

Diversität Nitrit oxidierender Bakterien in Böden des nordsibirischen Permafrostes und Sedimenten der Laptev-See

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
im Department Biologie der Fakultät für Mathematik,
Informatik und Naturwissenschaften an der Universität Hamburg

vorgelegt von
Mashal Alawi
aus
Hamburg

Hamburg
2007

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Frau Priv.-Doz. Dr. E. SPIECK
Weiterer Gutachterin der Dissertation:
Frau Professor Dr. E.-M. PFEIFFER
Tag der Disputation: 24. August 2007

Hamburg, den 07. August 2007




Professor Dr. Reinhard Lieberei
Leiter des Departments Biologie

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung

Abkürzungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

1	EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	1
2	GRUNDLAGEN.....	3
2.1	Die Bedeutung des Stickstoffkreislaufs	3
2.2	Nitrifikation in Böden und limnischen Gewässern	4
2.3	Nitrifikation in marinen Systemen	5
2.4	Nitrit oxidierende Bakterien (NOB).....	6
2.4.1	Stoffwechsel und Physiologie	6
2.4.2	Taxonomie und Phylogenie der NOB.....	7
2.4.3	Verbreitung und Kultivierung von NOB	9
2.5	Psychrophile und psychrotolerante Bakterien	11
2.6	Methodische Grundlagen.....	12
2.6.1	Charakterisierung und Quantifizierung von NOB und AOB	12
2.6.1.1	MPN-Test.....	12
2.6.1.2	Immunologischer Nachweis in Anreicherungskulturen	13
2.6.1.3	Chemotaxonomische Analysen der spezifischen Fettsäureprofile.....	13
2.6.2	Kultivierungsunabhängige molekularbiologische Methoden	14
2.6.2.1	Fluoreszenz <i>in-situ</i> Hybridisierung (FISH)	14
2.6.2.2	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	15
2.6.2.3	Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (DGGE) und Temperatur Gradienten Gelelektrophorese (TGGE)	15
3	DIE UNTERSUCHUNGSGEBIETE.....	18
3.1	Permafrost.....	18
3.2	Die Lage und Charakteristik der Untersuchungsgebiete.....	19
3.2.1	Das Lena-Delta	20
3.2.2	Die Insel Samoylov im Lena-Delta	21
3.2.3	Kap Mamontovy Klyk an der Küste der Laptev-See	22
3.2.4	Die Laptev-See	23
3.3	Das Probenmaterial	25
4	MATERIAL UND METHODEN.....	27
4.1	Methodenüberblick	27
4.2	Verwendete Bakterienstämme	28
4.3	Probennahme	29
4.4	Flüssig- und Festmedien.....	30
4.4.1	Nährmedien für AOB.....	30
4.4.2	Nährmedien für NOB	31
4.5	Kulturführung von Nitrit oxidierenden Bakterien	33
4.6	Most-Probable-Number (MPN) Test.....	34
4.7	Quantifizierung von Ammonium, Nitrit und Nitrat	34

4.7.1	Quantifizierung von Ammonium	35
4.7.2	Quantifizierung von Nitrit und Nitrat	36
4.8	Elektronenmikroskopische Untersuchungen.....	36
4.9	Molekularbiologische Untersuchungen.....	37
4.9.1	DNA Isolierung und Aufreinigung.....	37
4.9.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	38
4.9.2.1	Verwendete Primer und Reaktionsbedingungen.....	39
4.9.3	Agarose Gelelektrophorese	45
4.9.4	Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (DGGE)	46
4.9.5	Temperatur Gradienten Gelelektrophorese (TGGE).....	50
4.9.6	16S rDNA Klonierung und Sequenzierung.....	52
4.9.7	16S rRNA-Gen Sequenzvergleiche (Alignment).....	53
4.9.8	Stammbauberechnung.....	53
4.9.9	Fluoreszenz <i>in-situ</i> Hybridisierung (FISH)	54
5	ERGEBNISSE.....	56
5.1	Quantifizierung von AOB und NOB anhand des MPN-Tests	56
5.1.1	Samoylov; Kliff (Proben 3301-3310)	56
5.1.2	Samoylov; Polygonstruktur P1 (Proben W1-3, H1-3, Z1-3)	57
5.1.3	Mamontovy Klyk (Proben MAK 207-1 bis MAK 207-10)	58
5.1.4	Sedimente des Lena-Flusses.....	58
5.1.5	Sedimente der Laptev-See	58
5.2	Anreicherung und Kultivierung von NOB.....	60
5.2.1	Charakterisierung von Anreicherungskulturen aus Böden.....	61
5.2.2	Charakterisierung von marinen Anreicherungskulturen	62
5.3	Molekularbiologische Untersuchungen.....	66
5.3.1	DNA Extraktion aus Böden, Sedimenten und Kulturen	66
5.3.2	Anpassung der PCR-Bedingungen	67
5.3.3	Evaluierung neuer gattungsspezifischer Primersets	69
5.3.4	TGGE-Analysen.....	71
5.3.4.1	Gattungsspezifische TGGE-Analysen.....	72
5.3.4.2	Samoylov; Bodenprofil der Polygonstruktur P1.....	74
5.3.4.3	Samoylov; Bodenprofil der Polygonstruktur P2.....	78
5.3.4.4	Samoylov; Kliff (Proben 3301-3310)	80
5.3.4.5	Kurungnakh (Proben 1051, 1052 und 1066) und Lena-Sedimente	81
5.3.4.6	Sedimente der Laptev-See	85
5.3.5	Gattungsspezifisches 16S rRNA Gen-Screening.....	86
5.4	Taxonomie der NOB, Stammbaumanalysen.....	89
5.4.1	Taxonomie der <i>Nitrobacter</i> -ähnlichen Sequenzen.....	89
5.4.2	Taxonomie der <i>Nitrospira</i> -ähnlichen Sequenzen.....	89
5.4.3	Taxonomie des Nitrit oxidierenden Bakteriums aus der Klasse der <i>Betaproteobacteria</i> (' <i>Candidatus Nitrotoga arctica</i> ')	93
5.5	Elektronenmikroskopische Untersuchungen.....	95
5.5.1	EM von ' <i>Candidatus Nitrotoga arctica</i> '	95
5.5.2	EM von marinen Anreicherungskulturen	95
5.6	Identifizierung mit immunologischen Methoden	97
5.6.1	IF-Färbung an marinen Anreicherungskulturen	97
5.7	Fluoreszenz <i>in-situ</i> Hybridisierung (FISH).....	97
5.7.1	FISH mit marinen Anreicherungskulturen	97
6	DISKUSSION	99
6.1	NOB in permafrostbeeinflussten Gebieten Sibiriens	99
6.1.1	Verbreitung von NOB in permafrostbeeinflussten Böden Sibiriens.....	100
6.1.2	Diversität von NOB in permafrostbeeinflussten Böden Sibiriens	103
6.1.3	Verbreitung und Diversität von NOB in Sedimenten der Laptev-See	106

6.1.4	Anpassung an niedrige <i>in-situ</i> Temperaturen	107
6.1.5	Anreicherung und Kultivierung von NOB	110
6.2	Molekularbiologische Nachweismethoden für NOB.....	111
6.2.1	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	113
6.2.1.1	Spezifische Primersets.....	114
6.2.2	Verwendung der TGGE für Populationsanalysen	117
6.2.3	Identifizierung mittels IF-Färbung und FISH	119
7	AUSBLICK.....	121
8	LITERATUR	122
9	ANHANG.....	136
9.1	Charakterisierung der Probennahmeorte.....	136
9.1.1	Samoylov; Profil P1 (Proben W1-3, H1-3, Z1-3).....	136
9.1.2	Samoylov; Profil P2 (Proben 6675-6683).....	136
9.1.3	Samoylov; Kliff (Proben 3301-3310)	137
9.1.4	Mamontovy Klyk; Kliff (Proben 100 bis 110 und MAK207-1 bis 10).....	137
9.1.5	Sedimente des Lena Flusses.....	138
9.1.6	Sedimente der Laptev-See	138
9.2	DGGE/TGGE-Analysen	139
9.2.1	Samoylov; Kliff (Proben 3301-3310)	139
9.2.2	Nachweis von 'Candidatus Nitrotoga arctica'-ähnlichen Bakterien im Klärwerk .	140
9.3	16S rRNA Sequenzen dieser Arbeit.....	140
9.3.1	16S rRNA Sequenzen von <i>Nitrobacter</i> -ähnlichen Bakterien.....	140
9.3.2	16S rRNA Sequenzen von <i>Nitrospira</i> -ähnlichen Bakterien.....	141

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Diversität chemolithoautotropher Nitrit oxidierender Bakterien (NOB) in permafrostbeeinflussten terrestrischen, limnischen und marinen Habitaten Nordsibiriens untersucht. Bisher waren keine Daten von psychrophilen oder psychrotoleranten Nitrit oxidierenden Bakterien bekannt. Die durchgeführten Untersuchungen zeigten erstmals die hohe Diversität und Anpassungsfähigkeit von Nitrit oxidierenden Bakterien an niedrige Temperaturen auf. Zu den Probenahmeorten zählten Tundrenböden von Samoylov, Kurungnakh, Mamontovy Klyk sowie Sedimente der Lena und der angrenzenden Laptev-See. Die Bakterien konnten durch Verwendung selektiver Mineralmedien angereichert und teilweise physiologisch charakterisiert werden. Um die Taxonomie der NOB in Naturproben und Kulturen aufzuklären, wurden molekularbiologische Techniken eingesetzt. Die Temperatur Gradienten Gelelektrophorese (TGGE) ermöglichte zudem eine frühzeitige Optimierung des Anreicherungsprozesses.

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) und TGGE wurden für die 16S rRNA Analyse von NOB-Populationen in Umweltproben und Kulturen erfolgreich angepasst. Für die einzelnen Gattungen der NOB wurden spezifische und semi-spezifische Primersets abgeleitet. Für die Gattung *Nitrobacter* konnte durch Modifikation bekannter Sonden und Primer die Amplifikation mittels PCR verbessert werden. Für die Gattung *Nitrospira* wurden sechs neue Primer entwickelt, so dass eine zuverlässige DNA-Amplifikation aus Naturproben möglich war. Die neuen Primer eigneten sich für die spezifische Amplifikation des 16S rRNA Gens einzelner Subgruppen der Gattung. Für die wenig untersuchten Gattungen *Nitrococcus* und *Nitrospina* wurden ebenfalls Primer neu konstruiert und eingesetzt.

