleotidsynthese am 5'-Ende eines PCR-Primers angebracht und im Verlauf der PCR zu einer doppelsträngigen GC-Klammer aufgebaut.

Grundvoraussetzung für die Gewinnung von Sequenzinformation aus DGGE-Banden und die damit verbundene Möglichkeit zur Identifizierung oder phylogenetischen Einordnung am Standort vorhandener Bakterien ist eine klare Trennung der Banden voneinander. Unter Ausnutzung einer möglichst langen Laufstrecke muß das Signal-Hintergrund-Verhältnis optimiert werden. Die bis heute angewendete Methode nach Muyzer et al. (1993, 1995, 1999) unterliegt in dieser Hinsicht einigen Einschränkungen, die der bisherigen Verfahrensweise immanent sind.

So treten unter Standardbedingungen - 40 und 65 % Denaturierungsmittel und 60 °C – durch verschiedene Effekte, die von Sequenzvariationen der Primer über Wechselwirkungen zwischen Fragment und Glasplatten bis hin zu Temperaturinhomogenitäten reichen, die Banden oft nicht scharf umrissen hervor, sondern sind im Gel über eine Laufstrecke von bis zu 0.5 cm „verschmiert“. Dieser räumliche Verdünnungseffekt senkt die Detektionseffizienz für schwächere Banden und ineinander verlaufende Banden erschweren die Sequenzierung eluierter Produkte. Diesem Effekt konnte bisher nur dadurch begegnet werden, daß der Gradient großzügiger gewählt wurde; ein Denaturierungsmittelgradient von 20 bis 80 % liefert naturgemäß schärfere Banden, die in dem verengten Denaturierungsbereich begründet liegen. Damit entfällt allerdings der Vorteil der langen Laufstrecke, die wesentlich zum Auflösungsvermögen der Methode beiträgt.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine aktuelle Entwicklung aus der medizinischen Diagnostik (Cremonesi et al. 1997) für die Analyse bakterieller Diversität weiterentwickelt und optimiert: die Doppelgradienten-DGGE (DG-DGGE).

Grundprinzip der Methode ist die Überlagerung des Denaturierungsmittelgradienten mit einem Acrylamidgradienten in gleicher Richtung, der in Laufrichtung zu einer Verkleinerung der Porengröße führt. Als Folge dieser graduellen Verdichtung des Gels wird der Denaturierungsbereich der PCR-Fragmente lokal verkleinert, aufgeschmolzene Amplifikate werden in einem Gelbereich durch die in Elektrophoreserichtung kleiner werdenden Poren aufkonzentriert.

Abbildung 4.2 zeigt die Auftrennung von 16S rDNA-Fragmenten mit einer Länge von 500bp auf a) einem DGGE-Gel mit einem Denaturierungsmittelgradienten von 40-64% (6% Acrylamid), b) einem DGGE-Gel mit einem Denaturierungsmittelgradienten von 0-80% (6% Acrylamid) und c) einem DG-DGGE-Gel mit einem Denaturierungsmittelgradienten von 40-64% (6-8% Acrylamid). Die Fragmente wurden aus bakterieller DNA aus Meereis-Proben der Kieler Bucht (5'-Start – 3'534, siehe Tabelle 3.2) amplifiziert (Petri & Imhoff 2000).

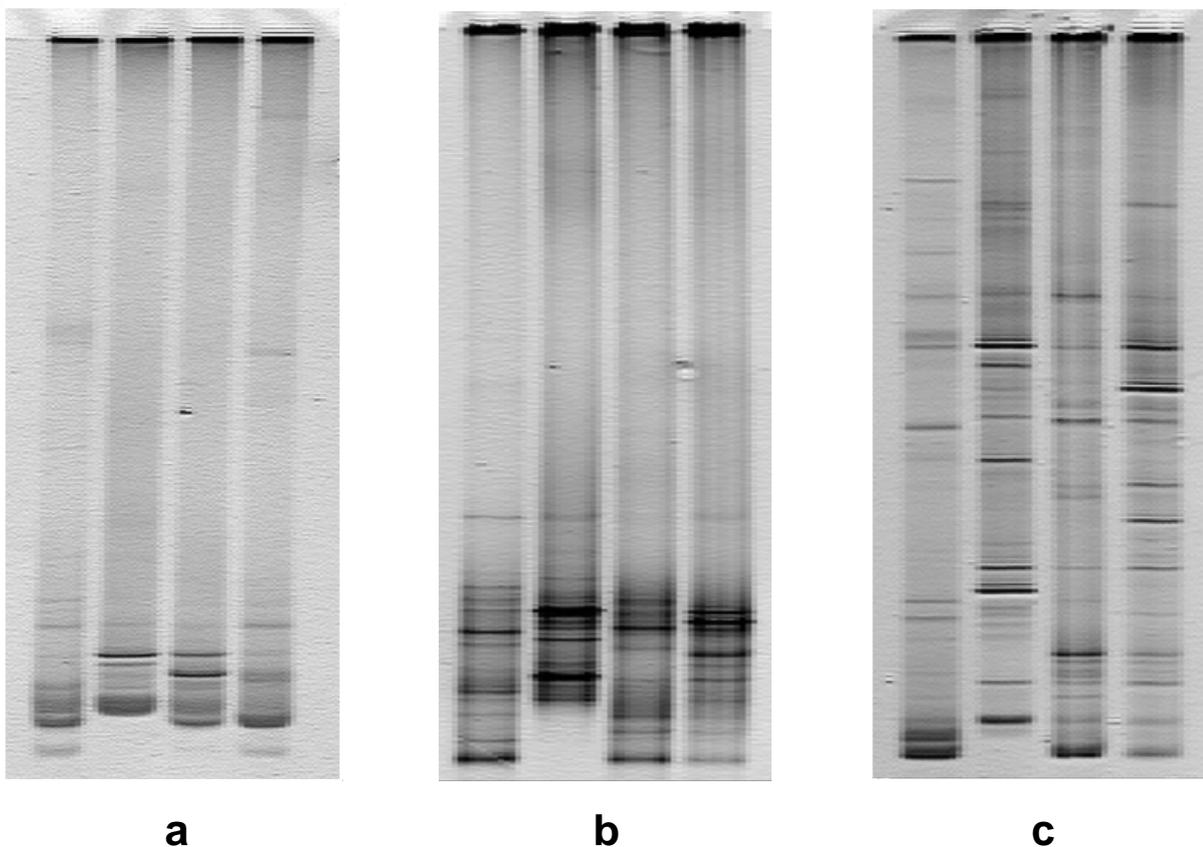


Abbildung 4.2: Vergleich der Bandenmuster identischer Proben auf einem a) DGGE-Gel mit einem Gradienten von 40-64%, b) DGGE-Gel mit einem Gradienten von 0-80% und c) DG-DGGE-Gel mit Gradienten von 40-64% und überlagertem Acrylamidgradienten 6-8%. Die 16S rDNA Fragmente wurden aus Meereisproben der Ostsee (Strander Bucht) mit den Primern 5'-Start - 3'-534 amplifiziert.

Diese Beispiele demonstrieren die erheblich bessere Auflösung der DG-DGGE-Gele, sowie die erhöhte Trennschärfe der Banden selbst bei gespreizten Denaturierungsmittelgradienten (Abbildung 4.2c). Zudem konnte in diesen Gelen der Anfangsbereich der 16S rDNA, der die hypervariablen Regionen V1-V3 umfaßt (5'-Start – 3'-534, siehe Tabelle 3.1), aufgetrennt werden, was mit der herkömmlichen DGGE-Technik nicht möglich war.

Abbildung 4.3 verdeutlicht die außergewöhnliche Trennleistung der Doppelgradienten-Gele am Beispiel der Dynamik der bakteriellen Diversität im Jahresverlauf am Standort Boknis Eck. Die Abbildung zeigt die Änderungen der bakteriellen Diversität im Bodenwasser (28 m Wassertiefe) und im Sediment (0-1 cm) und demonstriert zugleich die Stabilität der Sedimentgemeinschaft im Vergleich zur bakteriellen Gemeinschaft der Wassersäule (1 cm über dem Sediment) am selben Standort.

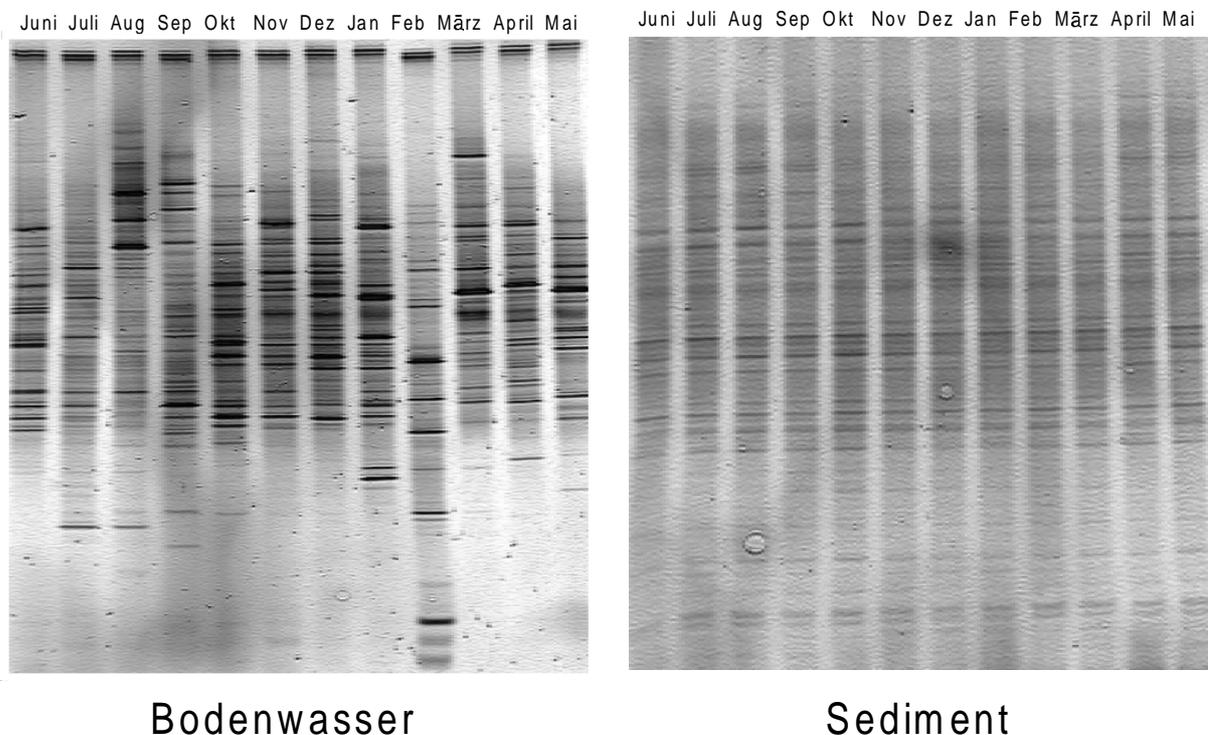


Abbildung 4.3: Darstellung des Auflösungsvermögens der DG-DGGE am Beispiel der jahreszeitlichen Änderung der bakteriellen Diversität im Bodenwasser und im Sediment Standort Boknis Eck. Amplifiziert wurden 16S rDNA-Fragmente mit den Primern 5'-341 und 3'-534.

4.1.3 T-RFLP

Das Konzept des terminalen Restriktionsfragment Längenpolymorphismus wurde 1997 zeitgleich in verschiedenen Arbeitsgruppen entwickelt und zuerst von Liu et al. (1997) publiziert. Diese Technik fand innerhalb kürzester Zeit Anwender aus verschiedensten Bereichen der mikrobiellen Diversitätsanalyse (Moeseneder et al. 1999), da sie eine Lücke in der bis dahin üblichen Analyse schließt: die T-RFLP liefert neben der qualitativen auch quantitative Aussagen über die Mengenverhältnisse der Bakterien oder allgemein der Organismen zueinander.

Die Methode basiert auf der Erzeugung und Auftrennung Spezies- oder Gruppenspezifischer Restriktionsfragmente unterschiedlicher Länge. Zunächst werden aus der DNA einer komplexen Gemeinschaft mittels PCR Fragmente des gewünschten Gens amplifiziert. Dabei kann es sich um die 16S rDNA oder auch um funktionelle Gene handeln. Die Amplifikation erfolgt mit einem Primer, der mit einem detektierbaren Farbstoff markiert ist, und einem unmarkierten Primer. Anschließend wird die Mischung der Fragmente mit einer Restriktionsendonuklease geschnitten. Die Verteilung der Restriktionsschnittstellen ist spezifisch auf Gruppen- oder sogar auf Speziesniveau und führt daher zu entsprechend spezifischen Restriktionsfragmenten. Die Fragmente unterscheiden sich nun in ihrer Länge und lassen sich durch die Elektrophorese über ein denaturierendes Gel voneinander trennen. Detektiert werden die Restriktionsfragmente anhand des markierten Primers, der bei der PCR in die Amplifikate eingebaut wird, und dessen Markierung über die Laser-Detektionseinheit eines Sequenziergerätes nachgewiesen werden kann. Die quantitative Aussage gewinnt man aus der Peakhöhe der sich ergebenden Fragmentmuster.

Eine quantitative Aussage setzt allerdings voraus, daß die PCR, mit der die ursprünglichen DNA-Fragmente erzeugt werden, quantitativ verläuft, d.h. nicht zu einer Verschiebung der Mengenverhältnisse der Fragmente unterschiedlicher Organismen führt. Dieser Tatbestand ist jedoch nicht ohne Einschränkung erfüllt. Die Zunahme der Menge der Amplifikate erfolgt in der PCR exponentiell, damit werden die Mengenverhältnisse zwischen den Organismen hoher Ausgangskonzentration (die demnach eine hohe Zahl an Matrizen für die PCR stellen) und den Organismen niedrigerer Konzentration (und niedrigerer Matrizenzahl) zugunsten der Organismen höherer Konzentration verschoben. Damit ist die T-RFLP in der bisher angewandten Form lediglich semi-quantitativ; sie kann aber, wie auch die DGGE, in idealer Weise für die Dokumentation der Verschiebung von Mengenverhältnissen dynamischer Gemeinschaften als Reaktion auf Umwelteinflüsse genutzt werden.

Die eigenen Arbeiten an dieser Methodik begannen 1997 vor der Publikation von Liu et al. (Nov. 1997) und hatten in erster Linie die Erhaltung des quantitativen Aspektes der T-RFLP zum Ziel. Der wesentliche Unterschied zu der von Liu veröffentlichten Methode liegt in der Umkehrung der Reihenfolge von PCR und Restriktion. Erfolgt zunächst die Restriktion der genomischen DNA, so erhält man ein Vielzahl von Restriktionsfragmenten, die sich mit einer Primer-Extension, bei der nur ein (markierter) Primer eingesetzt wird, amplifizieren lassen. Dieser Primer findet seine Bindungsstelle und die Polymerase erzeugt in jedem Reaktionszyklus ein Fragment bis zur nächsten Restriktionsschnittstelle, bei der die Amplifikation abbricht. Diese Reaktion erzeugt die gleichen Restriktionsfragmente wie die oben beschriebene T-RFLP. Bei dieser Prozeßführung nimmt die Zahl der Amplifikate nicht exponentiell, sondern linear zu, damit bleibt das Mengenverhältnis der Organismen zueinander gewahrt, es entstehen jedoch entsprechend weniger Fragmente (Abbildung 4.4).

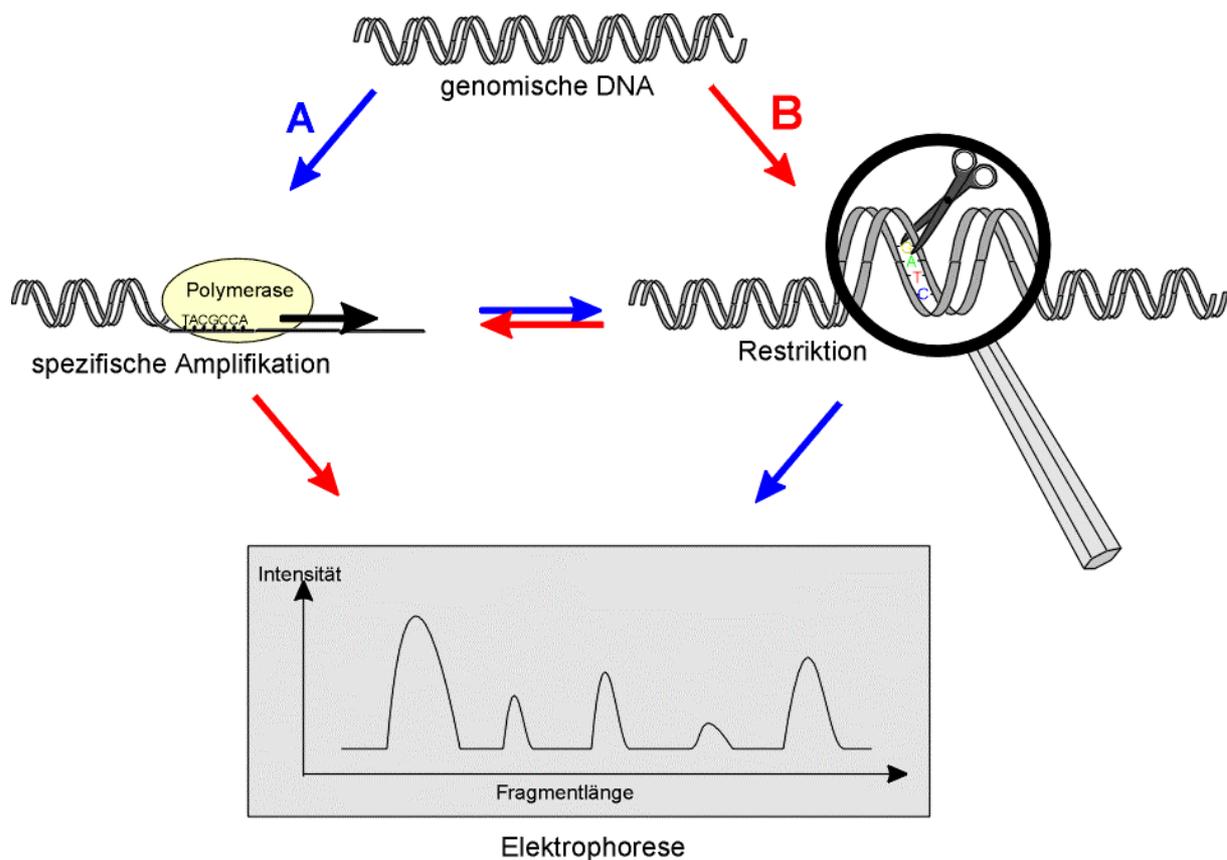


Abbildung 4.4: Schematische Darstellung der zwei möglichen Vorgehensweisen zur Erzeugung von terminalen Restriktionsfragmenten für die T-RFLP durch Amplifikation mit anschließender Restriktion (←A) und durch Restriktion mit anschließender Primer-Extension (←B)

4.1.4 Durchführung der T-RFLP

Die in der T-RFLP erzeugten Restriktionsfragmente, wurden in der vorliegenden Arbeit nach der Methode von Liu (1997), das heißt durch vorhergehende Amplifikation und anschließende Restriktion erzeugt (Weg A in Abbildung 4.4). Die entstehenden Restriktionsfragmente wurden über eine denaturierende Polyacrylamidgel-Elektrophorese getrennt. Durch die Amplifikation mit einem Fluorescein-markierten Primer konnten die Fragmente über eine Laser-Anregung detektiert werden. Die Elektrophorese wurde auf dem ALF-Sequencer durchgeführt unter den gleichen Bedingungen, wie sie für Sequenziergele zum Tragen kamen (Abschnitt 3.3.6.3).

Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit Unterstützung der ALF-Auswertesoftware, jedoch konnte nach diesem Auswerteargorithmus lediglich die Höhe der Peaks, nicht aber deren Flächen bestimmt werden, so daß die prozentualen Angaben lediglich Näherungswerte darstellen. Da es sich jedoch um eine vergleichende Betrachtung handelt, sollte die relative Menge der Fragmente innerhalb eines Standortes einen realistischen Einblick in die Abundanzen der zugehörigen Organismen geben. Zudem wurde durch den Zusatz einer definierten Menge des Primers und eines ungeschnittenen Fragments zu jedem Ansatz ein interner Laufweiten- und Peakhöhenstandard einbezogen, auf den die Daten bezogen wurden. Bei den dargestellten Diagrammen handelt es sich also um den Anteil der korrigierten Abundanzen, die auf die Gesamthöhe aller Peaks (100 %) normiert wurden.

4.2 Phylogenetische Betrachtungen

Für die Ableitung phylogenetischer Beziehungen nitratreduzierender Bakterien wurden die Sequenzen des *narH*-Gens aus Referenzstämmen und Isolaten zur 16S rDNA in Beziehung gesetzt. Dieser Vergleich erfolgte mit Sequenzen identischer Stämme, um die Vergleichbarkeit der Stammbaumtopologien zu gewährleisten.

Stammbezeichnung	Identifikation nach 16S rDNA (% Sequenzsimilarität)
Referenzstämmen	
<i>Paenibacillus</i> sp. LO161	<i>Paenibacillus lautus</i>
<i>Paracoccus denitrificans</i> LMD 82.5	<i>Paracoccus denitrificans</i> LMG 4218 ^T (99.2)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AL 98 (99.3)
<i>Pseudomonas alcaligenes</i> DSM 50342 ^T	<i>Pseudomonas alcaligenes</i> LMG 1224 ^T (98.7)
Isolate	
<i>Bacillus mycoides</i> KB 1-1-4	<i>Bacillus</i> sp. JJ#1 (96.9)
<i>Burkholderia</i> sp. KB 3-1-1	<i>Burkholderia cepacia</i> DSM 50181 (92.4)
<i>Carnobacterium</i> sp. KB 3-3-1	<i>Carnobacterium</i> sp. K 1 (96.7)
<i>Erwinia</i> sp. KB 30-7	<i>Erwinia herbicola</i> JCM 7000 (97.6)
<i>Kluyvera</i> sp. LL 152	(per Fettsäureanalyse identifiziert)
<i>Methylobacterium</i> sp. Bok 15-D-5	<i>Methylobacterium</i> sp. BF 15 (96.6)
<i>Methylobacterium</i> sp. Bok 3-8	<i>Methylobacterium extorquens</i> NCIMB 9399 (93.5)
<i>Methylobacterium</i> sp. Bok 30-9	<i>Methylobacterium zatmanii</i> NCIMB 11243 (94.4)
<i>Pseudomonas</i> sp. KB 1-3-4	<i>Pseudomonas syringae</i> LMG 1247t1 ^T (98.5)
<i>Pseudomonas</i> sp. AL 1L4	<i>Pseudomonas pavonaceae</i> IAM 1155 (96.2)
<i>Pseudomonas</i> sp. KB 1-3-1	<i>Pseudomonas taetrolens</i> IAM 1653 (94.6)
<i>Pseudomonas stutzeri</i> Bok 10-D-1	<i>Pseudomonas stutzeri</i> DSM 5190 ^T (97.9)
<i>Pseudomonas stutzeri</i> Bok 25-30-1	<i>Pseudomonas stutzeri</i> DSM 5190 ^T (98.5)
<i>Serratia proteamaculans</i> JML 182	<i>Serratia proteamaculans</i> DSM 4597 (99.4)
<i>Serratia</i> sp. KB 3-30-2	<i>Serratia proteamaculans</i> JML 182 (98.1)
<i>Shewanella</i> sp. KB 3-30-1	<i>Shewanella putrefaciens</i> LMG 26268 ^T (94.8)
<i>Shewanella</i> sp. Bok 1-30-2	<i>Shewanella frigidimarina</i> ACAM 565 (98.0)
<i>Sphingomonas</i> sp. Bok 30-10	<i>Sphingomonas</i> sp. BF 14 (91.8)
<i>Sphingomonas</i> sp. Bok 20-3-6	<i>Sphingomonas</i> sp. BF 14 (91.8)
<i>Bacillus cereus</i> Ki 21	<i>Bacillus cereus</i> WSBC 10204 (98.1)
<i>Cytophaga</i> sp. Ki 4y	<i>Cytophaga johnsonae</i> DSM 425 (92.3)
<i>Paenibacillus</i> A 234	<i>Paenibacillus</i> sp. KN 25 (96.4)
<i>Paenibacillus</i> sp. Ki 586	<i>Paenibacillus lautus</i> NRRL B-337 (89.3)
<i>Pseudomonas</i> sp. Ki 1z	<i>Pseudomonas migulae</i> CIP 105470 (97.2)
<i>Pseudomonas</i> sp. Ki 559	<i>Pseudomonas putida</i> DSM 291 ^T (97.0)
<i>Pseudomonas</i> sp. Ki 723	<i>Pseudomonas mandelii</i> CIP 105273 (97.6)
<i>Pseudomonas</i> sp. Ki 1w	<i>Pseudomonas migulae</i> CIP 105470 (97.8)
<i>Pseudomonas stutzeri</i> BTH 922	<i>Pseudomonas stutzeri</i> KC (99.0)
<i>Pseudomonas stutzeri</i> „Makran“	<i>Pseudomonas stutzeri</i> WM 88 (99.0)

Tabelle 4.4: Tabellarische Darstellung der mittels 16S rDNA-Sequenzierung identifizierten Isolate und die Sequenzsimilarität zu den durch Datenbankvergleich ermittelten nächsten Nachbarn.

Die in Tabelle 4.4 nicht aufgeführten Referenzstämme wurden nicht sequenziert, da die 16S rDNA-Sequenz für die phylogenetischen Analysen in der EMBL-Datenbank verfügbar war.

Die Berechnung der phylogenetischen Beziehungen von Bakterien auf der Basis von Gensequenzen ist generell ein Näherungsverfahren, mit dem aus den heutigen Relationen der Organismen zueinander Aussagen darüber getroffen werden, wie die Evolution der untersuchten bakteriellen Gene verlaufen ist. Die heutigen Verhältnisse können aus einer Vielzahl evolutionärer Szenarien hervorgegangen sein, daher ist gerade die Bewertung der berechneten Stammbäume von entscheidender Bedeutung. Diese Bewertung erfolgt entweder über einen iterativen Algorithmus („Neighbour joining“-Methoden) oder über die Festlegung eines Optimumskriteriums, an dem die berechneten Bäume bemessen werden können (wie bei der „maximum-likelihood“-Methode).

Grundlage jeder phylogenetischen Berechnung ist eine Similaritätsanalyse, ein Alignment, bei dem die einzelnen Sequenzen so zueinander in Beziehung gesetzt werden, daß Basen- oder Aminosäureaustausche deutlich werden. Die Alignments werden am Rechner erstellt, müssen jedoch „von Hand“ überprüft und häufig verbessert werden. Als Beispiel ist ein Alignment von Aminosäuresequenzen der β -Untereinheit der respiratorischen Nitratreduktase *narH* im Anhang eingefügt (Abbildung A2).

Die phylogenetische Beziehung zweier Bakterien (Sequenzen) zueinander wird durch die Anzahl der Basen-/Aminosäureunterschiede und deren Art festgelegt. Anhand dieser Daten wird eine phylogenetische Distanz berechnet, die im Stammbaum durch den Abstand, das heißt die Länge der Äste zwischen beiden Organismen, wiedergegeben wird.

Da es sich bei phylogenetischen Modellen um Näherungslösungen handelt, fließen generell zur Vervollständigung der Datensätze neben der Nukleotidsequenz auch abgeleitete Sequenzen in die Berechnungen ein. Demnach werden bei funktionellen Genen auch die Aminosäuresequenz und bearbeitete Nukleotidsequenzen (auf zwei Kodon-Positionen reduzierte Sequenzen, Kodon-korrigierte Sequenzen) verwendet. Bei der Analyse werden zudem bei der Korrektur der Alignments Informationen über die Sekundärstruktur berücksichtigt. Die im folgenden dargestellten Stammbäume des *narH*-Gens (Abbildung 4.5a und 4.6a) beruhen auf jeweils vier Datensätzen, die mittels des Parsimony-, des Distance- und des Maximum likelihood-Verfahrens berechnet wurden. Die dargestellten Stammbäume der Aminosäuresequenz und der 16S rDNA sind nach dem Maximum likelihood-Verfahren berechnet worden. Die Ergebnisse der anderen Verfahren sind in die Bootstrap-Analysen eingeflossen.

Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden in der Abbildung 4.5 nur ein oder zwei repräsentative Sequenzen einer phylogenetischen Entwicklungslinie aufgenommen. Diese Darstellung zeigt einen radialen Stammbaum, während die Abbildung 4.6 mit Hilfe einer Außengruppe (*Aeropyrum pernix* K 1) in Form eines Dendrogramms dargestellt wurde.

4.2.1 Phylogenie des *narH*-Gens

Generell lieferten die Daten aus der Analyse der Aminosäure- und der Nukleotidsequenzen mit den verschiedenen Methoden die gleiche Topologie der Stammbäume. Die grundsätzliche Struktur des Stammbaums der *narH*-Gene ist in Abbildung 4.5a gezeigt. Die Darstellung wurde aus der Aminosäuresequenz mit Hilfe von MOLPHY erstellt.

Der Stammbaum ist im wesentlichen in drei phylogenetische Gruppen aufgeteilt, die in signifikanter Weise voneinander getrennt sind: die Proteobakterien, die Gram-positiven Bakterien der Gattungen *Bacillus*, *Staphylococcus* und *Paenibacillus*, sowie die Sequenzen von *Mycobacterium tuberculosis*, *Thermus thermophilus* und *Aeropyrum pernix* bilden jeweils einen Hauptzweig (Abbildung 4.5a).

Auf der Seite der Proteobakterien weisen die *Pseudomonaden* eine hohe Sequenzsimilarität zueinander auf (bis zu 99%). Diese Gruppe teilt sich in zwei Untergruppen auf, die den Referenzorganismen *Pseudomonas stutzeri* und *Pseudomonas fluorescens* zuzuordnen sind (Abbildung 4.5a, Tabelle A3/A4). Eine weitere Gruppe der Proteobakterien wird durch die *Enterobacteriaceae* repräsentiert, die die Sequenzen von *Escherichia coli narH* und *narY* und dreier Isolate der Gattungen *Erwinia* und *Serratia* einschließt. Die Similaritätswerte dieser Gruppe liegen im Bereich von 75-90%/84-96%^a (Tabelle A3/A4). Zwei Isolate der Gattung *Shewanella* und die Sequenz von *Paracoccus denitrificans* LMD 82.5 bilden jeweils eigene Entwicklungslinien im Bereich der Proteobakterien.

Die Position von *Paracoccus denitrificans* innerhalb der Gruppe ist nicht vollständig geklärt, da der Ast zwischen dieser Sequenz und dem Knoten der *Shewanella*-Stämme zu kurz ist, um auf der Basis der verfügbaren Sequenzinformation als gesichert gelten zu können. Das äußert sich durch die geringe Bootstrap-Unterstützung der Verzweigung (<80%) sowie durch eine Verschiebung des *Paracoccus*-Astes in den Bereich der *Shewanella*-Sequenzen bei der Berechnung des Stammbaums nach dem Distance-Algorithmus (Jukes-Cantor-Modell, Tabelle in Abb. 4.5).

^a die Similaritätswerte sind jeweils in der Form Aminosäuresequenz/Bereich der Nukleotidsequenzen angegeben

Die Verzweigungen in der Gruppe der Gram-positiven Bakterien und der thermophilen Organismen werden allgemein durch hohe Bootstrap-Werte unterstützt (Tabelle 4.5). Auf der Seite der Bakterien mit niedrigem G+C-Gehalt lassen sich zwei phylogenetische Linien unterscheiden: die Sequenzen der Bacilli, sowie die Sequenzen von *Staphylococcus carnosus* TM 300 und der Paenibacilli (Abbildung 4.5a).

Die Gruppe der Bakterien mit hohem G+C-Gehalt faßt Prokaryoten aus dem Bereich der *Archaea* und der Gattungen *Thermus* und *Mycobacterium* zusammen; diese Sequenzen zeichnen sich durch eine geringe Similarität zueinander aus, die nur geringfügig über der zu den anderen Sequenzen liegt (Tabelle A3/A4). Folglich kann hier von drei eigenständigen Entwicklungslinien ausgegangen werden.

4.2.2 Vergleichende Phylogenie von *narH* und 16S rDNA

Für einen systematischen Vergleich der *narH*-Gene mit den Sequenzen der 16S rDNA wurden die beide Gene aus identischen Isolaten und Referenzstämmen amplifiziert und sequenziert. *Escherichia coli* ist insofern eine Ausnahme, als die Sequenzen von *narH* und 16S rDNA aus dem Stamm K 12, die Sequenz von *narY* (Datenbanksequenz) jedoch aus dem Stamm TG1 stammt. Ferner stand *Pseudomonas fluorescens* AK 15 nicht für eine Sequenzierung der 16S rDNA zur Verfügung, so daß in diesem Fall auf die Datenbanksequenz des Typenstamms zurückgegriffen wurde.

Die phylogenetischen Beziehungen auf der Basis des ribosomalen Gens sind in Abbildung 4.5b dargestellt. Sie stimmen im wesentlichen mit der Phylogenie von *narH* überein. Die Trennung von Proteobakterien und Gram-positiven Bakterien spiegelt sich in fast identischer Weise wider. Gemeinsam ist beiden Stammbäumen auch die phylogenetische Anordnung der Sequenz von *Thermus thermophilus* HB 8 im Bereich der Gram-positiven Bakterien und der Archaeobakterien. Diese Position ist jedoch nicht unumstritten. Aufgrund morphologischer Merkmale und verschiedener Signatur-Sequenzen funktioneller Gene besitzen die Gattungen *Thermus* und *Deinococcus* sowohl Merkmale der Gruppe der Monodermata, d.h. der Gram-negativen Bakterien, wie auch der Gruppe der Didermata, der Gram-positiven Bakterien (Gupta 1998). Es wird daher angenommen, daß diese Gattungen sehr ursprüngliche Eigenschaften der Evolution repräsentieren. Diese Annahme wird durch die phylogenetische Position der *narH*-Sequenz bestätigt.

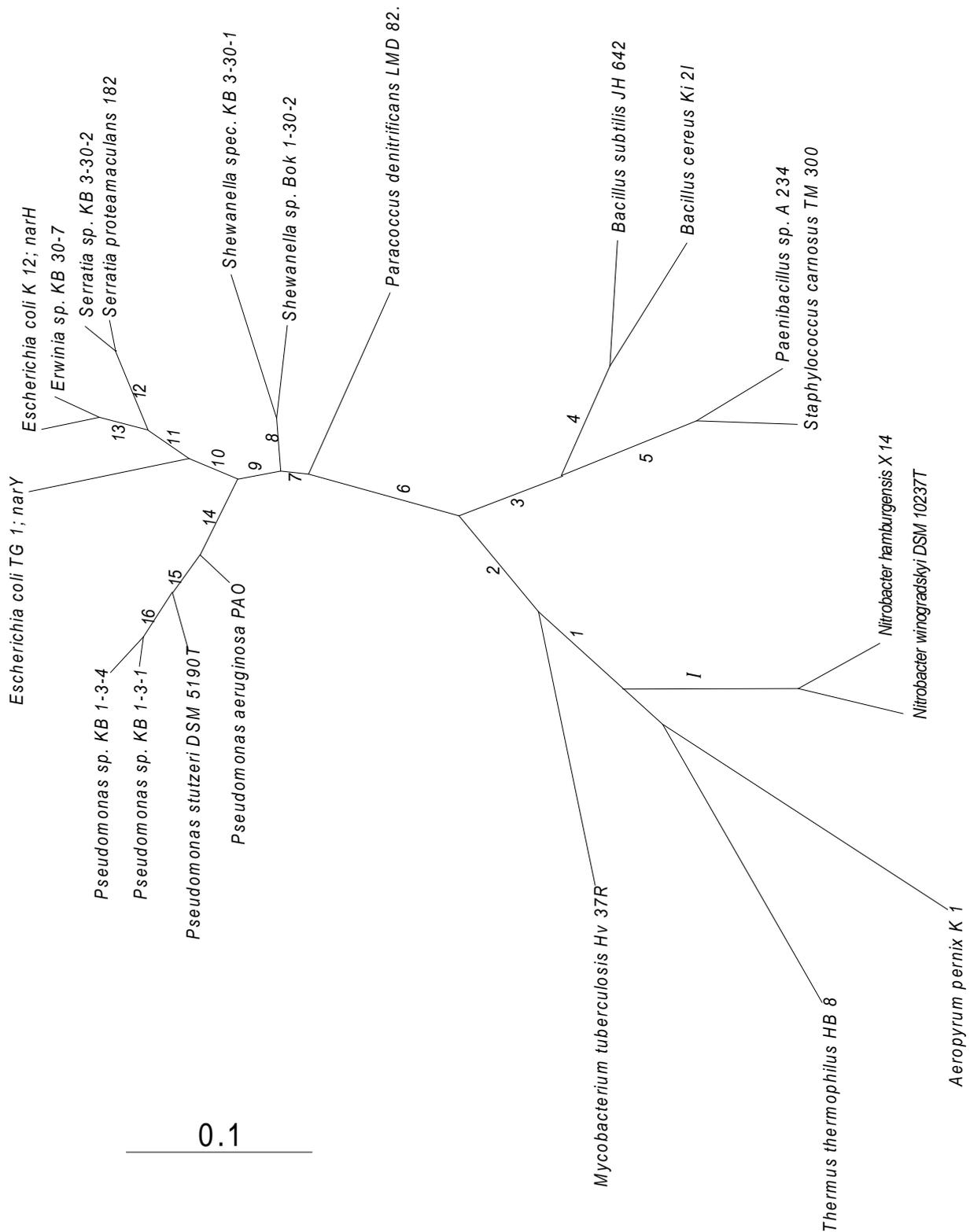


Abbildung 4.5a: Radialer *narH*-Stammbaum von Isolaten und Referenzstämmen der wesentlichen phylogenetischen Gruppen. Der Stammbaum wurde auf der Basis der Aminosäuresequenz mittels MOLPHY berechnet. Die Bootstrap-Werte (Tabelle 4.5) wurden jeweils mit 100 Replikationen berechnet.

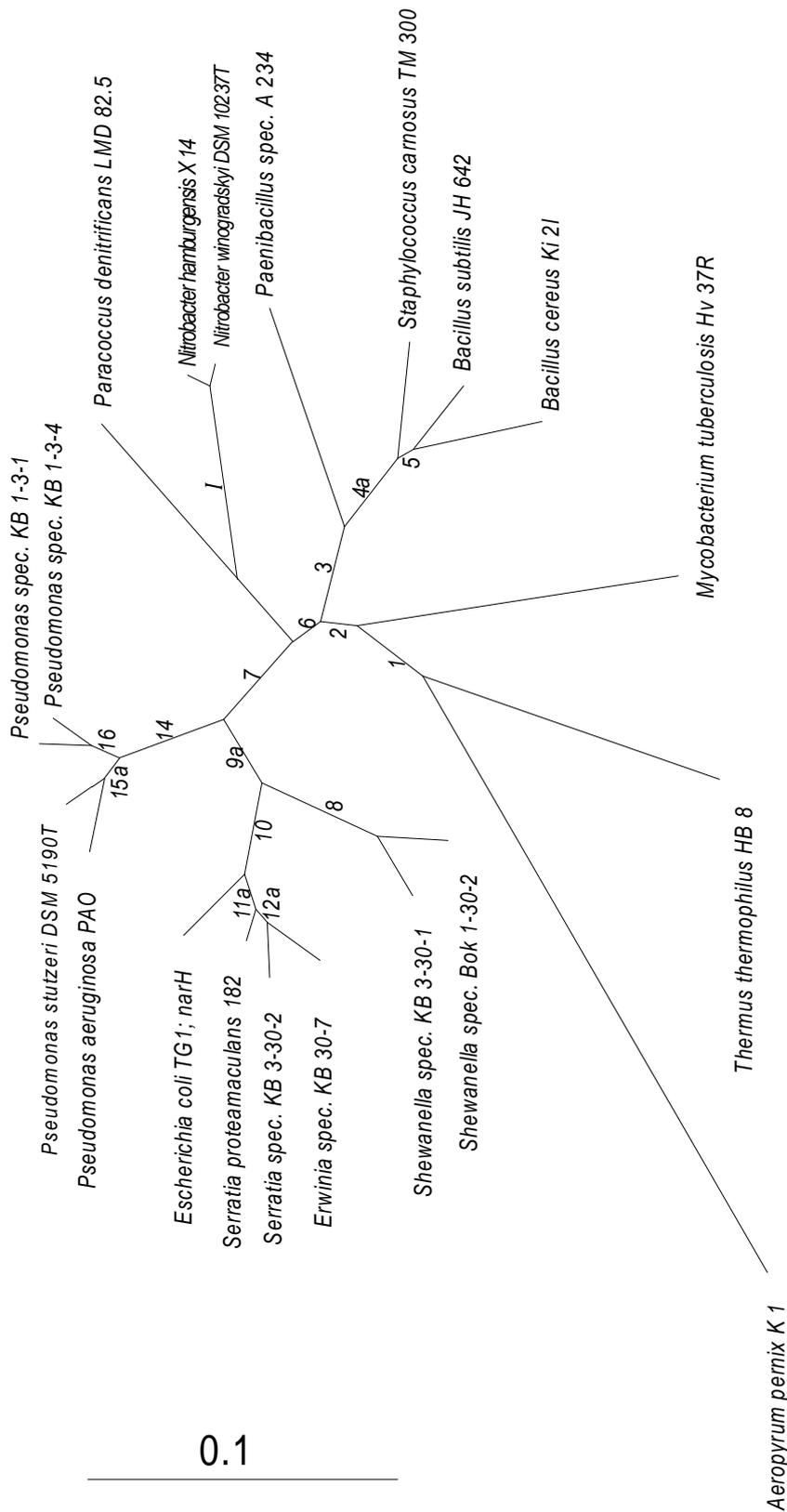


Abbildung 4.5b: Radialer 16S rDNA-Stammbaum von Isolaten und Referenzstämmen der wesentlichen phylogenetischen Gruppen. Der Stammbaum wurde auf der Basis der Nukleotidsequenzen mittels PHYLIP berechnet. Die Bootstrap-Werte (Tabelle 4.5) wurden jeweils mit 100 Replikationen berechnet.

Tabelle 4.5: Bootstrapwerte [%] für Aminosäure- und Nukleotidsequenzen aus Distance-, Parsimony- und maximum-likelihood-Berechnungen

Ast	Aminosäuren			Nukleotide (2 Basen) ^a			Nukleotide (3 Basen) ^b			Nukleotide (Kodon) ^c			16S rDNA Sequenzen		
	Dist	Pars	M.-L.	Dist	Pars	M.-L.	Dist	Pars	M.-L.	Dist	Pars	M.-L.	Dist	Pars	M.-L.
1	100	100	100	96	100	93	100	100	100	100	100	100	100	99	100
2	98	100	55	95	97	82	100	98	98	98	92	68	89	100	100
3	100	76	100	100	98	95	100	80	96	100	99	100	100	100	100
4	97	100	100	99	98	99	-	-	-	100	100	100	-	-	-
4a	-	-	-	-	-	-	97	69	60	-	-	-	100	*	100
5	100	100	100	100	100	100	93	98	100	100	99	100	100	*	100
6	79	63	60	99	91	92	96	91	97	100	92	96	91	95	98
7	*	51	60	71	68	79	99	63	97	58	80	68	100	100	100
8	76	76	85	71	68	81	100	90	92	92	79	82	100	100	100
9	*	40	68	87	93	96	98	51	*	*	77	80	-	-	-
9a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	100	100
10	94	54	96	53	93	66	82	*	*	100	68	84	100	*	*
11	98	39	96	93	*	*	90	*	*	100	77	90	73	*	*
12	100	52	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	*	77	*
12a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	92	*	74
13	100	100	100	100	100	100	100	92	97	100	99	100	-	-	-
14	100	90	100	100	99	96	100	91	100	100	100	100	100	100	100
15	84	81	85	56	79	78	-	52	-	72	90	86	-	-	-
15a	-	-	-	-	-	-	99	-	100	-	-	-	100	99	100
16	99	99	100	100	100	100	100	100	100	100	95	100	100	99	100
I	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Die Bootstrapwerte wurden unter Verwendung der Programme PAUP und MOLPHY mit jeweils 100 Replikationen berechnet.