In den Auftauzonen der nordsibirischen Tundrenböden wurde eine hohe Diversität von NOB vorgefunden. Erstmals konnten kältetolerante NOB kultiviert werden. Die Bakterien zeigten optimale Anpassungen hinsichtlich der niedrigen *in-situ* Temperatur und Substratverfügbarkeit. Anhand von Kultivierungsversuchen bei unterschiedlichen Temperaturen wurden die NOB je nach Stamm als psychrotolerant bis moderat psychrophil eingestuft. In allen Böden konnte eine Koexistenz von *Nitrobacter* und *Nitrospira* festgestellt werden. Es konnten bis zu drei verschiedene 16S rRNA Sequenzen von Bakterien der Gattung *Nitrospira* in nur einer Bodenzone nachgewiesen werden.

Bei einer Inkubationstemperatur von 17°C-28°C konnten vornehmlich *Nitrobacter*-ähnliche Bakterien detektiert werden. Insgesamt wurden drei Stämme dieser Gattung angereichert. Bei Temperaturen von 10°C-17°C sind hingegen *Nitrospira*-ähnliche Bakterien in den Kulturen angereichert worden. In den untersuchten Böden und den entsprechenden

Kulturen wurden zehn unterschiedliche *Nitrospira*-ähnliche 16S rRNA Sequenzen nachgewiesen. Zudem wurde ein Stamm dieser Gattung in einer Kultur aus dem Sediment der Lena sowie zwei marine Stämme in den Naturproben und Kulturen der Laptev-See-Sedimente detektiert. Die Stammbaumanalysen ergaben, dass Vertreter aus vier von fünf bekannten Clustern der Gattung *Nitrospira* in den permafrostbeeinflussten Gebieten Nordsibiriens und der Laptev-See vorkommen. Die Ergebnisse wurden durch den Abgleich mit weiteren Methoden wie der 16S rDNA Klonierung, Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung (FISH), Immun-Fluoreszenz Färbung und Transmissions-Elektronen Mikroskopie bestätigt.

Neben *Nitrobacter* und *Nitrospira*-ähnlichen Bakterien konnte ein bisher unbekanntes Nitrit oxidierendes Bakterium angereichert werden. Wie aus den Untersuchungen hervorgeht, handelt es sich um das erste NOB aus der Klasse der *Betaproteobacteria*. Die 16S rRNA Sequenz wurde sowohl in Kulturen wie auch Naturproben detektiert. Die über Klonierung erhaltene Gensequenz ist keiner bekannten Gattung zuzuordnen und bildet eine eigene Linie innerhalb der *Betaproteobacteria*. Für eine vorläufige taxonomische Klassifizierung wurde die Bezeichnung '*Candidatus Nitrotoga arctica*' gen.nov.spec.nov. gewählt. Das Bakterium zeigte in den Mineralmedien maximale Umsatzraten bei 10°C, dennoch konnte auch bei 4°C noch etwa ein Drittel der Aktivität gemessen werden. Somit ist das Bakterium chemolithoautotroph und moderat psychrophil. Durch die Anfertigung eines spezifischen Primerpaares und einer Sonde für FISH-Analysen konnte das Bakterium in Naturproben und Kulturen nachgewiesen werden.

Die Verbreitung und Bedeutung dieses neuen NOB kann somit künftig auch in anderen Ökosystemen untersucht werden. Das Wissen über die Physiologie dieses Bakteriums und die beteiligten kältetoleranten Enzyme könnte auch biotechnologischen Verfahren wie der Abwasseraufbereitung dienen.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
AOB	Ammoniak oxidierende Bakterien
APS	Ammoniumpersulfat
Abb.	Abbildung
ad	auffüllen auf
aqua deion.	deionisiertes Wasser
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
DAPI	4'6'-Diamidino-2-phenylindol
DGGE	Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	et alii
Eub	<i>Eubacteria</i>
Fa.	Firma
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
g	Gramm
GC	Guanin und Cytosin
h	Stunde
ha	Hektar
IF	Immuno-Fluoreszenz
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
l	Liter
Lsg.	Lösung
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MPN	Most Probable Number
mV	Millivolt
NaCl	Natriumchlorid
Nb. hamb.	<i>Nitrobacter hamburgensis</i>
Nb. X14	<i>Nitrobacter hamburgensis</i>
Nb. Z	<i>Nitrobacter vulgaris</i>
NJ	Neighbor Joining-Verfahren
NOB	Nitrit oxidierende Bakterien
Ns. mosc.	<i>Nitrospira moscoviensis</i>
Ns. M	<i>Nitrospira moscoviensis</i>
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
PCR	Polymerase Chain Reaction: Polymerase Kettenreaktion
pH	pH-Wert
Upm	Umdrehung pro Minute
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
S	SVEDBERG-Einheit
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TE	Tris-EDTA
TG	Trockengewicht
TGGE	Temperatur Gradienten Gelelektrophorese
Tris	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan
V	Volt

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Aufgliederung der Probenahmeorte und Probenbezeichnungen.....	25
Tabelle 2: Nitrit oxidierenden Kulturen aus der Stammsammlung der Universität Hamburg.....	28
Tabelle 3: Kulturbedingungen für Rein- und Anreicherungskulturen	33
Tabelle 4: Einbettungs-Schema nach Spurr	37
Tabelle 5: Sequenzen und Bezeichnungen der verwendeten Eubakterien-Primer	40
Tabelle 6: Sequenzen und Bezeichnungen der verwendeten spezifischen Primer und Sonden.	40
Tabelle 7: Verwendete Primerpaare und entsprechende PCR-Bedingungen	42
Tabelle 8: Programmabläufe für die PCR	43
Tabelle 9: Elektrophorese Bedingungen für die TGGE.....	51
Tabelle 10: Kliff-Samoylov Tiefenprofil. Zellzahlen von AOB und NOB.....	57
Tabelle 11: Samoylov Polygon-Profil P1. Zellzahlen von AOB und NOB	57
Tabelle 12: Polygonprofil aus Mamontovy Klyk. Zellzahlen von AOB und NOB	58
Tabelle 13: Zellzahlbestimmung von AOB aus Sedimenten der Laptev-See mittels MPN-Technik.....	59
Tabelle 14: Zellzahlbestimmung von NOB aus Sedimenten der Laptev-See mittels MPN-Technik	59
Tabelle 15: Kulturen von NOB aus den Tundra Böden Sibiriens und Sedimenten der Laptev-See.....	60
Tabelle 16: Substratumsätze in der Log-Phase der marinen Anreicherungskulturen S11 und F2.....	65
Tabelle 17: Sequenzen und Bezeichnungen der entwickelten spezifischen Primer und Sonden	70
Tabelle 18: Taxonomische Zuordnung von 16S rRNA Sequenzen. Kulturen Polygonstruktur P1 Samoylov (Eubakterien-Primerset, 640bp)	76
Tabelle 19: Taxonomische Zuordnung von 16S rRNA Sequenzen. Kulturen Polygonstruktur P1 Samoylov (<i>Nitrospira</i> -spezifisch, 320bp).....	77
Tabelle 20: Taxonomische Zuordnung von 16S rRNA Sequenzen. Kulturen Polygonstruktur P2 Samoylov. (Eubakterien-Primerset, 640bp)	79
Tabelle 21: Taxonomische Zuordnung von 16S rRNA Sequenzen. Kulturen Polygonstruktur P2 Samoylov (Eubakterien-Primerset, 640bp)	80
Tabelle 22: Taxonomische Zuordnung von 16S rRNA Sequenzen. Kulturen Kliff Samoylov (Eubakterien-Primerset, 640bp)	81
Tabelle 23: Taxonomische Zuordnung von 16S rRNA Sequenzen. Kulturen Bodenprofil Kurungnakh und Sedimente der Lena. (Eubakterien-Primerset, 640bp).....	83
Tabelle 24: Taxonomische Zuordnung von 16S rRNA Sequenzen. Kulturen Bodenprofil Kurungnakh (Eubakterien-Primerset, 640bp)	84
Tabelle 25: Taxonomische Zuordnung von 16S rRNA Sequenzen. Kulturen Sedimente der Laptev- See. (Eubakterien-Primerset, 640bp).....	85
Tabelle 26: Gattungsspezifisches 16S rRNA Gen-Screening der Proben aus Sibirien.....	88
Tabelle 27: Taxonomische Zuordnung von 16S rRNA Sequenzen zu den bekannten Clustern der Gattung <i>Nitrospira</i>	92
Tabelle 28: Berechnete 16S rRNA Similaritäten zwischen dem NOB Betaproteobakterium 6680 (<i>Candidatus Nitrotoga arctica</i>) und den nächstverwandten Sequenzen.....	94
Tabelle 29: Charakterisierung vom Samoylov Polygon-Profil P1. Probennahme August 2004	136
Tabelle 30: Charakterisierung vom Samoylov-Profil P2. Probentiefe 5-15 cm.....	136
Tabelle 31: Charakterisierung des Kliffs auf Samoylov. Probennahme August 2004	137
Tabelle 32: Charakterisierung des Profils aus Mamontovy Klyk (Kliff)	137
Tabelle 33: Charakterisierung des Thermoerosionstals aus Mamontovy Klyk	137
Tabelle 34: Charakterisierung der Sedimente des Lena Flusses	138
Tabelle 35: Charakterisierung der Laptev-See Sedimente	138