-: die alternative Verzweigung zu diesen Werten ist mit einem Suffix (a) gekennzeichnet

*: Verzweigung wurde in der Mehrzahl der Bootstrap-Replikationen nicht erhalten

^a: die Nukleotidsequenzen wurden auf die ersten beiden kodierenden Basen reduziert

^b: die Nukleotidsequenzen beinhalten alle drei kodierenden Positionen

^c: die Nukleotidsequenzen sind Kodon-korrigiert (s. Abschnitt 3.8)

Neben der prinzipiellen Übereinstimmung zeigt eine genaue Analyse beider Stammbäume verschiedene Diskrepanzen der Substruktur einzelner Gruppen auf.

Zunächst ist die phylogenetische Distanz zwischen Proteobakterien und Gram-positiven/thermophilen Bakterien im *narH*-Stammbaum signifikant größer (Abbildungen 4.5a und 4.5b). Auch die phylogenetischen Positionen der *Enterobacteriaceae* und der *Shewanella*-Gruppe variiert im Vergleich der Stammbäume. Die beiden Sequenzen der *Shewanella*-Isolate sind in der 16S rDNA Phylogenie mit den Gruppe der *Enterobacteriaceae* assoziiert, während die *narH*-Sequenzen dieser Organismen als eigenständige Entwicklungslinie präsentieren. Die Anordnung der *Enterobacteriaceae* differiert dagegen in Details.

Nach der 16S rDNA Phylogenie weist *Staphylococcus carnosus* eine größere Verwandtschaft zu den Sequenzen von *Bacillus subtilis* und *Bacillus cereus* auf (Similarität von 93%; 85.7% zu *Paenibacillus* A 234), während auf der Basis der *narH*-Daten eine größere Verwandtschaft zu *Paenibacillus* A 234 (78%/68-88%) als zu den *Bacillus*-Sequenzen (66%/65-83%) besteht (Tabellen A3-A5). Bei der Berechnung des Stammbaums auf der Basis der ungekürzten *narH*-Nukleotidsequenzen rückt die Sequenz von *Staphylococcus carnosus* enger an die *Bacillus*-Gruppe, bei einer Kodon-Korrektur zeigt sich jedoch wieder eine größere Sequenzsimilarität zum Isolat A 234. Folglich wird dieser Unterschied durch die Verwendung der Kodons verursacht.

In gleicher Weise ist auch die Verschiebung des terminalen Knotens der *narH*-Sequenz von *Pseudomonas aeruginosa* PAO in eine externe Position innerhalb der *Pseudomonaden*-Gruppe Kodon-abhängig.

Abbildung 4.6 zeigt die Topologie der Stammbäume aller verfügbaren *narH*-16S rDNA Sequenzpaare von Isolaten und Referenzstämmen. Der Stammbaum der *narH*-Sequenzen basiert hier auf der ungekürzten Nukleotidsequenz. Die in Klammern gesetzten Sequenzen wurden mit dem Primerpaar *narH50F* - *narH430B* amplifiziert und besitzen ein Länge von nur 130 Aminosäuren. Daher wurden diese Sequenzen nicht für eine exakte phylogenetische Analyse berücksichtigt. Dennoch ordnen sich die verkürzten Sequenzen in das phylogenetische Beziehungsgeflecht ein und demonstrieren damit die phylogenetische Aussagekraft auch kurzer Sequenzen; die weitgehende Übereinstimmung der phylogenetischen Ansätze von *narH* und 16S rDNA bleibt auch mit kurzen Sequenzen erhalten.

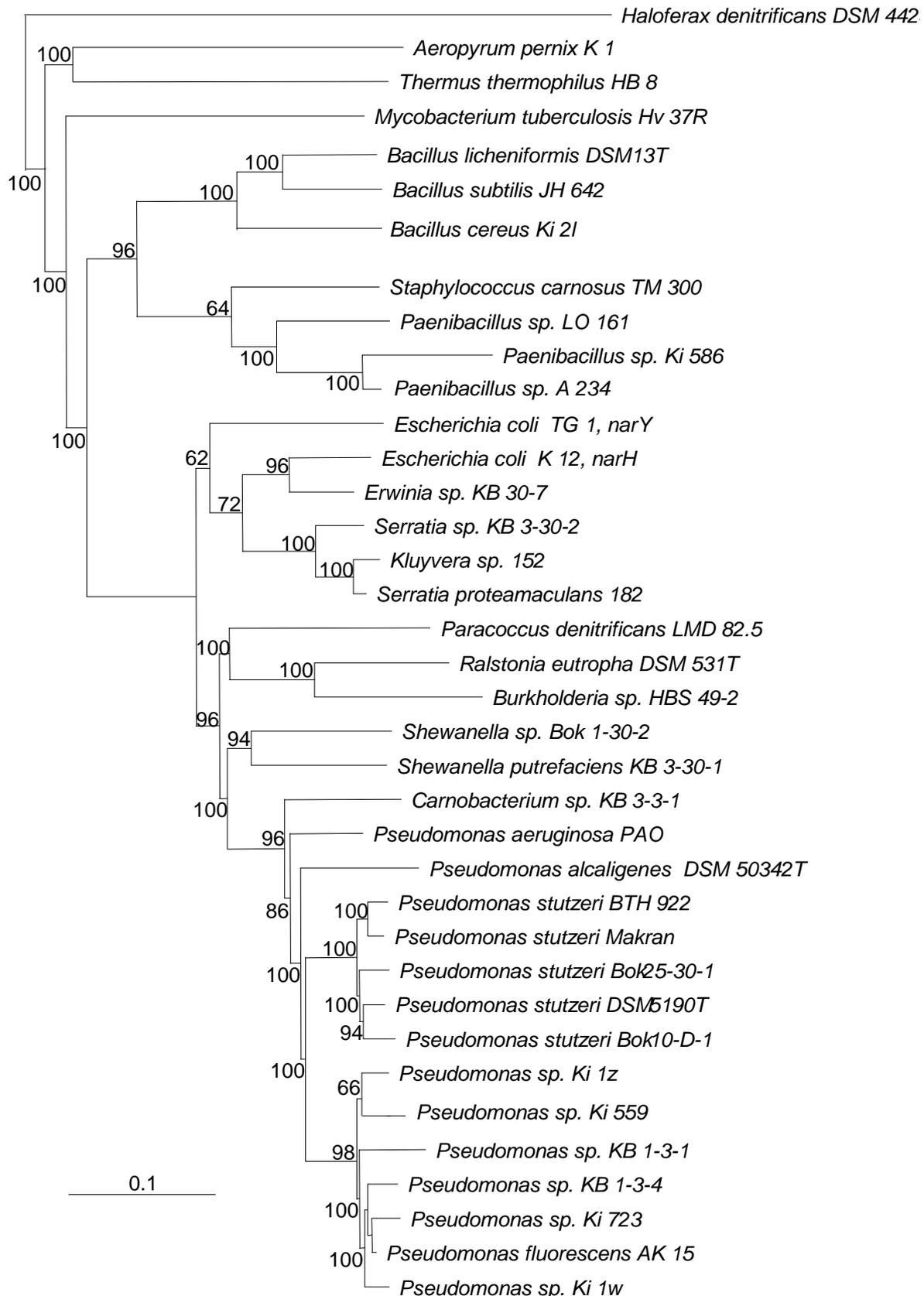


Abbildung 4.6a: *narH*-Stammbaum repräsentativer Referenzstämmen und Isolate. Der Stammbaum wurde auf der Basis der Nukleotidsequenz unter Einbeziehung aller drei kodierenden Positionen mittels PHYLIP berechnet. Die Bootstrap-Werte wurden mit 100 Wiederholungen in PAUP nach dem maximum-likelihood-Algorithmus berechnet.

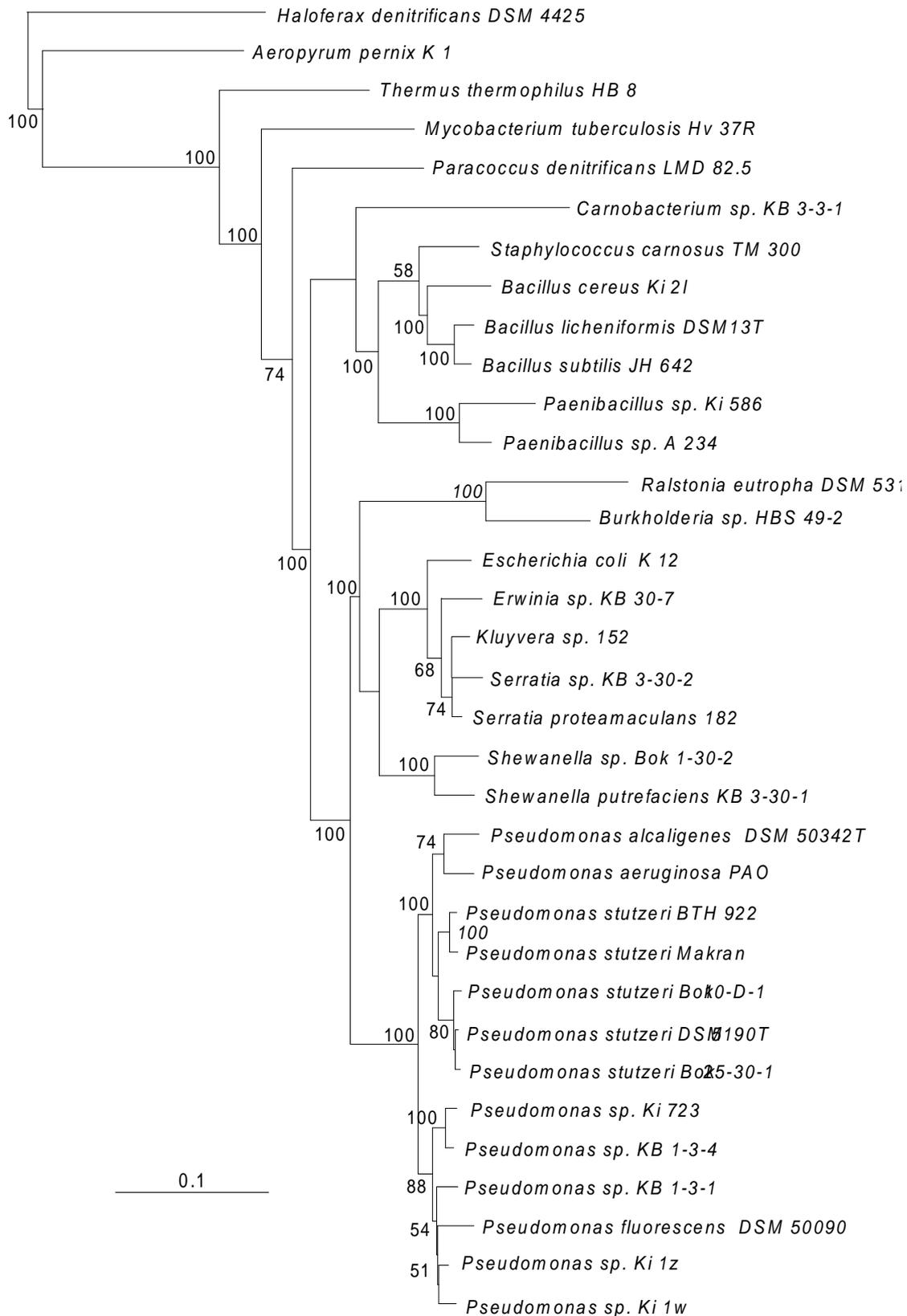


Abbildung 4.6b: 16S rDNA-Stammbaum repräsentativer Referenzstämmen und Isolate. Der Stammbaum wurde mittels PHYLIP berechnet. Die Bootstrap-Werte wurden mit 100 Wiederholungen in PAUP nach dem maximum-likelihood-Algorithmus berechnet.

Im Vergleich der Stammbäume von 16S rDNA und *narH* zeigt sich hier ein signifikanter Unterschied, der die phylogenetische Position von *Carnobacterium* sp. Isolat KB 3-3-1 betrifft. Die Sequenz zeigt im Stammbaum von *narH* eine vollständig andere phylogenetische Relation als auf Basis der 16S rDNA. So ist die Sequenz von Isolat KB 3-3-1 im Stammbaum der *narH*-Sequenzen in den Bereich der *Pseudomonaden* angeordnet.

Desweiteren unterscheidet sich die phylogenetische Substruktur des *Pseudomonaden*-Clusters in beiden Stammbäumen. Die grundsätzliche Einteilung in zwei größere Gruppen, die den Referenzstämmen *Pseudomonas stutzeri* und *Pseudomonas fluorescens* zuzuordnen sind, bleibt im *narH*-Stammbaum erhalten, in der letzteren Gruppe ist jedoch eine unterschiedliche Anordnung der Sequenzen in beiden Bäumen zu verzeichnen.

Die Substruktur der 5 Stämme von *Pseudomonas stutzeri* bleibt jedoch in beiden Stammbäumen erhalten. Die Sequenzen bilden in beiden Phylogenien einen eigenständigen Cluster aus zwei Ästen, die durch hohe Similaritäts- und hohe Bootstrap-Werte unterstützt werden. Einer der Äste wird durch die zwei Sediment-Isolate, der andere durch die Isolate aus der Wassersäule und dem Typenstamm gebildet. Diese Anordnung überrascht insofern, als die beiden Stämme aus den Sedimenten von räumlich sehr weit getrennten Orten (BTH 922 aus der Kieler Bucht, „Makran“ aus dem Sediment des Makran-Beckens im Indischen Ozean) isoliert wurden, während die Stämme Bok 25-30-1 und Bok 10-D-1 ebenfalls aus der Kieler Bucht isoliert wurden und damit räumlich enger verbunden sind. Die phylogenetische Anordnung wird jedoch sowohl von den Sequenzdaten, wie auch von Daten aus der RAPD-Populationsanalyse (J. Sikorski, pers. Mitteilung) unterstützt und unterstreicht damit den hohen Grad der Konserviertheit des *narH*-Gens innerhalb einer Art.

4.2.3 Signatur-Sequenzen

Die phylogenetischen Relationen der Arten, die sich aus den Sequenz-basierten Berechnungen ergeben, werden durch auffällige Insertionen und Deletionen („Indels“) in den Aminosäuresequenzen unterstützt. Die Indels eignen sich dann für eine Ableitung phylogentischer Beziehungen, wenn sie von konservierten Sequenzbereichen flankiert werden, die als eine Art Anker fungieren. Dieses Verfahren basiert auf der Voraussetzung, daß eine Insertion oder Deletion von Aminosäuren im Verlauf der Evolution in einer phylogenetischen Linie nur einmal geschieht und diese Veränderung an alle späteren Generationen weitergegeben wird.

Eine Analyse der *narH*-Daten zeigt zwei Aminosäure-Positionen, die die Kriterien für Signatur-Sequenzen erfüllen. An Position 71 (Abbildung A2 im Anhang) zeigen die

Sequenzen von *Staphylococcus carnosus* TM 300 und den *Paenibacillus*-Spezies A 234, Ki 586 und LO 161 eine Insertion von zwei Aminosäuren, die die phylogenetische Verwandtschaft der vier Stämme TM 300, A 234, Ki 586 und LO 161 unterstreicht. Die beiden insertierten Aminosäuren sind Teile des Sequenzmotivs Ala-Leu-Gly-Lys, von denen sich jeweils zwei Aminosäuren auch in den anderen Sequenzen wiederfinden. Die Aminosäuren werden durch ein Sequenzmotiv Leu/Ile-Phe-X-Asn-Pro flankiert, welches nach der Sekundärstrukturanalyse ein konserviertes Helixmotiv im *narH*-Gen darstellt.

Ferner zeigen beide *Shewanella*-Sequenzen ein insertiertes Valin an Position 147, welches in keiner Sequenz der anderen Proteobakterien erscheint. Diese Insertion befindet sich direkt hinter dem konservierten Bereich des Primers *narH430*.

4.2.4 Vergleichende Phylogenie von *narH* und *norB*

Kirstein und Bock publizierten 1993 eine Sequenz der Nitrit-Oxidoreduktase (*norB*) aus *Nitrobacter hamburgensis* X 14, die eine hohe Sequenzsimilarität zu den Sequenzen der dissimilatorischen Nitratreduktase aufwies. Die hohe Sequenzsimilarität und die Existenz der beschriebenen Sequenzmotive (Cystein-Reste, MGD-Bindestelle), sowie die gegensätzliche enzymatische Funktion deuten auf eine mögliche gemeinsame phylogenetische Wurzel hin. Eine vergleichbare Verwandtschaft ist bereits für die Ammonium- und die Methanmonoxygenase bekannt (Zahn et al. 1996). Aus der genomischen DNA eines weiteren Nitritoxidierers, *Nitrobacter winogradskyi* DSM 10237^T, ließen sich mit den Primern für *narH* entsprechende Fragmente amplifizieren und sequenzieren.

Der Sequenzvergleich der Gene zeigt eine große Distanz der bakteriellen *nor*-Gene von den *nar*-Genen, die sich in einer eigenständigen phylogenetischen Linie der *norB*-Sequenzen mit geringer Sequenzsimilarität zu den *narH*-Genen äußert (Abbildung 4.5a). Beide Sequenzen bilden eigenständige phylogenetische Linien mit einer Sequenzsimilarität von 90%/88-95 % zueinander (Tabelle A3/A4). Die phylogenetisch nächste Sequenz ist die von *Thermus thermophilus* mit einer Sequenzsimilarität von 64%/63-75 %. Alle anderen Sequenzen weisen Similaritätswerte im Bereich von 50 % auf. Diese Daten weisen auf eine sehr frühe phylogenetische Differenzierung der beiden Gene hin. Die phylogenetische Verwandtschaft zur Sequenz von *Thermus thermophilus* läßt sich auch der Insertion eines Tryptophan-Restes an Position 119 des Aminosäure-Alignments (Abbildung A2 im Anhang) entnehmen, die unmittelbar vor dem Primerbereich *narH430* lokalisiert ist.

4.2.5 Orthologie des *narH*-Gens

Die Aussagefähigkeit einer auf funktionellen Genen basierenden Phylogenie hängt wesentlich von der Orthologie der Gene ab. Diese Eigenschaft bezeichnet die Homologie von Genen, die sich aus einem gemeinsamen Vorläufer entwickelt und im Verlauf der Evolution ihre ursprüngliche Funktion bewahrt haben. Die Orthologie der *narH*-Gene läßt sich durch verschiedene Eigenschaften demonstrieren.

Im Gegensatz z.B. zur assimilatorischen Sulfitreduktase oder zur dissimilatorischen Nitratreduktase ist die Anordnung der funktionellen Gruppen innerhalb der gesamten Aminosäuresequenz in allen untersuchten Prokaryoten in identischer Weise aufzufinden. Alle Cystein-Bindestellen befinden sich an der gleichen Position innerhalb der Sequenzen. Auch ist die Komposition der Bindemotive in allen Sequenzen identisch mit Ausnahme der Sequenz von *Aeropyrum pernix*, bei der im dritten Cystein-Bindemotiv das Tyrosin gegen ein Tryptophan ausgetauscht ist. Gleiches gilt auch für die große Untereinheit *narG*, bei der bei allen bekannten Sequenzen die MGD-Bindemotive identisch angeordnet sind. Da die Motive sowohl in der Gruppe der *Bacteria* als auch bei den *Archaea* identisch angeordnet sind, müssen diese Strukturelemente vor der Divergenz der beiden Domänen Teil der Enzyme gewesen sein. Eine konvergente Evolution zweier Enzyme, die erst nach der Trennung beider Domänen zu identischen Positionen der Bindemotive geführt haben könnte, ist demgegenüber extrem unwahrscheinlich.

Die Paralogie einzelner Nitratreduktase-Gene kann als Verbreitungsmechanismus nicht ausgeschlossen werden, zumal das zweite *nar*-Operon in *Escherichia coli* TG 1 vermutlich aus einer Genduplikation entstanden ist, doch zeigt gerade die hohe Sequenzsimilarität dieser beiden Operons, daß diese Ereignisse wesentlich später in der evolutionären Geschichte erfolgt sind.

Darüberhinaus zeigt die lange evolutionäre Geschichte und das Vorkommen von *narH* in hyperthermophilen Bakterien (Ramirez-Arcos et al. 1998; Sako et al. 1996; Völkl et al. 1996), die vermutlich die ältesten Organismen darstellen, daß sich die Funktion der dissimilatorischen Nitratreduktase im Verlauf der Evolution nicht geändert hat.

Zusätzlich kann auch die Homologie von Nitratreduktase und Nitritoxidase hinsichtlich der Strukturelemente und der funktionellen Verwandtschaft als Hinweis auf einen gemeinsamen Vorläufer gewertet werden, aus dem sich die Gene ortholog entwickelt haben.

4.3 Analyse nitratreduzierender Standortgemeinschaften

Die Untersuchung der Diversität nitratreduzierender Bakterien in den Sedimenten der Ostsee wurde durch die Anwendung verschiedener, einander ergänzender Methoden durchgeführt. Als Ergänzung zur Isolierung und Identifizierung nitratreduzierender Bakterien anhand ihrer 16S rDNA und ihrer Membranfettsäuremuster wurden drei molekularbiologische Verfahren eingesetzt: die DGGE (denaturierende Gradientengelelektrophorese) mit anschließender Extraktion und Sequenzierung von Banden, die T-RFLP (terminale Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus) und die SSCP (Einzelstrangkonnektionspolymorphismus). Alle diese methodischen Ansätze wurden auf der Basis von Amplifikaten der Gene der membrangebundenen Nitratreduktase (*narH*) durchgeführt. Alle im Ergebnisteil präsentierten Abbildungen und Ergebnisse beziehen sich daher auf Bakterien, die das *narH*-Gen besitzen.

Alle drei angewendeten Methoden haben bestimmte Einschränkungen hinsichtlich der Gemeinschaftsanalyse auf der Speziesebene. So resultiert aus einer Sequenzvariation zweier Arten nicht zwangsläufig eine Auftrennung in verschiedene SSCP-, DGGE- oder T-RFLP-Signale. So zeigen zum Beispiel die Sequenzen einiger Isolate identische Positionen der Restriktionsschnittstelle von Dpn II (und auch anderer Restriktionsendonukleasen), die folglich in der T-RFLP ein überlagertes Signal liefern, so daß die Bestimmung des Anteils einzelner Arten nicht mehr möglich ist. Daher geben die verwendeten Methoden eher eine geringere Artenvielfalt wieder als möglicherweise am Standort vorhanden ist.

Entscheidend ist jedoch die Möglichkeit, durch die eingesetzten Methoden einen generellen Einblick in die Diversität nitratreduzierender Bakteriengemeinschaften in den Sedimenten der Ostsee zu gewinnen und gleichzeitig verschiedene Standorte und Sedimenthorizonte miteinander vergleichen zu können. Dieses Ziel wird durch den Einsatz dieser drei, einander in idealer Weise ergänzenden Methoden gewährleistet.

Wie die nachstehende Graphik 4.7 zeigt, sind die eingesetzten Methoden geeignet, einen Überblick über die *taxonomische Diversität* der Nitratreduzierer zu geben und die Standortgemeinschaft hinsichtlich der Artenvielfalt und der Abundanz ihrer Arten und Gruppen zu erfassen. Die *genetische Diversität*, das heißt die Diversität unterhalb der Speziesebene wird durch die eingesetzten Methoden zur Diversitätsanalyse (DGGE, T-RFLP, SSCP) nicht erfaßt. Gleichwohl konnte die Sequenzinformation der 16S rDNA und des *narH*-Gens verschiedener Isolate von *Pseudomonas stutzeri* genutzt werden, um Aussagen über die Variabilität dieser Gene innerhalb einer Art zu treffen.

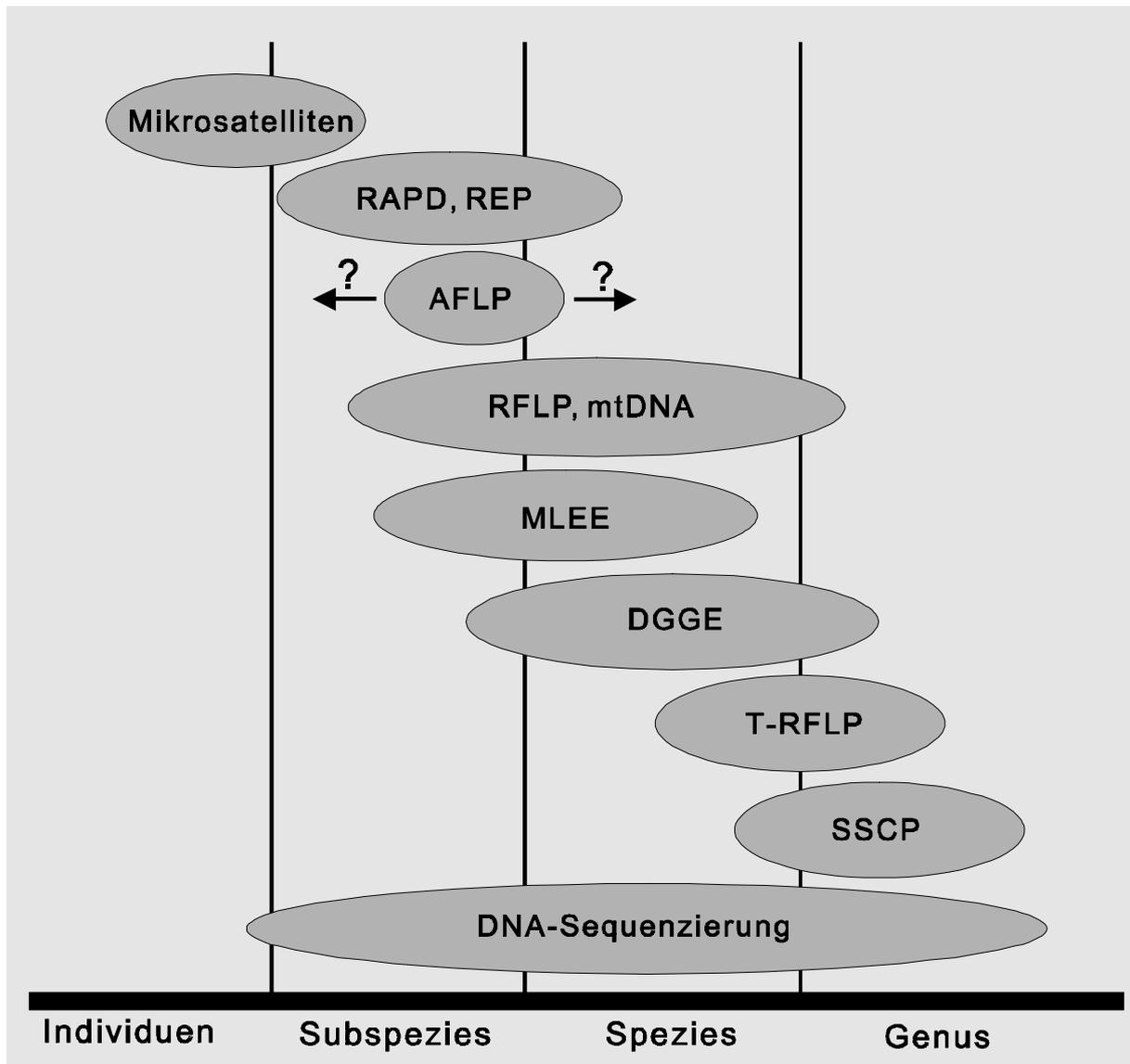
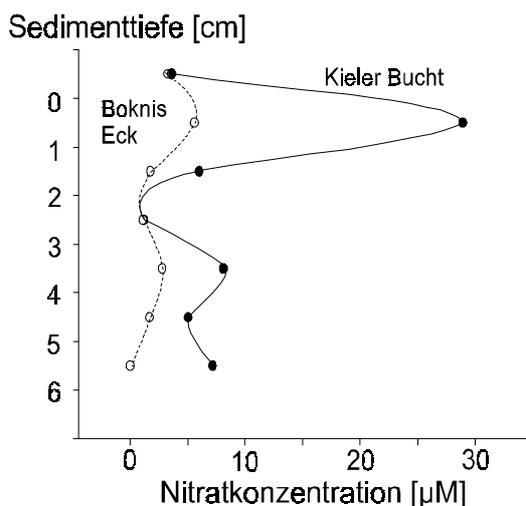
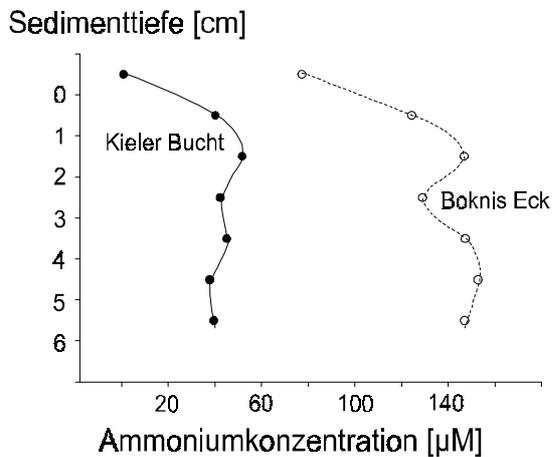
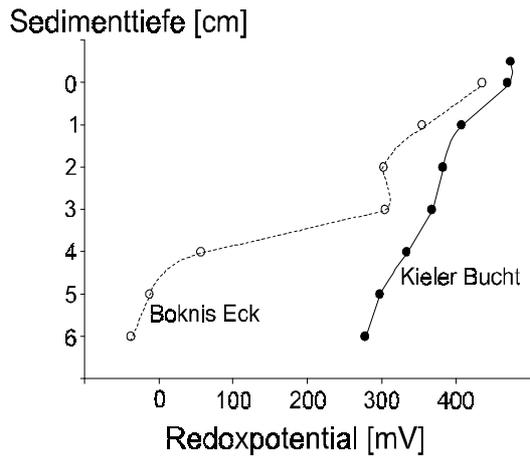


Abbildung 4.7: Allgemeine Darstellung des Auflösungsvermögens molekularer Methoden hinsichtlich der taxonomischen und genetischen Diversität von Prokaryoten und Eukaryoten (verändert nach Olson et al. 1994). Die Abkürzungen bezeichnen: SSCP (single strand conformation polymorphism), T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism), DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis), MLEE (multi locus enzyme elektrophoresis), RFLP (restriction fragment length polymorphism), mtDNA (Sequenz mitochondrialer DNA), AFLP (amplified fragment length polymorphism), RAPD (random amplified polymorphic DNA), REP (repetitive extragenic palindromic DNA), Mikrosatelliten (spezifische, über das Genom verteilte Sequenzabschnitte).

Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden die chemischen und physikalischen Daten der Standortanalysen im folgenden Fließtext in graphischer Form dargestellt, die zugehörigen Werte finden sich in Tabelle A6 im Anhang.



Abbildungen 4.8: Nährstoff- und Redoxprofile der Stationen „Kieler Bucht“ (●) und „Boknis Eck“ (○)

4.3.1 Standort westliche Ostsee

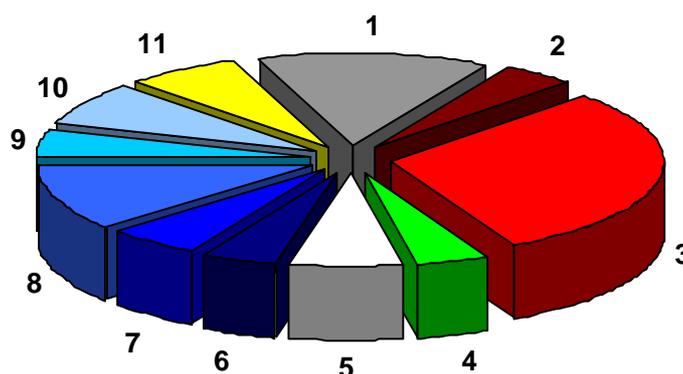
Unter der Standortbezeichnung „westliche Ostsee“ sind in dieser Arbeit die beiden Stationen „Boknis Eck“ in der Eckernförder Bucht und „Kieler Bucht“ zusammengefaßt (Abbildung 3.1).

Beide Stationen liegen im Bereich eines häufigeren Einstromes von salzhaltigem Nordseewasser. Aus diesem Grund schwankt die Salinität an den Stationen im langfristigen Mittel zwischen 16 und 22‰. Zum Zeitpunkt der Probenahme wurde eine Salinität von 17‰ gemessen. Beide Stationen wiesen durch die geringe Wassertiefe von 17 m (Kieler Bucht) und 27 m (Boknis Eck) bis zur Sedimentoberfläche eine Sauerstoffsättigung in der Wassersäule von ca. 90% auf. Wie aus den Redoxprofilen der Stationen zu entnehmen ist (Abbildung 4.8), waren auch die oberen Sedimentschichten bis etwa 3 cm an beiden Stationen oxisch. Darunterliegende Horizonte waren in Boknis Eck anoxisch, während in der Kieler Bucht das Redoxpotential bis zu einer Tiefe von 6 cm positiv blieb. Beide Stationen zeigten einen weitgehend vergleichbaren Verlauf der pH-Profile (Tabelle A6) und der Ammoniumkonzentrationen (Abbildung 4.8), wobei die Ammonium-Konzentration am Standort Boknis Eck über die gesamte Tiefe etwa dreimal so hoch war wie in der Kieler Bucht.

Auch die Profile der Nitratkonzentration zeigten an beiden Stationen einen einheitlichen Verlauf. In der Kieler Bucht zeigte sich ein stark ausgeprägtes Maximum in der obersten Sedimentschicht (0-1 cm), ein weiteres Maximum wurde zwischen 3 und 4 cm gemessen (Abbildung 4.8). Beide Maxima waren auch im NO_3^- -Profil von Boknis Eck nachweisbar, allerdings weniger ausgeprägt. Nitrit konnte an keiner der beiden Stationen in signifikanter Menge im Sediment nachgewiesen werden.

4.3.1.1 Analyse und Identifikation der Isolate

Bei der Diversitätsanalyse nitratreduzierender Bakterien an den Standorten in der Kieler und der Eckernförder Bucht ergab die Fettsäureanalyse von insgesamt 281 Isolaten (z.T. aus Nissen 1998) eine Einteilung in 11 phylogenetische Gruppen nach der euklidischen Distanz von 25, welche als Gattungsgrenze der Isolate angesehen werden kann (Crist et al. 1994, Landry 1996). Den prozentualen Anteil der einzelnen Gruppen zeigt die folgende Abbildung:



Symbol	Bakterielle Fettsäuregruppe	Prozentualer Anteil
■	1 Shewanella-Gruppe	13
■	2 Pseudomonas putida / Aeromonas-Gruppe	4
■	3 Pseudomonas stutzeri-Gruppe	31
■	4 Alteromonas-Gruppe	4
□	5 Vibrio, Listonella, Erwinia-Gruppe	7
■	6 Bacillus megaterium-Gruppe	4
■	7 Bacillus sphaericus-Gruppe	6
■	8 Bacillus und verschiedene andere Gram-Positive	11
■	9 Bacillus lentus-Gruppe	5
■	10 Bacillus mycoides-gruppe	7
■	11 Andere Isolate (jeweils 1-2 Isolate einer Gattung)	8

Abbildung 4.9: Darstellung der prozentualen Verteilung der Isolate auf bakterielle Fettsäuregruppen

Nach dieser Darstellung waren jeweils $\frac{1}{3}$ der Isolate den Pseudomonaden (35% der Gruppen 3 und 4) oder den *Bacilli* (33% der Gruppen 7 bis 11) zuzuordnen. Die größte Einzelgruppe ist die von *Pseudomonas stutzeri*, in der neben dieser Art auch *Pseudomonas mendocina* und *Pseudomonas pseudoalcaligenes* zu finden sind (31%).

Die *Shewanella*-Gruppe teilt sich auf in 9 Isolate der Gruppe *Shewanella putrefaciens* und 29 Isolate, die anhand der Fettsäurebibliothek nicht identifiziert werden konnten (no match), aber in Verwandtschaft zu *Shewanella putrefaciens* stehen. Die *Alteromonas*-Gruppe vereinigt *Alteromonas haloplanktis* und zwei nicht identifizierbare Isolate (no match). In Gruppe 11 sind alle Isolate zusammengefaßt, von denen maximal zwei Vertreter gefunden wurden. Diese Gruppe enthält Vertreter folgender Gattungen: *Clavibacter*, *Rhodococcus*, *Rathayibacter*, *Stenotrophomonas*, *Psychrobacter*, *Moraxella*, *Brevibacillus*, *Nocardia*, und *Gordona*.

Die Gruppe der Gram-positiven Bakterien besteht aus vier verschiedenen Clustern der Gattung *Bacillus* und einer Gruppe, in der neben *Bacillus* zusätzlich *Staphylococcus*, *Arthrobacter*, *Micrococcus* und *Brevibacillus* zu finden sind.

Zusätzlich zu den mit Hilfe der Fettsäureanalyse identifizierten Isolaten wurden 188 weitere Isolate von der Station Boknis Eck nach der Koloniemorphologie in Gruppen eingeteilt und Vertreter dieser Gruppen durch Sequenzierung von 16S rDNA-Sequenzabschnitten phylogenetisch eingeordnet. Das Diversitätsspektrum dieser Isolate beschränkte sich auf zwei Großgruppen und 6 Gruppen mit jeweils einer geringen Zahl von Vertretern. Es wurden 70 Isolate der Gattung *Sphingomonas* gefunden. Von weiteren 96 Isolate der Gattung *Methylobacterium* zeigte eine Gruppe von 77 Isolaten die größte 16S rDNA-Sequenzsimilarität zu *Methylobacterium extorquens* und eine Gruppe von 19 Isolaten zu *Methylobacterium zatmanii* (Tabelle 4.4). Die übrigen 22 Isolate waren in 6 weitere Gruppen geringer Abundanz aufgeteilt.

Die Lebendzellzahlen zeigten an beiden Standorten bis zu einer Tiefe von 6 cm im Sediment signifikante Mengen nitratreduzierender Bakterien. Die höchste Zahl nitratreduzierender Bakterien wurde in der obersten Schicht (10^7 bis $10^8/\text{cm}^3$) gefunden, in einer Tiefe von 6 cm wurden Zellzahlen im Bereich von $10^5/\text{cm}^3$ ermittelt.

4.3.1.2 DGGE-Analyse der Standortgemeinschaft

Die Analyse der Standortgemeinschaft mittels der DGGE auf der Basis amplifizierter *narH*-Genfragmente ergab ein relativ homogenes Bild der Diversität in den Sedimenthorizonten von Boknis Eck (Abbildung 4.10). Zwei DGGE-Banden waren durch alle Horizonte hindurch vertreten, eine weitere Bande war lediglich in der Schicht zwischen 3 und 4 cm nicht nachweisbar. Im mittleren Teil des Gels befanden sich weitere Banden, die in verschiedenen Horizonten präsent waren. Auffällig ist die dominierende Bande im Horizont 4-5 cm, die sich jedoch nicht sequenzieren ließ, was auf die Überlagerung mehrerer Banden hindeutet (**BE2**).

Im Gegensatz dazu zeigt das Profil der Kieler Bucht eine deutliche Stratifizierung im Vergleich der Gemeinschaft in den oberen drei Zentimetern und dem Horizont von 3-5 cm. So finden sich drei Banden **KB1**, **KB3** und **KB4** nur in den oberen Schichten, während zwei weitere Banden **KB2** und **KB5** nur in den darunterliegenden Zonen zu detektieren sind oder von oben nach unten im Sediment deutlich stärker hervortreten.

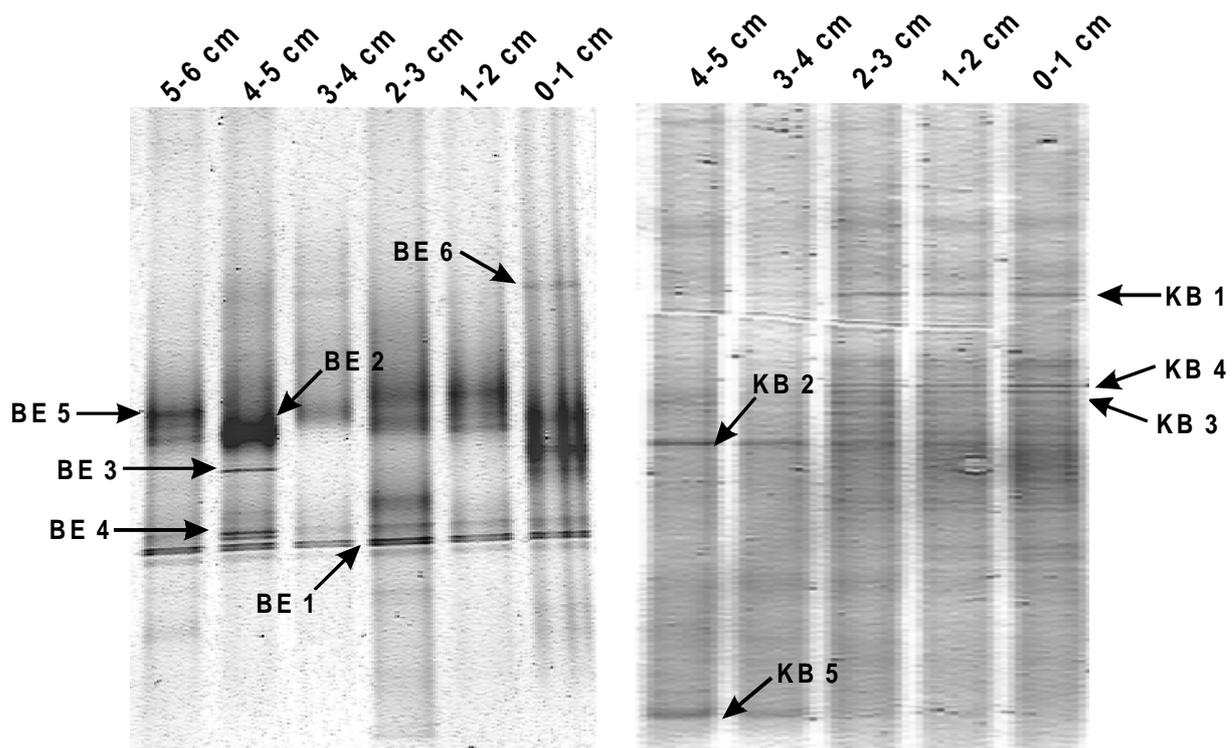


Abbildung 4.10: DGGE-Profil der Probenahmestandorte Boknis Eck (links) und Kieler Bucht (rechts). Die ausgeschnittenen und sequenzierten Banden sind mit einem → gekennzeichnet und mit entsprechender Bezeichnung versehen. Das Bild zeigt ein DG-DGGE-Gel mit Gradienten von 20-80% und überlagertem Acrylamidgradienten 6-8%.

Aus den DGGE-Profilen beider Stationen konnten 7 Banden ausgeschnitten und sequenziert werden. Die Banden wurden in den Stammbaum der Referenzorganismen eingeordnet, sie zeigten jedoch keine nähere phylogenetische Verwandtschaft zu den bekannten Sequenzen (Abbildung 4.11). Zwei Sequenzen bilden eine eigenständige phylogenetische Linie, die mit der Gruppe der β -Proteobacteria assoziiert ist (**BE2, BE4**), vier weitere Sequenzen sind im Bereich der γ -Proteobacteria positioniert (**BE1, BE3, KB1, KB3**). Keine dieser Sequenzen zeigt jedoch eine hohe Similarität zu einer Sequenz der Isolate. Sequenz **KB 2** ist mit der Sequenz von *Haloferax denitrificans* assoziiert und wurzelt tief im Stammbaum.

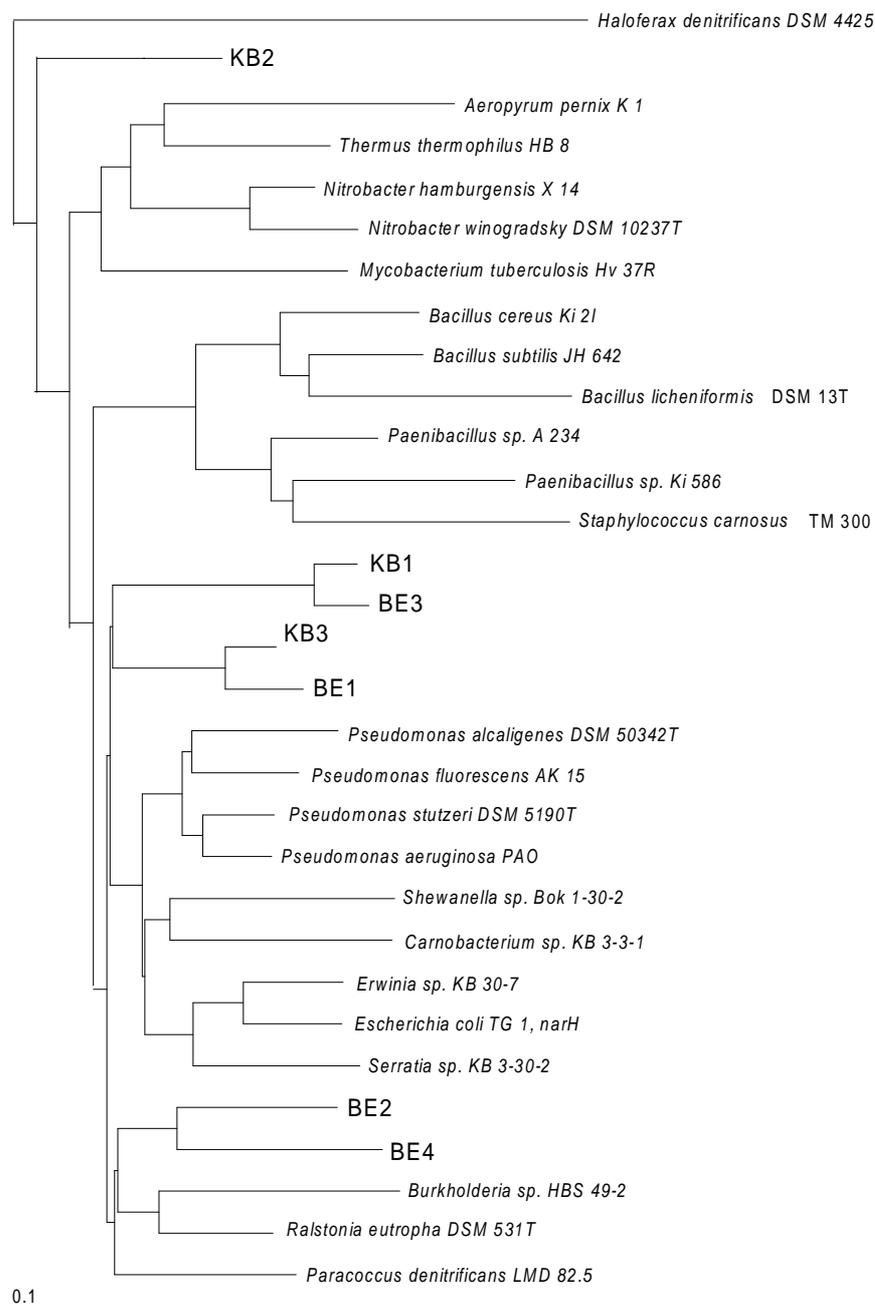


Abbildung 4.11: Stammbaum der *narH*-Sequenzen von DGGE-Banden der Standorte Boknis Eck (**BE**) und Kieler Bucht (**KB**) mit Referenzsequenzen ausgewählter Bakterien

4.3.1.3 SSCP-Analyse der Standortgemeinschaft

In den SSCP-Chromatogrammen der Station Kieler Bucht zeigt sich ein ähnliches Bild wie in der DGGE. Eine Gruppe von 4 Einzelstrangfragmenten mit relativ kurzer Retentionszeit nimmt in ihrer Intensität mit zunehmender Sedimenttiefe deutlich ab, während die Fragmente längerer Retentionszeit vorwiegend in den unteren Horizonten in Erscheinung treten. Einer der Peaks ist in der mittleren Schicht von 2-3 cm am deutlichsten vertreten.

In den Chromatogrammen der Station Boknis Eck zeigt sich dagegen größere Variabilität der verschiedenen Sedimenthorizonte, die im Kontrast zu dem gleichförmigen DGGE-Profil steht. Zu Beginn der Elektrophorese wurde eine Gruppe aus drei Signalen detektiert, die in fast allen Sedimenthorizonten vertreten ist. Dagegen sind im Bereich langer Retentionszeiten nur vereinzelte Peaks zu finden, die sich durch eine geringe Intensität auszeichnen und nur vereinzelt in den verschiedenen Zonen detektierbar sind. Abbildung 4.12 zeigt vergleichend die beiden Chromatogramm-Profile der Stationen Boknis Eck und Kieler Bucht in der westlichen Ostsee.

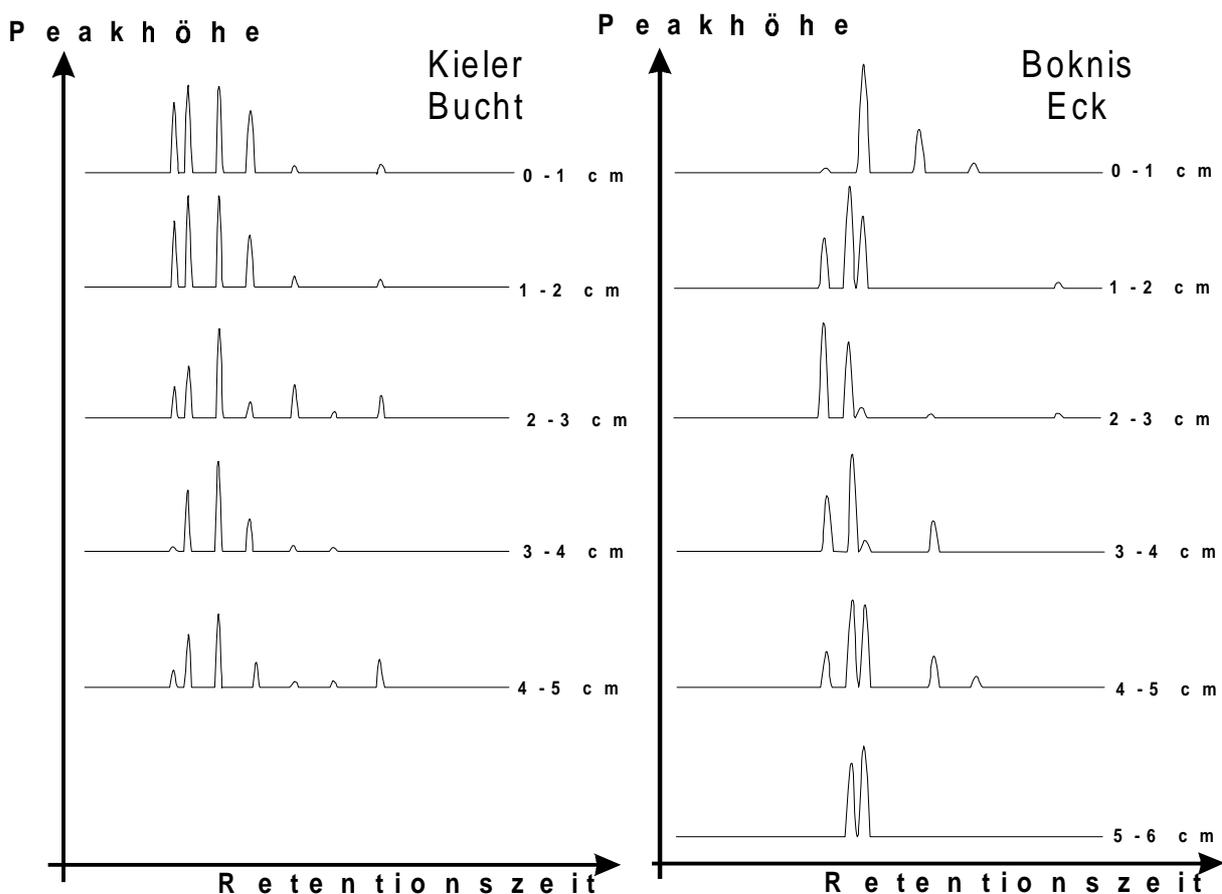


Abbildung 4.12: SSCP-Chromatogramme der Standorte Boknis Eck und Kieler Bucht für Amplifikate der dissimilatorischen Nitratreduktase *narH*

4.3.1.4 T-RFLP-Analyse der Standortgemeinschaft

Die Resultate der T-RFLP-Analysen bestätigen die Analysen der DGGE und der SSCP durch die homogene Verteilung der Restriktionsfragmente über alle Sedimenthorizonte (Abbildung 4.13). Die Restriktion von Standort-DNA aus Boknis Eck ergab insgesamt lediglich vier Fragmente, die in allen Horizonten vertreten sind (mit Ausnahme von Fragment 1, welches in der Schicht 0-1 cm nicht detektiert werden konnte).

In gleicher Weise ist die Trennung zwischen oberen und unteren Sedimentschichten in der Kieler Bucht auch in der T-RFLP nachvollziehbar, die in den oberen Schichten eine geringe Diversität von nur zwei Restriktionsgruppen ergab. Dagegen nimmt die Diversität in den unteren Zentimetern deutlich zu.

Nach der Analyse der Restriktionsschnittstellen innerhalb der DGGE-Sequenzen ist das Restriktionsfragment von 41 bp den Banden **BE1**, **BE3**, **BE5** und **KB3** zuzuordnen, das Restriktionsfragment von 88 bp den Sequenzen **BE4** und **KB1** und das Fragment von 140 bp der Sequenz **KB2**. Die Restriktionsfragmente von 51 bp der Station Boknis Eck und von 69 bp der Kieler Bucht-DNA lassen sich keiner der sequenzierten Banden zuordnen.

Die Gemeinschaft nitratreduzierender Bakterien am Standort Kieler Bucht wird nach den Ergebnissen der T-RFLP und der DGGE demnach von den zwei Organismen dominiert, die den Sequenzen **KB1** und **KB3** zuzuordnen sind und phylogenetisch mit der Gruppe der *γ-Proteobacteria* assoziiert ist. Das gilt insbesondere für die oberen drei Sedimentschichten von 0-3 cm. In den Schichten zwischen 3 und 5 cm treten 2 weitere Banden auf, die zwischen 4 und 5 cm etwa 60 % der Gesamtgemeinschaft ausmachen, während die beiden Fragmente von 41 und 88 bp in diesen Schichten jeweils einen Anteil von etwa 20 % einnehmen.

Die Sedimentschichten von Boknis Eck zeichnen sich durch eine auch mengenmäßig homogene Verteilung der Bakterien aus. Von den vier aufgetrennten Restriktionsfragmenten nehmen die beiden ersten Fragmente (41 und 51 bp) jeweils ca. 30 % an der Gesamtgemeinschaft ein. Da sich das Fragment von 41 bp auf mindestens drei verschiedene Banden aufteilt, läßt sich die Abundanz der einzelnen Banden nicht abschätzen. Dagegen sind die beiden längeren Fragmente von 88 bp und 140 bp jeweils mit etwa 20 % vertreten und stellen somit die Organismen mit der größten Abundanz dar.

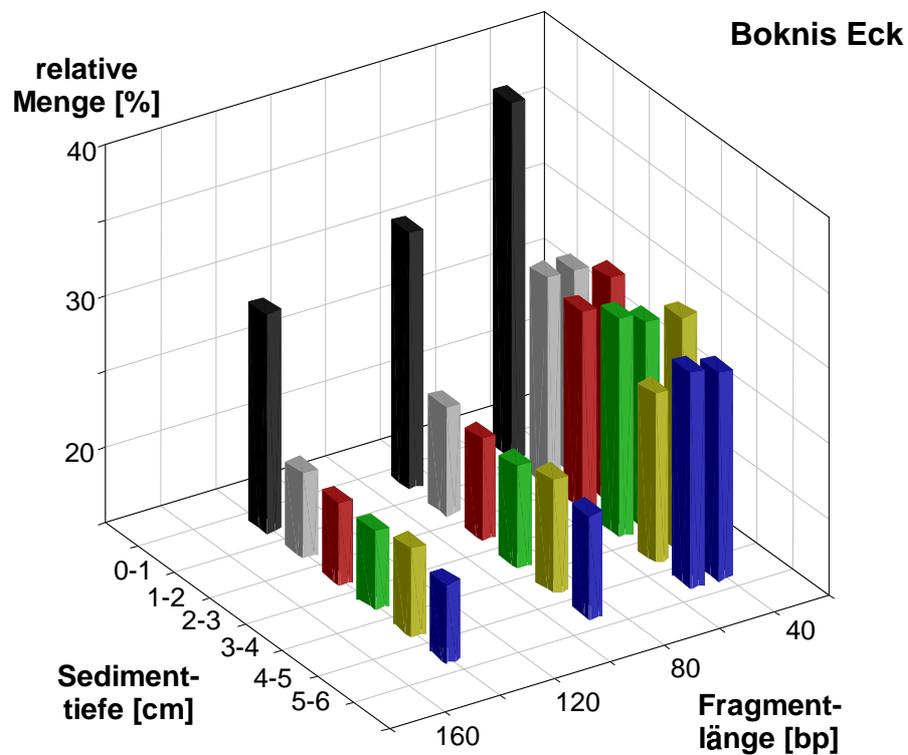
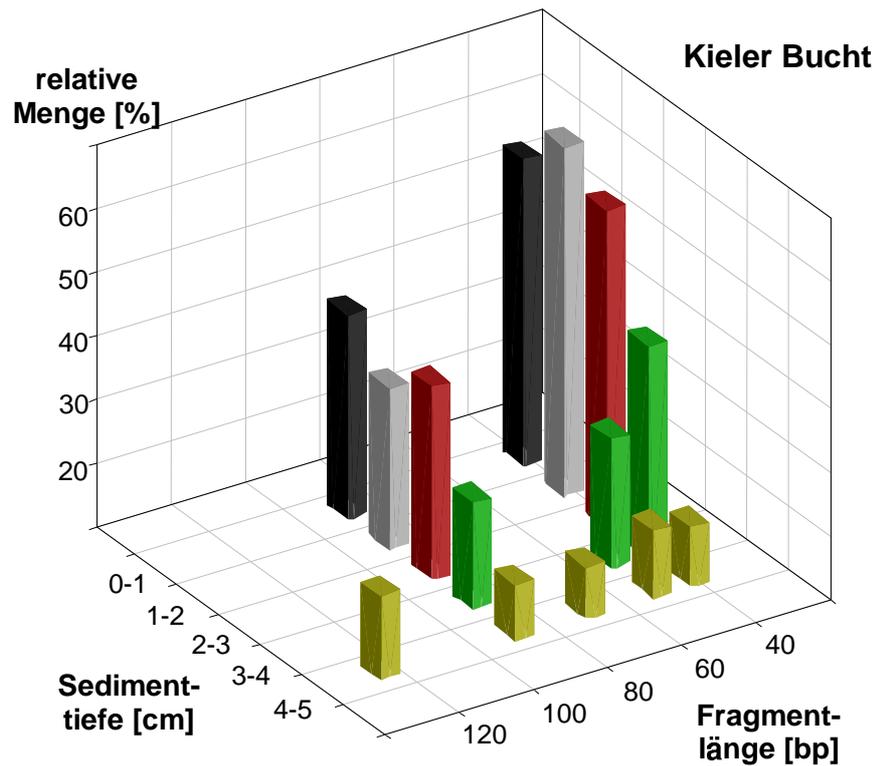


Abbildung 4.13: T-RFLP-Profile der Standorte Kieler Bucht (oben) und Boknis Eck (unten). Die Restriktionsfragmente wurden aus Amplifikaten der dissimilatorischen Nitratreduktase *narH* mit der Restriktionsendonuklease Dpn II (Erkennungssequenz GATC) erzeugt.

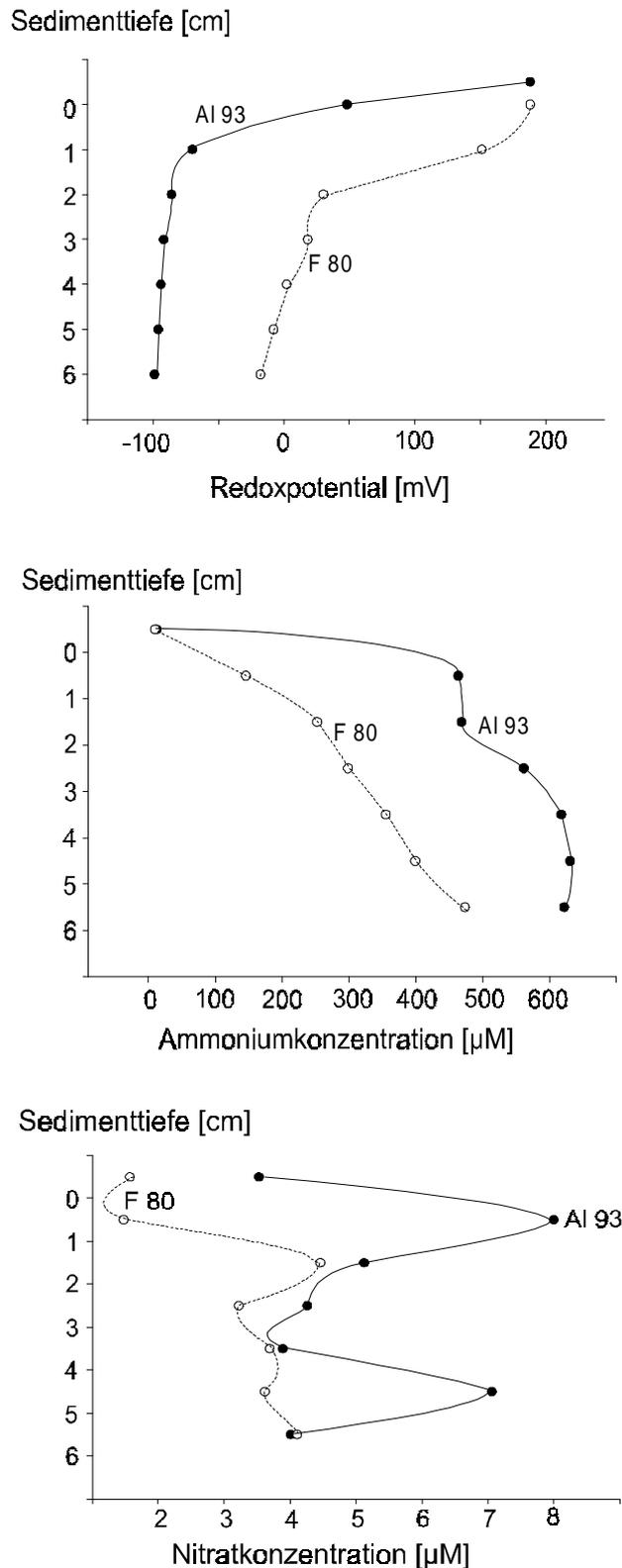


Abbildung 4.14: Die Nährstoff- und Redoxprofile der Stationen AL 93 (●) und F 80 (○)

4.3.2 Standort Gotlandsee

Die Probenahmestelle Gotlandsee umfaßt die Station AL 93 im Gotlandtief und Station F 80 im Farø-Tief. Bei diesen Standorten handelt es sich um Becken der zentralen Ostsee mit einer Tiefe von 240m (Gotlandtief) und 190m (Farø-Tief).

Diese Becken sind durch Schwellen von der westlichen Ostsee und der Nordsee getrennt, die den Einstrom salzhaltigen und sauerstoffreichen Nordseewassers bei normalen Wetterlagen verhindern. Lediglich bei lang anhaltenden, starken Westwindlagen gelangt sauerstoffhaltiges Wasser aus der Nordsee in diese Becken. Solche Salzwassereinbrüche treten in der Regel nur in der Zeit von Oktober bis Januar auf und sind in den letzten 20 Jahren selten vorgekommen. So fand 1993 der erste Salzwassereinbruch nach 16 Jahren statt.

Daher ist das Sediment in diesen Becken durch lang andauernde anoxische Verhältnisse geprägt (Matthäus 1996) und die Standortgemeinschaften an diese Bedingungen angepaßt. Das zeigt sich besonders an den nahezu identischen Redox-Profilen der zwei Standorte, die bereits an der Sedimentoberfläche negative Werte zeigen und innerhalb der ersten 3 cm ihr Minimum erreichen (Abbildung 4.14). Auch die NH_4^+ -Konzentration ändert sich an beiden Stationen in vergleichbarer Weise.

Mit zunehmender Tiefe steigt die Ammonium-Konzentration kontinuierlich an.

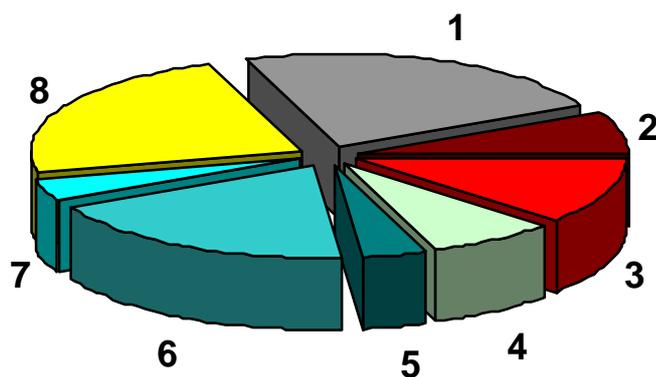
Die Profile der Nitratkonzentration von F 80 und AL 93 sind im Hinblick auf die Lage der Maxima vergleichbar, die Maxima sind jedoch im Profil der Station F 80 um einen Zentimeter nach unten verschoben. AL 93 zeigt signifikante Maxima zwischen 0 und 1 cm und zwischen 4 und 5 cm, das erste Maximum im Profil von F 80 ist ebenso ausgeprägt, befindet sich aber im Bereich 1-2 cm, das zweite, schwächere Maximum ist dagegen in der Sedimentschicht von 3-4 cm lokalisiert.

Auffällig ist insbesondere bei AL 93 die ausgeprägte Stratifizierung der Nitratwerte. So sinkt die Konzentration zwischen den beiden Maxima bei AL 93 wieder auf den Ausgangswert. Dagegen nimmt die Nitratkonzentration an der Station F 80 nach dem ersten Maximum lediglich um ca. 30% ab (Abbildung 4.14). Auch an diesen Stationen konnte kein Nitrit nachgewiesen werden.

4.3.2.1 Analyse und Identifikation der Isolate

Die Diversitätsanalyse mit kulturtechnischen Methoden lieferte bei der Auswertung der Fettsäureanalysedaten ein zunächst ähnliches Bild wie die küstennahen Stationen der westlichen Ostsee. Die Gruppe der Pseudomonaden nimmt einen Anteil von 20% an der Gesamtzahl der Isolate (52) ein, die Gruppe der Gram-positiven Bakterien ist mit 27% vertreten. Die *Shewanella*-Gruppe stellt mit 23% die größte Einzelgruppe. In der Gruppe 8 finden sich die gleichen Gattungen wie in der Gruppe 11 der westliche Ostsee: *Rhodococcus*, *Gordona*, *Nocardia* und *Psychrobacter* (Abbildung 4.15).

Eine genaue Analyse zeigt jedoch, daß sich gerade die Gruppe der Gram-positiven Bakterien signifikant an beiden Standorten unterscheidet. Aus den Sedimenten der tiefen Becken wurde kein Vertreter der Gattung *Bacillus*, die an den Standorten der westlichen Ostsee fast ein Drittel der gesamten Isolate ausmachen, isoliert. Die Gruppe der isolierten Gram-positiven Bakterien besteht an den Standorten der Gotlandsee in erster Linie aus Vertretern der Gattungen *Staphylococcus*, *Cellulomonas* und *Paenibacillus*.



Symbol	Bakterielle Fettsäuregruppe	Prozentualer Anteil
■	1 Shewanella-Gruppe	23
■	2 Pseudomonas putida / Aeromonas-Gruppe	8
■	3 Pseudomonas stutzeri-Gruppe	12
■	4 Brevundimonas-Gruppe	8
■	5 Paenibacillus-Gruppe	4
■	6 Staphylococcus/Cellulomonas-Gruppe	19
■	7 Moraxella-Gruppe	4
■	8 Andere Isolate (jeweils 1-2 Isolate einer Gattung)	22

Abbildung 4.15: Darstellung der prozentualen Verteilung der Isolate auf bakterielle Fettsäuregruppen

Die Lebendzellzahlen an den Stationen der Gotlandsee nehmen im Sedimentbereich von 1 bis 3 cm ein Maximum ($10^7/\text{cm}^3$) an, während in den Schichten darunter und der Sedimentoberfläche Lebendzellzahlen von 10^5 bis 10^6 bestimmt wurden.

4.3.2.2 DGGE-Analyse der Standortgemeinschaft

Die Diversitätsanalyse mittels molekularbiologischer Methoden bestätigt die starke Stratifizierung der Sedimente in der Gotlandsee. So zeigen die Tiefenprofile der Stationen F 80 und AL 93 kaum übereinstimmende Banden in den verschiedenen Sedimenthorizonten, wie das in Abbildung 4.16 dargestellt ist. Die verschiedenen Banden zeigen eine relativ gleichmäßige Verteilung der Intensität; mit Ausnahme der mittleren Horizonte zwischen 2 und 4 cm zeigt keine der DGGE-Spuren eine stark dominierende Bande (Abbildung 4.16). Die DNA aus der Sedimenttiefe 4-5 cm von AL93 ließ sich trotz intensiver Bemühungen nur sehr schlecht amplifizieren; daher zeigen die DGGE, die SSCP und die T-RFLP in diesem Horizont keine detektierbaren Signale.

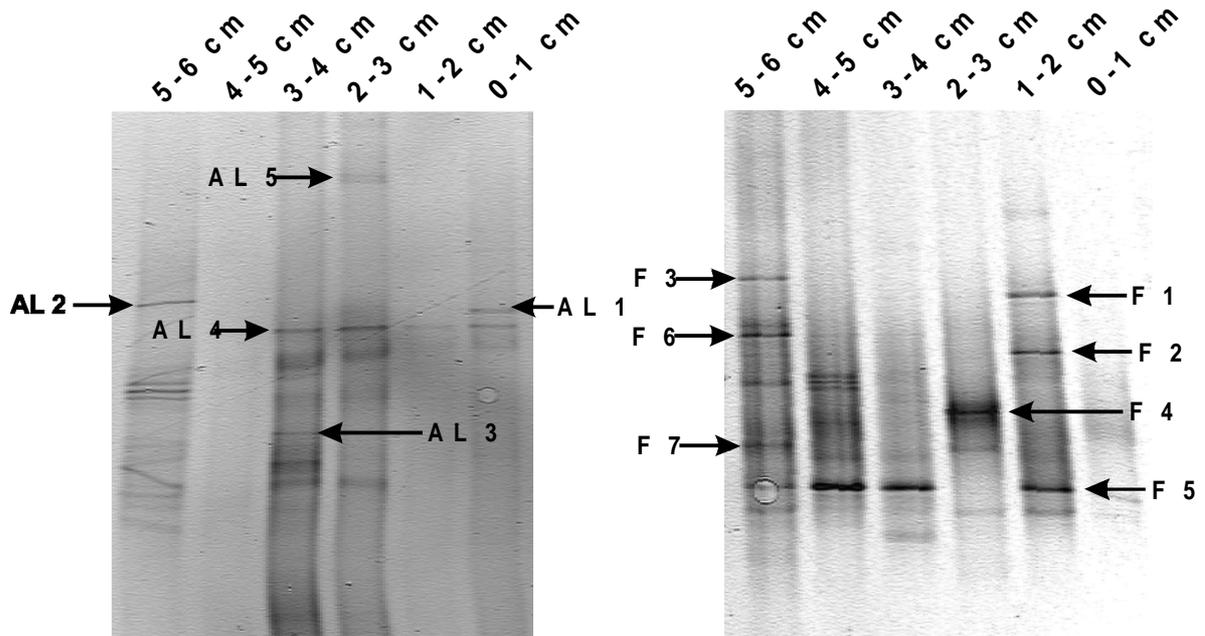


Abbildung 4.16: DGGE-Profil der Probenahmestandorte AL 93 und F 80 auf der Basis von *narH*-Amplifikaten. Die ausgeschnittenen und sequenzierten Banden sind mit einem → gekennzeichnet und mit entsprechender Bezeichnung (**F**) und (**AL**) versehen. Das Bild zeigt ein DG-DGGE-Gel mit Gradienten von 20-80% und überlagertem Acrylamidgradienten 6-8%.

Aus den DGGE-Gelen der Standorte in der Gotlandsee konnten 13 Banden sequenziert und phylogenetisch eingeordnet werden. Wie schon bei den Umweltsequenzen der Standorte der westlichen Ostsee zeigten die Sequenzen keine nähere Verwandtschaft zu bereits bekannten Sequenzen. Abbildung 4.17 zeigt den Stammbaum von Umwelt- und Referenzsequenzen.

Im Stammbaum der *narH*-Sequenzen präsentieren sich die Umweltsequenzen von AL 93 und F 80 als eigenständiges phylogenetisches Cluster.

Der Cluster der Umweltsequenzen ist in drei phylogenetische Untergruppen aufgetrennt. Die Sequenzen des größten Subclusters bilden eine in sich geschlossene Einheit mit relativ großer Similarität zueinander. Diese Sequenzen stammen fast alle von der Station F 80 und sind vermutlich verschiedene Vertreter der gleichen Gattung.

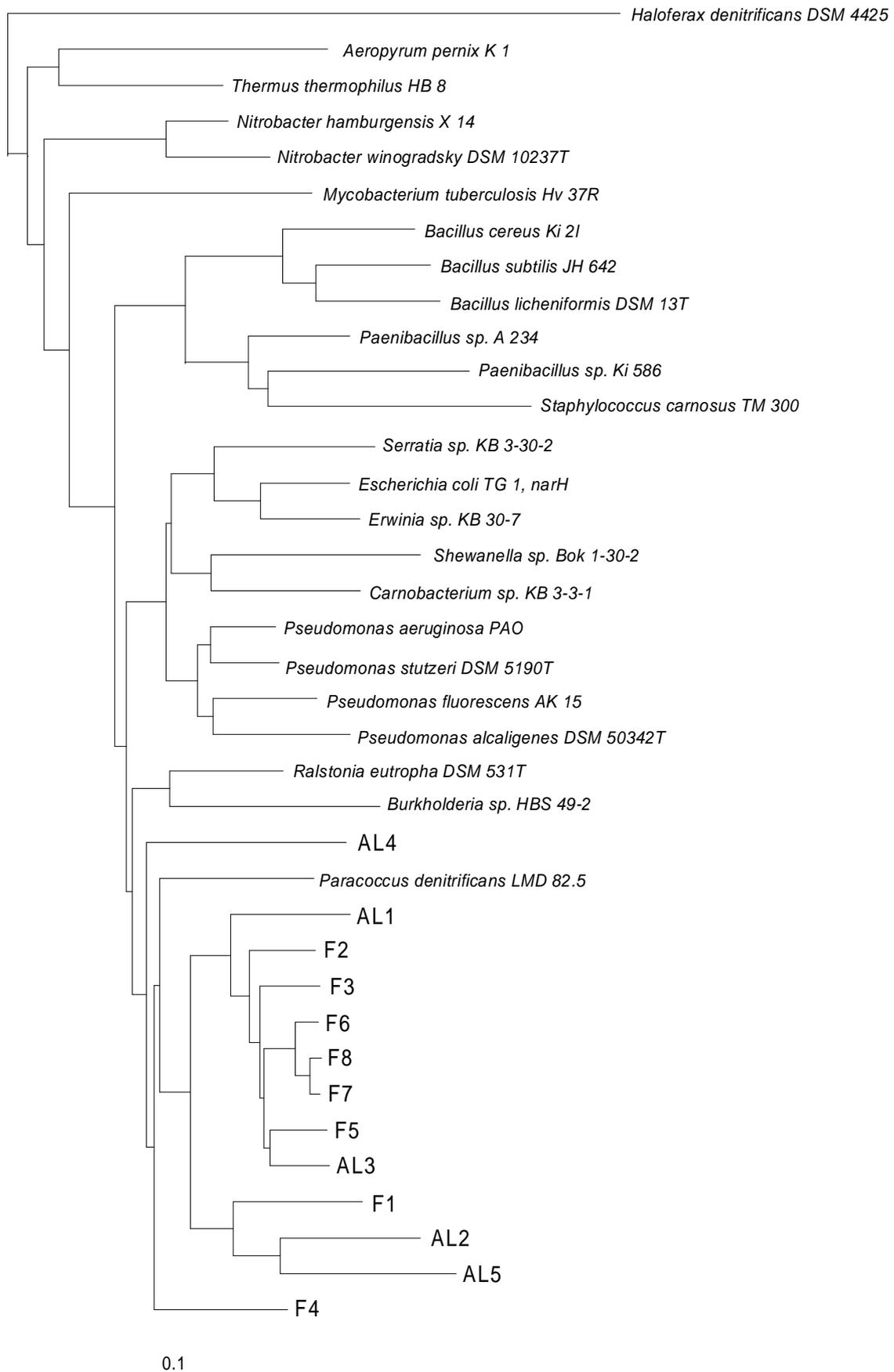


Abbildung 4.17: Stammbaum der *narH*-Sequenzen von DGGE-Banden der Standorte F 80 (F) und AL 93 (AL) mit Referenzsequenzen ausgewählter Isolate

4.3.2.3 SSCP-Analyse der Standortgemeinschaft

Auch die SSCP-Analyse der Nitratreduzierer-Gemeinschaft demonstriert die signifikante Stratifizierung der beiden Standorte (Abbildung 4.18). Insbesondere die Sedimentproben der Station F 80 zeigen wenige übereinstimmende SSCP-Peaks im Vergleich der verschiedenen Horizonte. Weniger deutlich ist diese Stratifizierung in den Horizonten der Station AL 93 wiedergegeben, doch findet sich auch hier eine der Station F 80 vergleichbare Vielfalt der SSCP-Peaks. Beide Stationen weisen in der obersten Sedimentschicht eine sehr geringe Diversität auf, die sich in gleicher Weise in den DGGE-Profilen zeigt.

Im Gegensatz zur DGGE zeigen die SSCP-Chromatogramme jedoch einen Rückgang der Diversität in den untersten Sedimentbereichen (5-6 cm), der in der DGGE nicht detektiert werden konnte.

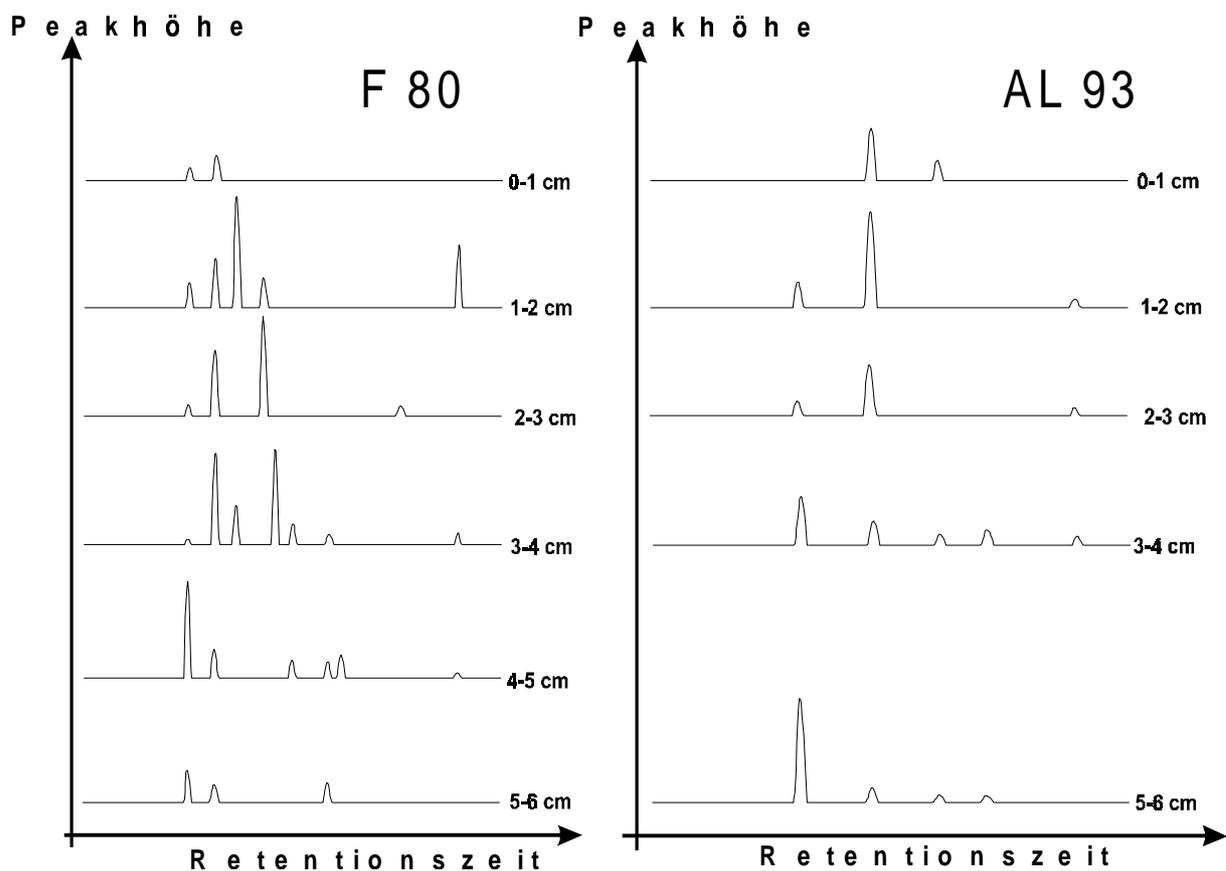


Abbildung 4.18: SSCP-Profile der *narH*-Amplifikate der beiden Stationen F 80 und AL 93

4.3.2.4 T-RFLP-Analyse der Standortgemeinschaft

In gleicher Weise wie die DGGE und die SSCP bestätigen auch die Ergebnisse der T-RFLP die Stratifizierung der Sedimentkerne aus dem Gotland- und dem Farø-Tief. Wie das Beispiel der Station F 80 zeigt, gibt es im Vergleich der unterschiedlichen Sedimenthorizonte nur wenige gemeinsame Restriktionsfragmente amplifizierter *narH*-Gene. Lediglich vier der 10 aufgeführten Fragmente (26bp, 41bp, 69bp und 80bp, durch ◀ in Abbildung 4.19 gekennzeichnet) sind in allen Horizonten vertreten. Desweiteren dokumentiert auch diese Methode eine relativ homogene Verteilung der Spezies-Abundanzen innerhalb der Horizonte.

Ferner weist das T-RFLP-Profil von F 80 einen dem SSCP-Chromatogramm vergleichbaren Rückgang der Diversität in der untersten Sedimentschicht von 5 bis 6 cm auf.

Die T-RFLP-Analyse der Station AL 93 dokumentiert die inhomogene Verteilung nitratreduzierender Bakterien in den verschiedenen Sedimenthorizonten. So ist – wie schon bei der SSCP und der DGGE - in den obersten zwei Zentimetern die Diversität der terminalen Restriktionsfragmente begrenzt, während in der Sedimentschicht 5-6cm 11 Restriktionsfragmente zu detektieren waren. Diese Beobachtungen stehen im Gegensatz zu der Peakverteilung an der Station F 80, bei der die Zahl der Signale in der T-RFLP und der SSCP in den unteren Schichten zurückgeht.

Der größte Anteil der sequenzierten Banden weist eine Dpn II-Restriktionsschnittstelle nach 41 bp auf. Dazu gehören die Banden **F1** bis **F4** und **AL1** bis **AL4**. Die beiden Banden **F6** und **F7** besitzen nach 51 bp eine ACGT-Erkennungssequenz, die Bande **F5** nach 80bp und die Bande **AL5** nach 93bp. Die Gruppe der 41 bp-Fragmente nimmt an der Gemeinschaft einen Anteil zwischen 6 und 22 % an der Station F 80 ein, während an der Station AL 93 zwischen 28 und 65 % aller Nitratreduzierer dieser Gruppe zugeordnet werden können. Die Abundanz der 51 bp-Fragmente liegt zwischen 13 und 22 % (F 80) und das 80bp-Fragmentes repräsentiert zwischen 10 und 16.5 % der Gemeinschaft. Die Bande **AL5**, die nach der DGGE-Analyse nur in dem Sedimenthorizont von 5-6cm detektierbar ist, zeigt sich auch in der T-RFLP als einziges Fragment der Länge 93bp mit einem Anteil von 7.7 % an der Gemeinschaft der Nitratreduzierer.