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum der Gattung <i>Nitrospira</i>	9
Abbildung 2: Luftaufnahme der Eiskeil-Polygon-Landschaft auf Samoylov	19
Abbildung 3: Die Küstenregion der Laptev-See, Probenahmeorte Samoylov und Mamontovy Klyk. ...	21
Abbildung 4: Luftbild der Insel Samoylov (Foto: C.Wille).....	21
Abbildung 5: Satellitenbild der Insel Samoylov und Kurungnakh.....	22
Abbildung 6: Die Laptev-See.....	23
Abbildung 7: Kombination aus klassischen und molekularbiologischen Techniken	27
Abbildung 8: Temperaturoptimum der Kultur 6678 ‘ <i>Candidatus Nitrotoga arctica</i> ’	62
Abbildung 9: Substratumsatz der Kultur Laptev-See S11 bei unterschiedlichen Temperaturen	63
Abbildung 10: Substratumsatz der Kultur Laptev-See F2 bei unterschiedlichen Temperaturen	64
Abbildung 11: Substratumsätze in der Log-Phase der marinen Anreicherungskulturen S11 und F2 ..	65
Abbildung 12: Ammonium-Verbrauch der Kultur Laptev-See AOB-S11.....	66
Abbildung 13: Verwendung unterschiedlicher Annealing-Temperaturen sowie BSA und DMSO	68
Abbildung 14: TGGE-Profil. Verwendung unterschiedlicher Annealing-Temperaturen und Reaktionszusätze für eine Multitemplate-PCR.....	68
Abbildung 15: TGGE-Profil von Reinkulturen der Gattung <i>Nitrobacter</i>	73
Abbildung 16: TGGE-Profil von Reinkulturen und Anreicherungskulturen der Gattung <i>Nitrobacter</i>	73
Abbildung 17: TGGE-Profil von Bodenproben der Polygonstruktur P1	75
Abbildung 18: TGGE-Profil von Anreicherungskulturen des Bodenprofils P1	76
Abbildung 19: <i>Nitrospira</i> -spezifische TGGE von Anreicherungskulturen der Polygonstruktur P1.....	77
Abbildung 20: TGGE-Profil (3 Gele) von Anreicherungskulturen der Polygonstruktur P2.....	78
Abbildung 21: DGGE-Profil, Samoylov Polygon P2.....	79
Abbildung 22: TGGE-Profil von Nitrit oxidierenden Anreicherungskulturen des Kliffs auf Samoylov ...	80
Abbildung 23: DGGE-Profil von Nitrit oxidierenden Anreicherungskulturen des Kliffs auf Samoylov. .	81
Abbildung 24: TGGE-Profil von NOB Kulturen aus Kurungnakh sowie Sedimenten der Lena.	83
Abbildung 25: TGGE-Profil. Folgekulturen der Proben aus Kurungnakh.....	84
Abbildung 26: TGGE-Profil von PCR-Produkten aus Naturproben und Kulturen der Laptev-See	85
Abbildung 27: <i>Nitrospira</i> -spezifisches TGGE-Profil von den marinen Kulturen F2 und S11	86
Abbildung 28: Neighbor-Joining Tree. Zuordnung der <i>Nitrobacter</i> -ähnlichen Sequenzen	89
Abbildung 29: Neighbor-Joining Tree. Zuordnung der <i>Nitrospira</i> -ähnlichen Sequenzen	91
Abbildung 30: Neighbor-Joining Tree. Zuordnung der marinen <i>Nitrospira</i> -ähnlichen Sequenzen	92
Abbildung 31: Neighbor-Joining Tree. Zuordnung des Nitrit oxidierenden Betaproteobakteriums 6680 (‘ <i>Candidatus Nitrotoga arctica</i> ’)	94
Abbildung 32: Elektronenmikroskopische Aufnahme von ‘ <i>Candidatus Nitrotoga arctica</i> ’	95
Abbildung 33: Ultra-Dünnschnitt einer Mikrokolonie der marinen NOB der Kultur Laptev-See S11	96
Abbildung 34: Typische Zellgestalt des marinen NOB der Kultur Laptev-See F2	96
Abbildung 35: Gattungsspezifische Färbung mit dem Antikörper Ak153-3.....	97
Abbildung 36: Gattungsspezifische Färbung mit der Oligonukleotid Sonde Nsp662, F2	98
Abbildung 37: Gattungsspezifische Färbung mit der Oligonukleotid Sonde Nsp662, S11	98
Abbildung 38: TGGE-Profil. Naturproben aus unterschiedlicher Tiefe vom Kliff auf Samoylov	139
Abbildung 39: DGGE-Profil mit Belebtschlammproben und Anreicherungskulturen aus dem Hamburger Klärwerk (Dradenau) (M. Kaya).....	140
Abbildung 40: 16S rRNA Sequenzen von <i>Nitrobacter</i> -ähnlichen Bakterien dieser Arbeit.....	140
Abbildung 41: 16S rRNA Sequenzen von <i>Nitrospira</i> -ähnlichen Bakterien dieser Arbeit	141
Abbildung 42: 16S rRNA Sequenzen von marinen <i>Nitrospira</i> -ähnlichen Bakterien dieser Arbeit	142

1 Einleitung und Zielsetzung

Aufgrund der essenziellen Bedeutung des Stickstoffs für alle Organismengruppen bedarf dessen mikrobieller Kreislauf in natürlichen Systemen weiterer Aufklärung. Bisher wurde kein psychrophiles oder psychrotolerantes Nitrit oxidierendes Bakterium (NOB) charakterisiert. In dieser Arbeit sollte die physiologische und phylogenetische Diversität von psychrophilen und psychrotoleranten NOB exemplarisch anhand von terrestrischen und marinen Probenmaterial aus Sibirien aufgeklärt werden. Beprobt werden sollte der Active Layer (Auftauzone) des Tundrabodens der im Lenadelta gelegenen Inseln Samoylov und Kurungnakh und des küstennahen Ortes Mamontovy Klyk. Des Weiteren sollten Sedimente der Lena und der Laptev-See untersucht werden. Durch die Mitarbeit an dem deutsch-russischen BMBF-Verbundprojekt "System Laptev-See" standen für die genaue Habitatcharakterisierung zu jeder Probenahmestelle geologische und geochemische Daten zur Verfügung.

Untersuchungen über die physiologische Charakteristik dieser Bakterien können wichtige Erkenntnisse für ökologische Fragestellungen liefern. Die Bedeutung der Nitrifikation und die physiologischen Leistungen der beiden beteiligten Gruppen, den Ammoniak (AOB) und Nitrit oxidierenden Bakterien (NOB) ist für die Böden und Fließgewässer der gemäßigten Zonen bereits mehrfach dargelegt worden (BOCK & KOOPS, 1992; LAANBROEK & WOLDENDORP, 1995; JETTEN et al., 1997; SPIECK & BOCK, 1998). Auch aus extremen Habitaten wie alkalischen Seen und heißen Quellen sind Nitrifikanten angereichert und charakterisiert worden (SOROKIN et al., 1998; LEBEDEVA et al., 2005). Industrielle und landwirtschaftliche Anwendungen wie die Abwasseraufbereitung (JURETSCHKO et al., 1998; KIM et al., 2004) sowie Verfahren zum Einsatz in Bioreaktoren (LEVIPAN et al., 2004) profitieren von dem Wissen, das über die beteiligten Bakterien verfügbar ist.

Die NOB sollten durch Verwendung selektiver Mineralmedien angereichert und physiologisch charakterisiert werden. Hierbei war im Besonderen das Anpassungspotenzial der Bakterien an die verhältnismäßig niedrigen *in-situ* Temperaturen von Interesse. Um die Diversität der NOB in Naturproben und Kulturen zu erfassen, sollten molekularbiologische Techniken eingesetzt werden. Die Polymerasekettenreaktion (PCR) lieferte die Basis für 16S rRNA Analysen. Mittels der Temperatur Gradienten Gelelektrophorese (TGGE) sollten die NOB in Anreicherungskulturen detektiert und anhand von Sequenzierungen der 16S rDNA Fragmente taxonomisch eingeteilt werden. Mittels TGGE-Monitoring der Kulturen wurde eine frühzeitige Optimierung der Kultivierungsbedingungen angestrebt. Die Ergebnisse sollten durch den Abgleich mit weiteren Methoden wie der 16S rDNA

Klonierung, Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung (FISH), Immun-Fluoreszenz (IF) Färbung und Transmissions-Elektronen Mikroskopie (TEM) bestätigt werden.

Ziele der Untersuchungen:

- Erfassung der Diversität und Verbreitung von NOB in permafrostbeeinflussten Böden Sibiriens sowie dem Lena-Delta und der angrenzenden Laptev-See. Anhand von Anreicherungskulturen sollte die Anpassungsfähigkeit von NOB im Hinblick auf die niedrigen *in-situ* Temperaturen untersucht werden. Hierbei sollte die Frage geklärt werden, ob in der Umwelt auch psychrotolerante oder psychrophile Nitrit oxidierende Bakterien zu finden sind und der mikrobielle Stickstoffkreislauf somit auch bei extrem niedrigen Temperaturen ablaufen kann.

- Zur taxonomischen Klassifizierung von NOB in Naturproben und Kulturen sollten 16S rRNA-Analysen mittels PCR und TGGE-Technik angefertigt werden. Im Weiteren bietet die Klonierung des 16S rRNA Gens, FISH, IF-Färbung sowie die elektronenmikroskopische Untersuchung die Möglichkeit erhaltene Ergebnisse zu überprüfen.

- Es wurde eine Verbesserung der Nachweis-Methoden für NOB in Böden und Kulturen angestrebt. Überprüfung möglicher Primerkombinationen für einen spezifischen Gattungsnachweis mittels PCR. Hierzu sollte die Spezifität der neuen Primer zunächst anhand von Untersuchungen mit Reinkulturen und Anreicherungskulturen der universitätseigenen Stammsammlung getestet werden. Im weiteren Verlauf könnten die Primer für den Nachweis von NOB in Naturproben und Kulturen eingesetzt werden.

2 Grundlagen

2.1 Die Bedeutung des Stickstoffkreislaufs

Der Stickstoffkreislauf ist ein elementarer Prozess, der das Leben auf der Erde prägt. Ungefähr 15 % der lebenden Biomasse bestehen aus Stickstoff. Im Besonderen wird Stickstoff in der reduzierten Form als Aminogruppe von Proteinen und in den Basen der Nucleinsäuren eingebaut. Auf der Erde überwiegt mengenmäßig der elementare Stickstoff der Atmosphäre mit mehr als 99 % des Gesamtstickstoffs. Im Verlauf des Kreislaufes wechselt der Redoxzustand von $-III$ bis $+V$. Elementarer Stickstoff kann von Stickstofffixierenden Bakterien aufgenommen und reduziert werden. Hierbei wird der elementare Stickstoff zu Ammonium reduziert und für diverse Organismengruppen nutzbar. Des Weiteren wird der Ammonium-Pool über die Prozesse der Proteolyse und Ammonifikation gespeist. Neben der Assimilation des Ammoniaks ist die Oxidation durch den bakteriellen Prozess der Nitrifikation von besonderer Bedeutung.

Die zwei Hauptprozesse der Nitrifikation werden in erster Linie von lithoautotrophen Bakteriengruppen geleistet. Sie unterteilen sich in die Ammoniak oxidierenden Bakterien (AOB) und die Nitrit oxidierenden Bakterien (NOB). Das von den AOB gebildete Nitrit ist das Substrat für die NOB, sie katalysieren den zweiten Schritt des Nitrifikations-Prozesses, die Oxidation zum Nitrat (BOCK & KOOPS, 1992). Die Vielfalt nitrifizierender Bakterien ist längst nicht aufgeklärt, so zeigten neuere Untersuchungen das auch Ammoniak oxidierende Archaeen an dem Prozess beteiligt sind (KÖNNEKE et al., 2005; FRANCIS et al., 2005).

Winogradsky gelang bei Versuchen mit AOB erstmals der endgültige Nachweis autotrophen Wachstums bei chemolithotrophen Mikroorganismen (WINOGRADSKY, 1890; FRANKLAND & FRANKLAND, 1890; PURKHOLD et al., 2000). Die beiden phänotypisch definierten Gram-negativen Gruppen nitrifizierender Bakterien sind nach heutigen Erkenntnissen phylogenetisch nicht unmittelbar miteinander verwandt (WATSON et al., 1989). Beide Gruppen erwiesen sich zudem als polyphyletisch (WOESE et al., 1984 a und b, 1985; TESKE et al., 1994). Die heterotrophe Nitrifikation der Bakterien, Pilze und einiger Algen hat eine untergeordnete Bedeutung, da dieser Prozess nicht der Energiegewinnung dient (KILLHAM, 1986). Die von den Nitrifikanten durchgeführten Oxidationen verhindern nicht nur eine toxische Nitritakkumulation, sondern beeinflussen auch die Aktivitäten der denitrifizierenden Bakterien. In dem anschließenden Prozess der Denitrifikation werden Nitrit oder Nitrat zu Stickoxiden und elementarem Stickstoff reduziert und der Kreislauf geschlossen (KNOWLES, 1982; 2000). Die Stoffwechsellleistungen der Denitrifikanten

beeinflussen durch die Emission von Treibhausgasen das globale Klima (UMAROV et al., 1990; VITOUSEK et al., 1997; PAPEN & BUTTERBACH-BAHL, 1999).

Eine wichtige Funktion haben NOB auch in künstlichen Systemen wie Kläranlagen (JURETSCHKO et al., 1998; PURKHOLD et al., 2000; WAGNER et al., 1996; KELLY, 2003; SIRIPONG et al., 2006). Von großem Interesse sind biotechnologische Verfahren zur Abwasseraufbereitung, bei denen lösliche Stickstoffverbindungen wie Ammonium, Nitrit und Nitrat in Bioreaktoren zu Stickoxiden und elementarem Stickstoff umgewandelt werden. Auch in der Aquaristik und Fischzucht (BURRELL et al., 2001) sowie der Trinkwasseraufbereitung (REGAN et al., 2002) nimmt die Nitrifikation eine Schlüsselfunktion ein.

2.2 Nitrifikation in Böden und limnischen Gewässern

Der zweistufige Prozess der Nitrifikation ist eine wichtige Teilreaktion des Stickstoffkreislaufes in Böden und limnischen wie auch marinen Gewässern. In natürlichen Systemen dient aus der Proteolyse und Ammonifikation freigesetztes Ammonium den AOB als Substrat. Die NOB oxidieren das von den AOB gebildete Nitrit weiter zu Nitrat. In landwirtschaftlich genutzten Böden werden bis zu 90 % des Ammoniums bis zum Nitrat oxidiert. Durch die Nitrifikation gebildetes Nitrat kann von Pflanzen assimiliert werden. Während positiv geladene Ammonium-Ionen durch Bindung an Tonpartikel im Boden verbleiben, werden rund 50 % der jährlichen Düngung auf den Feldern als Nitrit und Nitrat wieder ausgewaschen oder denitrifiziert. Eine zu geringe Leistung der Denitrifikanten kann zu einer hohen Konzentration an Salpetersäure und somit zu einer Ansäuerung der Böden führen (SIMEK, 2000; VAN MIEGROET & COLE, 1985). Nitrit und Nitrat gelangen so in das Grundwasser sowie andere limnische Systeme und verursachen erhebliche Schäden und Probleme bei der Trinkwassergewinnung. Nitrit wirkt in hohen Konzentrationen zudem als Umweltgift. Der anthropogene Eintrag von Stickstoffverbindungen durch Industrie und Landwirtschaft spielt demnach eine starke Rolle im Stickstoffhaushalt von Böden, Gewässern und der Luft.

Die Vielfalt an unterschiedlichen Umweltbedingungen hat eine sehr hohe Diversität an spezialisierten Gattungen und Arten von Nitrifikanten hervorgebracht (KOOPS & POMMERENING-RÖSER, 2001). KÖNNEKE et al. (2005) gelang es erstmals lithoautotrophe Ammoniak oxidierende Archaeen nachzuweisen. Wie aus den Untersuchungen hervorgeht, ist die Diversität der Nitrifikanten in natürlichen Systemen nicht gänzlich aufgeklärt.

Die Nitrifikation ist eine oxidative Reaktion, entsprechend sind die Bakterien in den oberen Zonen und dem Grenzbereich zur anoxischen Zone am aktivsten (ALTMANN et al., 2003). In limnischen Gewässern ist Nitrifikation sowohl in der Wassersäule wie auch in den oxischen Zonen des Sediments zu beobachten (CEBRON et al., 2003).

2.3 Nitrifikation in marinen Systemen

Der marine Stickstoffkreislauf bedingt die Verfügbarkeit von Stickstoffverbindungen und die biologische Aktivität im System (RYTHER et al., 1971) und hat daher Einfluss auf die Kohlendioxid-Fixierung und die Freisetzung von Stickoxiden (FALKOWSKI et al., 1998). Es wird postuliert, dass Stickstoff in marinen Systemen direkt die Primärproduktion limitiert (McCARTHY & CARPENTER, 1983; HOWARTH, 1988). Somit wird auch die Aufnahmekapazität und Abgabe von Kohlendioxid von den Ozeanen im besonderen Maße durch die Stickstoffverfügbarkeit gelenkt (KAHLIL & RASMUSSEN, 1992). FISHER et al. (1992) und DORTCH & WHITLEDGE (1992) zeigten hingegen ein variables Modell, indem der limitierende Faktor im marinen Ökosystem von der Jahreszeit abhängig ist. Ein maßgeblicher Eintrag von Stickstoffverbindungen, etwa 30×10^6 Tonnen pro Jahr findet über die Zuleitung der Flüsse in die Meere statt (FRITSCHKE, 1999). Besonders in den obersten, den jüngsten Zonen des Sediments, die verhältnismäßig viel Kohlenstoff aus abbaubaren organischen Stoffen bereithalten, konnte eine komplexe Bakterienpopulation nachgewiesen werden (RHEINHEIMER, 1991).

Die genauen mikrobiellen Prozesse in den tiefen anoxischen Zonen der Sedimente sind unzureichend geklärt. MORTIMER et al. (2002) gaben weitere Hinweise auf die Aktivitäten nitrifizierender Bakterien auch bei sehr geringen Sauerstoffkonzentrationen. FREITAG & PROSSER (2003) haben den sogenannten Anammoxprozess, die anaerobe Oxidation von Ammonium durch Planctomyceten in tiefen anoxischen Sedimentzonen nachgewiesen (JETTEN et al., 1997; STROUS et al., 1997; OP DEN CAMP et al., 2006). Im Allgemeinen nimmt die Zellzahl im Verlauf der anaeroben Zone stark ab. Hohe Nitratkonzentrationen sind auch in tieferen Zonen der Wassersäule zu messen. Das Nitrifikanten auch hier aktiv sind, konnte jedoch durch Untersuchungen mit ^{15}N nicht bestätigt werden. Die stärkste Nitrifikation innerhalb der Wassersäule von Ozeanen ist im unteren Bereich der euphotischen Zone (WARD et al., 1989; DORE & KARL, 1996), aber auch im Oberflächen nahen Wasser zu messen (ZEHR & WARD, 2002; SCHRAMM, 2003).

Ein in marinen Sedimenten häufig beobachtetes Phänomen ist die Kopplung des Nitrifikations- und des Denitrifikationsprozesses (KOIKE & SØRENSEN, 1988; HENRIKSEN

& KEMP, 1988; KINDAICHI et al., 2004). Aufgrund der räumlich sehr nah aneinander gelegenen oxischen und anoxischen Zone des Sediments kann das im Nitrifikationsprozess gebildete Nitrat als Substrat für die Denitrifikation genutzt werden. Auch andere Organismen wie Mikroalgen stehen in einer engen Wechselwirkung, so konkurrieren sie mit den nitrifizierenden Bakterien um Ammonium und Kohlendioxid (CARINI et al., 2003) und inhibieren die Nitrifikation durch Anheben des pH-Wertes (RISGAARD-PETERSEN et al., 1994; LORENZEN et al., 1998; AN & JOYE, 2001). Erhöhte C/N Werte (STRAUSS & LAMBERTI, 2000) und Sulfide (JOYE & HOLLIBAUGH, 1995) haben sich ebenfalls als inhibierend für den Nitrifikationsprozess erwiesen.

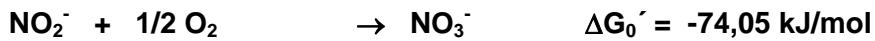
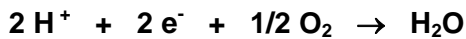
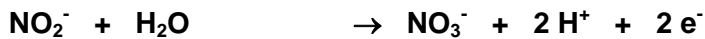
Es ist nicht möglich, genaue Aussagen über die phylogenetische und physiologische Diversität der am Stickstoffkreislauf der Meere beteiligten Bakterien zu bekommen, eine Isolierung mariner Bakterien ist nur selten gelungen (GIOVANNONI & RAPPE, 2000). Es konnten bisher drei marine NOB isoliert und beschrieben werden (WATSON & WATERBURY, 1971; WATSON, 1986). Während neben *Nitrospira marina* auch terrestrische beziehungsweise limnische Vertreter der Gattung angehören, sind die marinen Arten *Nitrococcus mobilis* und *Nitrospina gracilis* die einzigen Vertreter ihrer Gattung. BANO & HOLLIBAUGH (2001) konnten Bakterien der Gattung *Nitrospina* bei einem Eubakterien-Screening mittels 16S rDNA Klonierungen und DGGE-Analysen in Proben aus dem Arktischen Ozeans detektieren. Die nächstverwandte Sequenz wies jedoch nur 92 % Similarität mit der Reinkultur *Nitrospina gracilis* auf.