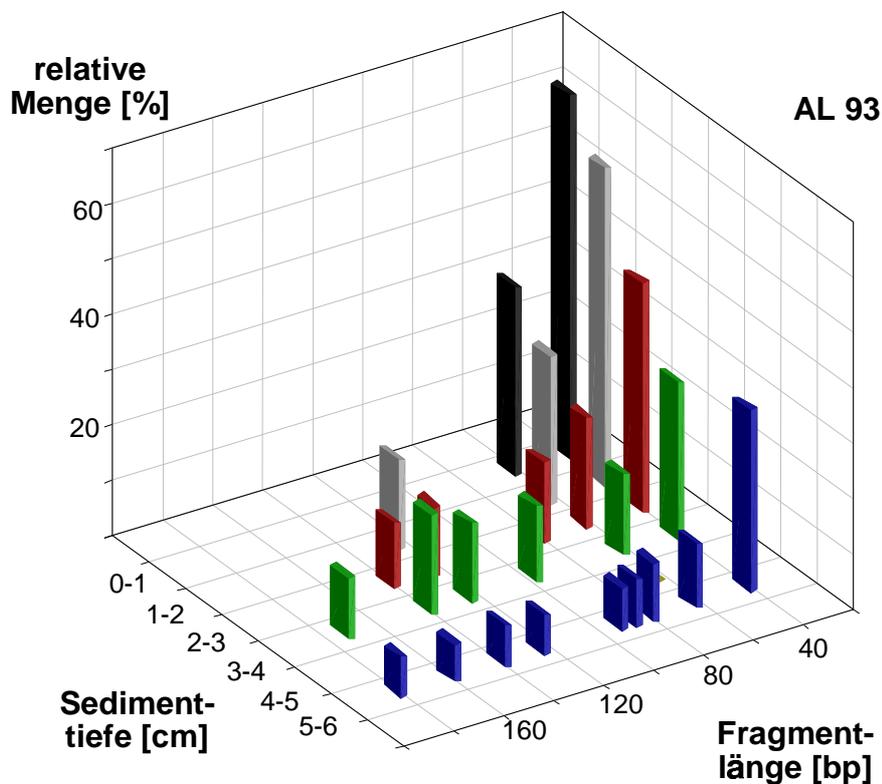
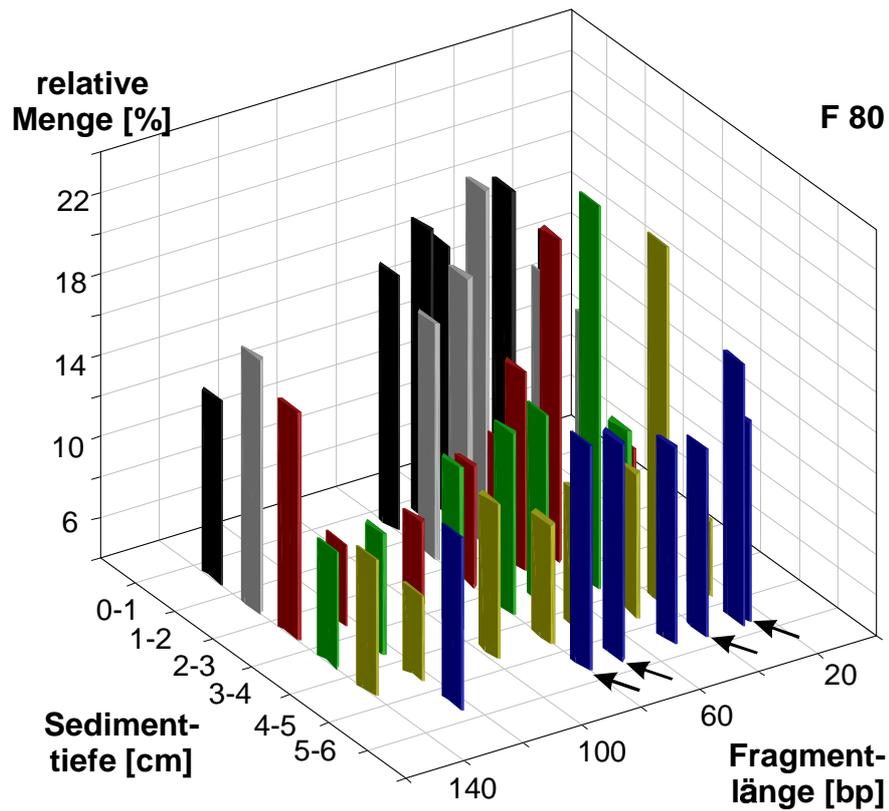
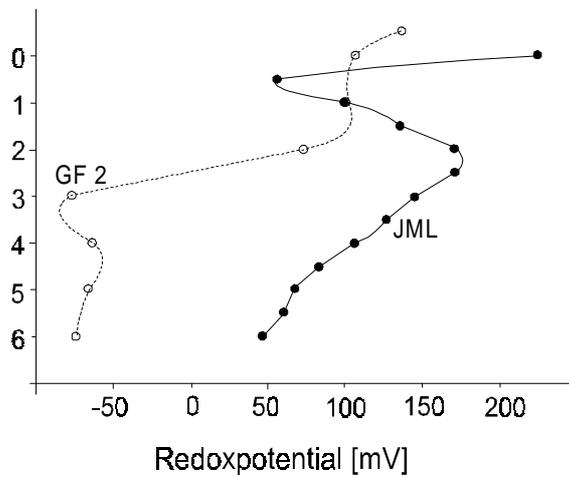
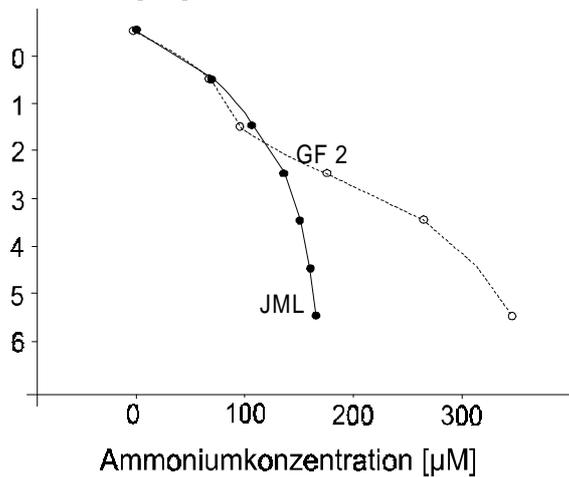


Abbildung 4.19: T-RFLP-Tiefenprofil amplifizierter *narH*-Genfragmente aus den Sedimentschichten der Probenahmestation F 80 (oben) und AL 93 (unten). Die Restriktionsfragmente wurden mit der Restriktionsendonuklease Dpn II (Erkennungssequenz GATC) erzeugt. Die beiden in allen Sedimenthorizonten vorhandenen Restriktionsfragmente sind durch einen ← gekennzeichnet.

Sedimenttiefe [cm]



Sedimenttiefe [cm]



Sedimenttiefe [cm]

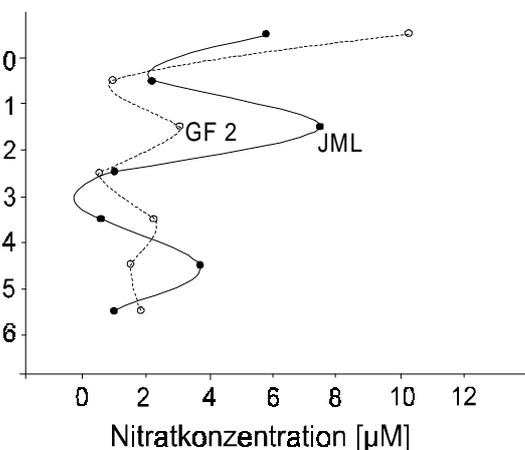


Abbildung 4.20: Die Nährstoff- und Redoxprofile der Stationen JML (●) und GF 2 (○)

4.3.3 Standort finnischer Meerbusen

Die folgenden Ergebnisse beinhalten die Probenahmen von den Stationen JML und GF 2.

Die Stationen des finnischen Meerbusens sind durch eine sehr geringe Salinität gekennzeichnet, die durch den Einstrom von großen Süßwassermengen durch die Flüsse Newa, Narva und Kymijoki hervorgerufen wird. Von den zehn größten Flüssen des Ostseeraumes gehören fünf dem östlichen Einzugsgebiet an, die eine große, zu einem hohen Prozentsatz landwirtschaftlich genutzte Fläche, entwässern. Entsprechend ist der landgebundene Stoffeintrag in dieses Seegebiet ein wichtiger Standortfaktor.

Die Standorte weisen bis zur Sedimentoberfläche eine geringe Sauerstoffsättigung zwischen 8 und 30% auf, doch werden die Verhältnisse im Sediment bereits innerhalb des ersten Zentimeters anoxisch (Abbildung 4.20). Während das Redoxpotential der Station GF 2 bereits nach 3 cm ein Minimum erreicht, zeigt die Station JML ein ausgeprägtes Maximum zwischen 1 und 3 cm. Dieses Maximum fällt räumlich mit einer auffälligen Stratifizierung des Sedimentes zusammen, die durch die unterschiedliche Färbung der Schicht zwischen 1 und 3 cm und den darunter- und darüberliegenden Schichten bereits optisch sichtbar wurde.

Das pH-Profil zeigt dagegen keine vergleichbare Stratifizierung (Tabelle A6 im Anhang).

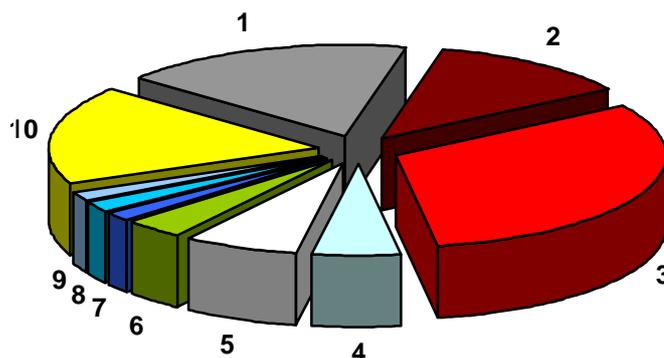
Die Ammoniumkonzentrationen zeigen im Tiefenprofil an beiden Stationen ein den Standorten der Gotlandsee vergleichbares Bild; die Konzentration steigt kontinuierlich bis zur Tiefe von 6 cm an. Der Konzentrationsgradient verläuft im Sediment von JML jedoch deutlich flacher und die Konzentration in 6 cm Sedimenttiefe beträgt nur etwa die Hälfte der Werte der Vergleichsstation GF 2.

Die Nitratprofile der Stationen des finnischen Meerbusens zeigen die gleiche Stratifizierung wie die der Station F 80. Einem signifikanten Maximum im Segment von 1 bis 2 cm folgt ein kleineres Maximum, welches bei JML im Bereich 4-5 cm liegt, während es bei GF 2 einen Zentimeter höher lokalisiert ist.

Im Gegensatz zu fast allen anderen Standorten steigt die Nitratkonzentration im Bodenwasser aus dem Gebiet des finnischen Meerbusens an. An Station GF 2 erreicht die Nitratkonzentration im bodennahen Wasser einen Wert von $10.27\mu\text{M}$, der etwa dreimal so hoch ist wie der höchste im Sediment gemessene Wert an dieser Station. Auch an der Station JML (und in geringerem Maße an F 80) zeigt sich ein signifikanter Anstieg der Nitratkonzentration beim Übergang vom Sediment zum Bodenwasser. Diese auffällige Erhöhung der Nitratkonzentration könnte dem Einfluß des landgebundenen Stoffeintrags zuzuschreiben sein, der sich insbesondere an der Station GF 2 durch die geographische Nähe zur Newa, dem größten Ostseezufluß, auswirken sollte.

4.3.3.1 Analyse und Identifikation der Isolate

Die Fettsäureanalyse der aus den Sedimenten des finnischen Meerbusens isolierten Bakterien ergab eine intermediäre Verteilung bakterieller Fettsäuregruppen im Vergleich zu den anderen Standorten. Die prozentualen Anteile der Gruppen 1-4 und der Gruppe 6 an der Gesamtzahl (47 Isolate) sind im Vergleich zum Standort westliche Ostsee leicht gestiegen. Die Abundanz der Gram-positiven Organismen ist dagegen noch geringer als in der Gotlandsee. Diese Fettsäuregruppe nimmt nur noch 6% an der Gesamtzahl ein; allerdings konnten aus diesen Sedimenten zwei Vertreter der Gattung *Bacillus* isoliert werden, die in der Gotlandsee nicht nachweisbar waren. Zwei neue Gruppen bereichern das Fettsäurespektrum der Isolate, die *Enterobacteriaceae*, die mit den Gattungen *Klebsiella* und *Kluyvera* vertreten sind, sowie die methylothropen Bakterien, die durch zwei Isolate der Spezies *Methylobacterium* sp. repräsentiert sind (Abbildung 4.21). Diese Art kam nach der genetischen Analyse auch in der westlichen Ostsee in signifikanter Abundanz vor, war aber dort nicht über die Fettsäureanalyse identifiziert worden.



Symbol	Bakterielle Fettsäuregruppe	Prozentualer Anteil
■	1 Shewanella-Gruppe	18
■	2 Pseudomonas putida / Aeromonas-Gruppe	12
■	3 Pseudomonas stutzeri-Gruppe	31
■	4 Enterobacteriaceae	5
□	5 Vibrio, Listonella, Erwinia-Gruppe	7
■	6 Methylobacteriaceae	4
■	7 Verschiedene Gram-Positive	2
■	8 Bacillus lentus-Gruppe	2
■	9 Bacillus mycooides-Gruppe	2
■	10 Andere Isolate (jeweils 1-2 Isolate einer Gattung)	17

Abbildung 4.21: Darstellung der prozentualen Verteilung der Isolate auf bakterielle Fettsäuregruppen

4.3.3.2 DGGE-Analyse der Standortgemeinschaft

Die DGGE-Analyse der Standortgemeinschaften im Finnischen Meerbusen auf der Basis von *narH*-Amplifikaten ergab eine ähnliche Stratifizierung der Diversität wie an den Standorten der Gotlandsee. Die beiden Probenahmestellen GF 2 und JML weisen eine steigende Zahl von DGGE-Banden in den mittleren Sedimentschichten von 2 bis 4 cm auf. In beiden Fällen fällt diese Zunahme von *narH*-Banden räumlich mit einem Nitratminimum zusammen (Abbildungen 4.20 und 4.22) und dokumentieren daher die Aktivität von Nitratreduzierern in diesem Tiefenhorizont. Im Gegensatz zu den mittleren Schichten konnten in den darüber- und darunterliegenden Horizonten nur wenige schwache Banden detektiert werden. Das folgende DGGE-Bild zeigt die Diversitätsprofile der Stationen JML und GF 2.

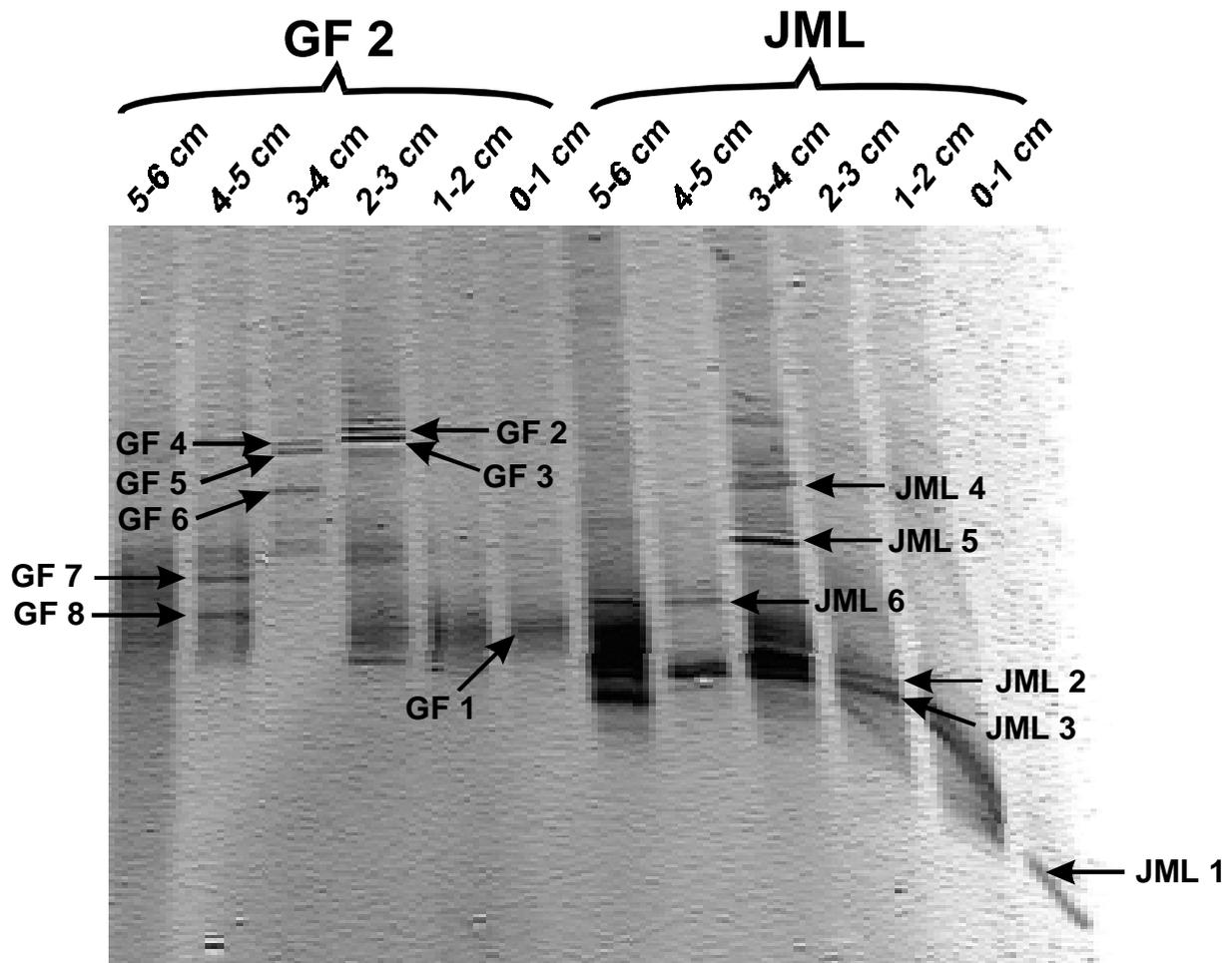


Abbildung 4.22: DGGE-Profil amplifizierter *narH*-Fragmente der Probenahmestandorte GF 2 und JML. Die ausgeschnittenen und sequenzierten Banden sind mit einem → gekennzeichnet und mit entsprechender Bezeichnung (GF) und (JML) versehen. Das Bild zeigt ein DG-DGGE-Gel mit Gradienten von 20-80% und überlagertem Acrylamidgradienten 6-8%.

Aus den DGGE-Gelen wurden 14 Banden ausgeschnitten, davon konnten 13 Banden sequenziert werden. Wie schon bei den Umweltsequenzen aus der Gotlandsee bildet ein Teil der Sequenzen ein eigenständiges phylogenetisches Cluster, das in zwei Subcluster aufgetrennt ist (JML2-4, GF2, GF4 in Abbildung 4.23). Eine weitere Sequenz ist mit der Gruppe der Gram-positiven Organismen assoziiert (GF1). Ähnlich wie im Stammbaum der Umweltsequenzen aus der westlichen Ostsee gibt es auch in diesem Stammbaum zwei Sequenzen, die phylogenetisch der Gruppe der γ -Proteobakterien nahestehen und Bestandteil des Clusters dieser Sequenzen sind. Ein weiteres Cluster steht in Relation zu der Gruppe der γ -Proteobakterien.

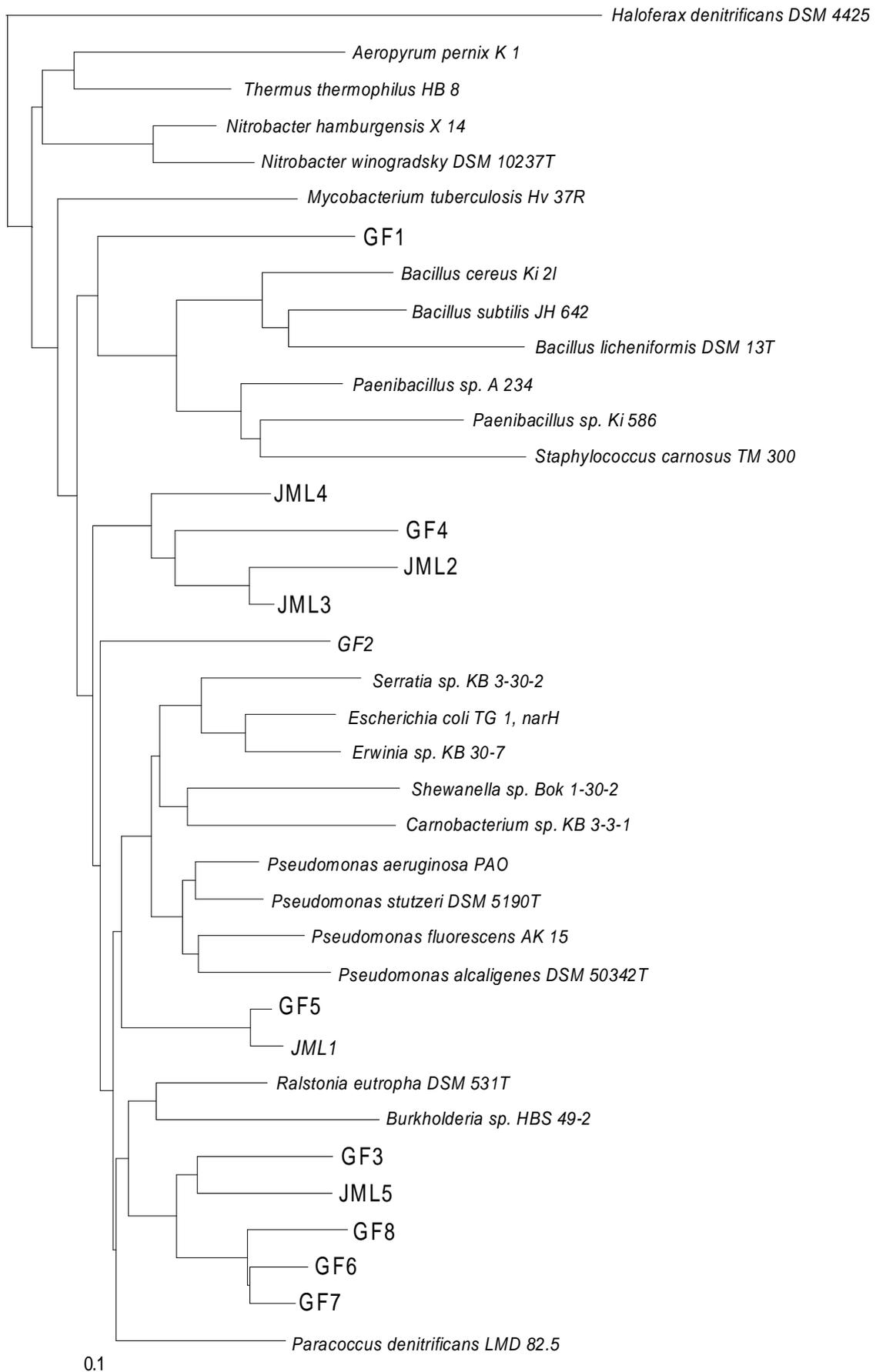


Abbildung 4.23: Stammbaum der *narH*-Sequenzen von DGGE-Banden der Standorte GF 2 (GF) und JML (JML) mit Referenzsequenzen ausgewählter Isolate.

4.3.3.3 SSCP-Analyse der Standortgemeinschaft

Die Analyse der SSCP-Chromatogramme demonstriert die starke Stratifizierung der Sedimentschichten dieser Standorte. Beide Stationen sind durch stark unterschiedliche Diversitätsmuster der Konformationsgruppen von *narH*-Einzelsträngen geprägt (Abbildung 4.24). Das gilt insbesondere für die Station GF 2, die eine Vielzahl von Peaks aufweist, deren Verteilung innerhalb der verschiedenen Sedimenthorizonte stark variiert. Insgesamt zeigt sich an dieser Station eine Zunahme der Zahl an SSCP-Signalen mit zunehmender Sedimenttiefe. Dieses allgemeine Bild unterstützt die Aussage des DGGE-Musters, welches eine vergleichbare Diversitätszunahme aufzeigt.

Eine ähnliche Stratifizierung des Sedimentes zeigen die Chromatogramme auch für die Station JML, allerdings ist die Zahl der detektierten Peaks insgesamt geringer. Im Kontrast zu der DGGE-Analyse ist hier jedoch der mittlere Sedimentbereich durch eine geringe Anzahl an Peaks gekennzeichnet, während in diesem Bereich die meisten DGGE-Banden zu finden sind.

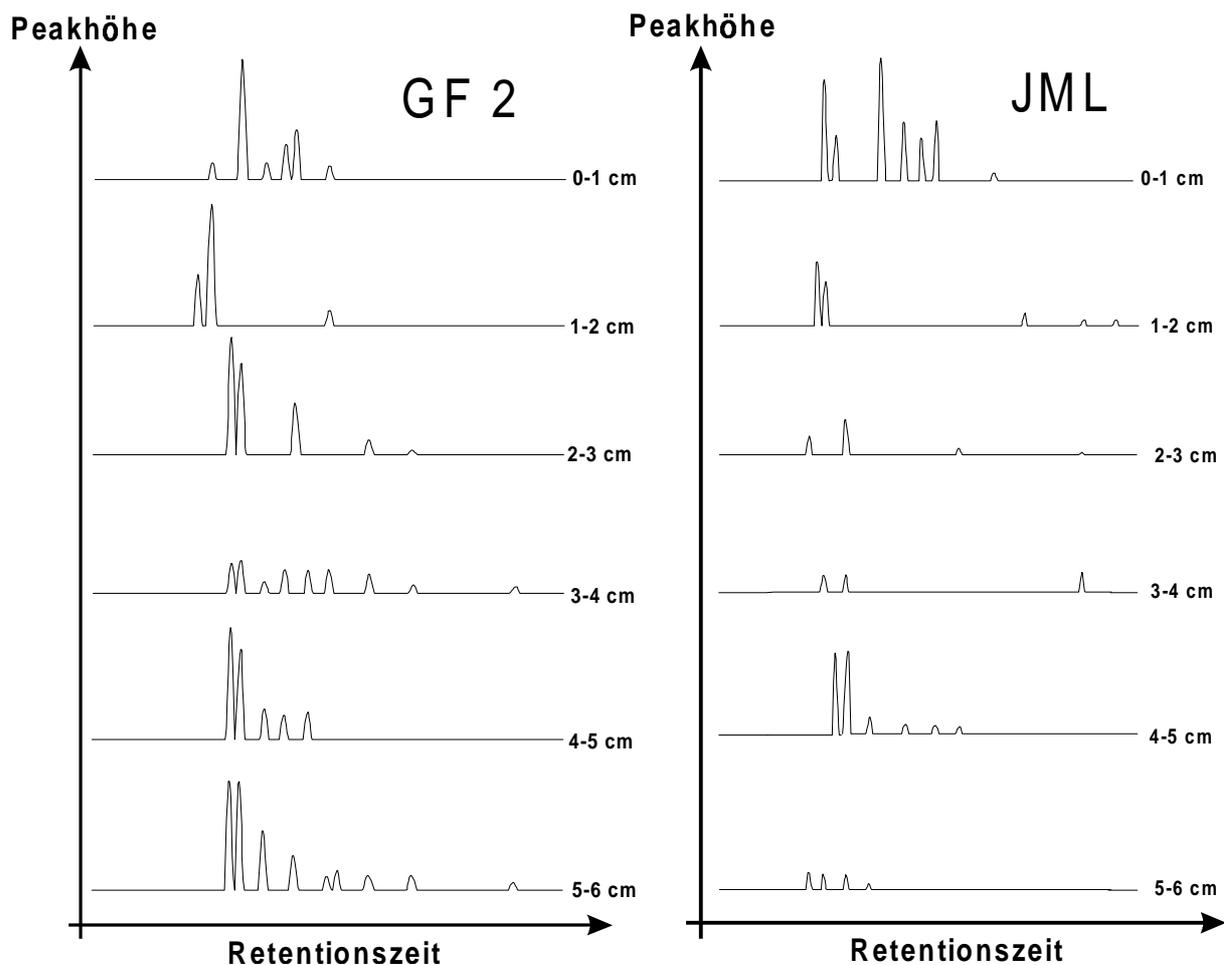


Abbildung 4.24: SSCP-Profilen der Stationen GF 2 und JML auf der Basis amplifizierter *narH*-Fragmente

4.3.3.4 T-RFLP der Standortgemeinschaft

Die aus der DGGE gewonnenen Erkenntnisse werden durch die Ergebnisse der T-RFLP sehr gut ergänzt und unterstützt. Die auffallende Zunahme der Zahl von T-RFLP-Signalen im mittleren Bereich der untersuchten Sedimentkerne weist auf eine Änderung in der Artenzusammensetzung innerhalb dieser Sedimenthorizonte hin. Besonders bei der Analyse der Umwelt-DNA von Station JML wird deutlich, daß die Diversität in den Tiefenhorizonten von 1-4 cm zunimmt. Die dargestellten Restriktionsfragmente mit einer Länge von 140 bis 200 bp (in Abbildung 4.25 durch } hervorgehoben) gehören aufgrund der Lage ihrer Restriktionsschnittstelle zu einer „Restriktionsfragmentgruppe“, die an keiner der anderen Stationen detektiert werden konnte. Darüberhinaus zeigt sich an dieser Station eine gleichmäßige Mengenverteilung der verschiedenen Restriktionsfragmente, die in ähnlicher Weise auch im DGGE-Profil dokumentiert ist.

Die Resultate der T-RFLP-Analyse der Station GF 2 unterstützen die Ergebnisse der DGGE in ausgezeichneter Weise (Abbildung 4.25). Neben der Diversitätsverschiebung im mittleren Segment, die mit beiden Techniken ermittelt werden konnte, zeigt sich das besonders an der stark eingeschränkten Zahl von Restriktionsfragmenten im Sedimenthorizont von 5 bis 6 cm. Diese Schicht ist im DGGE-Gel wie auch in der T-RFLP mit nur zwei Banden vertreten, wobei die Banden im DGGE-Gel über eine gewisse Gelstrecke verschmiert sind und daher nicht deutlich hervortreten.

Wie schon bei den Stationen der Gotlandsee läßt sich die überwiegende Mehrzahl von DGGE-Sequenzen der Fragmentgruppe von 41 bp zuordnen (**GF1**, **GF4-GF7**, **JML1-JML3**), die in der Gemeinschaft der Station JML bis ca. 22% und der Gemeinschaft von GF 2 mit Abundanzen von 8 (0-1 cm) bis 38% (5-6 cm) vertreten ist. **GF2** und **GF3** gehören der 88 bp-Fragmentgruppe an, die einen Anteil von etwa 10% an der Gemeinschaft hat. **GF8** (26 bp) erreicht in den unteren Sedimentschichten Abundanzen von bis zu 61% und ist in den Sedimentschichten von 0-4 cm mit etwa 10% vertreten.

Am Standort JML sind zusätzlich zu den 41 bp-Fragmenten noch ein 63 bp-Fragment (**JML4**) und ein 91 bp-Fragment (**JML5**) Sequenzen aus der DGGE zuzuordnen, die einen Anteil von 15-23% bzw. 9-18% an der Gemeinschaft der Nitratreduzierer ausmachen.

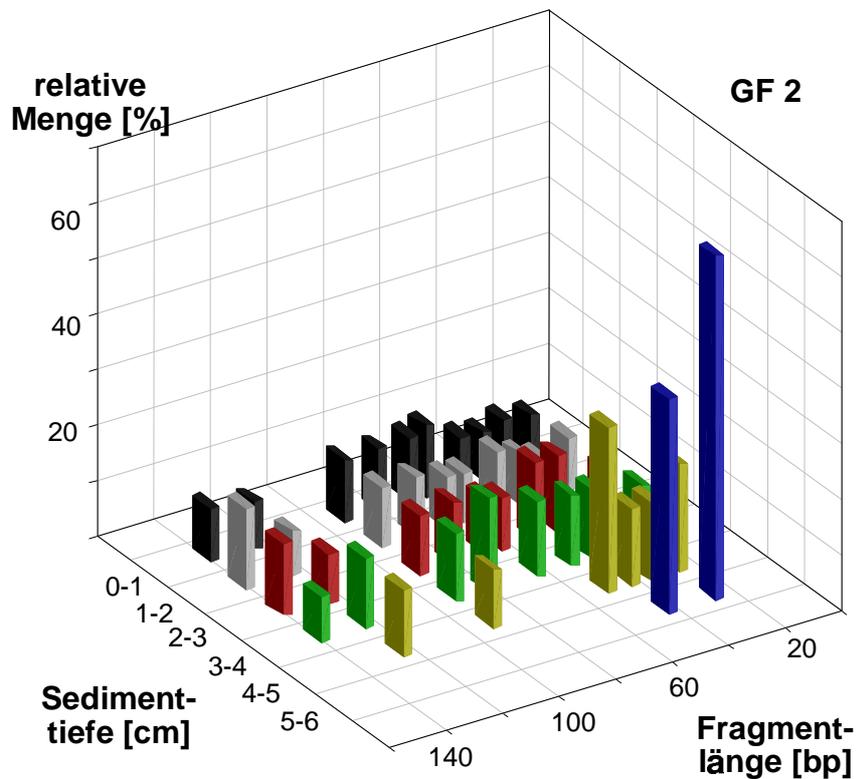
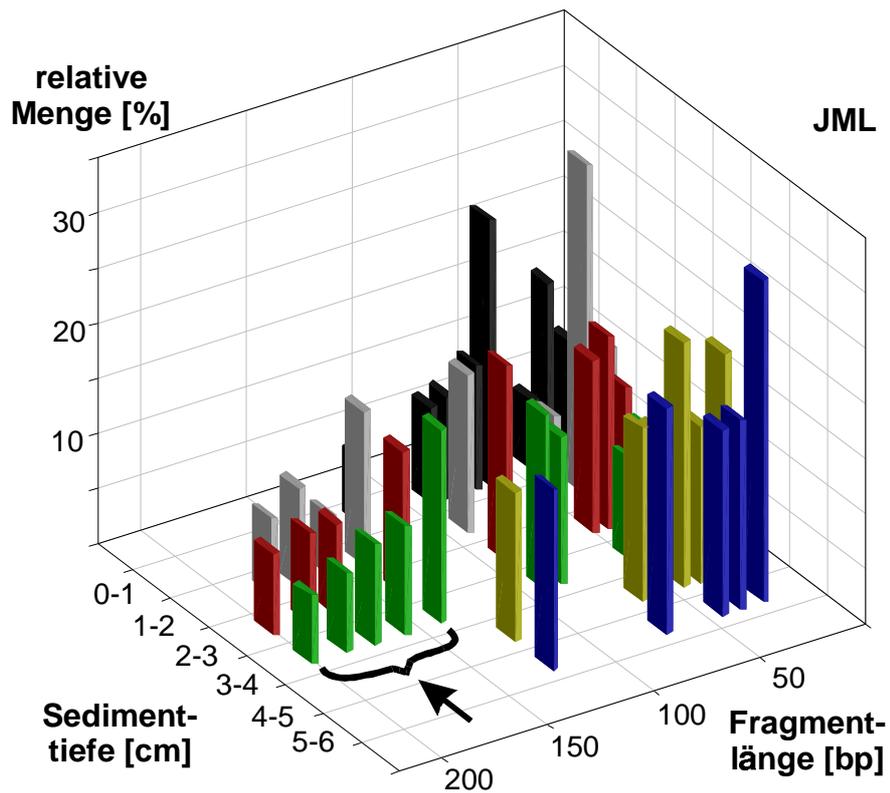


Abbildung 4.25: T-RFLP-Tiefenprofile amplifizierter *narH*-Genfragmente aus den Sedimenten der Probenahmestationen JML und GF 2. Die Restriktionsfragmente wurden mit der Restriktionsendonuklease Dpn II (Erkennungssequenz GATC) erzeugt. Die bei JML nur in den mittleren Sedimenthorizonten vorhandene Gruppe langer Restriktionsfragmente ist durch einen }← gekennzeichnet (s. Fließtext).

4.4 Nitratreduktion durch *Pseudomonas stutzeri* DSM 5190^T

Bei der Anwendung molekularbiologischer Techniken, die auf der Analyse von Standort-DNA beruhen, gehen Informationen über den Aktivitätszustand der Standortgemeinschaft verloren. Zwischen aktiven und inaktiven Zellen kann nicht differenziert werden, da mit den Methoden der DNA-Extraktion aus Standortmaterial auch DNA aus persistierenden und toten Zellen, sowie aus Sporen und Zysten gewonnen wird.

Eine Möglichkeit für die spezifische Erfassung aktiver Zellen bietet die Analyse der Standort-RNA. Dabei liefert die Analyse der ribosomalen RNA einen Hinweis auf wachsende Zellen (die ribosomale RNA wird auch als Zielmolekül bei der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung genutzt), während die Analyse der messenger-RNA (mRNA) als Matrize für aktuell exprimierte Proteine Hinweise auf den physiologisch aktiven Teil der Standortgemeinschaft geben kann. Da die Synthese der mRNA in der Zelle in vielen Fällen durch ein externes Signal, z.B. eine hohe Konzentration eines Nährstoffes wie Nitrat, ausgelöst wird, kann der Nachweis der mRNA für das entsprechende Enzym (z.B. der Nitratreduktase) als Nachweis für die Aktivität der entsprechenden Bakterien genutzt werden. Die mRNA wird dabei in einer RT-PCR in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben, die als Template für die Amplifikation spezifischer Genfragmente eingesetzt wird. Dadurch wird auch der direkte Vergleich der Standort-RNA und der Standort-DNA möglich, um zwischen aktiven und inaktiven Zellen oder Bakteriengruppen zu unterscheiden.

Die mRNA wird in der Regel jedoch innerhalb weniger Minuten nach der Synthese in der Zelle wieder abgebaut, so daß der Nachweis von mRNA gerade in Umweltproben schwierig ist.

In einem Kulturversuch mit *Pseudomonas stutzeri*, einem im Sediment häufig anzutreffenden Denitrifizierer, sollte untersucht werden, inwieweit die Aktivität nitratreduzierender Bakterien anhand der mRNA der dissimilatorischen Nitratreduktase (*narH*) am natürlichen Standort nachvollziehbar ist. Im wesentlichen sollten dabei die Zellparameter (Zellzahl, Biomasse, Zellvolumen), physikalische Parameter (pH, OD) und die Änderung der Nährstoffkonzentrationen als Begleitparameter aufgezeichnet und zur Exprimierung der entsprechenden Proteine für den vollständigen Abbau von Nitrat zu N₂ in Beziehung gesetzt werden. Der Nachweis der Proteinexprimierung sollte durch die Analyse des Proteinmusters und über den Nachweis der mRNA mittels der RT-PCR erfolgen.

Die Reduktion von Nitrat wurde in einer statischen Kultur von *Pseudomonas stutzeri* DSM 5190^T verfolgt.

Zu einer anoxischen 4 Liter-Kultur wurde zu einem Zeitpunkt T_0 Kaliumnitrat in einer Konzentration von 5 mM zugegeben und der Verlauf der Nitratreduktion verfolgt. Als Kohlenstoffquelle stand im Medium (siehe Seite 39) ausschließlich Acetat zur Verfügung. Innerhalb der ersten Stunde wurde die Kultur im Abstand von 10min beprobt (T_0 bis T_6), danach wurden stündlich Proben genommen. Die Einzeldaten der gemessenen Parameter sind in Tabelle A7 im Anhang zusammengefaßt. Die folgenden Abbildung 4.26 zeigt die zeitliche Änderung der Nährstoffkonzentrationen.

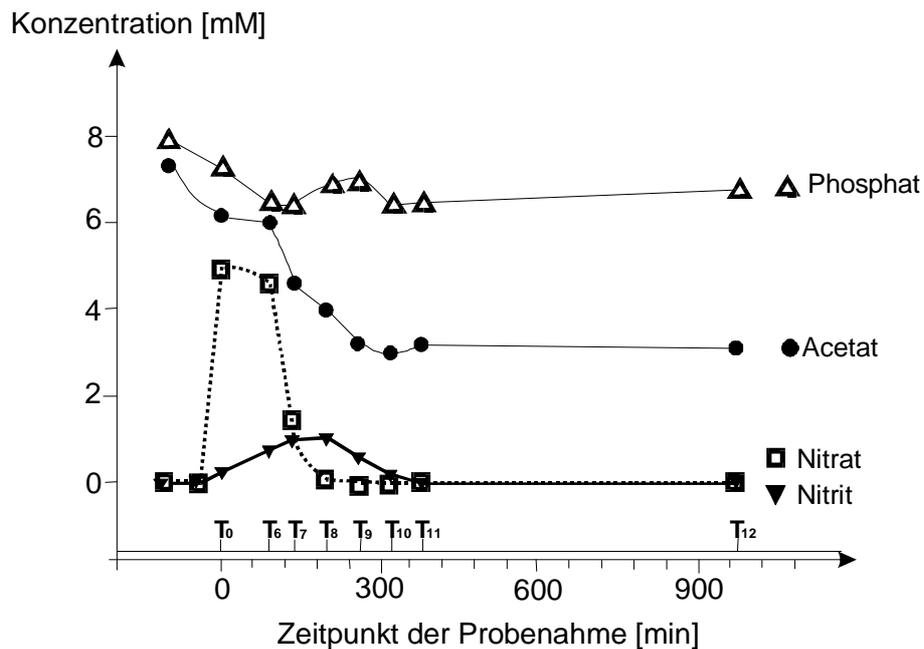


Abbildung 4.26: Darstellung der Nährstoffprofile von Nitrat, Nitrit, Acetat und Phosphat im Verlauf der Nitratreduktion durch eine Kultur von *Pseudomonas stutzeri* DSM 5190^T.

Diese Graphik verdeutlicht, daß *Pseudomonas stutzeri* bereits zum Zeitpunkt T_0 (die Probenahme erfolgte aus praktischen Gründen genau zwei Minuten nach der Zugabe des Nitrats) eine signifikante Menge des Nitrats zu Nitrit reduziert hat (0.23 mM, s. Tabelle A7 im Anhang). Demnach wurde bereits innerhalb der ersten Sekunden nach der Zugabe des Elektronenakzeptors Nitrat reduziert. Dieser Befund wird durch das Ergebnis der RT-PCR bestätigt. In den Proben, die nach der Nitratgabe genommen wurden, konnte die mRNA der Nitratreduktase nicht durch die RT-PCR detektiert werden. Auch das SDS-Gel (Abbildung 4.27) zeigt keine Änderung des Proteinmusters nach der Zugabe des Nitrats. Wäre die Nitratreduktase als Reaktion auf die Nitratzugabe exprimiert worden, müßte sich diese als neue Bande im SDS-Gel nach dem Zeitpunkt T_0 detektierbar sein. Diese Ergebnisse bestätigen die Hypothese, daß die respiratorische Nitratreduktase ein unter anaeroben

Bedingungen konstitutives Enzym ist und folglich unmittelbar für die Reduktion des Nitrats zur Verfügung steht (Körner & Zumft 1989).

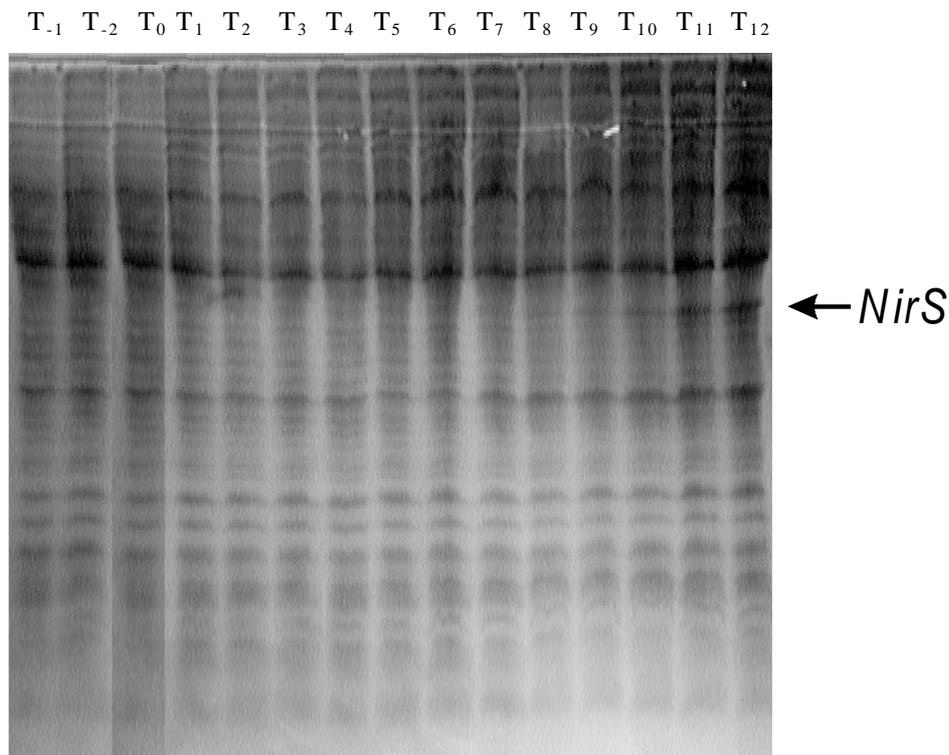


Abbildung 4.27: SDS-Gel der Änderungen des Proteinmusters im Verlauf der anaeroben Nitratreduktion einer statischen, anoxischen Kultur von *Pseudomonas stutzeri* DSM 5190^T

Im Gegensatz dazu scheint die dissimilatorische Nitritreduktase (*NirS*) unter den Reaktionsbedingungen nicht konstitutiv oder in nicht detektierbarer Konzentration vorhanden zu sein. Wie aus dem Proteinmuster zu entnehmen ist (←*NirS*), wird dieses Enzym im Verlauf der zunehmenden Akkumulation von Nitrit in größerer Menge exprimiert (Der Nachweis erfolgte über ein Proteinstandard im Gel). Acetat wurde bis zum vollständigen Verbrauch der verfügbaren Elektronenendakzeptoren verwertet, die Phosphataufnahme der Zellen war dagegen an das Vorhandensein von Nitrat gekoppelt. Durch den Entzug von Nitrat und Nitrit aus dem System stieg der pH-Wert auf fast 9.0 an und wurde durch Zugabe von Salzsäure zum Zeitpunkt T₈ wieder auf einen Wert zwischen 7.6 und 8.0 eingestellt.