2.4 Nitrit oxidierende Bakterien (NOB)

2.4.1 Stoffwechsel und Physiologie

Der Energiegewinn, der aus der Oxidation des Nitrits zum Nitrat resultiert, ist relativ gering. Die Reaktion wird bei *Nitrobacter* durch das Enzym Nitritoxidoreduktase (NOR) katalysiert (ALEEM et al., 1965; KUMAR et al., 1983). Über Molybdopterin, den Cofaktor der NOR (FUKUOKA et al., 1987; MEINCKE et al., 1992), werden die bei der Oxidation des Nitrits freiwerdenden Elektronen in die Atmungskette eingeschleust. Nach bisherigen Erkenntnissen werden die Elektronen über die Cytochrome a_1 , c_{550} und aa_3 auf molekularen Sauerstoff übertragen. Die Reaktion ist thermodynamisch ungünstig, da der Elektronentransport bis zum Cytochrom c_{550} entgegen dem Redoxgefälle verläuft.

Der Prozess der Nitritoxidation kann durch folgende Gleichungen beschrieben werden:



Unter Sauerstoff limitierenden Bedingungen katalysiert die NOR die Reduktion von Nitrat, welches dann alternativ zum Sauerstoff als terminaler Elektronenakzeptor der Atmung dient (SUNDERMEYER-KLINGER et al., 1984; FREITAG et al., 1987). So können Energieäquivalente auch unter anaeroben Bedingungen entstehen. Derzeit ist jedoch nicht bekannt, ob auch andere NOB die Fähigkeit zur Nitratreduktion besitzen. Der Kohlenstoffbedarf wird bei Nitrit oxidierenden Bakterien hauptsächlich über die Aufnahme von Kohlendioxid gedeckt.

2.4.2 Taxonomie und Phylogenie der NOB

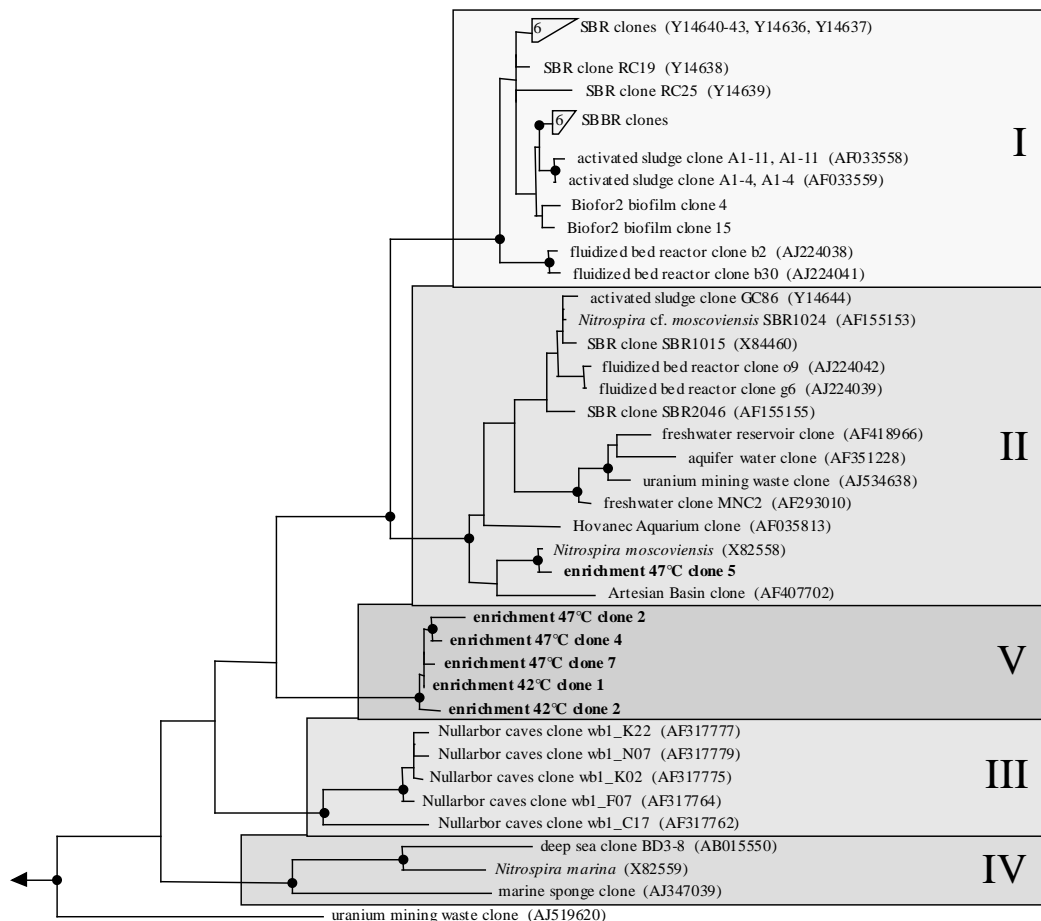
Zu den klassischen Unterscheidungsmerkmalen zählen morphologische Eigenschaften wie die Zellgestalt und Anordnung von intracytoplasmatischen Membranen (ICMs) (BOCK & KOOPS, 1992). Als Ergänzung zu diesen mikroskopisch überprüfbar Merkmalen können Ergebnisse aus immunologischen Untersuchungen mit Antikörpern gegen die Schlüsselenzyme nitrifizierender Bakterien und chemotaxonomische Analysen der Fettsäure-Muster hinzugezogen werden.

Bei den Nitrit oxidierenden Bakterien handelt es sich um eine polyphyletische Gruppe, die taxonomisch in die Gattungen *Nitrobacter*, *Nitrospira*, *Nitrococcus* und *Nitrospina* unterteilt wird (WATSON et al., 1989). Die Vielfalt der phänotypisch definierten Gruppen der Nitritoxidanten zeigt sich deutlich anhand der unterschiedlichen Zellmorphologie. Die Zellen von *Nitrobacter* sind pleomorphe Kurzstäbchen mit polar angeordneten intracytoplasmatischen Membranen (ICMs) (WATSON et al., 1989). *Nitrococcus mobilis* bildet coccoide Zellen mit charakteristischen tubulären ICMs. In den langen Stäbchen von *Nitrospina* sind keine ICMs lokalisiert. Die Zellmorphologie der Gattung *Nitrospira* ist durch die spiralförmigen Zellen geprägt, ICMs wurden nicht gefunden (WATSON et al., 1986). Zurzeit befinden sich zehn beschriebene Arten dieser vier Gattungen in Kultur (WATSON et al., 1986; WATSON & WATERBURY, 1971; EHRICH et al., 1995; SOROKIN et al., 1998). Es existieren jedoch weitere Kulturen noch nicht beschriebener Arten (Dr. SPIECK, pers. Mitteilung).

Anhand von 16S rRNA-Analysen wurden die isolierten Vertreter der NOB taxonomisch und phylogenetisch eingeordnet. Die Gattung *Nitrobacter* umfasst die vier beschriebenen Arten *Nb. winogradskyi* (WINSLOW et al., 1917; WATSON et al., 1971), *Nb. hamburgensis* (BOCK et al., 1983), *Nb. vulgaris* (BOCK et al., 1990) und *Nb. alkalicus* (SOROKIN et al., 1998). Diese Gattung gehört zu den *Alphaproteobakterien* (TESKE et al., 1994) und steht in enger Verwandtschaft mit *Rhodopseudomonas palustris* (SEEWALDT et al., 1982). Die Gattung *Nitrococcus* (WATSON & WATERBURY, 1971) gehört zu den *Gammaproteobacteria*. (WOESE et al., 1985) und umfasst bisher als einzigen isolierten Vertreter die marine Art *N. mobilis*. *Nitrospina gracilis* (WATSON & WATERBURY, 1971) wird zurzeit zu den *Deltaproteobakterien* (TESKE et al., 1994; GARRITY & HOLT, 2001) gezählt. Diese Zuordnung ist jedoch als vorläufig zu betrachten (BARTOSCH et al., 2002). Vertreter der Gattungen *Nitrospina* und *Nitrococcus* konnten bis heute nur aus marinen Habitaten isoliert werden (WATSON & WATERBURY, 1971).

Die Gattung *Nitrospira* stellt eine eigene Entwicklungslinie dar (EHRICH et al., 1995; SPIECK et al., 2005, 2006) und gilt als ursprünglichste Gattung der Nitrit oxidierenden Bakterien (SPIECK et al., 2005). Die beiden bisher beschriebenen Arten *Ns. marina* (WATSON et al., 1986) und *Ns. moscoviensis* (EHRICH et al., 1995) sind phylogenetisch deutlich differenzierbar. Sie weisen eine 16S rRNA Sequenzhomologie von nur 89 % auf (EHRICH et al., 1995). Das macht deutlich, dass sich diese beiden beschriebenen Arten bereits über einen verhältnismäßig langen Zeitraum unabhängig voneinander entwickelt haben. Vertreter der Gattung *Nitrospira* haben offenbar eine größere ökologische Bedeutung als ursprünglich angenommen (SPIECK & BOCK, 2001).

Die Vertreter der Gattung *Nitrospira* werden zurzeit anhand von 16S rDNA-Analysen (Abbildung 1) in fünf phylogenetische Cluster unterteilt (DAIMS et al., 2001). *Ns. moscoviensis* und *Ns. marina* sind die einzigen vollständig charakterisierten *Nitrospira* Reinkulturen. Umwelt-Klone aus Bioreaktoren und Belebtschlamm darunter '*Candidatus Nitrospira defluvii*' werden phylogenetisch zum Cluster I gezählt. *Ns. moscoviensis* und Klone, die von Proben aus der Rhizosphäre, aus Reaktoren und Süßwasser-Habitaten stammen, werden dem Cluster II zugeordnet. In Cluster III werden bisher Klone aus einem australischen Höhlensystem - den Nullarbor Caves - zusammengefasst (HOLMES et al., 2001). *Ns. marina* bildet das phylogenetisch weiter entfernte Cluster IV, welches in die Subgruppen IVa und IVb unterteilt wird (DAIMS et al., 2006). Neuere Untersuchungen geben Hinweise auf ein weiteres *Nitrospira* Cluster, vertreten durch eine Anreicherung aus dem Moskauer Heizungssystem mit der Bezeichnung EL42 (LEBEDEVA, et al., unveröffentlicht). Das vermeindlich neue Cluster wird in dieser Arbeit als Cluster V bezeichnet.



0.10

Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum der Gattung *Nitrospira*. Der Konsensusbaum aus mehreren Baumrechenverfahren wurde mit 16S rRNA Sequenzen, die länger als 1100 Basenpaare sind, erstellt. Die verschiedenen Cluster sind mit I bis V nummeriert. Die schwarzen Punkte markieren besonders stabile Knoten nach dem Maximum-Parsimony-Verfahren. Der Skalierungsbalken entspricht einem Sequenzunterschied von 10 % (unveröffentlichte Daten von Holger Daims, Universität Wien). SBR = Bioreaktor.

2.4.3 Verbreitung und Kultivierung von NOB

Nitritoxidanten sind ubiquitär verbreitet und regelmäßig in Böden, Süß- und Meerwasser anzutreffen (BOCK & KOOPS, 1992; SPIECK & BOCK, 1998). Zu den Habitaten zählen unter anderem saure Böden (HANKINSON & SCHMIDT, 1988; DE BOER et al., 1991), Sodaseen und alkalische Böden (SOROKIN et al., 1998). Selbst an extremen Standorten wie dem Boden der Antarktis (WILSON et al., 1997), Permafrostböden Sibiriens (SOINA et al., 1991), Wüstensand (WATSON et al., 1986) und Naturstein (BOCK & SAND, 1993) konnten Nitritoxidanten bereits nachgewiesen werden. Nur durch spezielle Anpassungen an lebensfeindliche Umweltfaktoren können die Nitritoxidanten an diesen Standorten überleben. Nitrifikanten konnten in 2,5 Mill. Jahre alten Permafrost-Sedimenten

nachgewiesen werden (SHI et al., 1997; GILICHINSKY et al., 2002). Als Schutz bilden einige Nitritoxidanten Mikrokolonien. Andere nutzen kompatible Solute als Osmoregulatoren, um sich den Umweltfaktoren anzupassen (LIN, 1994; PONDER et al., 2005). ZHOU et al. (1997) beschrieben eine hohe Diversität von Bakterien in Tundrenböden in Kolyma. Durch das von ZHOU et al. durchgeführte 16S rRNA Screening der Populationsstruktur von Eubakterien im Permafrost wird deutlich, dass in diesen extremen Habitaten noch viele unbekannte Gattungen und Arten zu finden sind.

In der Natur kommen Nitrit oxidierende Bakterien oft nur in geringen Zelldichten vor. Daher ist eine Detektion in Naturproben besonders schwierig. Durch die Nutzung selektiver mineralischer Medien (BELSER, 1979; BOCK & KOOPS, 1992) ist es möglich, Nitrit oxidierende Bakterien aus verschiedenen Habitaten unter Laborbedingungen zu kultivieren und anzureichern. Die meisten vorhandenen Isolate von Nitrit oxidierenden Bakterien gehören der Gattung *Nitrobacter* an (BOCK und KOOPS, 1992; SOROKIN et al., 1998). In den vergangenen Jahren konnten jedoch in wachsender Anzahl auch Vertreter der Gattung *Nitrospira* in verschiedenen Habitaten detektiert (DAIMS et al., 2000) und durch Anpassung der Anreicherungsbedingungen kultiviert werden. Neben den beschriebenen Arten, die aus Meerwasser (*Ns. marina*) und aus einem Heizungssystem in Moskau (*Ns. moscoviensis*) isoliert wurden (WATSON et al., 1986; EHRICH et al., 1995), sind *Nitrospira*-ähnliche Bakterien auch aus Belebtschlamm von Kläranlagen angereichert worden (JURETSCHKO et al., 1998; BARTOSCH et al., 1999; MARTINY et al., 2005; SPIECK et al., 2006). In nitrifizierenden Bioreaktoren (BURELL et al., 1998; SCHRAMM et al., 1998; OKABE et al., 1999), in einem australischen Höhlensystem - den Nullarbor Caves (HOLMES et al., 2001) und Süßwasseraquarien (HOVANEC et al., 1998) konnten Bakterien dieser Gattung detektiert werden. Weiterhin konnten mit Hilfe der PCR-Technik 16S rDNA-Klone aus der Rhizosphäre gewonnen werden, die eine hohe Sequenzähnlichkeit zu *Ns. moscoviensis* aufwiesen (MARRILLEY & ARAGNO, 1999).

Eine selektive Anreicherung bestimmter Nitritoxidanten ist durch das langsame Wachstum und die Vergesellschaftung der beiden Nitrit oxidierenden Bakteriengruppen *Nitrobacter* und *Nitrospira* sehr langwierig. Eine Kultivierung auf festen Medien ist bisher nur bei *Nitrobacter* gelungen (SOROKIN et al., 1998). Bei einigen marinen Stämmen ist ein Wachstum nur mit Meerwasser möglich, welches durch mineralische Nährlösungen nicht ersetzt werden kann (WATSON & WATERBURY, 1971). Wie WARD et al. (1995) bereits beschrieben haben, ist die Anreicherung mariner Stämme besonders aufwendig. Um einen Einblick in die Populationsstruktur von marinen Nitrifikanten zu erhalten, eignen sich molekularbiologische Methoden am besten.

2.5 Psychrophile und psychrotolerante Bakterien

Die Stoffwechselaktivität von Mikroorganismen wird neben dem Substratangebot maßgeblich von der Temperatur bedingt. Berücksichtigt man, dass 26 % der Landoberfläche permanent gefroren sind (STEVEN et al., 2005), ist die Erforschung von psychrophilen und psychrotoleranten Bakterien von großer Bedeutung. Wachstum und Stoffwechsellistung nitrifizierender Bakterien bei Temperaturen um den Gefrierpunkt wurden bisher nur vereinzelt nachgewiesen. Für die Nitrifikanten ist die beste Anpassung an Temperaturen um 5°C bei dem marinen Bakterium *Nitrosomonas cryotolerans* beschrieben worden (JONES et al., 1988).

Nach MORITA (1975; 2000) werden Bakterien mit einem Temperaturminimum $\leq 0^{\circ}\text{C}$, einem Temperaturoptimum von $\leq 15^{\circ}\text{C}$ und einem Maximum von $\leq 20^{\circ}\text{C}$ als cryophil (Synonym: psychrophil) bezeichnet. Die von MORITA (1975) eingeführte Bezeichnung psychrotroph sollte durch moderat psychrophil ersetzt werden, diese Organismen haben ein Minimum bei $\leq 0^{\circ}\text{C}$, ein Optimum bei $\geq 15^{\circ}\text{C}$ und ein Maximum bei $\geq 20^{\circ}\text{C}$. BROCK et al. (1994) unterscheidet weiter die sogenannten psychrotoleranten Bakterien, sie zeigen zwar ein Wachstumsoptimum bei mesophilen Temperaturen über 20°C , verlieren jedoch bei Temperaturen um den Gefrierpunkt verhältnismäßig wenig Aktivität. Sicherlich dürfen die Bezeichnungen der Temperaturoptima nicht als feste Grenzen für eine Einteilung angesehen werden. Zudem ein *in-vitro* gemessenes Temperaturoptimum nicht vollständig die komplexen *in-situ* Bedingungen berücksichtigt.

Mikroorganismen, die in permafrostbeeinflussten Gebieten vorkommen, müssen extremen Schwankungen unterschiedlicher chemischer und physikalischer Umweltfaktoren standhalten. Die entscheidenden Parameter im Habitat sind neben dem Substratangebot die Temperatur, die Sauerstoff- und Wasserverfügbarkeit und der durch Gefrierprozesse verursachte stellenweise hohe Salzgehalt im Boden.

Die aus Permafrostgebieten erhaltenen Reinkulturen, von Bakterien mit unterschiedlichsten Stoffwechseltypen, gehören über 30 verschiedenen Gattungen an. Die meisten dieser Reinkulturen sind nicht psychrophil sondern moderat psychrophil (psychrotroph), psychrotolerant und mesophil (RIVKINA et al., 1998, 2004; STEVEN et al., 2005). Nach RUSSEL & FUKUNAGA (1990) könnten psychrophile Bakterien in den tiefen permanent gefrorenen Zonen des Permafrostes zu finden sein, während der Auftauhorizont von psychrotoleranten und mesophilen Bakterien dominiert wird.

Besonderes Interesse für mikrobiologische Untersuchungen weckte der Auftauhorizont (englisch: Active Layer) des Permafrostes, der je nach Standortbedingungen im Lena-Delta

unterschiedliche Mächtigkeiten haben kann und am Ende des Sommers seine größte Ausdehnung erreicht (bis 60 cm). GANZERT et al. (2007) konnte in Tundrenböden von Samoylov und Mamontovy Klyk methanogene Archaeen detektieren. Die angereicherten Archaeen zeigten entweder psychrotolerante oder mesophile Eigenschaften. ZIMMERMANN (2007) hingegen erläuterte mit ihren Untersuchungen die wichtige Funktion von kältetoleranten Methan oxidierenden Bakterien in dem Active Layer von Böden auf Samoylov.

Der zum Beispiel durch hohe Salzkonzentrationen oder extreme Temperaturen ausgelöste sogenannte „Environmental Stress“ der auf die Bakterien wirkt, kann durch Nutzung kompatibler Solute und physiologische Anpassungen überwunden werden. Salzstress kann zum Beispiel durch KCl und NaCl im Cytoplasma ausgeglichen werden (OREN, 1986). Des Weiteren haben die kompatiblen Solute eine große Bedeutung für den Schutz vor verschiedenen Umwelteinflüssen (LIN, 1994; PONDER et al., 2005). Kompatible Solute gehören unterschiedlichen Stoffklassen an, dazu zählen Zucker und bestimmten Aminosäuren wie Glycinbetain und Tetrahydropyrimidinderivate wie Ectoin und Hydroxyectoin (GALINSKI, 1995). Die Adaption an kalte Temperaturen geht mit umfassenden Änderungen in dem Zellaufbau sowie den Enzymstrukturen einher (JONES & MORITA, 1985; RUSSEL & FUKUNAGA, 1990; KUMAR et al., 2002; UNELL et al., 2007). Die Fluidität der Membran kann durch Veränderung der Fettsäurestruktur mittels Regulation durch die Cis-/Trans-Isomerase an unterschiedliche Temperaturen angepasst werden (HEIPIEPER et al., 2003).

Die Kenntnisse über Proteine von Bakterien aus kalten Habitaten sind für industrielle Anwendungen von großem Interesse (JAENICKE & ZAVODSZKY, 1990; AGUILAR, 1996; SVINGOR et al., 2001). Verschiedene psychrophile Bakterien synthetisieren mehrfach ungesättigte Omega-3 Fettsäuren und sind daher selbst für die Lebensmittelindustrie von Interesse (NICHOLS et al., 1996; FELLER et al., 1996, 2003).