Die mittlere Geschwindigkeit der Nitratreduktion lag bei 1.5 mM Nitrat/h, die maximale Reaktionsgeschwindigkeit wurde zwischen T_6 und T_7 mit 4.4 mM Nitrat/h erreicht. Im selben Zeitraum wurde Acetat mit einer mittleren Reaktionsgeschwindigkeit von 1.5 mM/h verwertet, die maximale Umsatzrate zwischen T_6 und T_7 lag bei 3.9 mM Acetat/h. Zwischen T_7 und T_{10} , dem Maximum der Reduktion von NO_2^- , betrug die mittlere Reaktionsgeschwindigkeit 0.51 mM Acetat/h, das Maximum lag im Zeitraum $T_8 - T_9$ mit 0.76 mM Acetat/h.

Unter den vorgegebenen Reaktionsbedingungen (36°C) wurde die Gesamtmenge von 5 mM Nitrat innerhalb von 200 min nach der Zugabe reduziert. Wie in der Graphik 4.27 dargestellt stieg die Zellzahl in der Kultur im gleichen Zeitraum von $2.2 \cdot 10^5$ auf $2.5 \cdot 10^5$ (+10.6%), das mittlere Zellvolumen um 13.3% und die mittlere Biomasse um 18.8%. Im Zeitraum zwischen 200 und 400 Minuten nach T_0 , in dem nur noch Nitrit als Elektronenendakzeptor zur Verfügung stand, lagen die Veränderungen bei +38.5% für die Zellzahl, -13.9% für das mittlere Zellvolumen und +24.6% für die mittlere Biomasse.

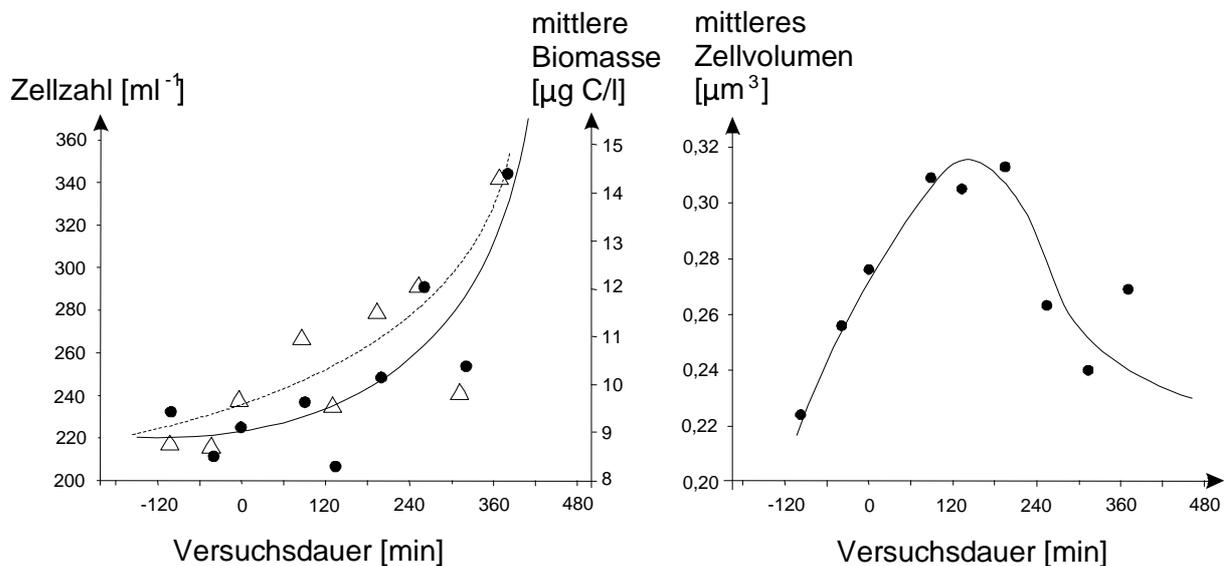


Abbildung 4.28: Darstellung der Änderungen der Zellparameter im Verlauf eines Nitratreduktionsversuches in einer statischen Kultur von *Pseudomonas stutzeri* DSM 5190^T. In der Graphik auf der linken Seite ist die Zellzahl (●) und die mittlere Biomasse (Δ) aufgetragen, in der rechten Graphik das mittlere Zellvolumen

5. Diskussion

Die Analyse natürlicher Bakteriengemeinschaften ist ein extrem komplexes Forschungsfeld, auf dem seit der Einführung molekularbiologischer Methoden stetig neue Entdeckungen gemacht wurden. So ist die Zahl „phylogenetischer Divisionen“ (Hugenholtz et al. 1998) der *Bacteria* auf inzwischen 36 angestiegen; ein weiteres Ansteigen der Zahl ist zu erwarten. Bei aller Euphorie über die neuen Methoden und die daraus resultierenden Entdeckungen neuer Arten, neuer phylogenetischer Linien und neuer Gene ist die Bedeutung der Organismen am Standort, ihre physiologischen Leistungen und die Wechselwirkungen mit ihrer natürlichen Umwelt und mit anderen Organismen lange in den Hintergrund getreten. Erst in jüngster Zeit hat eine Entwicklung eingesetzt, die sich in zunehmendem Maße mit den Fragen nach übergeordneten Zusammenhängen auseinandersetzt und dazu die Erkenntnisse und Methoden der Molekularbiologie und der Biochemie nutzt.

Die Erfassung funktioneller bakterieller Gruppen am natürlichen Standort ist zu einem zentralen Thema der modernen Mikrobiologie geworden. Der Nachweis und die Darstellung der Diversität dieser Gruppen auf molekularer Ebene ergänzt und erweitert den bisherigen Kenntnisstand und kann zu neuen Einsichten in ökologische Zusammenhänge führen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die funktionelle Gruppe nitratreduzierender Bakterien mittels molekularer und kulturtechnischer Methoden untersucht und in Beziehung zu den Standortparametern gesetzt. Zu diesem Zweck wurden neue Techniken entwickelt, die in Abschnitt 5.1 diskutiert werden, es wurde eine Sequenzdatenbank eingerichtet und eine Phylogenie der Nitratreduktase abgeleitet (Abschnitt 5.2) sowie eine Analyse verschiedener Standorte der Ostsee vorgenommen (Abschnitt 5.3).

5.1 Methodische Entwicklungen

Da die physiologische Funktion der Nitratreduktion in einer Vielzahl unterschiedlicher phylogenetischer Linien zu finden ist, war die Entwicklung eines Nachweissystems für nitratreduzierende Bakterien auf der Basis funktioneller Gene von entscheidender Bedeutung. Als Methode für die Analyse der natürlichen Nitratreduzierer-Gemeinschaften wurde die DGGE ausgewählt, die einen direkten Vergleich verschiedener Standorte sowie die Darstellung von Diversitätsunterschieden innerhalb eines Standortprofils erlaubt; diese Technik konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit weiter verbessert werden. Desweiteren kam mit der T-RFLP eine neue Methode zur Quantifizierung der phylogenetischen Gruppe innerhalb der Gemeinschaft zum Einsatz.

5.1.1 Primersystem für Nitratreduzierer

Für die dissimilatorische Nitratreduktion stehen zwei Nitratreduktasen zur Verfügung (*nar* und *nap*). Für beide Enzyme wurden Primersysteme entwickelt, doch basieren die Arbeiten an natürlichen Standorten aus bereits genannten Gründen (Abschnitt 2.6) ausschließlich auf den Genen des membrangebundenen Enzyms.

Ein generelles Problem der Spezifität von Primersystemen für funktionelle Gene ist die Beschränkung der natürlich vorhandenen Sequenzmotive für die Bindung prosthetischer Gruppen auf wenige, immer wiederkehrende Strukturelemente. Da diese Sequenzbereiche konserviert sind, eignen sie sich – häufig als einzige Sequenzbereiche - als Bindestellen für Primer. Da bislang nur ein Bruchteil bakterieller Gene sequenziert ist, kann im allgemeinen nicht ausgeschlossen werden, daß gleiche Bindemotive in anderen Enzymen vorhanden sind und deren Gene bei der PCR mitamplifiziert werden.

Das zeigt sich in der vorliegenden Arbeit daran, daß die Kombination der Primer *narH50F* – *narH590B*, deren Bindestellen in den Cystein-Motiven der FeS-Cluster-Bindung lokalisiert sind, bei den meisten Amplifikationen mehrere Banden lieferte. Diese Einschränkung konnte jedoch durch die Verwendung eines für die Faltung wichtigen Sekundärstrukturelementes als Primerbindestelle Rechnung getragen werden (Primer *narH430B*). Wie die Vergleiche mit den Datenbank-Sequenzen gezeigt haben, ist jedoch diese Bindestelle nicht vollständig konserviert. So weisen *Mycobacterium tuberculosis* Hv 37R und *Aeropyrum pernix* K 1 einen Aminosäureaustausch in diesem Bereich auf. Diese Basenaustausche sind jedoch bei keiner weiteren der 35 Sequenzen der Isolate und Referenzstämme aufgetreten. Das gleiche trifft auch für die Bindestelle von *narH1040B* zu, die ebenfalls in einem wichtigen Strukturelement lokalisiert ist, aber bei verschiedenen Referenzstämmen eine Sequenzvariabilität aufweist.

Im Gegensatz zu den funktionellen Genen anderer bakterieller Stoffwechselgruppen führt die Verbreitung der Nitratreduktion in einer Vielzahl verschiedener Bakterien dazu, daß derzeit nur sehr wenige Bakterien bekannt sind, die definitiv nicht zur dissimilatorischen Nitratreduktion befähigt sind; vielfach handelt es sich dabei um phototrophe Organismen wie *Chlorobiaceae* oder verschiedene *Chromatiaceae* (Betlach 1982). Daher ist die Zahl der möglichen Negativkontrollen für die Primerspezifität eingeschränkt. Wie die Tabellen 4.2 und 4.3 zeigen, lieferten die Amplifikationen aus der DNA dieser Stämme die erwarteten negativen PCR-Ergebnisse.

Die negativen Ergebnisse der Amplifikationen aus der DNA von *Flexibacter canadensis* DSM 3034^T, *Cytophaga johnsonae* Ki 4y und *Zoogloea ramigera* DSM 287^T sind auf den

ersten Blick überraschend, da diese Arten als Denitrifizierer bekannt sind. Bei diesen Arten ist die Fähigkeit zur Nitratreduktion jedoch abhängig vom Stamm, während die Fähigkeit zur Reduktion von Nitrit und Distickstoffmonoxid durch die entsprechende Enzymausstattung bei allen Stämmen dieser Arten gewährleistet ist.

Da die Nitratreduktion durch die assimilatorische oder die periplasmatische Nitratreduktase erfolgen kann, ist die Isolierung von Bakterien, die nicht über die membrangebundene Nitratreduktase verfügen, auf nitrathaltigen Medien wahrscheinlich. Daher können PCR-Ergebnisse einiger auf nitrathaltigen Medien gewachsener Isolate (*Methylobacterium extorquens* Bok 3-3-9, *Sphingomonas* sp. Bok 20-3-6 oder *Pseudomonas asplenii* DSM 50254^T) negativ sein. Zu dieser Gruppe von Isolaten dürften auch Bakterien gehören, die unter anaeroben Bedingung gären und andere Bestandteile der Komplexmedien verwerten.

Der Datenbankvergleich zeigt, daß die Bindestellen der Primers *narH50F* und *narH590B* in allen Bakterien, die die Gene der membrangebundenen Nitratreduktase tragen, vorhanden sind. Dabei unterliegt die Amplifikation mit dem Primer *narH590B* den oben beschriebenen Einschränkungen. Aufgrund der hohen Spezifität unter stringenten PCR-Bedingungen, sowie einer für die anschließende DGGE-Analyse optimalen Fragmentlänge von ca. 400 bp wurde das Primerpaar *narH50F* – *narH430B* für die Untersuchung von Umweltproben eingesetzt.

Generell muß bei der Analyse von Standortgemeinschaften ein Kompromiß zwischen der Stringenz der Primer und dem Spektrum der damit nachweisbaren Bakterien eingegangen werden. Bei weniger stringenten Bedingungen können mit diesem System auch Bakterien detektiert werden, die in einem der Primerbereiche Sequenzvariationen aufweisen, wie der C→T-Austausch bei *Mycobacterium tuberculosis* Hv 37R im Primerbereich von *narH430B*, es können aber auch Bakterien erfaßt werden, die nicht der Gruppe der Nitratreduzierer zuzuordnen sind.

Im Rahmen der Standortuntersuchungen wurde der Spezifität des eingesetzten Primersystems eine höhere Priorität eingeräumt, so daß die Diversität der Nitratreduzierer möglicherweise größer ist als mit dieser Methodik ermittelt. Durch die Spezifität des Systems zeigten jedoch alle sequenzierten Banden der DGGE die höchste Sequenzsimilarität zu den *narH*-Sequenzen der Referenzstämmen und der Datenbank-Sequenzen. Angesichts der Erkenntnisse aus der phylogenetischen Analyse des *narH*-Gens kann damit eine Zugehörigkeit der Sequenzen zu der Gruppe der *narH*-Gene als gesichert gelten.

5.1.2 Diskussion der DG-DGGE

Wie die Abbildungen 4.2 und 4.3 demonstrieren, führt der Einsatz der Doppelgradiententechnik zu einer deutlich erhöhten Auflösung und signifikant besserer Trennleistung der Gele. Damit sind die Voraussetzungen für die Gewinnung von Sequenzinformation aus DGGE-Gelen erheblich besser als bei herkömmlichen Gelen.

Ein großer Vorteil ist die Trennung von Fragmenten, die den hypervariablen Bereich der 16S rDNA umfassen. Dieser Genabschnitt eignet sich in idealer Weise für phylogenetische Untersuchungen eng verwandter taxonomischer Gruppen (z.B. die der Pseudomonaden), die sich nur in diesem Abschnitt der 16S rDNA soweit unterscheiden, daß eine Differenzierung auf Spezies-Niveau möglich ist.

Nach theoretischen Überlegungen zur Technik der DGGE beruht das „Versmieren“ der Banden in herkömmlichen DGGE-Gelen darauf, daß die Mobilität der aufgeschmolzenen Fragmente zwar auch in den bisher verwendeten Gelen stark eingeschränkt, aber nicht vollständig behindert wird. Dadurch können auch bereits denaturierte Fragmente im Verlauf der 18-stündigen Elektrophorese noch geringfügig wandern, was zu einer Verbreiterung der Banden führt. Ist diese Bewegung durch eine zusätzlich verringerte Porengröße unterbunden, wird das PCR-Fragment im vorhandenen Gelraum aufkonzentriert und die Banden treten schärfer hervor.

Einige grundsätzliche Einschränkungen, denen die DGGE-Technik als solche unterliegt, sind jedoch auch mit der Doppelgradiententechnik nicht zu umgehen. Während die variablen Sequenzbereiche der 16S rDNA mit der DG-DGGE auftrennbar sind (Abbildung 4.2), ist der Denaturierungsmittelgradient dieser Gele von 40-64% nicht auf die Auftrennung von Amplifikaten funktioneller Gene übertragbar. Das liegt in erster Linie an der hohen Sequenzvariabilität innerhalb der Gene, die wiederum in der nicht-letalen Austauschbarkeit der dritten kodierenden Nukleotide (der „wobble“-Position) begründet ist. Die selbst bei verschiedenen Individuen der gleichen Spezies vorkommende Sequenzvariabilität kann zu einer Verbreiterung der Banden und zu einem Verlust an Auflösungskapazität führen. Diese Probleme sind jedoch den Amplifikaten immanent und können daher auch mit der DG-DGGE nicht vollständig gelöst werden, auch wenn eine Erweiterung des Denaturierungsmittelgradienten zu überzeugenderen Ergebnissen führt (siehe Abbildungen 4.10, 4.16 und 4.22). Die Auftrennung von Amplifikaten funktioneller Gene wurden daher mit einem erweiterten Denaturierungsmittelgradienten von 20-80% durchgeführt (siehe 4.3).

5.1.3 Diskussion der T-RFLP

Die T-RFLP hat seit dem Erscheinen der Publikation von Liu et al. (1997) einen festen Platz in der Analyse der Diversität bakterieller Gemeinschaften eingenommen. Dafür gibt es verschiedene Gründe: die relativ einfache Durchführung der Technik ohne allzu großen apparativen Aufwand, die niedrige Detektionsgrenze für die markierten Produkte, die Möglichkeit zur Anwendung der Technik auf alle Standorte und auf funktionelle Gene sowie die Möglichkeit zur quantitativen Erfassung der Diversität, die bisher nur über die FISH (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung) möglich war.

Insgesamt hat sich die Durchführung nach dem in Abbildung 4.4 beschriebenen Weg A mit einer der Restriktion vorangehenden Amplifikation durchgesetzt, nachdem sich gezeigt hatte, daß die Primer-Extension keine detektierbare Menge der Restriktionsfragmente erzeugte. Das liegt im wesentlichen an der im Vergleich zum exponentiellen Reaktionsverlauf deutlich schlechteren Ausbeute eines linearen Reaktionsverlaufes. Die damit für diese Prozeßführung benötigte große DNA-Menge führte vermutlich zu einer Blockierung des Restriktionsenzym, so daß weitere Versuche an Umweltproben nach der Methode von Liu durchgeführt wurden.

Neben den ersten Versuchen im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde und wird jedoch auch in anderen Arbeitsgruppen intensiv an der Möglichkeit geforscht, den Weg B (Abbildung 4.4) zu beschreiten, um mögliche Verschiebungen durch die PCR zu unterbinden (H. Lüdemann, MPI für terrestrische Biologie, Marburg, pers. Mitteilung). Um die Menge der so entstehenden Fragmente über die Detektionsgrenze der eingesetzten Sequenziergeräte zu heben, könnte eine erheblich höhere Zyklenzahl der Primer-Extension zum Erfolg führen, die mit den heutigen Polymerasen erreichbar sein sollte.

Trotz dieser Einschränkung hat die Möglichkeit zur Quantifizierung von Genen in Umweltproben wesentlich zum Erfolg der Technik beigetragen. Durch die Einführung der T-RFLP läßt sich eine der größten Einschränkungen der FISH umgehen: die Beschränkung auf die 16S RNA.

Wie bereits in der Einleitung und im Abschnitt 2.4 erläutert, ist ein wesentlicher Teil der funktionellen bakteriellen Gruppen nicht in ihrer Gesamtheit über die 16S rDNA erfaßbar. Diese Gruppen lassen sich aber auch nicht über ihre funktionellen Gene durch die in-situ-Hybridisierung quantifizieren, weil deren mRNA für eine Detektion zu instabil ist; sie wird innerhalb von Minuten abgebaut. Diesen Einschränkungen begegnet die T-RFLP dadurch, daß die DNA detektiert wird, die von dem Aktivitätszustand der Organismen unabhängig ist. Damit lassen sich auch funktionelle Gene in einer Umweltprobe quantifizieren, selbst virale

Gene können möglicherweise detektiert und quantifiziert werden. Das gleiche gilt für Organismen, in denen eine starke Autofluoreszenz die Detektion durch die FISH erschwert (in erster Linie phototrophe Organismen) oder für Standorte, die durch eine hohe Partikelbelastung die Fluoreszenzsignale überlagern (z.B. Sediment- oder Bodenproben). Erste Publikationen mit der Anwendung der T-RFLP auf funktionelle Gene sind bereits erschienen (Horz et al. 2000).

Ein weiterer Vorteil der T-RFLP ist die Möglichkeit, diese Technik in Kombination mit der DGGE auf die identische Standort-DNA anzuwenden. Das unterbindet Probleme der Mikroheterogenität, die möglicherweise Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen der DGGE und der FISH hervorrufen kann. Darüber hinaus bietet die T-RFLP die Möglichkeit, eine Anzahl unterschiedlicher Gruppen oder Arten gleichzeitig zu identifizieren, was durch die Anwendung spezifischer Sonden in der FISH nur bedingt möglich ist.

Ein Nachteil der T-RFLP ist die fehlende Möglichkeit zur Unterscheidung zwischen der aktiven und der inaktiven Fraktion der Bakteriengemeinschaft auf der Basis von DNA-Proben. Es kann nicht unterschieden werden, ob es sich bei der detektierten DNA um solche aus lebenden Organismen handelt oder um freie DNA aus bereits lysierten Zellen. Dieser Einschränkung kann jedoch Rechnung getragen werden, wenn statt der DNA die Gesamt-RNA aus den Umweltproben isoliert und in einer RT-PCR in cDNA umgeschrieben wird. Die Anwendung der T-RFLP auf diese cDNA würde den direkten Vergleich der aktiven und der inaktiven Fraktionen der Bakteriengemeinschaft ermöglichen.

Generell ist bei der Anwendung der T-RFLP zu berücksichtigen, daß die Zuordnung der Restriktionsfragmente zu bestimmten Gattungen und Arten nur erfolgen kann, wenn entsprechende Sequenzinformation zur Verfügung steht oder eine große Datenbank Vergleiche erlaubt.

Aus der obigen Diskussion wird deutlich, daß die T-RFLP die Methoden der Gewinnung von Sequenzinformation aus Umwelt-DNA oder RNA, die Klonierung und die DGGE, in idealer Weise ergänzt. Es könnte sich mit dieser Technik eine Verbindung zwischen Diversität und Funktion von Bakteriengemeinschaften herstellen lassen, indem die Dynamik einer Gemeinschaft durch gezielte Manipulation anhand von Modellsystemen analysiert und damit die Reaktion der Gesamtgemeinschaft, wie auch einzelner funktioneller Einheiten, auf Umwelteinflüsse beleuchtet wird.

5.2 Phylogenie nitratreduzierender Bakterien

5.2.1 Phylogenie des *narH*-Gens und der Vergleich zur 16S rDNA

Für die Analyse der auf *narH* basierenden Phylogenie der Bakterien wurde soweit möglich die Primerkombination *narH50F* – *narH1040B* gewählt, um maximale Sequenzinformationen zu erhalten. Die aus dieser Analyse erhaltene Sequenzinformation von etwa 1000 Basenpaaren ist eine für die phylogenetische Analyse ausreichende Länge, die zudem alle funktionellen Genbereiche der β -Untereinheit des *nar*-Genclusters einschließt.

Die phylogenetische Analyse zeigt eine kongruente Entwicklung des *narH*-Gens und der 16S rDNA, die durch die weitgehend übereinstimmende Topologie der resultierenden Stammbäume (Abbildung 4.6) demonstriert wird. Die Kongruenz der Stammbaumtopologien gibt im Rückschluß einen weiteren Hinweis auf eine lineare, monophyletische Entwicklung des *narH*-Gens, und damit auf die Orthologie dieses Gens.

Die verhältnismäßig großen phylogenetischen Abstände zwischen den *Proteobacteria* und der Gruppe der Gram-positiven und der thermophilen Organismen deuten auf eine lange evolutionäre Geschichte des Gens hin. Von besonderem Interesse ist in diesem Zusammenhang der Tryptophan→Tyrosin-Austausch im dritten Cystein-Motiv in der Sequenz von *Aeropyrum pernix* K 1. Sollte dieser Sequenzunterschied in den Sequenzen anderer *Archaea* ebenso zu finden sein, so würde dies auf einen gemeinsamen Vorläufer der *narH*-Sequenzen hindeuten, der bereits vor der Trennung von *Bacteria* und *Archaea* existierte.

Desweiteren wird die These der langen evolutionären Geschichte der *nar*-Gene durch die Existenz dieser Gene in der Gruppe der thermophilen und hyperthermophilen Organismen unterstützt, die als früheste Formen mikrobiellen Lebens gelten (Ramirez-Arcos et al. 1998; Sako et al. 1996; Völkl et al. 1996).

Neben der grundsätzlichen Übereinstimmung unterschieden sich beide Stammbäume in einer Reihe von Details. Der größte Unterschied ist der signifikant größere Abstand der beiden Großgruppen – *Proteobacteria* und Gram-positiv/thermophile Bakterien (*Thermus thermophilus* und *Aeropyrum pernix*) – voneinander. Für diesen Unterschied sind verschiedene Erklärungsmodelle denkbar.

Zunächst ist es möglich, daß zwar beide Gene eine gemeinsame evolutionäre Geschichte haben, es aber beim *narH*-Gen periodische Veränderungen der Substitutionsraten, mithin eine höhere Zahl evolutionärer Mutationen, gegeben hat. So könnte eine höhere Substitutionsrate

der *nar*-Gene nach der Trennung der beiden großen phylogenetischen Einheiten zu einer Topologie wie der vorliegenden führen.

Prinzipiell könnte die Disparität der Astlängen innerhalb der Stammbäume auch das Ergebnis einer unterschiedlichen evolutionären Geschichte sein. So könnte die Nitratreduktase über einen lateralen Gentransfer aus einem ursprünglichen Prokaryoten in ein Proteobakterium gelangt sein und sich in dieser Gruppe monophyletisch verbreitet haben. Dagegen spricht allerdings die weite Verbreitung der Gene unter den Prokaryoten, sowie die Tatsache, daß die Längendifferenz zwischen 16S rDNA und *narH* in gleicher Weise innerhalb des Clusters der *Proteobacteria* auftritt (z.B. bei den *Shewanella*- oder *Bacillus*-Sequenzen). Somit müßte dieser Gentransfer sehr früh in der Erdgeschichte erfolgt sein und sich das *narH*-Gen und die 16S rDNA seither in gleicher Weise entwickelt haben. Denkbar wäre auch eine konvergente Evolution zweier Nitratreduktase-Gene. Diese Option ist jedoch wegen der Orthologie der Gene extrem unwahrscheinlich.

Schließlich könnte die größere Distanz der Sequenzen zueinander, die alle bisher sequenzierten *narH*-Gene gleichermaßen betrifft, auf eine längere Evolution der *nar*-Gene hinweisen. Demnach wären die Gene der Nitratreduktase *vor* der 16S rDNA entstanden. Von Walter Gilbert stammt die Hypothese, daß katalytisch aktive RNA-Moleküle im Verlauf der Evolution zuerst ihre eigene Replikation katalysierten und eine Reihe von enzymatischen Aktivitäten entwickelten (Gilbert 1986). Auf der nächsten Entwicklungsstufe begann die RNA Proteine zu synthetisieren, die sich durch die größere Anzahl von Sequenzbausteinen (20 Aminosäuren statt der vier Ribonukleotide) als effektivere Katalysatoren herausstellten. Schließlich bildete sich durch reverse Transkription die DNA, die ihrerseits die RNA als genetisches Material ersetzte. Innerhalb dieser Hypothese könnte die Nitratreduktase eines der ersten Enzyme gewesen sein, dessen kodierende RNA erst später in DNA transkribiert wurde.

Die letztgenannte evolutionäre Hypothese würde auch die Verschiebung der *Shewanella*-Gruppe in eine zentralere Position, also in größere Entfernung zur Gruppe der *Enterobacteriaceae*, erklären. Möglicherweise kann diese Verschiebung auch auf einen lateralen Gentransfer zurückzuführen sein.

Die Abweichungen der Sequenzen von *Pseudomonas aeruginosa* PAO und *Staphylococcus carnosus* TM 300 beruhen im wesentlichen auf der unterschiedlichen Kodon-Verwendung dieser Arten im Vergleich zu den taxonomisch verwandten Arten. Diese Annahme wird dadurch belegt, daß die Positionen der beiden Arten im Stammbaum der Nukleotidsequenzen

mit allen drei kodierenden Basen (Abbildung 4.6) exakt den Positionen im 16S rDNA-Stammbaum entspricht, während die auf zwei Basen reduzierte Nukleotidsequenz und die Aminosäuresequenz zu den in Abbildung 4.5 dokumentierten Unterschieden führt. Daher muß ein großer Teil der Unterschiede in der Kodon-Verwendung begründet sein.

Die phylogenetische Zuordnung der Sequenz von *Staphylococcus carnosus* wird durch die Signatur-Sequenzen unterstützt, dennoch kann diese Verzweigung nicht als gesichert gelten, da die Bootstrapwerte recht gering sind. Im Gegensatz dazu ist die phylogenetische Verschiebung der Sequenz von *Pseudomonas aeruginosa* durch hohe Bootstrap-Werte gesichert. In beiden Fällen kann die Differenz der beiden Topologien nicht restlos geklärt werden, zumal über die taxonomische Relevanz der Kodon-Verwendung bisher keine Informationen verfügbar sind, so daß die Bedeutung dieser Differenzen nicht abschätzbar ist. Da die dritte kodierende Base hochvariabel ist, könnte es sich bei dem phylogenetischen Einfluß dieser Positionen auch um Plesiomorphien handeln, das heißt Sequenzsimilaritäten, die auf Hin- und Rückmutation beruhen. Für eine definierte Zuordnung der betreffenden Sequenzen wäre zusätzliche Sequenzinformation notwendig, insbesondere die Sequenzen der α -Untereinheit *narG* könnten zur Klärung dieser Diskrepanzen beitragen.

Für die Sequenz von *Pseudomonas aeruginosa* kommt zusätzlich ein lateraler Gentransfer als Erklärung in Frage. Diese These wird insbesondere durch zwei Faktoren gestützt: einerseits ist lateraler Gentransfer ein für die Gruppe der Pseudomonaden gut dokumentierter Verbreitungsmechanismus genetischer Information, der neben funktionellen Genen auch die 16S rDNA einschließt (Ogunseitan 1995, Peters et al. 1997; Sikorski et al. 1998; Wright & Olson 1994), andererseits gibt es innerhalb der *Pseudomonas*-Gruppe im *narH*-Stammbaum eine Reihe von Verschiebungen, die prinzipiell auf diesem Mechanismus beruhen könnten. Allerdings liegen diese Verschiebungen alle auf dem Niveau der Subcluster-Struktur; folglich handelt es sich dabei um Auswirkungen geringfügiger Sequenzunterschiede, die eine phylogenetische Einordnung der extrem eng verwandten Gruppe der Pseudomonaden sehr erschweren und keine signifikanten Aussagen erlauben. Dies trifft in der Gattung *Pseudomonas* auch auf der Basis der 16S rDNA zu.

Alle weiteren Topologieunterschiede beruhen im wesentlichen auf dem Fehlen stabilisierender Sequenzen. Wie Hillis (1996) gezeigt hat, korreliert die Stabilität einer phylogenetischen Zuordnung mit der Zahl der Sequenzen innerhalb einer phylogenetischen Linie. Folglich ist die Position der Sequenzen von *Paracoccus denitrificans* oder *Thermus thermophilus* nicht gesichert, auch wenn sie sich gut ins Gesamtbild einfügen.

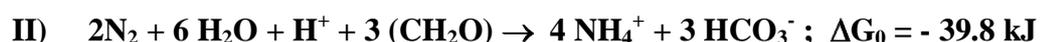
5.2.2 Phylogenie von *narH* und *norB*

Die vergleichende Phylogenie der respiratorischen Nitratreduktase und der Nitrit-Oxidoreduktase zeigt, daß die Trennung beider Gene relativ früh in der Evolution erfolgt sein muß, wenn man davon ausgeht, daß die thermophilen Organismen *Aeropyrum pernix* und *Thermus thermophilus* eine sehr ursprüngliche Form der Prokaryoten darstellen. Da die Gene für *narH* und *norB* die gleiche Struktur und Anordnung der funktionellen Cystein-Motive aufweisen (mit einem Tryptophan-Rest im dritten Motiv) kann die Orthologie der beiden Gene vorausgesetzt werden. Demnach sind beide Gene aus einem gemeinsamen Vorläufergen entstanden. Über die Frage, welcher der beiden Prozesse aus dem anderen hervorgegangen ist, wurde in den 70er Jahren intensiv disputiert (Broda 1977a, 1977b, 1975a, 1975b; Egami 1973, 1976, 1977; Olson 1970, 1981a, 1981b; Rambler & Margulis 1976; Shimizu 1975; Zohner & Broda 1979), ohne jedoch auf der Basis der verfügbaren Ergebnisse zu einem Konsens zu gelangen. Die Beantwortung dieser Frage steht in direktem Zusammenhang mit der Frage, aus welchen Quellen die Ausgangsprodukte der Reaktionen (Nitrit und Nitrat) stammen könnten und folglich der Frage, ob die Nitratrespiration – oder allgemeiner die Respiration oxidierter anorganischer Substanzen wie Nitrat, Sulfat, CO₂ usw. - vor oder nach dem Auftreten von atmosphärischem Sauerstoff entstanden ist.

In der ursprünglichen reduzierenden Atmosphäre waren Wasserstoff und Ammoniak in geringen und Methan und elementarer Stickstoff in größeren Mengen verfügbar. Unter diesen Bedingungen begann die chemische Evolution. Durch den Einfluß von UV-Strahlung, elektrischen Entladungen etc. begann ein Prozeß, der über den Verlust von elementarem Wasserstoff in die Exosphäre zu einer neutralen Atmosphäre führte, die als vorherrschende Gase N₂ und CO₂ aufwies. In dieser Periode begann die Evolution der Stoffwechselwege (Broda 1975a). Für die Entwicklung der Stoffwechselwege mußten die Ausgangssubstanzen in ausreichender Menge zur Verfügung stehen. Als Quelle für Ammonium, dem Edukt der Nitrifikation, kommt unter den herrschenden Bedingungen in erster Linie die chemische Stickstofffixierung in Betracht. Dieser Prozeß ist jedoch stark endergonisch (Broda 1975a),



und konnte daher unter den herrschenden Bedingungen nur durch die Kopplung mit einem exergonischen Prozeß stattfinden:



wobei (CH₂O) schematisch eine Kohlenhydrat-Einheit darstellt.

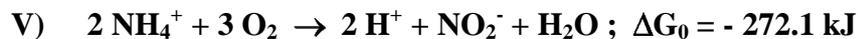
Die Oxidation von Ammonium zu Nitrat kann dagegen nicht mit einer Oxidation von reduzierten Kohlenstoffverbindungen kombiniert werden und bleibt daher endergonisch:



Die Oxidation von Ammonium ist prinzipiell jedoch auch unter dem Einfluß ionisierender Strahlung oder elektrostatischer Entladungen in der ursprünglichen Atmosphäre denkbar (Hall 1973; Egami 1976). Genauso könnte Nitrat durch direkte Oxidation von elementarem Stickstoff entstanden sein, wenn die kurzfristige Existenz freier Sauerstoffradikale oder freier Sauerstoffmoleküle in der ursprünglichen Atmosphäre angenommen wird (Egami 1973):



Auch die Oxidation von Ammonium zu Nitrat bei Anwesenheit von Sauerstoff ist energetisch begünstigt:



Auch eine biogene Quelle für Nitrat in prä-oxischer Zeit kann nicht ausgeschlossen werden. So postulierte Tanaguchi (1971) einen „photosynthetischen Nitrifizierer“, der nach folgender Gleichung



Ammoniak zu Nitrat oxidieren könnte. In ähnlicher Weise postulierte Olson 1970 die photochemische Nitritoxidation und die reverse Dunkelreaktion (Nitratreduktion) als Vorläufer der Photosynthese, obwohl bisher bei phototrophen Bakterien keine Nitratreduktion nachgewiesen werden konnte.

Allerdings sind Nitrat und Nitrit starke Oxidationsmittel, welche eventuell vorhandene reduzierte Verbindungen



oder organische Substanzen anaerob sofort oxidieren können:



Durch Kopplung der Ammoniumoxidation und der Nitratreduktion (in diesem Fall der Denitrifikation) erhält man folgende schematisierte Reaktionsgleichung:



Unter der bereits erwähnten Voraussetzung, daß sich die Stoffwechselwege und die Enzyme nur entwickelt haben können, wenn die Reaktionsedukte in ausreichender Menge zur Verfügung standen, ergeben sich aus diesen energetischen Betrachtungen fünf mögliche evolutionäre Hypothesen:

a) Nitrit und Ammonium bildeten *nach* der Entwicklung der oxidierenden, d.h. sauerstoffhaltigen Atmosphäre die Grundlage für die Entstehung der respiratorischen Nitratreduktion durch die biogene Bildung von Nitrat. Demnach wäre die Nitritoxidase das ursprünglichere Enzym und die *narH*-Gene hätten sich aus den *norB*-Genen entwickelt, nachdem ausreichend Nitrat zur Verfügung stand.

b) Nitrat und Nitrit entstanden *gleichzeitig nach* der Entwicklung der oxidierenden Atmosphäre. Nach dieser Hypothese könnte es ein gemeinsames Vorläuferprotein gegeben haben, welches sowohl Nitritoxidation wie auch Nitratreduktion katalysierte. Daraus entwickelten sich die späteren Proteine durch divergente Evolution und durch Spezialisierung der Organismen.

c) Nitrat entstand *vor* der aeroben Respiration und der damit verbundenen Möglichkeit der biogenen Nitritentwicklung durch nicht-biogene Prozesse. Aufgrund der größeren chemischen Stabilität von Nitrat gegenüber Nitrit (z.B. bei der Reaktion mit Ammonium) wäre die Nitratrespiration damit der ursprünglichere Prozeß und möglicherweise für die biogene Bildung von Nitrit als Grundlage für die Nitritoxidation verantwortlich.

d) Nitrit entstand *vor* der aeroben Respiration in erster Linie durch biogene Prozesse, möglicherweise durch eine photosynthetische Nitrifikation. Damit hätten die Gene der Nitratreduktion ihren Ursprung in den Genen der Nitritoxidation.

e) Beide oxidierten Stickstoffverbindungen entstanden *gleichzeitig vor* der Entwicklung einer oxidativen Atmosphäre durch biogene (photosynthetische Nitrifikation/Denitrifikation) oder nicht-biogene Prozesse. Dieses evolutionäre Szenario würde die Hypothese eines gemeinsamen Vorläuferproteins stützen, aus dem beide Enzyme durch divergente Evolution hervorgegangen sind.

Aufgrund verschiedener geologischer Argumente und nach den Ergebnissen der Sequenzanalysen diverser respiratorischer Enzyme scheinen sich einige respiratorische Stoffwechselwege in einem sehr frühen Stadium der Evolution entwickelt zu haben. So ergab die phylogenetische Analyse der Sequenzen dreier Sulfat- und Sulfitreduktasen (*PsrABC*, *DsrAB* und *AprAB*), sowie zweier Cytochrom-Oxidasen (*SoxM* und *SoxB*) der *Archaea* und *Bacteria*, daß diese Enzyme eine lange evolutionäre Geschichte haben und bereits im letzten gemeinsamen Vorfahren der drei Domänen *Archaea*, *Bacteria* und *Eukarya* vorhanden gewesen sein können (Castresana & Moreira 1999). In diese Gruppe ordnen sich nach den Sequenzdaten der vorliegenden Arbeit auch die Gene der dissimilatorischen Nitratreduktase (*narGHJ*) ein. Interessant ist vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse der Nachweis aller Gene für die Enzyme der aeroben, der Nitrat-, der Sulfat- und der Schwefelrespiration im hyperthermophilen Archaeon *Pyrobaculum aerophilum* (Fitz-Gibbon et al. 1997).

Bei keinem dieser Gene kann jedoch lateraler Gentransfer nach der Trennung der Domänen als Ursprung der Gene in den Domänen ausgeschlossen werden, wie am Beispiel verschiedener Proteine bei ausreichender Diversität der Organismen und der Proben gezeigt werden konnte (Delwiche & Palmer 1996; Smith et al. 1992) und wie auch die Sequenz von *Carnobacterium* sp. Isolat KB 3-3-1 in Abbildung 4.6 demonstriert. Die Orthologie der Gene spricht dennoch dafür, daß diese Möglichkeit nicht als hauptsächlicher Verbreitungsmechanismus der Gene anzusehen ist.

Zudem gibt die Homologie der Cytochrom-Oxidasen I und II zu den N₂O und NO-Reduktasen der Denitrifizierer Hinweise darauf, daß sich die Cytochrom-Oxidasen aus diesen Genen der dissimilatorischen Nitratreduktion entwickelt haben (Sarastre & Castresana 1994; van der Oost et al. 1994); damit wäre die Denitrifikation eine der ursprünglichsten physiologischen Funktionen. Unterstützt wird diese Annahme durch die

Tatsache, daß die Gene der N_2O - und NO -Reduktase in den prokaryotischen Domänen oft mit den Genen der aeroben Respiration vergesellschaftet sind, die damit durch Genduplikation und divergente Evolution entstanden sein könnten (Stouthamer 1992; Völkl et al. 1993), wenn auch bisher keine Enzyme der Denitrifikation außer der Nitratreduktase in Archaea nachgewiesen worden sind.

Neben den Sequenzdaten sprechen jedoch auch geochemische Daten dafür, daß die oxidierten Stickstoffverbindungen Nitrat und Nitrit *vor* der aeroben Respiration durch biogene und nicht-biogene Prozesse entstanden sein könnten. So fand Sugawara (1944, 1947) in einer wäßrigen Inklusion aus Nephelin-Basalt in Hamada-si, Japan, größere Mengen von Nitrat (4.4 – 97 mg/l) und Nitrit (0.54 – 2100 mg/l), sowie weitere Solute, die der qualitativen Zusammensetzung des Meerwassers gleichen (Egami 1973). Die Felsformation, die zahlreiche Kavitäten mit entsprechenden Inklusionen aufwies, konnte geologisch einem magmatischen Ursprung aus eindeutig prä-oxischen Zeiten zugeordnet werden.

Wenn also nach der bisherigen Argumentation davon ausgegangen werden kann, daß Nitrat und Nitrit ihren Ursprung vor der Entwicklung einer aeroben Atmosphäre haben, so entscheidet sich die Frage, welcher evolutionäre Ansatz angenommen werden kann, an der Art der Entstehung von Nitrat und Nitrit.

Eine mögliche biogene Quelle von Nitrat könnte der von Taniguchi 1971 postulierte „phototrophe Nitrifizierer“ sein, der unter Ausnutzung photosynthetischer Energie Ammonium zu Nitrat oxidiert. Für einen solchen bakteriellen Stoffwechselweg konnten bisher jedoch keinerlei Belege gefunden werden. Da demnach eine biogene Entstehung von Nitrat nach den heutigen Erkenntnissen nur über die Oxidation von Nitrit erfolgt sein kann, würde ein solcher Ursprung des Nitrats auf eine Entwicklung der *nar*-Gene aus den *nor*-Genen hindeuten.

Allerdings ist die Verbreitung der Nitritoxidase innerhalb der Gruppe der *Bacteria* sehr beschränkt und in der Gruppe der *Archaea* konnte bislang kein Vertreter der Nitritoxidierer gefunden werden. Daher scheint eine primär biogene Entstehung von Nitrat durch die Aktivität nitritoxidierender Prokaryoten wenig wahrscheinlich.

Zudem gibt es eine Reihe von Hinweisen auf einen nicht-biogenen Ursprung der oxidierten Stickstoffverbindungen. So vermutete Kasting (1993) die Existenz lokaler Sauerstoff-„Oasen“ als Folge der Photolyse von Wasser, die nach den energetischen Betrachtungen (Gleichungen VII und VIII) zur Entstehung von Nitrat und Nitrit beigetragen

haben könnten. Diese These wird durch die Entdeckung von einigen Vertretern der *Archaea* (Völkl et al. 1993) und der *Bacteria* (Huber et al. 1992) unterstützt, die selbst bei extrem geringen Sauerstoffkonzentrationen (0.3 – 0.5 %) durch aerobe Respiration wachsen können und damit die Evolution einer aeroben Respirationskette vor der Entwicklung einer sauerstoffreichen Erdatmosphäre plausibel erscheinen lassen. Diese lokalen Sauerstoffoasen könnten folglich auch für eine nicht-biogene Produktion von Nitrat und Nitrit verantwortlich sein wie Egami bereits 1973 postulierte, zumal unter den zu der Zeit herrschenden Temperaturen die Reaktion einer deutlich reduzierten kinetischen Hemmung unterliegen sollte.

Für ein Vorläuferprotein, welches sowohl Nitratreduktion wie auch Nitritoxidation katalysierte, sprechen zahlreiche Dokumentationen für die katalytische Fähigkeit der Proteine zur Hin- und Rückreaktion. So publizierte Tsay 1997 einen Bericht über zwei Stämme von *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*, die selbst bei Anwesenheit von Sauerstoff zu paralleler Denitrifikation und Nitrifikation befähigt sind (diese Publikation ist nur in chinesischer Sprache erschienen und daher nur als Auszug verfügbar). Die gleiche katalytische Aktivität konnte auch für *Thiosphaera pantotropha* und *Nitrosomonas eutropha* gezeigt werden (Richardson 1998; Zart & Bock 1998). Allerdings ist bei allen Untersuchungen bisher unklar geblieben, ob dabei das gleiche Enzym für die Nitritoxidation wie für die Nitratreduktion genutzt wird.

Nach den bisher diskutierten Befunden scheint eine gleichzeitige, nicht-biogene Entstehung von Nitrat und Nitrit vor der Entstehung einer oxidativen Atmosphäre plausibel. Aufgrund der Orthologie beider Gene könnten beide Enzyme aus einem gemeinsamen Vorläuferprotein entstanden sein, welches in Abhängigkeit von den Umweltbedingungen die Reduktion von Nitrat oder die Oxidation von Nitrit katalysierte.

Für eine Bestätigung einer der Hypothesen bedarf es jedoch weitergehender Untersuchungen, die neben der Sequenzierung weiterer Nitritoxidasen insbesondere physiologische Untersuchungen der Nitratreduktase und der Nitritoxidase einschließen.

5.3 Standortuntersuchungen

Die zwei Stationen, die als Probenahmestellen „westliche Ostsee“ (KB, BE), „Gotlandsee“ (AL 93, F 80) und „finnischer Meerbusen“ (JML, GF 2) jeweils vergleichend untersucht werden, weisen generell ein kohärentes Bild der physikalischen und chemischen Parameter auf, welches eine gemeinsame Diskussion der jeweiligen Probenahmestellen erlaubt. Auch die molekularen Methoden, die zur Beschreibung der Standortgemeinschaften herangezogen wurden (SSCP, DGGE, T-RFLP, Sequenzierung), ergänzen sich in den meisten Fällen zu einem homogenen Gesamtbild. Auftretende Unterschiede können zum Teil methodisch, zum Teil durch die Zusammensetzung der Gemeinschaft bedingt sein. So ist eine niedrige Zahl von Restriktionsfragmenten, SSCP-Signalen oder DGGE-Banden nicht mit einer geringen „Diversität“ (Artenvielfalt) der Gemeinschaft gleichzusetzen, da sich SSCP-, DGGE- oder T-RFLP-Signale verschiedener Spezies möglicherweise zu einem gemeinsamen Signal überlagern. Die tatsächlich vorhandene „Diversität“ der Nitratreduzierer ist damit eher höher einzuschätzen, als mit den Methoden nachzuweisen ist. Eine im Vergleich höhere Zahl von Signalen in einem Horizont oder an einer Station ist Ausdruck einer größeren „Diversität“ in dem Sinne, daß die Zahl der „Restriktions-“, der „SSCP-“ oder der „DGGE-Gruppen“ höher ist.

Die Sequenzanalyse gibt Hinweise darauf, daß sich die Unterschiede in der Basensequenz und damit die Lage der Restriktionschnittstellen und das Laufverhalten im DGGE- oder SSCP-Gel eher im Rahmen von „Gattungsdiversität“ auswirken (siehe auch Abbildung 4.7), das heißt, daß ein Standort oder eine Sedimentschicht mit einer vergleichsweise höheren Zahl von Signalen vermutlich mehr verschiedene Gattungen enthält, als eine Schicht oder ein Standort mit wenigen Signalen. Damit läßt sich aber keine Aussage über die absolute Diversität (im Sinne von Artenvielfalt einer Gemeinschaft) treffen, da diese Vielfalt auch aus einer großen Zahl taxonomisch sehr ähnlicher Mikroorganismen zusammengesetzt sein kann.

Generell konnte an allen untersuchten Standorten eine enge Korrelation der Diversitätsparameter im Hinblick auf die Stratifizierung der Diversität, auf Verteilungsmuster, auf Abundanzen etc. mit den physikalischen und chemischen Standortbedingungen festgestellt und in verschiedenen Erklärungsmodellen diskutiert werden.

Die drei untersuchten und diskutierten Standorte „westliche Ostsee“, „Gotlandsee“ und „finnischer Meerbusen“ repräsentieren ganz unterschiedliche Gemeinschaften nitratreduzierender Bakterien, deren Diversität durch die chemischen und physikalischen

Rahmenbedingungen bestimmt wird. Das Spektrum reicht von 1.) den flachen Küstensedimenten der westlichen Ostsee, die einer starken Kopplung benthischer und pelagischer Prozesse unterliegen und in nahezu direktem Kontakt zur Primärproduktion, zu atmosphärischen Nährstoffeinträgen und zur Nährstoffsedimentation stehen, über 2.) sulfidische, über lange Zeiträume hinweg anoxische Sedimente der Gotlandsee, die in vergleichsweise geringem Maße über die Wassersäule mit Nitrat versorgt werden, bis hin zu 3.) den Standorten des finnischen Meerbusens, die ausreichend mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt werden, um eine effektive Kopplung aerober und anaerober Prozesse an Gradienten zu ermöglichen. Dementsprechend sind die Standortgemeinschaften sehr unterschiedlich, was sich sowohl in der Diversität der kultivierten Bakterien, wie auch in den Ergebnissen der molekularen Methoden manifestiert.

5.3.1 Standort westliche Ostsee

Die Sedimente der Standorte Boknis Eck und Kieler Bucht sind geprägt durch den Einfluß ständig wechselnder Wasserkörper, die je nach Wetterlage wechselnde Anteile salzreichen Kattegatwassers oder salzärmeren Ostseewassers enthalten können. Der Salinitätsunterschied verursacht eine Schichtung der Wassersäule, die relativ lange stabil sein kann und die physikalischen Rahmenbedingungen für biologische und chemische Prozesse im Wasser und im Sediment bildet (von Bodungen 1986). Durch respiratorische Vorgänge wird in der windärmeren Sommerperiode der Sauerstoff im Sediment und im bodennahen Wasser aufgezehrt und es stellen sich anoxische Verhältnisse ein. Diese Schichtung wird erst mit dem Einsetzen der Herbststürme aufgehoben. Zum Zeitpunkt der Ausfahrt H 114 mit FS Heincke herrschte starker Wind zwischen 6 und 10 Beaufort, der für eine Durchmischung der Wassersäule an beiden Standorten sorgte, so daß Sauerstoff bis zur Sedimentoberfläche gemessen werden konnte.

Die wechselnden Sauerstoffverhältnisse, denen beide Standorte unterliegen, wirken sich jedoch in der Kieler Bucht stärker aus, da die Probenahmestelle Boknis Eck in einer Rinne liegt und daher weniger exponiert ist. Desweiteren ist diese Station mit 28 m Wassertiefe tiefer als die Station Kieler Bucht (14 m). Daher sollte die Gemeinschaft im Sediment von Boknis Eck weniger großen Änderungen im Artenspektrum unterworfen sein (die Stabilität der Sedimentgemeinschaft von Boknis Eck wird durch die zeitlich aufgelöste DG-DGGE-Analyse in Abbildung 4.3 eindeutig bestätigt).

Die beiden Standorte unterscheiden sich weiterhin in der Beschaffenheit des Sedimentes stark voneinander. Die Sedimentkerne der Station Boknis Eck zeigen ein schlickiges Sediment, während die Station Kieler Bucht sandiges Sediment aufweist. Sandige Sedimente sind erheblich durchlässiger für Wasser und führen damit zu einer signifikant höheren Sauerstoffdiffusion bis in tiefere Sedimentschichten. Das zeigt sich deutlich im Vergleich der beiden Redoxprofile, die für die Station Kieler Bucht bis in die größte gemessene Tiefe von 14cm oxische Verhältnisse anzeigt, während in der Eckernförder Bucht in einer Tiefe von 3cm eine ausgeprägte Redoxsprungschicht den Übergang von oxischen zu anoxischen Verhältnissen markiert.

Unter den oben beschriebenen Rahmenbedingungen sollten sich an beiden Standorten grundsätzlich verschiedene Nitratreduzierer-Gemeinschaften ausgebildet haben, die mit den angewendeten Methoden detektierbar sein sollten. Diese Annahme wird durch die Diversitätsanalyse bestätigt. Während sich in der DGGE von Boknis Eck eine weitgehend stabile Gemeinschaft von Nitratreduzierern präsentiert (die nach Abbildung 4.3 auch über längere Zeiträume stabil ist), folgt das DGGE-Profil der Kieler Bucht einer strikten Zonierung in ein oxisches und ein anoxisches Kompartiment (Abbildung 4.10). Ein vergleichbares Muster findet sich auch in der T-RFLP und der SSCP (Abbildungen 4.11 und 4.12).

Kähler konnte 1990 zeigen, daß die Denitrifikationsraten im sandigen Sediment der Kieler Bucht die Raten an Boknis Eck um etwa das Fünffache übersteigen und diskutierte diesen Befund im Hinblick auf eine mögliche Kopplung von Nitrifikation und Denitrifikation in den oxischen Sedimenten der Kieler Bucht (in der folgenden Diskussion schließt der Begriff Nitrifikation sowohl die Oxidation von Ammonium zu Nitrit, wie auch die Oxidation von Nitrit zu Nitrat ein). Die höchsten Denitrifikationsraten wurden dabei in den jeweils obersten Sedimentschichten zwischen 0 und 1 cm gemessen.

Die extrem hohe Nitratkonzentration in den obersten Sedimentschichten der Kieler Bucht, die mit $28\mu\text{M}$ Nitrat die höchste Konzentration an allen gemessenen Stationen darstellt, spricht dafür, daß erstens das zur Verfügung stehende Nitrat in dieser Schicht nicht bevorzugt als Elektronenendakzeptor verwendet wird, da ausreichend Sauerstoff vorhanden ist, und daß zweitens dieser Peak auf die Aktivität von Nitrifizierern zurückzuführen ist.

Aus der Betrachtung der Nährstoff- und Diversitätsprofile und der für diesen Standort nachgewiesenen Kopplung von Nitrifikation und Denitrifikation ergibt sich zunächst, daß

die Gemeinschaft der Nitratreduzierer in zwei signifikant unterschiedliche Gruppen aufgeteilt ist. Das wird insbesondere in der DGGE-Analyse (Abbildung 4.10) deutlich.

Die Bedingungen in den oberen Sedimentschichten bis etwa 3 cm selektieren offensichtlich eine Gemeinschaft von Denitrifizierern, die erfolgreich um verfügbares organisches Material konkurrieren, ohne – wie die hohe Nitratkonzentration zeigt – auf die Fähigkeit zur Nitratreduktion angewiesen zu sein. Diese Annahme wird durch die Artenzusammensetzung der isolierten Nitratreduzierer bestätigt, die zum überwiegenden Teil aus ubiquitären Denitrifizierern der Gattungen *Pseudomonas*, *Bacillus* und *Shewanella* besteht (Abbildung 4.9). Auch die in den oberen Sedimentschichten detektierten DGGE-Banden (Abbildung 4.10) sind nach der phylogenetischen Analyse der Sequenzen (Abbildung 4.11) mit diesen Gattungen assoziiert.

Das durch die Nitrifizierer produzierte Nitrat wird in der Nitratreduktionszone reduziert, die nach dem Nitratprofil (Abbildung 4.8) bei etwa 2 cm Sedimenttiefe beginnt. In der Tiefe zwischen 2 und 3 cm wurde die niedrigste Konzentration an Nitrat gemessen ($1.2\mu\text{M}$, Tabelle A6), was auf eine effektive Denitrifikation in diesem Bereich hindeutet. Offenbar finden die Denitrifizierer erst in dieser Tiefe, das heißt in der Übergangszone zwischen oxischen oder mikrooxischen Bedingungen geeignete Voraussetzungen für die respiratorische Nitratreduktion. Dabei sind allerdings in den oberen Sedimentschichten keine Änderungen in der Artenzusammensetzung der Gemeinschaft festzustellen (Abbildung 4.10).

Dagegen zeigen sowohl die T-RFLP-Analyse als auch die DGGE der Station Kieler Bucht unterhalb von 3 cm Sedimenttiefe eine deutliche Änderung der Artenzusammensetzung. So nimmt die Zahl der Restriktionsfragmente in der T-RFLP deutlich zu. Genauso zeigt die Zonierung des DGGE-Profiles eine räumliche Trennung zwei verschiedener Nitratreduzierer-Gemeinschaften. Die SSCP vom Standort Kieler Bucht zeigt dagegen vergleichbare Diversitätsprofile durch alle Schichten, deren Signale sich allerdings in ihrer Intensität unterscheiden. So nimmt in den SSCP-Chromatogrammen die Intensität der ersten vier Signale nach unten hin deutlich ab, während die Signale längerer Retentionszeit stärker werden. Auch diese Intensitätsverschiebung könnte in Anbetracht der Nährstoff- und Redoxsituation in diesem Profil ein Hinweis auf eine Verschiebung der Artenzusammensetzung mit zunehmender Sedimenttiefe sein.

Die Änderung der Artenzusammensetzung in den unteren Sedimentschichten deutet darauf hin, daß sich entweder eine Gemeinschaft von „DNRA“-Bakterien etabliert haben könnte, die unter anoxischen oder mikrooxischen Bedingungen Nitrat zu Ammonium reduzieren,

oder eine andere Gruppe von Denitrifizierern, die in der Konkurrenz um organisches Material weniger erfolgreich ist, in diesem Sedimentbereich aktiv ist. Typische „DNRA“-Bakterien der Gattungen *Aeromonas* oder *Vibrio* konnten durch die Fettsäureanalyse der Isolate nachgewiesen werden, wenn auch nur in geringer Abundanz (Abbildung 4.9).

Im Gegensatz zu der Station „Kieler Bucht“ ist an der Station „Boknis Eck“ eine Zonierung der Nitratreduzierer-Gemeinschaft weniger offensichtlich. Das DGGE-Profil wie auch die T-RFLP (Abbildungen 4.10 und 4.13) zeigen eine signifikante Änderung der Artenzusammensetzung. Lediglich das SSCP-Profil zeigt im Horizont 5-6 cm eine Abnahme der Zahl von Signalen (Abbildung 4.12).

In dieser Tiefe konnte an Boknis Eck kein Nitrat mehr detektiert werden, während die Nitratkonzentration in der Kieler Bucht bei etwa $7.1 \mu\text{M}$ lag. Nach dem Nährstoffprofil (Abbildung 4.8) wird das im Sediment erzeugte oder durch die Wassersäule eingetragene Nitrat im Sedimentbereich zwischen 2 und 4 cm weitgehend reduziert. Dieser Bereich ist durch eine Redoxsprungschicht zwischen 2 und 3 cm gekennzeichnet, die den Übergangsbereich zwischen oxischem und anoxischem Sediment markiert. Wenn das Nitrat in dieser Schicht größtenteils verbraucht wird, so ist zu erwarten, daß das Sediment unterhalb dieses Bereiches nicht ausreichend mit Nitrat versorgt wird und sich daher keine dauerhafte Gemeinschaft nitratreduzierender Bakterien etablieren kann.

Die von Kähler (1990) an der Station Boknis Eck gemessenen Denitrifikationsraten bestätigen diese Annahme. So wurde in dieser Untersuchung zu keinem Zeitpunkt innerhalb eines Jahres unterhalb von vier Zentimetern im Sediment eine signifikante Denitrifikation festgestellt; die höchsten Raten wurden im Frühjahr nach der Frühlingsblüte gemessen und beschränkten sich im wesentlichen auf die oberen drei Zentimeter des Sediments.

Im Übergangsbereich von oxischen zu anoxischen Bedingungen am Standort Boknis Eck zeigt sich im Profil der Ammonium-Konzentration ein Minimum; im gleichen Horizont weist auch die Nitratkonzentration einen sehr geringen Wert ($1.1 \mu\text{M}$) auf. Das SSCP-Chromatogramm dieser Schicht zeigt, daß auch in Bezug auf die Artenzusammensetzung in dieser Schicht ein Übergang stattfindet. Im Bereich langer Retentionszeiten treten zwei schwache Signale auf, von denen eines ausschließlich der darüberliegenden Schicht und das andere nur den tieferen Schichten zuzuordnen ist (Abbildung 4.12). Bei diesen Fragmenten könnte es sich um die Banden im oberen Teil des DGGE-Gels handeln (**BE2** in Abbildung

4.10)., die dem gleichen Verteilungsmuster folgen, aber nur unscharf hervortreten und daher nicht zu sequenzieren waren

Die Verhältnisse in diesem Übergangsbereich von oxischen zu anoxischen Verhältnissen könnten – wie in der Kieler Bucht - ein Habitat für die räumliche Kopplung von Nitrifikation und Denitrifikation sein. Dieses „symbiotische“ Zusammenwirken beider Stoffwechselwege ist für die Ostsee und zahlreiche andere Standorte (Chang & Tseng 1999; Kuai & Verstraete 1998; Müller et al. 1995; Tuominen et al. 1998; Uemoto & Saiki 2000) beschrieben worden, und findet vorwiegend innerhalb solcher Gradienten wie im vorliegenden Fall statt. Möglicherweise wird diese Umwandlung von Ammonium in gasförmige Stickstoffverbindungen durch nitrifizierende Denitrifizierer wie *Nitrosomonas* oder *Nitrobacter* katalysiert (siehe Tabelle 2.1, Tiedje 1988), doch ist über die Diversität nitratreduzierender Bakterien innerhalb solcher Gradienten bisher wenig bekannt.

Die Diversitätsanalyse der kultivierten nitratreduzierenden Bakterien im Bereich der westlichen Ostsee zeigt im wesentlichen die Dominanz zweier Gruppen, der *Proteobacteria* und der *Bacilli*. Im Einklang mit diesen Ergebnissen lieferte die Analyse der Standort-DNA vier Banden, die mit der Gruppe der γ -*Proteobacteria* assoziiert sind sowie zwei weitere Banden, die sich phylogenetisch zwischen den α - und den β -*Proteobacteria* eingeordnet sind (**BE3** und **BE5**). Darüber hinaus bildet eine Umweltsequenz aus der DGGE (**KB2**) eine eigenständige phylogenetische Linie, die mit der Sequenz von *Haloferax denitrificans* DSM 4425 assoziiert ist (Abbildung 4.11). Aufgrund der phylogenetischen Verzweigung handelt es sich hierbei möglicherweise ebenfalls um eine archaeelle Sequenz.

Insgesamt läßt sich aber nach der *narH*-Sequenz keine der Banden einer bekannten Gattung der Datenbank zuordnen. So ist weder ein Vertreter der Pseudomonaden noch der Bacilli unter den Umweltsequenzen vertreten, obwohl diese beiden Gattungen ca. 60% der isolierten Nitratreduzierer stellen. Wie bereits am Beispiel des Isolats *Carnobacterium* sp. KB 3-3-1 erläutert, scheint jedoch auch horizontaler Gentransfer der *nar*-Gene möglich, so daß trotz der phylogenetischen Einordnung der Umweltsequenzen nicht ausgeschlossen werden kann, daß es sich bei den Bakterien nicht um Pseudomonaden oder Bacilli handelt.

Interessant ist die phylogenetische Einordnung der Banden **BE4** und **KB1**, die als eigenständige Linie zwischen den α - und den β -*Proteobacteria* zu finden sind (Abbildung 4.11). Da auch viele der Nitritoxidierer diesen Gruppen angehören, könnten diese Sequenzen zu Bakterien gehören, die sowohl zur Nitritoxidation wie auch zur Nitratreduktion oder Denitrifikation befähigt sind. Eine solche Art ist z.B. *Paracoccus*

denitrificans (ehem. *Thiosphaera pantotropha*), die sowohl zu heterotropher Nitrifikation wie auch – über das *nap*-System – zu aerober Denitrifikation befähigt ist (Robertson & Kuenen 1990; Wehrfritz et al. 1993) und folglich in einem mikroaeroben System eine ideale Nische für die Kopplung beider Prozesse finden könnte. Gleiches gilt auch für die Spezies *Alcaligenes faecalis*, die der Gruppe der β -*Proteobacteria* angehört und die enzymatische Ausstattung für Nitritoxidation und Denitrifikation besitzt (Anderson et al. 1993; van Niel et al. 1992), sowie für einige andere Bakterien (Castignetti & Hollocher 1984).

Die Bedingungen gerade im Sediment der Station „Kieler Bucht“ sind für die Kopplung dieser beiden Teilreaktionen des Stickstoffkreislaufs ideal, da in den oberen Zentimetern des Sediments ausreichend Sauerstoff für die Produktion von Nitrat vorhanden ist (Nitratpeak an der Sedimentoberfläche) und gleichzeitig ein Sauerstoffgradient existieren sollte, der durch die respirativen Prozesse bedingt ist und mikrooxische oder anoxische Bereiche für das Nitratreduktionssystem erzeugt.

5.3.2 Standort Gotlandsee

Die beiden Probenahmestellen in der Gotlandsee unterliegen vollständig anderen Bedingungen als die oben diskutierten Standorte der westlichen Ostsee. In beiden Becken lag zum Zeitpunkt der Probenahme (Oktober 1998) bereits in einer Wassertiefe von ca. 120 m eine Sauerstoffsprungschicht, unterhalb derer kein Sauerstoff detektiert werden konnte.

Demzufolge ist das Sediment bereits an der Oberfläche anoxischen Bedingungen unterworfen und es findet in der Wassersäule unterhalb der Sprungschicht eine Denitrifikation statt (Brettar 1991), die in der Regel für den weitgehenden Verbrauch des freien, durch die Nitrifikation oberhalb der Sauerstoffsprungschicht erzeugten Nitrats verantwortlich ist. Folglich werden die Sedimente nur mit geringen Mengen Nitrat über die Wassersäule versorgt.

Dennoch waren zum Zeitpunkt der Probenahme (Oktober 1998) an beiden Stationen ausgeprägte Nitratmaxima in den obersten Sedimenthorizonten (Abbildung 4.14), an AL 93 auch in 5 cm Sedimenttiefe, meßbar, deren Werte 2-3 mal so hoch sind wie die Nitratwerte der darüberstehenden Wassersäule. Prinzipiell kommen als Quellen für dieses Nitrat mehrere Wege in Betracht, von denen die Versorgung aus der Wassersäule durch Sedimentation größerer Partikel (Detritus, Aggregate), die wahrscheinlichste ist.

Die Sedimentationsgeschwindigkeit solcher Partikel ist so groß, daß die darin eingeschlossenen Nährstoffe nicht vollständig abgebaut werden können, bevor die Partikel im Sediment begraben werden. Ferner sind die Nährstoffe häufig in komplexen chemischen Strukturen gebunden, die zunächst in kleinere, „verstoffwechselbare“ Einheiten zerlegt werden müssen. Im Sediment werden die Bestandteile durch das Zusammenwirken einer Vielzahl von Exoenzymen aufgebrochen und so den Mikroorganismen verfügbar gemacht. Der Abbau der Nährstoffe erfolgt dann in definierten Zonen, die für die jeweilige funktionelle Bakteriengruppe in der Konkurrenz um die Nährstoffe die besten Bedingungen bietet.

Eine weitere Möglichkeit ist die Existenz filamentöser Schwefelbakterien der Gattungen *Thioploca* und *Beggiatoa*, die in der Lage sind, große Mengen Nitrat (150-500 mM, Ahmad et al. 1999) zu speichern, die über den DNRA-Weg bei der Oxidation von Sulfid reduziert werden (Jørgensen & Gallardo 1999). Bei der Gewinnung von Porenwasser aus den Sedimentproben werden die Zellen lysiert und dieses Nitrat freigesetzt, was zu den gemessenen Nitratpeaks geführt haben könnte. Allerdings sind die filamentösen Schwefeloxidierer zum Wachstum auf Sauerstoffgradienten und Schwefelgradienten angewiesen; solche Bedingungen sind jedoch in den tiefen Becken der Ostsee nur sehr selten vorzufinden. Die Existenz dieser Bakterien konnte an den Stationen der Ostsee mit oxischer Wassersäule auch auf der Fahrt H 114 festgestellt werden. Nachweise filamentöser Schwefelbakterien existieren für die tieferen Becken der Ostsee (Arkona-Becken, Gotlandbecken) und auch für die Kieler Bucht (Rumohr 1996).

Beide Standorte zeigten im Oktober 1998 an der Sedimentoberfläche (0-1 cm) eine sehr geringe Zahl von Banden und Signalen, die sich in den Resultaten aller drei angewendeten Methoden manifestiert. In der SSCP zeigen beide Standorte lediglich zwei Signale in der obersten Schicht. Genauso weist die DGGE in beiden Fällen keine definierte Bande in diesem Horizont auf. Von den 10 in der T-RFLP von F 80 aufgetrennten Fragmenten kommen nur fünf in den oberen Sedimentbereichen vor, während bei AL 93 nur zwei bzw. drei Fragmente detektiert wurden.

Obwohl in diesem Sedimentbereich also ausreichend Nitrat vorhanden ist und anaerobe Bedingungen herrschen, findet offensichtlich keine Nitratreduktion statt. Eine Erklärung hierfür liefert der Vergleich mit den Daten der parallel an den Standorten vorgenommenen Untersuchungen sulfatreduzierender Bakterien (M. Drews, pers. Mitteilung). Nach der Analyse der Aktivitätsprofile sulfatreduzierender Bakterien deuten sich eine

Konkurrenzsituation von sulfat- und nitratreduzierenden Bakterien in den Sedimenten des Gotlandbeckens und des Farø-Tiefs hin, die zu einer starken Stratifizierung und Zonierung der Bakteriengemeinschaften führt. So wurden die maximalen Sulfatreduktionsraten im Bereich maximaler Nitratkonzentration und die minimalen Raten in der Zone des Nitratminimums gemessen. In gleicher Weise zeigt das Profil von Elementarschwefel einen zum Nitratprofil kohärenten Verlauf.

Diese Annahme einer Konkurrenzsituation von nitrat- und sulfatreduzierenden Bakterien konnte mit den verschiedenen Methoden bestätigt werden. Beide Standorte zeigen ausgeprägte Unterschiede in der Artenvielfalt und -abundanz, wobei insbesondere die verschiedenen Sedimenttiefen von AL 93 deutlich voneinander getrennt sind.

Auffällig ist die fehlgeschlagene Amplifikation von *narH*-Fragmenten aus der DNA der Sedimentschicht von 4 bis 5 cm und die nur mäßige Amplifikation aus der DNA der oberen Sedimentbereiche, die räumlich mit einem Nitratmaximum und einem Maximum der Sulfatreduktionsraten zusammenfallen. Eine Verdrängung durch Sulfatreduzierer bietet hier ein Erklärungsmodell dafür, warum in diesen Schicht keine oder nur wenige Nitratreduzierer zu finden sind, während sowohl darunter wie auch darüber Vertreter dieser funktionellen Gruppe festzustellen ist.

Der kohärente Verlauf der Nitrat- und Elementarschwefelprofile könnte einen Hinweis darauf geben, daß es sich bei den Nitratreduzierern in der Zone von 2-4cm um Bakterien handelt, die die Nitratreduktion mit der Oxidation reduzierter Schwefelverbindungen koppeln. Hinweise auf das Zusammenwirken dieser physiologischen Leistungen wurden für oxisch-anoxische Grenzschichten bereits nachgewiesen (Brettar 1991b).

Zu dieser Kopplung von Schwefeloxidation und Nitratreduktion sind eine Reihe bakterieller Gruppen befähigt, zu denen Organismen wie *Pseudomonas stutzeri* (Thiosulfatoxidierer), *Thiomicrospira denitrificans* und *Paracoccus denitrificans* (Sulfidoxidierer) gehören. Die erste Spezies ist unter den Isolaten von diesem Standort mit einem Anteil von 12% repräsentiert, doch wurde unter den sequenzierten Banden von AL 93 keine gefunden, die phylogenetisch eng mit den fünf Sequenzen der *Pseudomonas stutzeri*-Isolate korreliert ist. Wie im Abschnitt 5.2 bereits diskutiert wurde, ist jedoch der laterale Gentransfer gerade bei *Pseudomonaden* nicht ausgeschlossen, so daß sich prinzipiell hinter einer der sequenzierten Banden auch ein Vertreter der Gattung *Pseudomonas* verbergen kann, der das *narH*-Gen auf diesem Weg „ausgetauscht“ hat und folglich keine phylogenetische Verwandtschaft zeigt.

Stattdessen bilden fast alle Banden der Standort-DNA von F 80 und AL 93 ein gemeinsames Cluster, daß sich im Stammbaum im Bereich der α -Proteobacteria (*Paracoccus denitrificans*) und der β -Proteobacteria (*Ralstonia*, *Burkholderia*) einordnet (Abbildung 4.17). Diese phylogenetische Relation könnte ein Hinweis auf Bakterien sein, die ähnlich wie *Paracoccus denitrificans* die Sulfidoxidation mit der Nitratreduktion verbinden und sich somit die Standortbedingungen zunutze machen.

Die Kultivierung nitratreduzierender Bakterien ergab eine hohe Abundanz von Vertretern der Gattungen *Pseudomonas* und *Shewanella* (43%), unter denen zahlreiche denitrifizierende (und z.T. schwefeloxidierende) Spezies zu finden sind und die sowohl in der Wassersäule wie auch in den Sedimenten der Ostsee weit verbreitet sind (Abbildung 4.15). So isolierte Brettar 1987 in der Wassersäule der Gotlandsee *Shewanella putrefaciens* als Denitrifikanten mit der höchsten Abundanz.

Im Gegensatz zu den flacheren Stationen der westlichen Ostsee und des finnischen Meerbusens konnten in den tiefen Becken der Gotlandsee keine Vertreter der Gattung *Bacillus* isoliert werden. Auch der molekularbiologische Ansatz ergab keinen Hinweis auf Vertreter dieser Gruppe. Vielmehr findet eine Verschiebung der Artenzusammensetzung Gram-positiver Bakterien zu den coryneformen Arten (*Cellulomonas*, *Arthrobacter* etc.) statt. Offenbar finden die Bacilli unter den vorherrschenden Verhältnissen keine optimalen Wachstumsbedingungen. Allerdings ist die Zahl von 52 Isolaten, die zudem auf komplexen Medien kultiviert und isoliert wurden, nicht ausreichend repräsentativ, um gesicherte Aussagen über das Fehlen bestimmter Gattungen treffen zu können.

Da es sich bei den Standorten F 80 und AL 93 um sulfidisch geprägte Standorte handelt, die über lange Zeiträume anoxische und reduzierende Zustände aufweisen, sollte die bakterielle Gemeinschaft durch diese Bedingungen einem starken Selektionsdruck unterworfen sein, der vorwiegend Organismen selektiert, die eine aktive Rolle im Schwefelkreislauf spielen (Sulfatreduzierer, Schwefeloxidierer) oder die unter den vorherrschenden Bedingungen aus fermentativen Stoffwechselwegen Wachstumsenergie gewinnen. Desweiteren sollte die Konkurrenz um organisches Material ein wesentlicher Selektionsfaktor sein. Demnach sollte sich also eine stark zonierte Gemeinschaft etabliert haben, die auf den unterschiedlichen Ansprüchen der Sedimentgemeinschaft beruht und die zum Zeitpunkt der Probenahme an den Standorten AL 93 und F 80 mit allen eingesetzten Methoden beobachtet wurde.

5.3.3 Standort finnischer Meerbusen

Die beiden Standorte im finnischen Meerbusen waren hinsichtlich der Denitrifikation bereits Gegenstand intensiver Untersuchungen (Tuominen et al. 1998). So wurden für GF 2 Denitrifikationsraten von 200 bis $650 \mu\text{M N m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ gemessen, die zu einem großen Anteil aus der Kopplung von Nitrifikation und Denitrifikation herrühren. Nach der Untersuchung von Tuominen et al. (1998) lag das Maximum der Aktivität im Spätsommer/Herbst. Ähnliche Bedingungen führten an der Station JML zu Denitrifikationsraten zwischen 150 und $400 \mu\text{M N m}^{-2} \text{ d}^{-1}$. Die Studie von Tuominen et al. (1998) stellt jedoch keine Korrelation der Umsatzraten zur Diversität der Denitrifizierer her.

Die im Verlauf der Ausfahrt H 114 aufgezeichneten Nährstoff- und Redoxprofile liegen im Rahmen der über mehrere Jahre gemessenen Werte von Tuominen et al. (1998), daher sollten die Verhältnisse trotz der unterschiedlichen Probenahmezeitpunkte im wesentlichen vergleichbar sein. Eigene Messungen an diesen Standorten, die im Rahmen einer gemeinsamen Ausfahrt im Juli 1997 mit FS „Alkor“ durchgeführt wurden, bestätigen die Vergleichbarkeit der Ergebnisse.

Die an beiden Stationen im Vergleich zum Sediment relativ hohe Nitratkonzentration im Bodenwasser deutet auf die Aktivität nitrifizierender Bakterien in der Wassersäule oder den landgebundenen Eintrag über die Flüsse hin. Beide Standort zeigen eine bis zum Bodenwasser oxische Wassersäule (Sauerstoffsättigung von 31 % an GF 2 und 8 % an JML), die für die Nitrifikation ausreichend Sauerstoff liefern sollte. Trotz der geringeren Wassertiefe an der Station JML (78 m gegenüber 83 m an GF 2) weist JML eine signifikant geringere Sauerstoffkonzentration im Bodenwasser auf, die sich in gleicher Weise in den vorherigen Jahren zeigte (Tuominen et al. 1998). Beide Standorte wiesen eine identische Salinität auf, daher handelt es sich offenbar um den gleichen Wasserkörper, so daß die niedrigere Sauerstoffkonzentration im Bodenwasser von JML offenbar auf eine erhöhte Sauerstoffrespiration zurückzuführen ist.

Da beide Standorte ein starke Kopplung von Nitrifikation und Denitrifikation aufweisen, erklären diese Sauerstoffverhältnisse die signifikant geringeren Denitrifikationsraten an JML im Vergleich zu GF 2 (Tuominen et al. 1998). Diese Kopplung wird insbesondere an den Profilen der Station JML deutlich, die im Kontrast zu allen bisher diskutierten Stationen keine kontinuierliche Abnahme des Redoxprofiles zeigt, sondern einen Peak in einer Sedimenttiefe von 2 cm. Das Redoxpotential im Sediment wird also zunächst positiver und nimmt erst ab 3 cm ab, bis es unterhalb von 6 cm negative Werte erreicht (Abbildung 4.20). Der Übergang von oxischen zu anoxischen Bedingungen vollzieht sich dabei entlang eines

linearen Gradienten. GF 2 weist dagegen eine ausgeprägte Redoxsprungschicht zwischen 2 und 3 cm auf, die in ähnlicher Weise schon in Boknis Eck festzustellen war.

Die Verschiebung des Redoxpotentials hin zu oxidierenden Bedingungen in den oberen Sedimentschichten von JML könnte z.B. durch Bioturbation hervorgerufen worden sein, die nachgewiesenermaßen einen erheblichen positiven Einfluß auf die Denitrifikationsleistung einer Sedimentgemeinschaft hat (Rysgaard et al. 1995). Das begründet sich in erster Linie durch die erhöhte Sauerstoffversorgung durchmischter Sedimente, die zu einer erhöhten Nitrifikationsleistung und folglich einer erhöhten Nitratbildung führt. Für die Bioturbation als Ursache für das ungewöhnliche Redoxprofil des Sediments von JML spricht die zeitliche Begrenzung der Redoxverhältnisse, da dieser Peak bei einer ersten Probenahme im Sommer 1997 nicht zu detektieren war.

Der auffällige Peak im Redoxprofil von JML geht mit einem Maximum der Nitratkonzentration einher (Abbildung 4.20). Diese Korrelation weist auf eine starke Nitrifikation in den oberen Sedimentschichten hin, die ideale Voraussetzungen für eine räumliche Kopplung von Nitrifikation und Denitrifikation bietet. Durch den engen räumlichen Bezug innerhalb des Sediments kann das entstehende Nitrat direkt in anoxischen oder mikrooxischen Nischen zu Stickstoff oder anderen gasförmigen Stickstoffverbindungen reduziert werden. Demnach sollte sich in diesem Sediment eine starke Stratifizierung zwischen den oberen 2-3 cm und den darunterliegenden Schichten auf die Diversität der Gemeinschaft auswirken. Tatsächlich konnten in der DGGE-Analyse starke Unterschiede ausgemacht werden, die eine deutliche Zunahme der Artenvielfalt in den unteren Schichten aufzeigen.

Die Zone höchster Aktivität der Nitratreduzierer sollte nach der Analyse der physikalischen und chemischen Parameter an der Station JML der Bereich zwischen 3 und 4 cm sein (Nitratminimumzone), der entsprechend in der DGGE und in der T-RFLP die größte Zahl von Banden aufweist. Allerdings zeigt sich in den SSCP-Chromatogrammen ein gegenteiliges Bild, welches in den mittleren Sedimentschichten die geringste Zahl an Signalen zeigt (Abbildung 4.24). An der Station GF 2 ist in allen Horizonten eine im Vergleich zu JML deutlich höhere Zahl von Signalen in den SSCP-Chromatogrammen festzustellen, während die T-RFLP und die DGGE-Analyse weniger Signale als bei JML aufweisen.

Die SSCP-Analyse zeigt drastische Unterschiede in der Artenzusammensetzung der verschiedenen Schichten auf, wobei keiner der detektierten Peaks durch alle Horizonte hindurch vertreten ist (Abbildung 4.24). In gleicher Weise demonstriert auch die T-RFLP-

Analyse, daß die Gemeinschaft strikt zoniert ist; keines der 15 separierten Restriktionsfragmente ist in allen Schichten vertreten.

Die T-RFLP-Analyse von JML fällt insbesondere dadurch auf, daß in der Zone zwischen 2 und 4 cm einige außergewöhnlich lange Restriktionsfragmente detektiert wurden (157 – 210bp), die an keiner der anderen Stationen auftraten (Abbildung 4.25). Diese Fragmente nehmen einen Anteil von 14-24% an der Gesamtgemeinschaft ein. Das Auftreten diese Fragmente im exakten Bereich des Sauerstoffgradienten könnte ein Hinweis darauf sein, daß die Bakterien, auf die diese Restriktionsfragmente zurückzuführen sind, an solche Gradienten angepaßt sind. Dabei könnte es sich möglicherweise um Spezies der bereits erwähnten filamentösen Schwefelbakterien der Gattungen *Beggiatoa*, *Thioploca* etc. handeln. Die Analyse der Sulfid- und Sulfatwerte in dieser Sedimentschicht zeigt eine deutliche Korrelation mit dem Redoxprofil; das Profil der Sulfidkonzentration ist dem Redoxprofil exakt gegenläufig, während das Profil der Sulfatkonzentration dem Redoxprofil folgt (M. Drews, IfM Kiel, pers. Mitteilung). Demnach könnte der Nitratpeak an der Sedimentoberfläche nicht ausschließlich auf die Aktivität nitrifizierender Bakterien zurückzuführen sein, sondern möglicherweise auch auf freigesetztes Nitrat aus solchen Bakterien.

Diese Annahme wird dadurch unterstützt, daß das Profil der Ammoniumkonzentration von JML keinerlei Minimum aufweist, wie das bei erhöhter Nitrifikation zu erwarten wäre, wenn auch die Ammoniumkonzentration insgesamt um eine Größenordnung höher liegt als die Nitratkonzentration. Ein solches, zumindest angedeutetes Minimum zeigt sich dagegen im Profil von GF 2, welches trotz geringerer Nitratkonzentration und gleicher Ammoniumkonzentration ein signifikantes Minimum in der Zone des Nitratpeaks aufweist.

Die Standortgemeinschaft des Sediments von JML könnte folglich in den oberen Zentimetern entweder durch Nitrifizierer oder durch filamentöse Schwefelbakterien dominiert sein. Anhand der Sequenzen kann in dieser Hinsicht keine Zuordnung getroffen werden, da entsprechende Referenzsequenzen nicht zur Verfügung stehen und die sequenzierten Banden sich phylogenetisch nicht zu anderen Referenzorganismen in Beziehung setzen lassen. Die Umweltsequenz, die aus der obersten Schicht der Station JML stammt (**JML1**) ordnet sich phylogenetisch in die Gruppe der γ -*Proteobacteria* ein und ist offenbar mit diesen verwandt. Eine weitere Bande (**JML5**) liegt innerhalb eines Clusters von Umweltsequenzen, die eine phylogenetische Relation zu den beiden Vertretern der β -*Proteobacteria* zeigen.

Der Standort GF 2 zeigt wie schon JML eine strenge Zonierung der Diversität, die in den SSCP-Chromatogrammen und im DGGE-Gels deutlich wird (Abbildungen 4.22 und 4.24). Die Banden im den oberen beiden Zentimetern des DGGE-Profiles treten nicht deutlich hervor, dennoch war die Bande **GF1** sequenzierbar. Diese Bande bildet phylogenetisch eine eigenständige Linie, die mit dem Cluster der Gram-positiven Bakterien assoziiert ist und daher nicht auf einen der bekannten Nitritoxidierer hinweist. Theoretisch könnte es sich um einen heterotrophen Nitrifizierer (z.B. *Arthrobacter*) handeln, die jedoch in marinen Systemen bisher nicht nachgewiesen wurden und hier auch nach dem bisherigen Kenntnisstand keine optimalen Wachstumsbedingungen vorfinden.

Unterhalb der Sedimentschicht von 2-3 cm nimmt die Diversität der *narH*-Gene deutlich zu. Das läßt sich sowohl in der SSCP- wie in der DGGE-Analyse nachvollziehen (Abbildungen 4.22 und 4.24). Die SSCP-Chromatogramme von GF 2 zeigen unterhalb der Redoxsprungschicht eine zunehmende Zahl von Signalen mit langer Retentionszeit, wie sie schon in den Profilen von AL 93 und F 80 in den Horizonten negativen Redoxpotentials nachzuweisen waren. Aus den betreffenden Sedimenthorizonten wurden die Banden **GF4** bis **GF8** ausgeschnitten und sequenziert. Die Umweltsequenzen von **GF6** bis **GF8** bilden im Stammbaum ein Gruppe zusammen mit **JML5**, die phylogenetisch mit den β -*Proteobacteria* verwandt ist und wahrscheinlich Vertreter dieser Gruppe repräsentieren.

Die Sequenz von **GF4** ordnet sich dagegen in ein Cluster von Umweltsequenzen ein, die zu keiner der Referenzsequenzen eine engere taxonomische Relation zeigen. Diese Sequenzen können nicht weitergehend eingeordnet werden, prinzipiell ist aber auch an dieser Station die Anwesenheit filamentöser Schwefelbakterien denkbar.

Die T-RFLP-Analyse der GF 2-Sedimente liefert ein vollständig anderes Bild der Artenzusammensetzung als die beiden anderen Methoden (Abbildung 4.25). Während in den oberen Schichten bis 4 cm eine Vielzahl von Restriktionsfragmenten aufgetrennt wurde, reduziert sich diese Vielfalt in den Schichten unterhalb von 4 cm auf 2 Restriktionsfragmente. Eine Analyse der Lage der Restriktionsschnittstellen innerhalb der aus den unteren Schichten gewonnenen Sequenzen zeigt jedoch, daß alle Sequenzen den Fragmentgruppen von 26 bp und 41 bp zuzuordnen sind, was nach dem Grad der phylogenetischen Verwandtschaft auch angenommen werden konnte. Daher ist die tatsächliche Vielfalt der Nitratreduzierer in diesen Schichten durch die T-RFLP nur unzureichend wiedergegeben.

Das zeigt auch die phylogenetische Einordnung der Sequenzen, die bis auf die zwei Banden von **JML2** und **JML3**, die aus der gleichen Sedimentschicht stammen, und die beiden auf gleicher Höhe laufenden Banden **JML6** und **JML7** keine engere phylogenetische Verwandtschaft der Banden zueinander erkennen läßt.