2.6 Methodische Grundlagen

2.6.1 Charakterisierung und Quantifizierung von NOB und AOB

2.6.1.1 MPN-Test

Für die Bestimmung der Most Probable Number (MPN), der wahrscheinlichsten Keimzahl von Bakterien, wird ein selektives Nährmedium eingesetzt, in das verschiedene

Verdünnungen einer Probe gegeben werden. Aus der Anzahl bewachsener Kulturen nach der Inkubation kann statistisch die höchstwahrscheinliche Keimzahl berechnet werden (ALEF, 1991). Voraussetzung für eine zuverlässige Quantifizierung ist das Wachstum der Spezies in den eingesetzten mineralischen Flüssigmedien. Bei Quantifizierungen von Nitrifikanten in Naturproben ist es bekannt, dass die über den MPN-Test ermittelten Zellzahlen häufig um den Faktor 100-1000 zu gering ausfallen. Dies wird auf die schlechten Verteilungsmöglichkeiten der in Mikrokolonien vorliegenden Bakterien während der Probenverdünnung zurückgeführt (BELSER, 1979; PROSSER, 1982; BOTH et al., 1990; BOTH & LAANBROEK, 1991; KOOPS & POMMERENING-RÖSER, 2001).

2.6.1.2 Immunologischer Nachweis in Anreicherungskulturen

Immunologische Untersuchungen mit Antikörpern gegen das Schlüsselenzym der NOB (JOSSERAND & CLEYET-MAREL, 1979; AAMAND et al., 1996) oder der AOB (FIENCKE et al., 2000) liefern weitere taxonomische Hinweise. Es wurde erkannt, dass jede der vier bekannten Gattungen der NOB ein charakteristisches immunologisches Muster der Schlüsselenzyme aufweist (BARTOSCH et al., 1999). Die Ähnlichkeit der oxidierenden Systeme kann somit als weiteres taxonomisches Merkmal benutzt werden. Mit dieser Methode können zum Beispiel die Nitrit oxidierenden Gattungen *Nitrobacter* und *Nitrospira* anhand des relativen Molekulargewichts der β -Untereinheiten ihrer Schlüsselenzyme unterschieden werden (BARTOSCH et al., 2002). Um ausreichende Enzymmengen für immunologische Analysen von *in-situ* Proben zu erhalten, müssen die Nitritoxidanten zuvor angereichert werden.

2.6.1.3 Chemotaxonomische Analysen der spezifischen Fettsäureprofile

Eine wichtige Methode der Chemotaxonomie stellen Analysen der spezifischen Fettsäureprofile der Zellmembranen dar. Mit Hilfe dieser Analysen konnten die vier bekannten Nitrit oxidierenden Gattungen anhand ihrer charakteristischen Fettsäure-Muster differenziert werden (LIPSKI et al., 2001). Bei einigen Vertretern der Gattung *Nitrospira* konnte mit dieser Methode eine Marker-Fettsäure detektiert werden, die bisher unbekannt war. Die Fettsäurebildung wird jedoch von den Anzuchtbedingungen beeinflusst, so dass Anreicherung und Kultivierung der Bakterien unter möglichst vergleichbaren Bedingungen erfolgen sollten. Aufgrund der sehr unterschiedlichen Fettsäureprofile innerhalb der Gattung *Nitrospira* ist eine Differenzierung der einzelnen Arten möglich. So konnte die Kultur EL42 von den beiden beschriebenen Arten *Ns. marina* und *Ns. moscoviensis* abgegrenzt werden (LIPSKI et al., 2001).

2.6.2 Kultivierungsunabhängige molekularbiologische Methoden

Damit Bakterien physiologisch charakterisiert werden können, müssen sie aus ihrem natürlichen Habitat heraus angereichert und isoliert werden. Um direkt in heterogenen Naturproben Nitrit oxidierende Bakterien untersuchen zu können, eignen sich dagegen molekularbiologische Techniken auf der Basis der PCR (DEGRANGE & BARDIN, 1995; KINDAICHI et al., 2006). Verschiedene Studien haben auch die Möglichkeiten einer Quantifizierung von Nitrifikanten mittels Real-Time PCR aufgezeigt (HERMANSSON & LINDGREN, 2001; HARMS et al., 2003; KINDAICHI et al., 2006). Neuere Untersuchungen versuchen mit Hilfe von Microarray-Analysen nitrifizierende Bakterien zu erfassen. Die Probleme, die aus der sehr geringen *in-situ* Zellzahl resultieren, werden jedoch nur bei vorheriger Amplifikation der DNA verringert, wobei dann eine genaue Quantifizierung schwierig wird (KELLY, 2003; SIRIPONG et al., 2006).

Unter Verwendung molekularbiologischer Techniken konnte bereits die mikrobielle Vielfalt verschiedener Bakteriengruppen in der arktischen und antarktischen Region aufgezeigt werden (BRINKMEYER et al., 2003). Ammoniak oxidierende Bakterien konnten mittels 16S rRNA Genanalysen im Nordpolarmeer nachgewiesen werden (HOLLIBAUGH et al., 2002). Für die Analyse von Bakteriengemeinschaften eignen sich auch die Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung (FISH) und die Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (DGGE) sowie die Temperatur Gradienten Gelelektrophorese (TGGE). Bei komplexen schwer trennbaren Bandenmustern kann eine Klonierung mit anschließender Sequenzierung eingesetzt werden.

2.6.2.1 Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung (FISH)

Bei der Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung (FISH) ist es möglich, mit gattungsspezifischen Sonden gegen die 16S rRNA, Anreicherungskulturen von NOB oder auch Naturproben zu analysieren. Auf diese Weise können einzelne Gattungen unter dem Konfokalen-Laser-Rastermikroskop optisch unterschieden werden (AMANN et al., 1995; GIESEKE et al., 2001). Durch eine Kombination aus FISH und *in-situ* Messungen mit Mikroelektroden können darüber hinaus Hinweise auf Kultivierungsbedingungen erhalten werden (SCHRAMM et al., 1998; OKABE et al., 1999). Für den Nachweis vieler *Nitrobacter*-ähnlicher Bakterien genügt dabei meist eine einzige Oligonukleotid-Sonde, da die einzelnen Arten nah verwandt sind (ORSO et al., 1994; WAGNER et al., 1996; MOBARRY et al., 1996; GRUNDMANN & NORMAND, 2000). Vertreter der Gattung *Nitrospira* konnten auf diese Weise in nitrifizierenden Bioreaktoren (JURETSCHKO et al., 1998; SCHRAMM et al., 1998; OKABE et al., 1999) und in Belebtschlamm von Kläranlagen (BARTOSCH et al., 1999) nachgewiesen werden. Auch die komplexe mikrobielle Population von sibirischen

Tundrenböden konnte teilweise mit Hilfe der FISH aufgedeckt werden (KOBABE et al., 2004, 2005).

2.6.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die spezifische Amplifikation bestimmter Markergene mit Hilfe der PCR erlaubt es, auch mit geringen Zellkonzentrationen der NOB zu arbeiten (BURRELL et al., 1998, 2001; HOVANEK et al., 1998; JURETSCHKO et al., 1998; SCHRAMM et al., 1998; MARILLEY & ARAGNO, 1999; HALL et al., 2002). Die Amplifikation von DNA mittels PCR bildet die Grundlage für weitere Analyse-Techniken wie die DGGE/TGGE und 16S rDNA-Klonierungen. Die Selektivität der PCR wird maßgeblich von der Auswahl der Primer beeinflusst, daher ist ein stetiger Abgleich mit 16S rRNA Datenbanken notwendig um aktuelle Primer zu prüfen oder Neue zu entwickeln. Auch in dieser Arbeit wurden für die Gattungen der NOB neue Primer konstruiert. Die Qualität und Ausbeute der PCR-Produkte hängt stark von den Amplifikationsbedingungen ab und kann besonders bei Naturproben sehr schwanken. Da die PCR eine Voraussetzung für weitere TGGE-Analysen des 16S rRNA Gens ist, muss die Qualität der PCR-Produkte jedoch sehr hoch sein. Um eine optimale Multitemplate-Amplifikation der komplexen Boden-Bakteriengemeinschaft zu erhalten, wurden im Rahmen dieser Arbeit unterschiedliche Reaktionsparameter und Zusätze getestet. Zur Quantifizierung von Nitrifikanten wurde auch die kompetitive PCR (PHILLIPS et al., 2000; DIONISI et al., 2002) und die Real-Time PCR eingesetzt (HERMANSSON & LINDGREN, 2001; HARMS et al., 2003; KINDAICHI et al., 2006), jedoch beruhen auch diese Techniken auf der Spezifität der gewählten Primer, so dass neue Arten möglicherweise nicht erfasst werden.

2.6.2.3 Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (DGGE) und Temperatur Gradienten Gelelektrophorese (TGGE)

Eine weitere, auf der Anwendung der PCR beruhende molekularbiologische Technik zur *in-situ* Analyse bakterieller Populationen ist die DGGE und TGGE (TESKE et al., 1994; MUYZER et al., 1998). Diese Methode bietet durch die Auftrennung von PCR-Amplifikaten neben der Untersuchung von Reinkulturen auch die Möglichkeit zu ersten Analysen von Anreicherungskulturen und Naturproben mit geringen Zellzahlen der Zielorganismen. Hier wird die genetische Variabilität von Bakterienpopulationen anhand distinkter DNA-Banden im Gel erfasst. Bei den Untersuchungen der Diversität von Bakterienpopulationen haben diese Methoden eine breite Anwendung gefunden (MUYZER et al., 1993, 1995; ISHII et al., 2000; DIEZ et al., 2001). Aus der genomischen DNA, die aus Reinkulturen, Anreicherungen oder Naturproben extrahiert wurde, kann mit Hilfe ausgewählter Primer mit der PCR-

Technik ein bis zu 1500 Basenpaar langes 16S rDNA-Fragment amplifiziert und sequenzspezifisch aufgetrennt werden.

Neben Amplifikaten des 16S rRNA-Gens können auch Amplifikate anderer Gene mit Hilfe dieser Techniken analysiert werden (WAWER & MUYZER, 1995). Für taxonomische *in-situ* Untersuchungen von Populationen der Nitritoxidanten ist jedoch das 16S rRNA-Gen am besten geeignet (PACE et al., 1986). Das gilt auch für die Mehrzahl anderer Bakteriengruppen und vor allem für Mischpopulationen verschiedener Bakteriengruppen (MUYZER & RAMSING, 1995). Die Sequenzen der 16S rRNA codierenden Gene zählen zu den besten phylogenetischen Chronometern. Die Nukleotidsequenz dieses Gens ist evolutiv betrachtet hoch konserviert, daher können durch Sequenzvergleiche unter anderem auch die phylogenetischen Verwandtschaften verschiedener Bakteriengruppen miteinander verglichen werden.