5.3.4 Selektion der Standortgemeinschaften

Aus der Diskussion der drei Standorte „westliche Ostsee“, „Gotlandsee“ und „finnischer Meerbusen“ ergibt sich ein interessanter Einblick in die verschiedenen Mechanismen, die zur Selektion einer bestimmten Gruppe oder Gemeinschaft von Nitratreduzierern unter den verschiedenen Standortbedingungen führen.

In Küstensedimenten, deren oberste Sedimentschichten im allgemeinen oxisch sind, findet eine enge Kopplung von Nitrifikation und Denitrifikation statt, die zur Selektion von Denitrifizierern führt. Diese können erfolgreich um verfügbares organisches Material konkurrieren, ohne auf die Fähigkeit zur Denitrifikation angewiesen zu sein. Da sich zusätzlich durch die Sauerstoffrespiration der Nitrifizierer anoxische oder mikrooxische Nischen bilden können und gleichzeitig ausreichend Nitrat zur Verfügung steht, ist diese fakultative Fähigkeit zur Denitrifikation ein weiterer Selektionsvorteil.

Zusätzlich ergibt sich durch die Ausbildung von Sauerstoff- und Sulfidgradienten unterhalb oxischer Sedimentoberflächen ein Habitat für filamentöse Schwefelbakterien (*Thioploca*, *Beggiatoa* etc.), die große Mengen an Nitrat speichern und bei Bedarf auf dem DNRA-Weg reduzieren können. Diese Bakterien stellen vermutlich einen Teil der Nitratreduzierer-Gemeinschaft an den Standorten im finnischen Meerbusen.

Bei der Selektion der Sedimentgemeinschaft in den tiefen Becken der Ostsee, die durch lang anhaltende anoxische Zustände geprägt sind, tritt dagegen die Konkurrenz von Nitrat- und Sulfatreduzierern um organisches Material als entscheidender Faktor auf. Die strenge Zonierung der Sedimente hinsichtlich der Artenzusammensetzung kennzeichnet den engen Zusammenhang zwischen den verfügbaren Nährstoffen und den aktiven Organismen. Insbesondere haben Bakterien, die sowohl Stickstoff- wie auch Schwefelkomponenten für ihr Wachstum nutzen können (z.B. *Pseudomonas stutzeri*, *Paracoccus denitrificans*, *Thiomicrospira denitrificans*), oder sogar die beiden Stoffkreisläufe (H_2S -Oxidation mit der NO_3^- -Reduktion) miteinander verbinden, hier einen entscheidenden Selektionsvorteil.

5.4 Nitratreduktion durch *Pseudomonas stutzeri* DSM 5190^T

Angesichts der Ergebnisse der Kultivierungen nitratreduzierender Bakterien aus den Sedimenten der drei Standorte, die als eine der häufigsten Gruppen die *Pseudomonas stutzeri*-Gruppe hervorbrachten, sollte in einem Kulturversuch geklärt werden, ob die Aktivität nitratreduzierender Bakterien über den Nachweis der mRNA der *narH*-Gene im Sediment nachvollziehbar ist.

Die Reduktion von Nitrat ließ sich in diesem Versuch hervorragend dokumentieren. *Pseudomonas stutzeri* setzte innerhalb von 200 Minuten 5 μ M Nitrat um, welches nach einer gewissen „Speicherzeit“ für das Zellwachstum und die Zellteilung verwendet wurde. Das Nitrit wurde erst dann reduziert, als die höher oxidierte Komponente Nitrat bereits vollständig zu Nitrit reduziert worden war. Die aus der Reduktion von Nitrit zu gewinnende Energie ist erheblich geringer als die aus der Nitratreduktion zu beziehende Energie, so daß am natürlichen Standort zunächst eine Konkurrenzsituation um verfügbares Nitrat entsteht. Das erklärt die rasche Aufnahme des verfügbaren Nitrats.

Wie Körner und Zumft (1989) durch spezifische Antikörper zeigen konnten, ist die Expression der Nitratreduktase von der Einstellung anaerober Bedingungen abhängig. Mit dem Absinken der Sauerstoffkonzentration beginnt die Umstellung auf die Nitratatmung. Die Expression der Nitritreduktase wird zusätzlich noch durch die Anwesenheit von Nitrit induziert; dieser Befund wird durch die Analyse der Proteinmuster in Abbildung 4.27 bestätigt.

Wenn aber die Nitratreduktase bereits unter einem Schwellenwert der Sauerstoffkonzentration quasi optional exprimiert wird, so kann die mRNA, die ohnehin nur wenige Minuten stabil ist, nicht als Antwort der Standortgemeinschaft auf eine Nitratzugabe nachgewiesen werden. So ist der Nachweis aktiver Nitratreduzierer mit Hilfe der molekularen Methoden nur dann zu führen, wenn der Zeitpunkt der Probenahme mit dem Einstellen anoxischer Bedingungen zusammenfällt. Das ist jedoch angesichts der Vielfalt der steuernden Umweltfaktoren nahezu unmöglich. Das macht der Kulturversuch mit *Pseudomonas stutzeri*, bei dem trotz großer Mengen an Zellmaterial keine mRNA der Nitratreduktase über eine RT-PCR amplifiziert werden konnte, deutlich. Daher ist in diesem Fall die Anwendung anderer Methoden, z.B. der Nachweis und die Quantifizierung des exprimierten Proteins die einzige Möglichkeit, die in-situ-Aktivität von Nitratreduzierern nachzuweisen.

6. Ausblick

Ein wesentlicher Fortschritt, der im Rahmen dieser Arbeit erzielt wurde, ist die Möglichkeit, nitratreduzierende (und nitritoxidierende) Bakterien als funktionelle Gruppe zu erfassen. Das eröffnet ganz neue Möglichkeiten bei der Evaluierung gekoppelter stoffwechselphysiologischer Prozesse, deren Bedeutung gerade für das System aus Nitrifikation und Denitrifikation vielfach beschrieben worden ist. Auch werden auf diese Weise Erkenntnisse über die Steuerung von nitratreduzierenden Prozessen in der Umwelt möglich, was insbesondere im Hinblick auf die Freisetzung des Treibhausgases N_2O von Bedeutung ist.

Ein zentraler Punkt der Untersuchung natürlicher Standortgemeinschaften bleibt aber die Kultivierung von Bakterien, die angesichts der neuen molekularen Techniken oft in den Hintergrund tritt. Nur über die Kultivierung von Bakterien ist es jedoch möglich, physiologische Leistungen zu bestimmen und zu untersuchen, Datenbanken zu erstellen und Umweltsequenzen und -daten in einen Gesamtrahmen einzufügen. Im umgekehrten Verfahren kann aber beispielsweise die Umweltsequenz genutzt werden, um der Kultivierung bisher nicht kultivierter oder gar nicht kultivierbarer Bakterien ein Stück näher zu kommen, da eine phylogenetische Einordnung auch Hinweise auf physiologische Leistungen erbringen kann.

Darüber hinaus unterstreichen die Ergebnisse dieser Untersuchungen noch einmal eindrucksvoll, daß für die angestrebte Beschreibung der Wechselwirkungen von Bakterien in und mit ihrem natürlichen Habitat die kombinierte Anwendung verschiedener Methoden unabdingbar ist, um Resultate zueinander in Beziehung setzen zu können, sie aneinander abzugleichen. Das Beziehungsgeflecht der Standortgemeinschaften ist ein extrem kompliziertes Netzwerk mannigfaltiger Prozesse und Vorgänge, die letztlich nur in ihrer Gesamtheit auf die Bedingungen am Standort aufeinander und auf den Standort einwirken und diesen gestalten können.

Schon heute gibt es eine Reihe interessanter Ansätze, Bakteriengemeinschaften als „multizelluläre Organismen“ zu betrachten (Shapiro 1998), die als Versuch interpretiert werden können, Konzepte der intra- und interzellulären Kommunikation und des Zusammenwirkens von Bakterien zu äußeren Auswirkungen in Beziehung zu setzen. Ein Schritt in diese Richtung ist die Beschreibung und Analyse funktioneller bakterieller Gruppen, die als kleinere Untereinheiten einer Gesamtgemeinschaft aufgefaßt werden können und mit den heute verfügbaren technischen Möglichkeiten beschreibbar geworden

sind. Durch die zunehmende Anzahl von Genomsequenzierungen (derzeit etwa 130 laufende oder abgeschlossene Projekte), die durch die enormen Fortschritte der Sequenzierungstechniken ermöglicht werden, wird in näherer Zukunft eine Vielzahl von Sequenzdaten zur Verfügung stehen, die eine Erfassung aller stoffwechselphysiologischen Gruppen über die Gene zentraler Proteine erlaubt. Auf der Basis dieser Daten sollte in Zukunft die Lücke zu füllen sein, die bisher zwischen den Beschreibungen der Systeme eukaryotischer Organismen und prokaryotischer Organismen klafte.

Wesentlichen Anteil an den Fortschritten bei der Beschreibung funktioneller bakterieller Einheiten haben deskriptive Arbeiten, die jenseits kleinskaliger Inhomogenitäten und kurzfristiger Veränderungen eine Abschätzung größerer Zusammenhänge überhaupt erst ermöglichen. So bildet die Beschreibung neuer Arten und neuer phylogenetischer Linien wie auch das langfristige „Monitoring“ von Standortparametern und bakterieller Diversität keinen wissenschaftlichen Selbstzweck, sondern das Fundament für solche Arbeiten, die sich beispielsweise mit Nahrungsgefügen, biogeochemischen Zyklen oder Ökosystemanalysen befassen. Die Deskription stellt einen Sachverhalt zur Diskussion und erlaubt so die Entwicklung von Hypothesen und Modellen, die an diesen und anderen Beschreibungen gemessen werden können und müssen.

7. Literatur

- Ahmad, A., Barry, J.P., Nelson, D.C. (1999) Phylogenetic affinity of a wide, vacuolate, nitrate-accumulating *Beggiatoa* sp. from Monterey Canyon, California, with *Thioploca* spp. Appl. Environ. Microbiol. 65, 270-277
- Anderson, I.C., Poth, M., Homstead, J., Burdige, D. (1993) A comparison of NO and N₂O production by the autotrophic nitrifier *Nitrosomonas europaea* and the heterotrophic nitrifier *Alcaligenes faecalis*. Appl. Environ. Microbiol. 59, 3525-3533
- Awramik, S.M., Schopf, J.W., Walter, M.R. (1983) Filamentous fossil bacteria from the Archean of Western Australia. Precamb. Res. 20, 357-374
- Bach, H.-J. (1996) Bakterielle Populationen und Stoffumsatzpotentiale in Acker-, Grünland- und Waldböden einer Jungmoränenlandschaft in Schleswig-Holstein. EcoSys: Beiträge zur Ökosystemforschung, Supplement Band 15
- Ballard, A.L., Ferguson, S.J. (1988) Respiratory nitrate reductase from *Paracoccus denitrificans*. Evidence for two b-type haems in the γ subunit and properties of a water soluble active enzyme containing α and β subunits. Eur. J. Biochem. 174, 207-212
- Barns, S.M., Takala, S.L., Kuske, C.R. (1999) Wide distribution and diversity of members of the bacterial kingdom *Acidobacterium* in the environment. Appl. Environ. Microbiol. 65, 1731-1737
- Bell, L.C., Richardson, D.J., Ferguson, S.J. (1990) Periplasmic and membrane-bound respiratory nitrate reductases in *Thiosphaera pantotropha*: the periplasmic enzyme catalyzes the first step in aerobic denitrification. FEBS Lett. 265, 85-87
- Berks, B.C., Ferguson, S.J., Moir, J.W. Richardson, D.J. (1995) Enzymes and associated electron transport systems that catalyse the respiratory reduction of nitrogen oxides and oxyanions. Biochim. Biophys. Acta 1232, 97-173
- Berks, B.C., Page, M.D., Richardson, D.J., Reilly, A., Cavill, A., Outen, F., Ferguson, S.J. (1995b) Sequence analysis of subunits of the membrane-bound nitrate reductase from a denitrifying bacterium: the integral membrane subunit provides a prototype for the dihaem electron-carrying arm of a redox loop. Mol. Microbiol. 15, 319-331
- Berks, B.C., Richardson, D.J., Reilly, A., Willis, A.C., Ferguson, S.J. (1995c) The *napEDABC* gene cluster encoding the periplasmic nitrate reductase system of *Thiosphaera pantotropha*. Biochem. J. 309, 983-92
- Betlach, M.R. (1982) Evolution of bacterial denitrification and denitrifier diversity. Antonie Van Leeuwenhoek 48, 585-607

- Blasco, R., Castillo, F., Martinez-Luque, M. (1997) The assimilatory nitrate reductase from the phototrophic bacterium, *Rhodobacter capsulatus* E1F1, is a flavoprotein. FEBS Lett. 414, 45-49
- Blasco, F., Iobbi, C., Ratouchniak, J., Bonnefoy, V., Chippaux, M. (1990) Nitrate reductases of *Escherichia coli*: sequence of the second nitrate reductase and comparison with that encoded by the *narGHJ* operon. Mol. Gen. Genet. 222, 104-111
- Bloch, E., Rachel, R., Burggraf, S., Hafenbradl, D., Jannasch, H.W., Stetter, K.O. (1997) *Pyrolobus fumarii*, gen. and sp. nov., represents a novel group of archaea, extending the upper temperature limit for life to 113 degrees C. Extremophiles 1, 14-21
- Bonnefoy, V., Demoss, J.A. (1994) Nitrate reductases in *Escherichia coli*. Antonie Van Leeuwenhoek 66, 47-56
- Bowman, J.P., McCammon, S.A., Brown, M.V., Nichols, D.S., McMeekin, T.A. (1997) Diversity and association of psychrophilic bacteria in Antarctic sea ice. Appl. Environ. Microbiol. 63, 3068-3078
- Brettar, I. (1991) Denitrifikation in der Wassersäule der zentralen Ostsee, Regulationsfaktoren und mikrobiologische Aspekte. Berichte aus dem Institut für Meereskunde Nr. 208
- Broda, E. (1977a) The position of nitrate respiration in evolution. Orig. Life 8, 173-174.
- Broda, E. (1977b) Two kinds of lithotrophs missing in nature. Z. Allg. Mikrobiol. 17, 491-493.
- Broda, E. (1975a) The history of inorganic nitrogen in the biosphere. J. Mol. Evol. 7, 87-100
- Broda, E. (1975b) The beginning of photosynthesis. Orig. Life 6, 247-251
- Busse, H.J., Denner, E.B., Lubitz, W. (1996) Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. J. Biotechnol. 47, 3-38
- Castignetti, D., Hollocher, T.C. (1984) Heterotrophic nitrification among denitrifiers. Appl. Environ. Microbiol. 47, 620-623
- Castresana, J., Moreira, D. (1999) Respiratory chains in the last common ancestor of living organisms. J. Mol. Evol. 49, 453-460
- Chang, Y.J., Tseng, S.K. (1999) A novel double-membrane system for simultaneous nitrification and denitrification in a single tank. Lett. Appl. Microbiol. 28, 453-456
- Chin, K.J., Lukow, T., Conrad, R. (1999) Effect of temperature on structure and function of the methanogenic archaeal community in an anoxic rice field soil. Appl. Environ. Microbiol. 65, 2341-2349
- Cole, J.A., Brown, C.M. (1980) Nitrate reduction to ammonia by fermentative bacteria: a short circuit in the biological nitrogen cycle. FEMS Microbiol. Lett. 7, 65-72

- Cremonesi, L., Firpo, S., Ferrari, M., Righetti, P.G., Gelfi, C. (1997) Double-gradient DGGE for optimized detection of DNA point mutations. *Biotechniques* 22, 326-330
- Crist, A.E., Jr. Johnson, L.M., Burke, P.J. (1996) Evaluation of the Microbial Identification System for identification of clinically isolated yeasts. *J. Clin. Microbiol.* 34, 2408-2410.
- Daalsgard, T., Bak, F. (1994) Nitrate reduction in a sulfate-reducing bacterium, *Desulfovibrio desulfuricans*, isolated from rice paddy soil: Sulfide inhibition, kinetics, and regulation. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 291-297
- de Bruijn, F.J. (1992) Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergenic consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2180-2187
- DeLong, E.F. (1997) Marine microbial diversity: the tip of the iceberg. *Trends Biotechnol.* 15, 203-207
- Delwiche, C.F., Palmer, J.D. (1996) Rampant horizontal transfer and duplication of rubisco genes in eubacteria and plastids. *Mol. Biol. Evol.* 13, 873-882
- DeMoss, J.A., Hsu, P.Y. (1991) *NarK* enhances nitrate uptake and nitrite excretion in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 173, 3303-3310
- Denton, A.L., McConaughy, B.L., Hall, B.D. (1998) Usefulness of RNA polymerase II coding sequences for estimation of green plant phylogeny. *Mol. Biol. Evol.* 15, 1082-5
- Edwards, K.J., Bond, P.L., Gihring, T.M., Banfield, J.F. (2000) An archaeal iron-oxidizing extreme acidophile important in acid mine drainage. *Science* 287, 1796-1799
- Egami, F. (1977) Nitrate accumulated on the earth before the accumulation of atmospheric oxygen by green plants and it was utilized as terminal electron acceptor and nitrogen source. *Seikagaku.* 1977 49, 238-240
- Egami, F. (1976) Comment on the position of nitrate respiration in metabolic evolution. *Orig. Life* 7, 71-72
- Egami, F. (1973) A comment to the concept on the role of nitrate fermentation and nitrate respiration in an evolutionary pathway of energy metabolism. *Z. Allg. Mikrobiol.* 13, 177-181
- Enoch, H.G., Lester, R.L. (1974) The role of novel cytochrom b-containing nitrate reductase and quinone in the in vitro reconstitution of formate-nitrate reductase activity of *E.coli*. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 61, 1234-1241
- Fenchel, T.M., Jørgensen, B.B. (1977) Detritus food chains of aquatic ecosystems and the role of bacteria. In: „Advances in microbial ecology.“ (M. Alexander Hrsg.) Band 1, Plenum Publishing Corp. New York, S. 1-58

- Fitz-Gibbon, S., Choi, A.J., Miller, J.H. (1997) A fosmid-based genomic map and identification of 474 genes of the hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum aerophilum*. *Extremophiles* 1, 36-51
- Gilbert, W. (1986) The RNA world. *Nature* 319, 618-620
- Gangeswaran, R., Eady, R.R. (1996) Flavodoxin 1 of *Azotobacter vinelandii*: characterization and role in electron donation to purified assimilatory nitrate reductase. *Biochem. J.* 317, 103-108
- Guerrero, R. (1998) Crucial crisis in biology: life in the deep biosphere. *Int. Microbiol.* 1, 285-294
- Gürtler, V., Stanisich, V.A. (1996) New approach to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology* 142, 3-16
- Gupta, R.S. (1998) Protein phylogenies and signature sequences: a reappraisal of evolutionary relationships among archaeobacteria, eubacteria, and eukaryotes. *Microbiol. Mol. Biol. Reviews* 62, 1435-1491
- Hall, J.B. (1973) *Space Life Science* 4, 204
- Hansen, J.I., Henricksen, K., Blackburn, T.H. (1981) Seasonal distribution of nitrifying bacteria and rates of nitrification in coastal marine sediments. *Microbiol. Ecol.* 7, 297-304
- Hillis, D.M. (1996) Inferring complex phylogenies. *Nature* 383, 130-131
- Hiraishi, A., Nagashima, K.V., Matsuura, K., Shimada, K., Takaichi, S., Wakao, N., Katayama, Y. (1998) Phylogeny and photosynthetic features of *Thiobacillus acidophilus* and related acidophilic bacteria: its transfer to the genus *Acidiphilium* as *Acidiphilium acidophilum* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48, 1389-1398
- Hiraishi, A., Ueda, Y. (1994) *Rhodoplanes* gen. nov., a new genus of phototrophic bacteria including *Rhodopseudomonas rosea* as *Rhodoplanes roseus* com. nov. and *Rhodoplanes elegans* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44, 665-673
- Holland, H.D. (1997) Evidence for life on Earth more than 3850 million years ago. *Science* 275, 38-39
- Horz, H.P., Rotthauwe, J.H., Lukow, T., Liesack, W. (2000) Identification of major subgroups of ammonia-oxidizing bacteria in environmental samples by T-RFLP analysis of *amoA* PCR products. *J. Microbiol. Methods* 39, 197-204
- Huber, H., Wilharm, T., Huber, D. (1992) *Aquifex pyrophilus* gen. nov. sp. nov., represents a novel group of marine hyperthermophilic hydrogen oxidizing bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 15, 340-351
- Hugenholtz, P., Goebel, B.M., Pace, N.R. (1998) Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.* 180, 4765-4774

- Imhoff, J.F., Trüper, H.G. (1977) *Ectothiorhodospira halochloris* sp. nov., a new extremely halophilic phototrophic bacterium containing bacteriochlorophyll b. Arch. Microbiol. 114, 115-121
- Jørgensen, B.B., Gallardo, V.A (1999) *Thioploca* spp.: filamentous sulfur bacteria with nitrate vacuoles. FEMS Microbiol. Lett. 28, 301-313
- Jones, B.E., Grant, W.D., Duckworth, A.W., Owenson, G.G. (1998) Microbial diversity of soda lakes. Extremophiles 2, 191-200
- Jouanneau, Y., Jeong, H.-S., Willison, J. C. (1998) Overexpression in *Escherichia coli* of the rnf genes from *Rhodobacter capsulatus*--Characterization of two membrane-bound iron-sulfur proteins. Eur. J. Biochem. 521, 54-64
- Judd, A.K., Schneider, M., Sadowsky, M.J., de Bruijn, F.J. (1993) Use of repetitive sequences and the polymerase chain reaction technique to classify genetically related *Bradyrhizobium japonicum* serocluster 123 strains. Appl. Environ. Microbiol. 59, 1702-1708
- Kähler, P. (1990) Denitrifikation in marinen Küstensedimenten (Kieler Bucht, Ostsee). Berichte aus dem Institut für Meereskunde Nr. 199
- Kasting, J.F. (1993) Earth's early atmosphere. Science 259, 920-926
- Kawarabayasi, Y., Hino, Y., Horikawa, H., Yamazaki, S., Haikawa, Y., Jin-no, K., Takahashi, M., Sekine, M., Baba, S., Ankai, A., Kosugi, H., Hosoyama, A., Fukui, S., Nagai, Y., Nishijima, K., Nakazawa, H., Takamiya, M., Masuda, S., Funahashi, T., Tanaka, T., Kudoh, Y., Yamazaki, J., Kushida, N., Oguchi, A., Kikuchi, H., et al. (1999) Complete genome sequence of an aerobic hyper-thermophilic crenarchaeon, *Aeropyrum pernix* K1. DNA Res. 6, 83-101, 145-152
- Kim, B.J., Lee, S.H., Lyu, M.A., Kim, S.J., Bai, G.H., Chae, G.T., Kim, E.C., Cha, C.Y., Kook, Y.H. (1999) Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (*rpoB*). J. Clin. Microbiol. 37, 1714-20
- Kishino, H., Hasegawa, M. (1989) Evaluation of the maximum likelihood estimate of the evolutionary tree topologies from DNA sequence data, and the branching order in *Hominoidea*. J. Mol. Evol. 29, 170-179
- Kirstein, K., Bock, E. (1993) Close genetic relationship between *Nitrobacter hamburgensis* nitrite oxidoreductase and *Escherichia coli* nitrate reductases. Arch. Microbiol. 160, 447-453
- Körner, H., Zumft, W.G. (1989) Expression of denitrification enzymes in response to the dissolved oxygen level and respiratory substrate in continuous culture of *Pseudomonas stutzeri*. Appl. Environ. Microbiol. 55, 1670-1676

- Koroleff, F. (1983) Determination of ammonia. In: K. Grasshoff, M. Erhardt, K. Kremling (Hrsg.) „Methods of seawater analysis.“ Verlag Chemie, Weinheim, S. 150-157
- Kuai, L., Verstraete, W. (1998) Ammonium removal by the oxygen-limited autotrophic nitrification-denitrification system. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4500-4506
- Laanbroek, H.J., Pfennig, N. (1981) Oxidation of short-chain fatty acids by sulfate reducing bacteria in freshwater and marine sediments. *Arch. Microbiol.* 128, 330-335
- Lämmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- Landry, W.L. (1994) Identification of *Vibrio vulnificus* by cellular fatty acid composition using the Hewlett-Packard 5898A Microbial Identification System: collaborative study. *J. AOAC Int.* 77, 1492-1499.
- Leblond-Bourget, N., Philippe, H., Mangin, I., Decaris, B. (1996) 16S rRNA and 16S to 23S internal transcribed spacer sequence analyses reveal inter- and intraspecific *Bifidobacterium* phylogeny. *Int. J. Syst. Bact.* 46, 102-111
- Liu, P.Y., Shi, Z.Y., Lau, Y.J., Hu, B.S., Shyr, J.M., Tsai, W.S., Tseng, C.Y. (1995) Comparison of different PCR approaches for characterization of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 33, 3304-3307
- Liu, W.T., Marsh, T.L., Cheng, H., Forney, L.J. (1997) Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4516-4522
- Lloyd, D. (1993) Aerobic denitrification in soils and sediments: From fallacies to facts. *Trends in ecology and evolution* 8, 352-356
- Ludwig, W., Schleifer, K.H. (1994) Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* 15, 155-173
- Lüdemann, H., Arth, I., Liesack, W. (2000) Spatial changes in the bacterial community structure along a vertical oxygen gradient in flooded paddy soil cores. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 754-762
- Matthäus, W. (1996). Ozeanographische Besonderheiten. In: Lozán, J.L., Lampe, R., Rachor, E., Rumohr, H. & von Westernhagen, H. (Hrsg.). „Warnsignale aus der Ostsee.“ Parey Verlag, 1. Auflage, Berlin, pp 17-24.
- Möseneder, M.M., Arrieta, J.M., Muyzer, G., Winter, C., Herndl, G.J. (1999) Optimization of terminal-restriction fragment length polymorphism analysis of complex marine bacterioplankton communities and comparison with denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Env. Microbiol.* 65, 3518-3525

- Moreno-Vivián, C., Ferguson, S.J. (1998) Definition and distinction between assimilatory, dissimilatory and respiratory pathways. *Mol. Microbiol.* 29, 664-666
- Moreno-Vivián, C., Roldan, M. D., Reyes, F. (1994) Isolation and characterization of transposon Tn5 mutants of *Rhodobacter sphaeroides* deficient in both nitrate and chlorate reduction. *FEMS microbiol. Lett.* 115, 279-284
- Morpeth, F.F., Boxer, D.H. (1985) Kinetic analysis of respiratory nitrate reductase from *Escherichia coli* K 12. *Biochemistry* 24, 40-46
- Müller, E.B., Stouthamer, A.H., van Verseveld, H.W. (1995) Simultaneous NH₃ oxidation and N₂ production at reduced O₂ tensions by sewage sludge subcultured with chemolithotrophic medium. *Biodegradation* 6, 339-349
- Muyzer, G. (1999) DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 317-322
- Muyzer, G., Hottenträger, S., Teske, A., Wawer, C. (1995) Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA - A new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities. *Molecular Microbial Ecology Manual* (Book Akkermans)3.4.4., 1-22
- Muyzer, G., DeWaal, E.C., Uitterlinden, A.G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695-700
- Myrold, D.D., Tiedje, J.M. (1985) Establishment of denitrification capacity in soil: effects of carbon, nitrate and moisture. *Soil. Biol. Biochem.* 18, 559-568
- Nissen, S. (1999) Diversitätsanalyse von Bakteriengemeinschaften der Ostsee mittels molekularbiologischer Methoden. Diplomarbeit, IfM Kiel
- Nissen, S. (1998) Diversitätsanalyse isolierter denitrifizierender Bakterien der westlichen Ostsee (Boknis Eck) mittels Fettsäureanalyse. Semesterarbeit, IfM Kiel
- Noji, S., Nohno, T., Saito, T., Taniguchi, S. (1989) The *narK* gene product participates in nitrate transport induced in *Escherichia coli* nitrate-respiring cells. *FEBS Lett.* 252, 139-143
- Ogunseitan, O.A. (1995) Bacterial genetic exchange in nature. *Sci. Prog.* 78, 183-204
- Olson, C.B. (1981) A theory of the origin of life. *Orig. Life* 11, 353-368
- Olson, G.J., Woese, C.R., Overbeek, R. (1994) The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. *Journal of Bacteriology* 176, 1-6
- Olson, J.M. (1981) Evolution of photosynthetic and respiratory prokaryotes and organelles. *Ann N Y Acad Sci.* 361, 8-19
- Olson, J.M. (1970) The evolution of photosynthesis. *Science* 168, 438-446

- Pace, N.R. (1997) A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* 276, 734-740
- Pace, N.R. (1996) New perspective on the natural microbial world: molecular microbial ecology. *ASM News* 62, 463-470
- Page, L., Griffiths, L., Cole, J.A. (1990) Different physiological roles of two independent pathways for nitrite reduction to ammonia by enteric bacteria. *Arch. Microbiol.* 154, 349-354
- Palys, T., Nakamura, L.K., Cohan, F.M. (1997) Discovery and classification of ecological diversity in the bacterial world: the role of DNA sequence data. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 1145-1156
- Peters, M., Heinaru, E., Talpsep, E., Wand, H., Stottmeister, U., Heinaru, A., Nurk, A. (1997) Acquisition of a deliberately introduced phenol degradation operon, *pheBA*, by different indigenous *Pseudomonas* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4899-4906
- Petri, R., Imhoff, J.F. (1999) Genetic analysis of the bacterial sea ice communities of the Western Baltic Sea using an improved double gradient method of denaturing gradient gel electrophoresis and evidence for the dominance of anoxygenic phototrophic purple sulfur bacteria and other anaerobic bacteria in the inner horizons of the sea ice. *Polar Biol. EASIZ Proceedings* (akzeptiert)
- Pfennig, N. (1974) *Rhodopseudomonas globiformis*, sp. N., a new species of the *Rhodospirillaceae*. *Arch. Microbiol.* 100, 197-206
- Podgorsek, L. (1998) Oxidative Prozesse des Schwefelzyklus in den Sedimenten der Ostsee. Dissertation, IfM Kiel
- Potter, L.C., Millington, P., Griffiths, L., Thomas, G.H., Cole, J.A. (1999) Competition between *Escherichia coli* strains expressing either a periplasmic or a membrane-bound nitrate reductase: does Nap confer a selective advantage during nitrate-limited growth? *Biochem. J.* 344, 77-84.
- Rambler, M., Margulis, L. (1976) Comment of Egami's concept of the evolution of nitrate respiration. *Orig. Life* 7, 73-74.
- Ramirez-Arcos, S., Fernandez-Herrero, L.A., Berenguer, J., Römermann, D., Friedrich, B. (1998) A thermophilic nitrate reductase is responsible for the strain specific anaerobic growth of *Thermus thermophilus* HB 8. *Biochim. Biophys. Acta* 1396, 215-227
- Reyes, F., Roldan, M.D., Klipp, W., Castillo, F., Moreno-Vivian, C. (1996) Isolation of periplasmic nitrate reductase genes from *Rhodobacter sphaeroides* DSM 158: structural and functional differences among prokaryotic nitrate reductases. *Mol. Microbiol.* 19, 1307-1318

- Robertson, L.A., Kuenen, J.G. (1990) Combined heterotrophic nitrification and aerobic denitrification in *Thiosphaera pantotropha* and other bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 57, 139-512
- Robertson, L.A., Cornelisse, R., De Vos, P., Hadjoetomo, R., Kuenen, J.G. (1989) Aerobic denitrification in various heterotrophic nitrifiers. *Antonie Van Leeuwenhoek* 56, 289-299
- Römermann, D., Friedrich, B. (1985) Denitrification by *Alcaligenes eutrophus* is plasmid dependent. *J. Bacteriol.* 162, 852-854
- Rosado, A.S., Duarte, G.F., Seldin, L., Van Elsas, J.D. (1998) Genetic diversity of *nifH* gene sequences in *Paenibacillus azotofixans* strains and soil samples analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2770-2779
- Rotthauwe, J.H., Witzel, K.P., Liesack, W. (1997) The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4704-4712
- Rumohr, H. (1996). Veränderungen am Meeresboden. In: Lozán, J.L., Lampe, R., Rachor, E., Rumohr, H. & von Westernhagen, H. (Hrsg.). „Warnsignale aus der Ostsee.“ Parey Verlag, 1. Auflage, Berlin, pp 162-167.
- Rysgaard, S., Christensen, P.B., Nielsen, L.P. (1995) Seasonal variation in nitrification and denitrification in estuarine sediment colonized by benthic microalgae and bioturbating infauna. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 126, 111-121
- Sabaty, M., Gagnon, J., Vermeglio, A. (1994) Induction by nitrate of cytoplasmic and periplasmic proteins in the photodenitrifier *Rhodobacter sphaeroides* forma sp. *denitrificans* under anaerobic or aerobic condition. *Arch. Microbiol.* 162, 335-343
- Sako, Y., Nomura, N., Uchida, A., Ishida, Y., Morii, H., Koga, Y., Hoaki, T., Maruyama, T. (1996) *Aeropyrum pernix* gen. nov., sp. nov., a novel aerobic hyperthermophilic archaeon growing at temperatures up to 100 degrees C. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 1070-1077
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467
- Sarastre, M., Castresana, J. (1994) Cytochrome oxidase evolved by tinkering with denitrification enzymes. *FEBS Lett.* 341, 1-4
- Schneider, B., Nies, A., Friedrich, B. (1988) Transfer and expression of lithoautotrophy and denitrification in a host lacking these metabolic activities. *Appl. Environ. Microbiol.* 14, 3173-3176

- Schröder, I., Darie, S., Gunsalus, R.P. (1993) Activation of the *Escherichia coli* nitrate reductase (*narGHJI*) operon by *NarL* and *Fnr* requires integration host factor. *J. Biol. Chem.* 268, 771-774
- Searcy, D.G. (1986) Some features of thermo-acidophilic archaeobacteria predaptive for the evolution of eukyrotic cells. *System. Appl. Microbiol.* 7, 198-201
- Seitz, H.-J., Cypionka, H. (1986) Chemolithotrophic growth of *Desulfovibrio desulfuricans* with hydrogen coupled to ammonification of nitrate and nitrite. *Arch. Microbiol.* 146, 63-67
- Seitzinger, S.P. (1990) Denitrification in aquatic sediments. In: „Denitrification in soil and sediment.“ (N.P. Revsbech & J. Sørensen Hrsg.) Plenum Press, New York, S. 301-322
- Shapiro, J.A. (1998) Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. *Annu. Rev. Microbiol.* 52, 81-104
- Shen, R., Yu, C., Ma, Q., Li, S. (1997) Direct evidence for a soluble methane monooxygenase from type I methanotrophic bacteria: purification and properties of a soluble methane monooxygenase from *Methylomonas* sp. GYJ3. *Arch. Biochem. Biophys.* 345, 223-229
- Shiba, T. (1991) *Roseobacter litoralis* gen. nov., sp. nov., and *Roseobacter denitrificans* sp. nov., aerobic pink-pigmented bacteria which contain bacteriochlorophyll a. *Syst. Appl. Microbiol.* 14, 140-145
- Shimizu, M. (1975) Molten earth and the origin of prebiological molecules. *Orig. Life* 6, 15-21
- Siddiqui, R.A., Warnecke-Eberz, U., Hengsberger, A., Schneider, B., Kostka, S., Friedrich, B. (1993) Structure and function of a periplasmic nitrate reductase in *Alcaligenes eutrophus* H16. *J. Bacteriol.* 175, 5867-5876
- Sikorski, J., Graupner, S., Lorenz, M.G., Wackernagel, W. (1998) Natural genetic transformation of *Pseudomonas stutzeri* in a non-sterile soil. *Microbiology* 144, 569-576
- Smith, M.W., Feng, D.F., Doolittle, R.F. (1992) Evolution by acquisition: The case für horizontal gene transfers. *Trends Biochem. Sci.* 17, 489-493
- Smith, M.S., Tiedje, J.M. (1980) Growth and survival of antibiotic resistant denitrifier strains in soil. *Can. J. Microbiol.* 26, 854-856
- Sørensen, J., Jørgensen, B.B., Revsbech, N.P. (1979) A comparison of oxygen, nitrate and sulfate respiration in coastal marine sediments. *Microb. Ecol.* 5, 105-115
- Sørensen, J. (1984) Seasonal variation and control of oxygen, nitrate, and sulfate respiration in coastal marine sediments. In: „Current perspectives in microbial ecology.“ (M.J. Klug, C.A. Reddy, Hrsg.) Proceedings of the 3rd International Symposium on microbial ecology, Washington, S. 447-453

- Sørensen, J., Christensen, D., Jørgensen, B.B. (1981) Volatile fatty acids and hydrogen as substrates for sulfate reducing bacteria in anaerobic marine sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* 42, 5-11
- Sørensen, J. (1978) Capacity for denitrification and reduction of nitrate to ammonia in a coastal marine sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* 35, 301-305
- Stewart, V., Parales, J. Jr., Merkel, S.M. (1989) Structure of genes *narL* and *narX* of the *nar* (nitrate reductase) locus in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 171, 2229-2234
- Stewart, V., MacGregor, C.H. (1982) Nitrate reductase in *Escherichia coli* K-12: involvement of *chlC*, *chlE*, *chlG* loci. *J. Bacteriol.* 151, 788-799
- Stiefel, E.I. (1973) Proposed molecular mechanism for the action of molybdenum in enzymes: coupled proton and electron transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 988-992
- Stouthamer, A.H. (1992) Metabolic pathways in *Paracoccus denitrificans* and closely related bacteria in relation to the phylogeny of prokaryotes. *Antonie Van Leeuwenhoek* 61, 1-33
- Sugahara, I., Hayashi, K., Kimura, T. (1986) Distribution and generic composition of denitrifying bacteria in coastal and oceanic waters. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 52, 497-503
- Sugawara, K., Oana, S., Koyama, T. (1944) Chemistry of the aqueous inclusion in nepheline-basalt from Nagahama, Hamada-si, Simane prefecture. I. *Proc. Japan Acad.* 20, 721
- Sugawara, K., Oana, S., Koyama, T. (1949) Chemistry of the aqueous inclusion in nepheline-basalt from Nagahama, Hamada-si, Simane prefecture. II. *Proc. Japan Acad.* 25, 103
- Taniguchi, S. (1971) Cell and nitrate-developments in the study of nitrate-respiring systems. In: „Different slices of biochemistry.“ (S. Suzuki, M. Ishimoto, M. Kageyama, Hrsg.) Kodansha Ltd. Tokyo, S. 122
- Taylor, B.F., Hearn, W.L., Pincus, S. (1979) Metabolism of monofluoro and monochlorobenzoates by a denitrifying bacterium. *Arch. Microbiol.* 122, 301-306
- Terai, H. (1979) Taxonomic study and distribution of denitrifying bacteria in Lake Kizaki. *Jpn. J. Limnol.* 40, 81-92
- Terai, H., Yoshioka, T. (1983) Serological study on seasonal and vertical distribution of specific denitrifying bacteria in Lake Kizaki. *Jpn. J. Limnol.* 44, 81-92
- Teske, A., Wawer, C., Muyzer, G., Ramsing, N.B. (1996) Distribution of sulfate-reducing bacteria in a stratified fjord (Mariager Fjord, Denmark) as evaluated by most-probable-number counts and denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified ribosomal DNA fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1405-1415
- Tiedje, J.M. (1988) Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. In: „Biology of anaerobic microorganisms.“ (A.J.B. Zehnder Hrsg.) Wiley series in ecological and applied microbiology, New York 1988, S. 179-244

- Trevors, J.T. (1997a) Bacterial evolution and metabolism. *Antonie Van Leeuwenhoek* 71, 257-263
- Trevors, J.T. (1997b) Evolution of bacterial genomes. *Antonie Van Leeuwenhoek* 71, 265-270
- Trevors, J.T. (1997c) Bacterial evolution and silicon. *Antonie Van Leeuwenhoek* 71, 271-276
- Trevors, J.T. (1997d) Molecular evolution in bacteria: surfaces, cathodes and anodes. *Antonie Van Leeuwenhoek* 71, 363-368
- Trevors, J.T. (1996) Genome size in bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 69, 293-303
- Tsay, S.S., Yu, P.J. (1997) [Isolation of bacteria which could perform nitrification and denitrification simultaneously by gene probe]. *Chung Hua Min Kuo Wei Sheng Wu Chi Mien I Hsueh Tsa Chih* 30, 265-2674
- Tuominen, L., Heinänen, A., Kuparinen, J., Nielsen, L.P. (1998) Spatial and temporal variability of denitrification in the sediments of the northern Baltic Proper. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 172, 13-24
- Ueda, T., Suga, Y., Yahiro, N., Matsuguchi, T. (1995) Remarkable N₂-fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of *nifH* gene sequences. *J. Bacteriol.* 177, 1414-1417
- Uemoto, H., Saiki, H. (2000) Nitrogen removal reactor using packed gel envelopes containing *Nitrosomonas europaea* and *Paracoccus denitrificans*. *Biotechnol. Bioeng.* 67, 80-86
- van der Oost, J., de Boer, A.P., de Gier, J.W., Zumft, W.G., Stouthamer, A.H., van Spanning, R.J. (1994) The heme-copper oxidase family consists of three distinct types of terminal oxidases and is related to nitric oxide reductase. *FEMS Microbiol. Lett.* 121, 1-9
- van Niel, E.W., Braber, K.J., Robertson, L.A., Kuenen, J.G. (1992) Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification in *Alcaligenes faecalis* strain TUD. *Antonie Van Leeuwenhoek* 62, 231-237
- Völk, P., Huber, R., Drobner, E., Rachel, R., Burggraf, S., Trincone, A., Stetter, K.O. (1993) *Pyrobaculum aerophilum* sp. nov., a novel nitrate-reducing hyperthermophilic archaeum. *Appl. Env. Microbiol.* 59, 2918-2926
- von Bodungen, B. (1986) Annual cycles of nutrients in a shallow inshore area, Kiel bight – variability and trends. *Ophelia* 26, 91-107
- Walter, M.R., Buick, R., Dunlop, J.S.R. (1980) Stromatolites 3.400-3.500 Myr old from the North pole area, Western Australia. *Nature* 284, 443-445
- Wawer, C., Muyzer, G. (1995) Genetic diversity of *Desulfovibrio* spp. in environmental samples analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis of [NiFe] hydrogenase gene fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2203-2210

- Wehrfritz, J.M., Reilly, A., Spiro, S., Richardson, D.J. (1993) Purification of hydroxylamine oxidase from *Thiosphaera pantotropha*. Identification of electron acceptors that couple heterotrophic nitrification to aerobic denitrification. FEBS Lett 335, 246-250
- Williams, R. J., Evans, W.C. (1975) The metabolism of benzoate by *Moraxella* species through anaerobic nitrate respiration. Biochem. J. 148, 1-10
- Woese, C.R., Fox, G.E. (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5088-5090
- Wright, A., Olson, R.H. (1994) Self-mobilization and organization of the genes encoding the toluene metabolic pathway of *Pseudomonas mendocina* KR1. Appl Environ Microbiol 60, 235-242
- Yamamoto, S., Harayama, S. (1998) Phylogenetic relationships of *Pseudomonas putida* strains deduced from the nucleotide sequences of *gyrB*, *rpoD* and 16S rRNA genes. Int. J. Syst. Bacteriol. 48, 813-819
- Zahn, J.A., Arciero, D.M., Hooper, A.B., DiSpirito, A.A. (1996) Evidence for an iron center in the ammonia monooxygenase from *Nitrosomonas europaea*. FEBS Lett. 397, 35-38.
- Zohner, A., Broda, E. (1979) Model experiments on nitrite and nitrate in simulated primeval conditions. Orig. Life. 9, 291-298
- Zart, D., Bock, E. (1998) High rate of aerobic nitrification and denitrification by *Nitrosomonas eutropha* grown in a fermentor with complete biomass retention in the presence of gaseous N₂O or NO. Arch. Microbiol. 169, 282-286
- Zumft, W.G. (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61, 533-616

Tabelle A1: PCR-Bedingungen für die Amplifikation und Sequenzierung von PCR-Produkten

Programmteil			Amplifikation von 16S rDNA -Fragmenten	Amplifikation von Fragmenten funkt. Gene	Amplifikation von Fragmenten für die DGGE
1	Initiativschritt	Denaturierung	2 min, 94 °C	2 min, 94 °C	2 min, 94 °C
		Zyklenzahl	1	1	1
2	"Touchdown"-Phase	Annealing	30 s, 65 °C -1 °C/Zyklus	30 s, 63 °C -1 °C/Zyklus	30 s, 60 °C -1 °C/Zyklus
		Elongation	40 s, 72 °C	40 s, 72 °C	40 s, 72 °C
		Denaturierung	30 s, 94 °C	30 s, 94 °C	30 s, 94 °C
		Zyklenzahl	15	15	15
3	Amplifikation	Annealing	30 s, 50 °C	30 s, 48 °C	30 s, 48 °C
		Elongation	40 s, 72 °C	40 s, 72 °C	40 s, 72 °C
		Denaturierung	30 s, 94 °C	30 s, 94 °C	30 s, 94 °C
		Zyklenzahl	25	25	25
4	Finale Extension	Annealing	1 min, 40 °C	1 min, 40 °C	1 min, 40 °C
		Elongation	5 min, 72 °C	5 min, 72 °C	5 min, 72 °C
		Zyklenzahl	1	1	1

Programmteil			Re-Amplifikation von eluierten Banden	Cycle-sequencing (ALF)	Cycle-sequencing (ABI310)
1	Initiativschritt	Denaturierung	2 min, 94 °C	2 min, 94 °C	2 min, 94 °C
		Zyklenzahl	1	1	1
2	"Touchdown"-Phase	Annealing	30 s, 68 °C -1 °C/Zyklus		
		Elongation	40 s, 72 °C		
		Denaturierung	30 s, 94 °C		
		Zyklenzahl	10		
3	Amplifikation	Annealing	30 s, 58 °C	30 s, 50 °C	15 s, 50 °C
		Elongation	40 s, 72 °C	40 s, 72 °C	4 min, 60 °C
		Denaturierung	30 s, 94 °C	30 s, 94 °C	15 s, 94 °C
		Zyklenzahl	20	30	30
4	Finale Extension	Annealing	1 min, 40 °C	1 min, 40 °C	
		Elongation	5 min, 72 °C	5 min, 72 °C	
		Zyklenzahl	1	1	

CONSENSUS	KCIGCHTCSV	TCKNVWTSRE	G.EYAWFNNV	ETKPGIGYPK	.WENQEKWKG	GW.R.....	GKL.PR.G.K
PfluoresIMSEDI.NAN---	..TIN..I.G.
PstutzeriIMDV.NGD---	..TIN.KI.G.
ShewanellaIVFEN.NK.TDA---	..ELKI.G.
E.coli HRPQVL.F.TDYIPKIN---	..Q..M.NR
SerratiaWKMSV.NA.DI.KIN---
E.coli YGMND.E.QV.DVN---	..IR..L.N.
ParacoccusVDRR.NV.TRC---	..H.R.KQ.G.
BsubtilisAS.T.N.SA.MYQ.D.D.YTLKK---	..ELKS.S.
Paenibac.TT.N.KA.M.VR.D.LYTLRK---	..ELKS.N.
Staphylo.T.N.PA.IVR.D.HYTLNKK---	..DLKA.SR
Mycobac.QA.N.ST.VR.VRTY.D.R.RV.DKK---	..R.RL.D.GR
Nitrobac.IA.I.D.KT.MYWTR.D.T.YRVV-DGTRQ	KS.RL.LQG.
	10	20	30	40	60	60	70

CONSENSUS	...LA...IF	ANPDLP.IDD	YYEPDFDFDYO	.LHTAP...K	HQP.ARPRSL	ITG.RM.KIE	WGNPWEEILG
Pfluores	FRV..N--..SL..HLG-ETS.K.E
Pstutzeri	FRV..N--..TNIS-EVS.Q.E
Shewanella	IRL..K--..EEDS-QVQ.E
E.coli H	AML.GK--..H.GNEGSSHTIE.AK....DD..
Serratia	LGL.SK--..V.ALYNQD-IQ.K
E.coli Y	MGVITK--..VV.QTH.S.EG-I.TD.K.D.VIL
Paracoccus	WRI..N--..EDH.KS.EM-QAF.TKS.E.E
Bsubtilis	TNR..G--L	Y..NQ.SWNYE.T.TNS.QK-VK.S	L..DF.N
Paenibac.	LSKI.LGK..	Y..M.EMKWTYN.E	Y.TN.GEQ-S.VAH.A	V..EQ.D-L
Staphylo.	WSKI.FGK..	Y..M.V.KWTYN.E	H.T.KAS-S.VTAH.V	S.DKID-LH
Mycobac.	IHK.LR--..K.T.GWTYE.N.TSAG-DTF.T.AS.NP.K-VS
Nitrobac.	WGT.SN--..	Y..Y.TLF.WTYN.INLA-DE.TAI.M
	80	90	100	110	120	130	140

CONSENSUS	GEF.KR.KD	NFD.....Q	.IYG.FENTF	MMYLPRLCEH	CLNPACVASC	PSGAIYKREE	DGIVLIDQDK
Pfluores	T..A..R.K	...K--I.A	D...EYT.A.AE
Pstutzeri	T..A..R.K	...K--V.A	D...QYI..CIE
Shewanella	T..E..K.N	...NV--I.K	D...Q.KS
E.coli H	...D..A.K	...T--I.K	AM.SQT
Serratia	...S..S.K	...N--M.K	EM..QTG
E.coli Y	...E..AR.R	...EA--M.K	EM..QST
Paracoccus	...E..S.Y	...EG--I.K	D...EYEE
Bsubtilis	.GHITGLE.P	.VQK---MEE	S.KTE.DDV	I.....I	I.....SMV.NA
Paenibac.	.HVTGPH.P	.IQK---IEE	E.KFN.KS	.I.....SMD
Staphylo.	.GHVTGPE.P	.IQR---IEE	K.QFD.DQSMD
Mycobac.	.SPEIVPN.P	VLKKVNQVNQ	EVKCLKL.EFISM
Nitrobac.	.SQVYANN.P	...GASDEEM	RQINEINS.V	FF.....I.NGAQ
	150	160	170	180	190	200	210

CONSENSUS	CRGWRC.SG	CPYKKIYFNW	KSGKSEKCIF	CYPRIEAG.P	TVCSETCVGR	IRYLGVLLYD	ADRI.E.AS.
PfluoresIMAS.V.T
PstutzeriIFMAH.V.T
ShewanellaV.ATFQQ.EIA.NT
E.coli HITSQA.ERA.T
SerratiaLTSQETGG.A
E.coli YL.ISQE.A.T
ParacoccusVY	ST.....LL.S.QLMK.A.A.AS
Bsubtilis	...S.Y.V.S	...V	QTN.A...TL	F..L...L	I.....MKVE.A.V
Paenibac.	...Y.MT	...V	QTN.....	F.....MAH.V.T
Staphylo.	...Y.MT	...V	TN.A...T	F..V...MTMVH.V.C
Mycobac.	...V	...V	H.T.A...TL	...V.LL	...LV...V
Nitrobac.	..A...V	...T	ST..A...L	...L.S.HA	PA.FHS	...I.LV	...A.E.T.KA
	220	230	240	250	260	270	280

CONSENSUS	ENE.DLY..Q	L.IFLDPNDP	.VI.QA..DG	IP.SVIEAAQ	.SPVYKMA.D
Pfluores	A..Q...EK	.E.....	A..R..LA	V.Q...DS	R.....V
Pstutzeri	V..Q...AK	.E.....F	K..E..LN	V.M.....	K.....V
Shewanella	P..K...QA	.DV.....	A..EA.RKE	.SDNW.T	R.....I
E.coli H	...K...QR	.EV.....	K..E..IKH	.L.....	Q.....ME
Serratia	..DK...QS	.D.....	A..A..LK.C	-...D.K	Q.T.....ME
E.coli Y	.R.V...ER	CEV...H	S..EE.LKQ	..QN..D.H	G.....M
Paracoccus	.S.M...DAH	VG.....	E..AA.RAE	V.EDW.KG	K..IW...ME
Bsubtilis	...K...HS	.DV.....	E.AKL.KEQ	..AEC...	Q..I...II
Paenibac.	V..Q...AK	.E.....F	K..E..LN	V.M.....	K.....V
Staphylo.	...Q...EK	CEL..N.Y.E	D..E..KK	..TMDW	N.....L.IE
Mycobac.	.SDT...EA	RR.L...H	R..AG.RAE	.ADEW	R....ALINT
Nitrobac.	PQDQ-.VMA	RN.IK..F	DI.AA.RAN	..D.K	K....QFVKK
	290	300	310	320	330

Tabelle A3: Similaritäten der Aminosäuresequenzen und der auf zwei Basen reduzierten Nukleotidsequenzen des narH-Gens

Isolate und Referenzstämme	Sequenzsimilarität (%)																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1 <i>Pseudomonas</i> spec. KB 1-3-4		92,7	88,2	85,9	77,0	76,8	72,0	75,1	75,7	74,9	73,5	71,5	57,4	56,7	62,7	57,7	55,4	51,9	48,4	50,7	50,9
2 <i>Pseudomonas</i> spec. KB 1-3-1	95,8		86,8	86,4	76,6	76,3	72,6	75,7	75,5	75,3	72,8	70,3	56,8	56,5	63,1	57,7	54,9	52,4	49,4	50,8	50,2
3 <i>Pseudomonas stutzeri</i> DSM 5190 ^T	92,1	92,1		89,3	79,2	79,1	73,6	74,6	75,5	74,5	73,1	71,0	58,9	58,0	68,3	60,9	55,6	52,4	48,6	52,8	50,5
4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO	90,6	91,2	93,3		79,1	79,9	74,6	76,6	77,7	76,9	75,5	74,8	59,2	58,2	64,7	61,5	58,8	54,8	51,2	53,2	52,6
5 <i>Shewanella</i> spec. Bok 1-30-2	83,5	83,1	82,6	84,3		81,3	72,8	73,0	73,3	74,1	71,0	72,9	60,8	61,3	62,9	59,9	56,8	51,4	47,7	52,8	53,8
6 <i>Shewanella</i> spec. KB 3-30-1	84,5	83,5	85,5	86,7	87,2		75,4	75,6	74,5	75,4	72,9	74,7	61,7	61,9	62,2	59,5	58,0	51,5	48,6	53,0	53,0
7 <i>Escherichia coli</i> TG 1, narH	84,2	84,2	84,0	85,4	82,9	85,1		87,0	81,6	80,4	76,4	69,0	58,9	60,2	62,9	59,4	55,9	52,0	49,2	52,0	52,6
8 <i>Erwinia</i> spec. KB 30-7	85,1	85,4	84,9	85,9	83,1	83,9	92,8		83,7	82,3	77,3	69,5	58,9	60,4	62,8	59,3	57,7	52,0	48,3	52,5	52,7
9 <i>Serratia</i> spec. KB 3-30-2	86,5	85,9	86,9	87,9	82,5	83,9	89,5	89,8		94,1	76,5	68,3	57,9	59,6	62,5	58,6	56,4	52,7	48,8	52,6	51,9
10 <i>Serratia proteamaculans</i> 182	87,3	86,9	86,7	88,1	84,3	84,8	89,2	89,0	96,4		75,2	68,0	57,8	59,1	61,6	57,8	56,5	52,3	48,6	52,0	50,6
11 <i>Escherichia coli</i> TG 1, narY	84,3	83,3	83,4	85,4	79,2	82,9	86,5	85,6	86,0	85,9		70,7	58,5	57,0	63,0	60,1	59,4	51,0	48,0	53,0	50,5
12 <i>Paracoccus denitrificans</i> LMD 82.5	80,6	79,9	80,9	83,9	81,5	84,8	79,8	79,2	79,5	80,0	80,8		58,4	58,0	57,8	56,1	58,7	53,3	50,1	50,8	52,6
13 <i>Bacillus cereus</i> Ki 2i	69,7	69,4	70,6	70,6	73,4	75,2	71,8	71,4	70,5	70,9	70,3	71,4		82,8	66,8	65,4	57,9	52,1	49,1	52,1	53,2
14 <i>Bacillus subtilis</i> JH 642	68,6	68,3	70,2	69,9	72,6	74,4	73,5	72,1	71,1	71,4	69,1	71,0	90,1		68,0	67,2	58,4	52,1	49,6	52,4	53,6
15 <i>Paenibacillus</i> spec. A 234	76,2	75,9	79,5	77,5	73,9	75,3	77,4	76,4	75,7	75,3	76,3	72,2	78,2	79,8		78,8	57,4	52,1	48,8	54,4	51,3
16 <i>Staphylococcus carnosus</i> TM 300	70,5	70,4	72,3	73,1	72,7	73,1	73,0	72,8	70,6	70,9	72,0	70,4	78,4	79,4	86,2		60,5	48,9	45,6	52,5	49,7
17 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Hv37R	68,8	68,8	68,5	71,4	68,1	70,3	69,3	70,9	71,2	71,0	71,6	72,8	69,6	69,1	68,4	70,4		53,8	50,4	54,0	53,8
18 <i>Nitrobacter hamburgensis</i> X 14	65,5	65,4	66,0	67,8	66,4	65,3	66,3	67,0	66,3	66,4	66,4	67,3	68,4	66,0	68,0	67,2	65,8		90,6	55,2	64,1
19 <i>Nitrobacter winogradskyi</i> DSM 10237 ^T	63,3	63,6	64,0	65,9	63,4	63,4	63,5	63,7	63,7	63,5	64,1	65,6	66,2	64,3	63,9	60,0	64,0	94,8		52,3	59,8
20 <i>Aeropyrum pernix</i> K 1	63,5	62,9	64,8	65,3	65,2	64,6	64,9	65,8	65,4	66,0	66,8	63,6	65,4	67,6	67,4	65,8	64,2	65,8	64,4		54,9
21 <i>Thermus thermophilus</i> HB 8	64,5	63,8	64,2	67,4	66,6	66,6	65,6	65,7	65,7	65,1	64,3	67,8	66,2	65,5	63,6	63,4	67,9	75,1	72,2	67,1	

Alle Similaritätswerte wurden nach dem maximum-likelihood-Algorithmus unter Verwendung des Programms MOLPHY berechnet. Im Dreieck links unten befinden sich die Werte für die auf die beiden ersten kodierenden Positionen reduzierten Nukleotidsequenzen, im Dreieck oben rechts befinden sich die Similaritätswerte der Aminosäuresequenzen.

Tabelle A4: Similaritäten der Codon-korrigierten Nukleotidsequenzen und der nicht-reduzierten Nukleotidsequenzen des narH-Gens

Isolate und Referenzstämme	Sequenzsimilarität (%)																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1 <i>Pseudomonas</i> spec. KB 1-3-4		89,4	84,5	83,8	67,4	69,0	74,3	74,4	78,3	78,8	72,6	69,8	57,3	58,1	66,8	55,1	58,5	59,2	56,8	53,5	58,4
2 <i>Pseudomonas</i> spec. KB 1-3-1	97,2		86,4	85,3	68,0	69,9	73,4	75,8	77,9	79,5	71,5	69,3	55,7	56,7	66,6	53,2	59,4	60,5	57,8	53,4	59,5
3 <i>Pseudomonas stutzeri</i> DSM 5190 ^T	94,2	93,8		89,3	66,2	70,2	74,3	74,4	79,6	80,0	71,2	71,8	55,8	59,6	73,3	54,0	60,0	62,7	60,4	56,0	59,0
4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO	93,0	93,3	94,2		66,8	69,6	74,2	73,9	78,6	78,9	71,8	74,1	55,6	59,8	69,1	53,7	63,3	63,7	61,5	56,7	62,9
5 <i>Shewanella</i> spec. Bok 1-30-2	87,8	87,5	87,8	88,4		76,7	67,5	68,6	66,8	68,2	66,1	63,1	64,7	59,4	58,9	63,0	54,1	52,9	50,7	50,8	53,5
6 <i>Shewanella</i> spec. KB 3-30-1	88,2	87,7	88,9	89,0	90,1		70,1	70,4	69,8	70,2	67,9	67,6	65,2	61,2	60,7	61,2	56,1	53,5	52,2	50,8	54,6
7 <i>Escherichia coli</i> TG 1, narH	84,1	82,9	83,8	85,6	84,1	86,3		83,6	81,1	80,6	76,0	67,9	60,0	60,2	65,2	57,9	57,5	57,8	56,1	51,6	55,0
8 <i>Erwinia</i> spec. KB 30-7	85,6	85,7	85,5	86,9	84,7	86,9	82,0		80,5	80,1	74,9	66,5	60,5	60,7	63,1	58,4	59,8	57,9	54,9	52,4	56,1
9 <i>Serratia</i> spec. KB 3-30-2	87,6	87,8	87,3	88,0	85,3	87,4	82,6	93,9		91,8	75,8	69,8	57,7	59,2	66,5	55,1	61,5	59,7	57,7	54,5	59,0
10 <i>Serratia proteamaculans</i> 182	88,9	88,6	88,3	89,6	86,1	87,4	83,0	91,3	92,5		76,0	69,4	58,5	58,2	66,5	55,9	62,8	60,7	58,4	55,3	58,7
11 <i>Escherichia coli</i> TG 1, narY	89,0	88,9	87,9	89,4	87,0	88,2	82,8	91,0	91,8	97,3		67,4	59,1	56,6	62,6	57,8	58,7	57,4	55,1	53,7	55,3
12 <i>Paracoccus denitrificans</i> LMD 82.5	86,1	85,5	85,1	87,5	83,1	86,1	84,1	87,8	88,0	88,0	87,9		55,9	57,4	62,5	52,6	63,0	60,5	59,5	54,4	61,6
13 <i>Bacillus cereus</i> Ki 2i	75,4	75,0	76,1	75,6	77,2	78,9	75,2	76,6	76,1	76,2	76,1	75,7		75,0	63,3	67,1	53,7	53,2	50,5	48,3	51,1
14 <i>Bacillus subtilis</i> JH 642	75,8	75,0	76,5	75,8	77,8	79,0	76,1	78,4	77,6	77,6	77,2	75,2	91,0		66,9	65,0	55,1	53,9	53,1	53,0	54,4
15 <i>Paenibacillus</i> spec. A 234	79,7	79,5	82,4	80,5	78,7	78,9	76,6	80,3	80,2	79,3	78,7	80,2	80,8	82,8		68,1	59,1	58,2	55,3	54,9	55,4
16 <i>Staphylococcus carnosus</i> TM 300	76,1	75,6	77,4	78,0	76,4	76,9	74,2	78,8	77,3	76,7	76,6	78,0	80,9	82,7	88,6		52,8	47,9	46,3	49,0	46,8
17 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Hv37R	74,7	73,7	73,0	75,5	74,2	74,9	75,8	73,1	75,2	75,7	75,8	76,2	74,4	75,0	73,7	76,9		59,6	57,3	53,4	59,0
18 <i>Nitrobacter hamburgensis</i> X 14	61,6	60,8	62,0	63,3	62,4	61,7	62,3	61,7	61,9	62,0	61,6	61,0	63,0	63,2	61,9	59,8	61,1		87,5	57,8	66,7
19 <i>Nitrobacter winogradskyi</i> DSM 10237 ^T	59,7	59,0	59,4	61,7	59,2	60,2	60,2	59,6	59,5	59,9	59,5	59,0	61,7	61,4	58,8	56,8	58,1	88,0		57,7	63,9
20 <i>Aeropyrum pernix</i> K 1	70,8	69,9	71,5	72,5	72,1	71,9	70,1	71,7	72,0	72,1	71,8	73,4	70,1	71,4	72,8	72,8	71,1	64,1	62,4		62,9
21 <i>Thermus thermophilus</i> HB 8	70,9	69,8	69,3	71,5	73,9	71,8	72,3	71,6	71,6	72,3	71,6	70,1	71,0	71,5	68,8	69,5	72,6	68,5	66,0	73,8	

Alle Similaritätswerte wurden nach dem maximum-likelihood-Algorithmus unter Verwendung des Programms MOLPHY berechnet. Im Dreieck links unten befinden sich die Werte für die Codon-korrigierten Nukleotidsequenzen, im Dreieck oben rechts befinden sich die Similaritäten der nicht-reduzierten Nukleotidsequenzen.

Tabelle A5: Similaritäten der 16S rDNA-Sequenzen

Isolate und Referenzstämme	Sequenzsimilarität (%)																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1 <i>Pseudomonas</i> spec. KB 1-3-4		97,4	95,4	94,7	86,3	87,0	84,9	85,3	85,0	86,1	81,6	78,7	79,5	79,0	78,9	76,0	80,2	80,5	62,4	75,7
2 <i>Pseudomonas</i> spec. KB 1-3-1			95,0	94,1	85,6	86,1	85,0	84,7	84,6	85,8	81,0	79,0	79,9	79,0	79,1	76,4	80,1	79,8	62,4	75,2
3 <i>Pseudomonas stutzeri</i> DSM 5190 ^T				96,8	85,5	86,1	84,7	85,0	84,8	85,8	80,9	79,2	79,1	79,2	78,9	76,1	80,1	80,6	61,0	75,3
4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO					84,5	85,3	84,9	84,9	84,7	85,8	81,3	78,7	78,8	78,3	79,0	76,3	79,6	79,9	61,7	75,0
5 <i>Shewanella</i> spec. Bok 1-30-2						96,3	88,1	88,7	88,5	89,6	79,5	76,8	76,5	76,5	76,6	74,9	78,6	79,3	60,5	73,2
6 <i>Shewanella</i> spec. KB 3-30-1							87,5	88,4	88,2	89,1	80,4	77,3	77,5	77,1	77,4	75,8	79,0	79,1	60,8	73,6
7 <i>Escherichia coli</i> TG 1, narH								95,4	94,5	94,1	78,8	76,8	76,9	76,8	77,3	75,5	78,7	78,8	60,8	74,9
8 <i>Erwinia</i> spec. KB 30-7									96,6	96,5	79,3	75,3	76,0	76,0	76,3	75,4	78,1	78,3	60,6	74,5
9 <i>Serratia</i> spec. KB 3-30-2										98,1	79,3	76,0	76,5	76,1	77,4	75,3	78,2	78,3	60,1	74,2
10 <i>Serratia proteamaculans</i> 182											79,3	76,1	76,9	76,3	77,3	76,3	78,3	78,4	60,6	74,0
11 <i>Paracoccus denitrificans</i> LMD 82.5												77,5	78,7	77,7	77,9	76,8	87,3	87,7	64,5	75,2
12 <i>Bacillus cereus</i> Ki 2i													93,6	86,7	93,0	77,3	78,6	79,1	62,4	75,1
13 <i>Bacillus subtilis</i> JH 642														87,0	92,7	78,4	79,4	79,9	63,3	75,8
14 <i>Paenibacillus</i> spec. A 234															85,7	77,5	79,0	78,9	63,3	75,1
15 <i>Staphylococcus carnosus</i> TM 300																77,4	78,7	79,3	61,2	75,4
16 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Hv37R																	75,2	75,6	62,0	76,0
17 <i>Nitrobacter hamburgensis</i> X 14																		98,8	62,9	74,3
18 <i>Nitrobacter winogradskyi</i> DSM 10237 ^T																			63,2	74,8
19 <i>Aeropyrum permix</i> K 1																				66,6
20 <i>Thermus thermophilus</i> HB 8																				

Die Similaritätswerte wurden nach dem maximum-likelihood-Algorithmus unter Verwendung des Programms MOLPHY berechnet.

A6: Werte der chemischen und physikalischen Parameter der Probenahmestationen

Station	Sedimenttiefe [cm]	NO ₃ ⁻ -Konz. [µM]	NH ₄ ⁺ -Konz. [µM]	Redoxpotential [mV]	pH-Wert
Boknis Eck	Bodenwasser	-	77.2	347	7.10
	Sedimentoberfläche	-	-	350	7.10
	0.0-1.0	5.6	124.2	222	7.09
	1.0-2.0	1.8	146.7	250	7.03
	2.0-3.0	1.1	128.9	164	6.96
	3.0-4.0	2.8	147.2	17	6.95
	4.0-5.0	1.7	152.6	-12	6.98
	5.0-6.0	0.0	146.9	-40	7.02
Kieler Bucht	Bodenwasser	3.59	0.7	483	7.78
	Sedimentoberfläche	-	-	479	7.95
	0.0-1.0	28.9	40.1	417	8.06
	1.0-2.0	6.0	51.6	392	8.08
	2.0-3.0	1.2	42.2	377	7.97
	3.0-4.0	8.1	45.0	343	7.79
	4.0-5.0	5.1	37.7	307	7.70
	5.0-6.0	7.2	39.4	287	7.65
BY 1B	Bodenwasser	6.8	2.1	273	7.75
	Sedimentoberfläche	-	-	264	7.50
	0.0-0.5	1.3	92.9	177	7.56
	0.5-1.0	-	-	120	7.60
	1.0-1.5	1.0	243.5	106	7.61
	1.5-2.0	-	-	100	7.61
	2.0-2.5	2.3	353.1	126	7.61
	2.5-3.0	-	-	44	7.58
	3.0-3.5	4.4	438.4	-1	7.56
	3.5-4.0	-	-	-73	7.52
	4.0-4.5	1.2	467.1	-112	7.50
	4.5-5.0	-	-	-129	7.47
5.0-5.5	0.9	498.0	-135	7.45	
5.5-6.0	-	-	-135	7.44	
BY 4B	Bodenwasser	2.6	15.2	106	7.21
	Sedimentoberfläche	-	-	48	7.39
	0.0-1.0	1.7	106.1	-17	7.49
	1.0-2.0	1.3	215.9	-69	7.53
	2.0-3.0	2.1	291.8	-92	7.60
	3.0-4.0	5.7	381.1	-109	7.64
	4.0-5.0	2.6	450.9	-115	7.64
	5.0-6.0	1.4	509.5	-118	7.64
AL 93	Bodenwasser	3.5	11.8	198	7.75
	Sedimentoberfläche	-	-	58	7.86
	0.0-1.0	8.0	463.3	-60	7.81
	1.0-2.0	5.1	468.1	-76	7.65
	2.0-3.0	4.3	561.3	-82	7.57
	3.0-4.0	3.9	617.5	-84	7.55
	4.0-5.0	7.1	630.5	-86	7.55
	5.0-6.0	4.0	621.8	-89	7.55

A6: Werte der chemischen und physikalischen Parameter der Probenahmestationen (Forts.)

Station	Sedimenttiefe [cm]	NO ₃ ⁻ -Konz. [μM]	NH ₄ ⁺ -Konz. [μM]	Redoxpotential [mV]	pH-Wert
BY 15A	Bodenwasser	3.5	9.4	-	7.58
	Sedimentoberfläche	-	-	189	7.57
	0.0-1.0	5.4	67.8	24	7.49
	1.0-2.0	1.4	85.1	-13	7.51
	2.0-3.0	2.6	100.4	-17	7.51
	3.0-4.0	4.5	130.0	-43	7.53
	4.0-5.0	5.4	144.3	-39	7.54
	5.0-6.0	5.2	160.1	-40	7.56
F 80	Bodenwasser	1.6	9.8	-	-
	Sedimentoberfläche	-	-	198	7.20
	0.0-1.0	1.5	145.5	161	7.33
	1.0-2.0	4.5	252.0	40	7.38
	2.0-3.0	3.2	298.3	28	7.41
	3.0-4.0	3.7	354.8	12	7.45
	4.0-5.0	3.6	398.9	2	7.46
	5.0-6.0	4.1	473.2	-8	7.47
LL 17	Bodenwasser	5.4	4.5	182	7.13
	Sedimentoberfläche	-	-	167	7.24
	0.0-1.0	4.6	115.6	48	7.35
	1.0-2.0	13.2	209.1	17	7.45
	2.0-3.0	11.1	230.5	-4	7.50
	3.0-4.0	3.9	268.9	-29	7.52
	4.0-5.0	5.2	313.6	-31	7.54
	5.0-6.0	4.6	359.0	-33	7.58
JML	Bodenwasser	5.8	0.6	-	7.22
	Sedimentoberfläche	-	-	235	7.16
	0.0-0.5	2.2	72.6	67	7.01
	0.5-1.0	-	-	110	6.91
	1.0-1.5	7.5	109.1	146	6.93
	1.5-2.0	-	-	182	6.83
	2.0-2.5	1.0	137.3	182	6.76
	2.5-3.0	-	-	156	6.66
	3.0-3.5	0.6	153.2	138	6.61
	3.5-4.0	-	-	117	6.59
	4.0-4.5	3.7	162.0	94	6.58
	4.5-5.0	-	-	79	6.59
	5.0-5.5	1.0	166.9	70	6.59
5.5-6.0	-	-	58	6.61	
GF 2	Bodenwasser	10.3	0.2	147	7.30
	Sedimentoberfläche	-	-	117	7.73
	0.0-1.0	1.0	69.8	112	7.53
	1.0-2.0	3.1	98.0	84	7.49
	2.0-3.0	0.6	176.8	-66	7.47
	3.0-4.0	2.3	267.2	-52	7.46
	4.0-5.0	1.6	315.3	-56	7.46
	5.0-6.0	1.9	347.5	-63	7.46

Tabelle A7: Zellparameter und Nährstoffkonzentrationen des Nitratverwertungsversuchs mit *Pseudomonas stutzeri* DSM 5190^T

	Zeitpunkt der Probenahme [in min von T ₀]														
	T ₋₂ [-100]	T ₋₁ [-40]	T ₀ [0]	T ₁ [12]	T ₂ [30]	T ₃ [45]	T ₄ [60]	T ₅ [75]	T ₆ [90]	T ₇ [135]	T ₈ [200]	T ₉ [260]	T ₁₀ [320]	T ₁₁ [380]	T ₁₂ [980]
Zellparameter															
pH-Wert	7.88	7.76	8.02	8.05	8.08	8.17	8.24	n.d.	8.60	8.96	8.04	7.69	8.03	8.29	8.46
Optische Dichte [588nm]	0.038	0.080	0.098	0.093	0.090	0.085	0.090	0.105	0.175	0.130	0.085	0.280	0.100	0.090	n.d.
Zellzahl/ml (*10 ³)	232.6	211.7	224.9						237.0	206.9	248.8	291.0	253.9	344.7	311.2
mittleres Zellvolumen [µm ³]	0.224	0.256	0.276						0.309	0.305	0.313	0.263	0.240	0.269	0.153
mittlere Biomasse [µg C/l]	8.68	8.60	9.59						10.83	9.40	11.40	11.96	9.70	14.20	9.22
mittleres Zellgewicht [fg/Zelle]	37.30	40.64	42.66	Zu den Probenahmezeitpunkten T ₁ bis T ₅ wurden ausschließlich Proben für die Bestimmung von Proteinmustern und die Detektion der mRNA der funktionellen Gene entnommen.					45.71	45.42	45.83	41.09	38.20	41.20	29.62
Zahl der sich teilenden Zellen	9	10	10						3	10	11	12	14	13	14
Nährstoffe															
Acetat [mM]	7.36	6.88	6.16						6.04	4.57	3.99	3.23	3.00	3.18	3.09
Nitrat [mM]	-	-	(3.95)						4.63	1.33	0.07	-	-	-	-
Nitrit [mM]	-	-	0.24						0.75	0.98	1.03	0.59	0.19	0.01	-
Phosphat [mM]	7.89	7.63	7.25						6.47	6.42	6.85	7.05	6.41	6.47	6.74

^a: die Nitratzugabe lag bei 5mM, der gemessene Wert beruht auf unzureichender Durchmischung zu diesem Probenahmezeitpunkt direkt nach der Zugabe

n.d.: nicht detektiert

': die Konzentration lag unterhalb der Nachweisgrenze

Tabelle A8: Rezepte der verwendeten Lauf- und Auftragspuffer

Gel-Laufpuffer:	Gel-Ladepuffer:
1) TBE-Puffer (10x): 100 mM Tris [pH 8.0] 83 mM Borsäure 10 mM Na-EDTA	8) Ladepuffer für DGGE-Gele : 0.002 % (w/v) Bromphenolblau 0.002 % (w/v) Xylenecyanol 70 % (w/v) Glycerol
2) TAE-Puffer (50x): 40 mM Tris [pH 7.8] 40 mM Natriumacetat 4m M Na-EDTA	9) Ladepuffer für SDS-Gele: 100 mM Tris-HCl [pH 6.8] 10 % (w/v) Glycerol 4 % (w/v) SDS
3) TE-Puffer (10x): 10 mM Tris [pH 8.0] 1 mM Na-EDTA	0.4 % (v/v) β -Mercaptoethanol 0.002 % (w/v) Bromphenolblau
	10) Ladepuffer für Agarosegele: 0.25 % (w/v) Bromphenolblau 40 % (w/v) Sucrose
Puffer für DNA- und Proteinextraktion:	Reinigungspuffer für DNA-Extrakte:
4) SDS-Extraktionspuffer: 0.25 M NaCl 0.1 M EDTA [pH 8.0] 2 % (w/v) SDS	11) QF-Puffer: 1.25 M NaCl 50 mM MOPS 15 % (v/v) Ethanol [pH 8.2]
5) MOPS-Puffer: 50 mM 3-(N-Morpholino)- propansulfonsäure 750 mM NaCl	12) QC-Puffer: 1.0 M NaCl 50 mM MOPS 15 % (v/v) Ethanol [pH 7.0]
6) GITC-Lösung: 6.25 g Guanidinisothiocyanat in 10.5 ml 100 mM Tris [pH 7.5]	
7) SSC (20x, Salt sodium citrate) 3 M NaCl 0.3 M tri-Natriumcitrat [pH 7.4] mit 10 M NaOH	

Anhang A9: Abkürzungsverzeichnis

AFLP	Amplifikationsfragment Längenpolymorphismus
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaare
BSA	Rinder (bovine) Serumalbumin
cDNA	komplementäre (complementary) Desoxynukleinsäure
ddNTP	dideoxy-Nukleotidtriphosphat
DG-DGGE	denaturierende Gradientengelelektrophorese mit Doppelgradienten
DGGE	denaturierende Gradientengelelektrophorese
DNRA	Dissimilatorische Nitratreduktion zum Ammonium
dNTP	desoxy-Nukleotidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
E.	Escherichia
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
ERIC	enterobacterial repetitive intragenic consensus DNA
et al.	et alii
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
GITC	Guanidinisothiocyanat
ITS	intern transkribierter Spacer
MLEE	Multilocus Enzymelektrophorese
MGD	Molybdoguanidinukleotid
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	Boten (messenger) Ribonukleinsäure
mtDNA	mitochondriale DNA
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymeraseketten (-chain) reaktion
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidon
RAPD	random amplified polymorphic DNA
REP	repetitive extragenic palindromic DNA
RFLP	Restriktionsfragment Längenpolymorphismus
RT-PCR	Revers transkribierte Polymeraseketten (chain) reaktion
SDS	Natrium (sodium) dodecylsulfat
SSC	salt sodium citrate (Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer)
SSCP	Einzelstrang (single strand) Konformationspolymorphismus
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
T-RFLP	terminaler Restriktionsfragment Längenpolymorphismus
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TSB	Trypticase Soja Bouillon
UV	Ultraviolett

Tabelle A10: Übersicht über die Internet-Adressen verwendeter Netzressourcen**Phylogenieprogramme**

<http://cmgm.stanford.edu/phylip/>
<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip/software.html>
<http://members.tripod.de/korbi/puzzle/>
<http://abacus.gene.ucl.ac.uk/ziheng/paml.html>
<http://iubio.bio.indiana.edu/>
<ftp://sunmh.ism.ac.jp/pub/molphy/>
<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>
<http://ag.arizona.edu/tree/programs/programs.html>
<ftp://ftp.pasteur.fr/pub/GenSoft/unix/>
<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/molphy.html>

Biologische Software und Datenbanken

<http://www.bis.med.jhmi.edu/Dan/software/biol-links.html>
<http://darwin.eeb.uconn.edu/systematics.html>
<http://www.biologie.uni-regensburg.de/Genetik/Schmitt/links.html>
<http://herbaria.harvard.edu/treebase/>
<http://bioweb.pasteur.fr/intro-uk.html>
<http://www.sdsc.edu/ResTools/cmshp.html>
<http://elib.uni-osnabrueck.de/BIOLOGIE/tools/javasoft.html>
<http://www.embl-heidelberg.de/~toldo/JaMBW/3/1/9/>

Allgemeine biologische Links

<http://www.pin.de/~sarkar/cms-hotlist.html>
<http://www.expasy.ch/alinks.html>
<http://www.natur.cuni.cz/mac/~fatima/fc/biobook.htm#dbases>

Molekularbiologische Anleitungen

http://www.goetting.purespace.de/labprot_haupt.html
<http://www.cx.unibe.ch/ikp/manual/list.html>
http://biochem.roche.com/prod_inf/manuals/pcr_man/pcr_toc.html
<http://www.bioscience.org/urllists/protocol.htm>
<http://www.horizonpress.com/gateway/protocols.html>
http://members.tripod.de/biomedpage/Labprot/labprot_haupt.html

Sammlungen von Mikroorganismen

<http://www.atcc.org/home.cfm>
<http://www.dsmz.de/>

Sequenz-Datenbanken

<http://www.cme.msu.edu/RDP/html/analyses.html>
<http://srs.ebi.ac.uk/>
<http://www.biophys.uni-duesseldorf.de/service/polandform.html>
<http://genome.dkfz-heidelberg.de/>
<http://www.ebi.ac.uk/Submissions/>

Literaturdatenbanken

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/>
<http://mmbr.asm.org/>
<http://intl-journals.asm.org/>
<http://intl-aem.asm.org/>
<http://www.brzn.de/cgi-bin/nph-wwwredir/www.gbv.de:57777/>
http://www.subito-doc.de/infos/zugaenge/zugaenge_index.html
<http://uncweb.carl.org/>

Anhang A11: Publikationen

Imhoff, J.F., Süling, J., Petri, R.: *Phylogenetic relationships among the Chromatiaceae, their taxonomic reclassification and description of the new genera Allochromatium, Halochromatium, Isochromatium, Marichromatium, Thiococcus, Thiohalocapsa and Thermochromatium*. Int J Syst Bacteriol 48:1129-1143 (1998)

Guyoneaud, R., Süling, J., Petri, R., Matheron, R., Caumette, P., Pfennig, N., Imhoff, J.F.: *Taxonomic rearrangements of the genera Thiocapsa and Amoebobacter on the basis of 16S rDNA sequence analyses, and description of Thiolamprovum gen. nov.*. Int J Syst Bacteriol 3:957-964 (1998)

Imhoff, J.F., Petri, R., Süling, J.: *Reclassification of species of the spiral-shaped phototrophic purple non-sulfur bacteria of the alpha-Proteobacteria: description of the new genera Phaeospirillum gen. nov., Rhodovibrio gen. nov., Rhodothalassium gen. nov. and Roseospira gen. nov. as well as transfer of Rhodospirillum fulvum to Phaeospirillum fulvum comb. nov., of Rhodospirillum molischianum to Phaeospirillum molischianum comb. nov., of Rhodospirillum salinarum to Rhodovibrio salexigens*. Int J Syst Bacteriol 3:793-798 (1998)

Petri, R., Imhoff, J.F.: *The relationship of nitrate reducing bacteria on the basis of narH gene sequences and the congruent phylogeny of narH and 16S rDNA based on pure culture studies and analyses of environmental DNA*. Syst. Appl. Microbiol. 23:47-57 (2000)

Petri, R., Imhoff, J.F.: *The development of phototrophic purple sulfur bacteria in Baltic Sea ice cover detected by analysis of environmental DNA and application of an improved double gradient method of denaturing gradient gel electrophoresis*. Polar Biol. (akzeptiert)

Petri, R., Imhoff, J.F.: *Natural and culturable diversity of nitrate-reducing bacteria within Baltic Sea sediments*. In Vorbereitung.

Anhang A12: Präsentationen

EASIZ-Symposium & Workshop, Bremerhaven, Juni 1999:

Strategies for the investigation of activity and diversity of bacterial sea ice communities – a molecular biological approach.

R. Petri, J.F. Imhoff

Frühjahrstagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM),
Göttingen, März 1999:

- *Activity and diversity of the bacterial community in sea ice from the coastal baltic sea.*

H.C. Giesenhausen, K. Meiners, R. Petri, T. Mock

- *Cultured and natural diversity of denitrifying bacteria in a soil habitat*

R. Petri, A. Lauer, J. F. Imhoff

Extreme Marine Environments, GEOMAR Kiel, November 1998:

Bacteria in sea ice and underlying brackish water (Kiel Bight, Western Baltic Sea)

H.C. Giesenhausen, K. Meiners, R. Petri, T. Mock

Wissenschaftliche Konferenz der Wissenschaftsgemeinschaft Gottfried Wilhelm Leibnitz zur
Biodiversität: Erfassung, Erhaltung, Nutzung. Berlin, November 1998:

Diversity analysis of denitrifying bacteria in the Kiel Bight

R. Petri, J.F. Imhoff

Körper-Symposium on Molecular and Microsensor Studies of Microbial Communities, Bremen,
September 1998:

Strategies for the analysis of natural communities of denitrifying bacteria

R. Petri, A.Lauer, J.F. Imhoff

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Meereskunde an der Christian-Albrechts-Universität Kiel, in der Abteilung Marine Mikrobiologie, erstellt.

Herrn Prof. Dr. J.F. Imhoff danke ich für die Betreuung der Arbeit, die mir den notwendigen wissenschaftlichen Freiraum ließ, aber auch durch anregende Diskussionen eine Vielzahl neuer Erkenntnisse brachte, sowie für die Hilfe beim Verfassen der Publikationen und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Herr Prof. Dr. P. Schönheit danke ich für seine Bereitschaft, das Korreferat für diese Arbeit zu übernehmen.

Mein Dank gilt vielen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern der Abteilung Marine Mikrobiologie für das angenehme Arbeitsklima und ihre Hilfestellung bei verschiedenen Aufgaben. Manuela Drews, Silke Nissen und Antje Lauer danke ich für die Isolate, die in die phylogenetischen Untersuchungen eingegangen sind, Sylvia Walter für ihre Hilfe bei der Fettsäureanalyse und Regine Koppe und für ihren Einsatz bei dem Kulturversuch.

Ich erinnere mich gerne an die Ausfahrten im Rahmen des Kieler Bucht Projektes und insbesondere an die Ausfahrt mit FS Heincke; an die trotz des Wetters glänzende Zusammenarbeit und ausgezeichnete Stimmung an Bord, zu der alle, von der Mannschaft („Kiek mol Jung, so muttst dat moken“), über unseren Techniker Detlef Hoffmann („Sag mal, Seekrankheit, wie geht das eigentlich?“) bis hin zum „Hiuwi“, alle beigetragen haben.

Thomas Mock, Klaus Meiners und besonders Dr. Hanna Giesenhausen danke ich für die Meereisproben aus der Kieler Bucht und für ihren Beitrag zu dem, was letztlich daraus geworden ist.

Der größte Dank gilt zwei Freunden, ohne deren Beitrag diese Arbeit nicht denkbar wäre: Dr. Lilijana Podgorsek und Dr. Jörg Süling haben mir gezeigt, daß eine kreative Zusammenarbeit, die auf Vertrauen beruht, auch in der wissenschaftlichen Welt möglich und unabdingbar ist.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit, abgesehen von der Beratung durch meine akademischen Lehrer, selbstständig angefertigt und außer den hier angegebenen keine weiteren Hilfsmittel verwendet habe.

Kiel, den