MOESENEDER et al. (1999) und DIEZ et al. (2001) verglichen die Ergebnisse von DGGE-Analysen mit denen von Klonierungen, Terminal-Restriction Length Polymorphism (RFLP) und der Capillary Electrophoresis (CE). Bei den Untersuchungen wurde deutlich, dass die Ergebnisse von DGGE-Analysen mit denen anderer PCR basierter Techniken für Populationsanalysen vergleichbar sind. SANTEGOEDS et al. (1996) und JACKSON et al. (1998) zeigten jedoch auch die Schwächen der DGGE/TGGE-Technik auf. Anhand von DGGE-Profilen komplexer Bakterien Populationen, von denen Verdünnungsreihen angelegt wurden, zeigte sich eine falsche Darstellung der eigentlichen Populationsstruktur in sehr starken Verdünnungsstufen. Abhängig von der Bindeaffinität der Primer an unterschiedliche Templates und der Tatsache, dass die Amplifikatmenge der ersten Cyclen der PCR entscheidenden Einfluss auf die Amplifikatvielfalt hat, kann bei sehr geringen Zellzahlen die Populationsstruktur nicht zuverlässig erfasst werden.

DGGE Analysen

Bei der DGGE werden die PCR-Produkte in einem Polyacrylamidgel mit einem linearen Harnstoff-Formamid-Gradienten nach ihren sequenzabhängigen Schmelzeigenschaften aufgetrennt (FISHER & LERMANN, 1979, 1983). Um DNA-Moleküle dieser Länge (280-640 bp) gelelektrophoretisch auftrennen zu können, eignet sich ein 6-8 %iges Polyacrylamid-Gel. Die denaturierende Wirkung auf den DNA-Doppelstrang wird durch die Zugabe von Harnstoff und Formamid erreicht. Formamid wirkt während der Elektrophorese stabilisierend auf den denaturierten Zustand der DNA. Wird in dem Gel mit Hilfe eines Gradienten-Mischers ein linearer Harnstoff/Formamid-Gradient angelegt, bilden die untersuchten DNA-Fragmente bei einer konstanten Temperatur von 60°C in Abhängigkeit

von ihrem sequenzspezifischen Schmelzverhalten distinkte Banden (MUYZER & RAMSING, 1995; MUYZER & SMALLA, 1998).

TGGE-Analysen

Anders verläuft die teilweise Denaturierung der DNA in einem TGGE-Gel. Hier wird an Stelle eines chemischen Gradienten ein computergesteuerter Temperaturgradient angelegt und das Gel gleichmäßig mit Harnstoff und Formamid hergestellt. Der sehr genaue, frei wählbare, Temperaturgradient hat den Vorteil, dass kein chemischer Gradient hergestellt werden muss. Dieser ist nur schwer reproduzierbar herzustellen, so dass die Gele in der TGGE einfacher direkt miteinander verglichen werden können. Die TGGE konnte bereits erfolgreich für das Monitoring von Bakterienpopulationen in Böden und Meeren eingesetzt werden (HEUER et al., 1997; MUYZER et al., 1998; MUYZER, 1999; WIELAND et al., 2001). In künstlichen Systemen wie Bioreaktoren bewährte sich die TGGE, um Veränderungen der Bakterienpopulation zu registrieren (GOMEZ-VILLALBA et al., 2006; MOLINA-MUNOZ et al., 2007).

3 Die Untersuchungsgebiete

3.1 Permafrost

Das Klima der Erde wird durch Permafrostböden und deren Auftauprozesse entscheidend beeinflusst. Nicht nur vergangene Klimaphasen lassen sich durch die Erforschung der Auftauprozesse rekonstruieren, auch aktuelle und künftige Klimaveränderungen sind hier frühzeitig detektierbar. Permafrost prägt auch die Landschaft Zentralnordsibiriens und den Meeresboden der nördlich angrenzenden Laptev-See.

Ein Boden, der für mindestens zwei aufeinanderfolgende Jahre eine Temperatur von unter 0°C aufweist, wird als Permafrost bezeichnet (Permafrost Subcommittee, 1988). Über 29 % der Landmasse wird vom Permafrost bedeckt. Dazu gehören ca. 80 % der Landfläche Alaskas, 50 % der Russischen Föderation, 50 % Kanadas und 20 % Chinas.

Das Gebiet des Lena-Deltas gehört zur Zone des kontinuierlichen Permafrostes. Die Mächtigkeit des Permafrostes kann hier 200-600 m betragen (ERSHOV, 1991). Bedingt durch geringe Niederschläge ist eine isolierende Schneedecke nicht oder nur in geringem Maße vorhanden. Sogenannte Thermoerosions-Prozesse lassen die an der Küste auftretenden Eiskomplexe bis zu sechs Meter pro Jahr schrumpfen. Im östlichen Teil des Deltas kommt es zur Akkumulation von Sedimenten.

Die Mächtigkeit des Auftauhorizonts wird in erster Linie durch die Sonneneinstrahlung und die Schneebedeckung beeinflusst, die Lufttemperaturen haben einen geringeren Einfluss (SCHIRRMEISTER, 2005). Selbst erhöhte Lufttemperaturen während der kurzen Sommermonate reichen nicht aus, um tiefere Bodenschichten aufzutauen. Bei einer möglichen Verzerrung der Sommermonate, und damit einem dauerhaften Anstieg der Lufttemperaturen, kann es jedoch zu einem verstärkten Auftauen auch tiefer Bodenzonen kommen (HUBBERTEN & SCHIRRMEISTER, 2006).

Bodenfeuchte und Vegetation spielen bei den Gefrier- und Auftauprozessen eine wichtige Rolle. Vegetationen wie Moosbedeckungen können, ähnlich wie Schnee, die Wärmeeinstrahlung abfangen, wobei Schmelz- und Regenwasser Wärme bis in tiefere Bodenhorizonte tragen kann und somit die Auftauprozesse verstärkt. Dieses Phänomen ist in den Eiskeil-Polygonzentren zu beobachten. Die Polygonzentren sind gekennzeichnet durch eine Bodendepression, die durch die Bildung von Eiskeilen entsteht. Diese Eiskeil-Polygon-Netze sind eine in Permafrostgebieten weitverbreitete Landschaftsform. Sie sind in den Zonen des kontinuierlichen Permafrostes zu finden, wo im Winter durch

Kältekontraktion des Bodens Frostrisse entstehen, die an der Geländeoberfläche pentagonale oder hexagonale Strukturen bilden, die Polygone genannt werden. Diese Polygone weisen Wälle entlang der Ränder des muldenförmig vertieften Zentrums auf (Abbildung 2). Im Zentrum kann im Sommer das Schmelz- und Niederschlagswasser nicht abfließen, so dass sich Staunässe bildet. Dies führt im Boden des Zentrums zu sauerstoffarmen Bereichen. Vom Wall kann das Wasser in das Zentrum ablaufen, so dass der Boden des Walls relativ trocken ist (KOBABE et al., 2004, 2005). Das Schmelzwasser des Frühjahrs sickert in Frostrisse und gefriert. Durch Erwärmung dehnt sich der Boden aus, wobei die durch Gefrier- und Auftau-Prozesse entstandenen Eisadern eine horizontale Ausdehnung verhindern. So kommt es an den Polygonrändern zu einer langsamen Aufwölbung des Bodens. Durch ein alljährliches Wiederholen dieser Prozesse entsteht die typische Form der Low-Center-Polygone mit eingefallenem Zentrum und erhöhtem Randwall (WASHBURN, 1979).

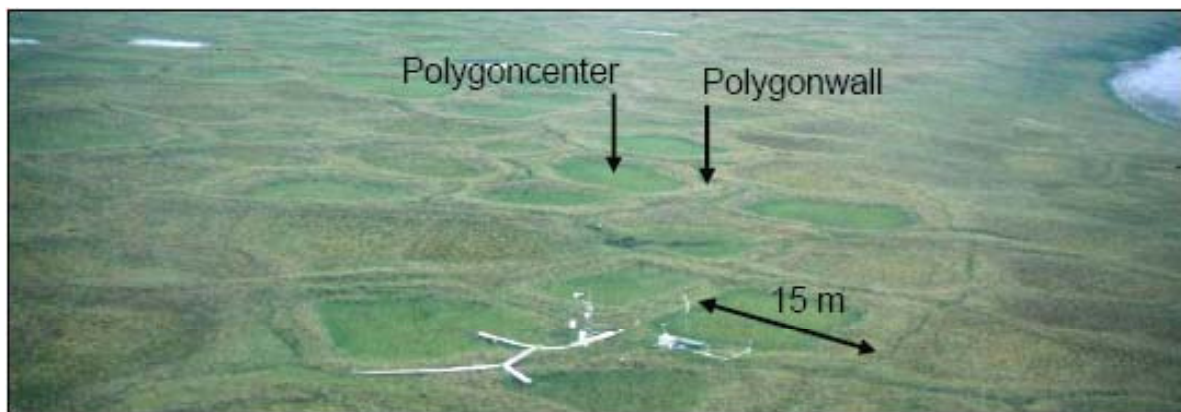


Abbildung 2: Luftaufnahme der Eiskeil-Polygon-Landschaft auf Samoylov. In der Mitte ist eine Klima-Messwarte zu sehen (Foto: Prof. Dr. E.-M. Pfeiffer)

3.2 Die Lage und Charakteristik der Untersuchungsgebiete

Um Unterschiede in der Population und die Gesamtheit der Diversität von nitrifizierenden Bakterien zu erfassen, wurden exemplarisch fünf Standorte untersucht, die sich hinsichtlich der Vegetation und ihrer Lage im Gelände unterschieden. Drei der Untersuchungsstandorte lagen auf der Insel Samoylov (Profil P1, P2 und das Kliff), zwei Probenreihen stammten aus dem Gebiet Kap Mamontovy Klyk, westlich des Lena-Deltas gelegen. Weitere Proben wurden aus einem fünf Meter tiefen Bodenbohrkern aus Kurungnakh entnommen. Neben den Bodenproben wurden auch Sedimente der Lena sowie der Laptev-See untersucht.

Im Rahmen des Projekts „System Laptev-See“ wurden von Mitarbeitern des AWI Potsdam im Jahr 2002 Bodenproben von der Insel Samoylov und Kurungnakh für mikrobiologische und geochemische Untersuchungen genommen. Der erste Probenstandort ist ein typisches Low-Center-Polygonzentrum es ist durch einen hohen Gehalt an organischen Materials (*Sphagnum*, *Carex*-Wurzeln) sowie einen hohen Wasserstand mit ausgedehnten anoxischen Verhältnissen gekennzeichnet. Der Boden wurde als *Typic Historthel* (USDA, 2006) klassifiziert. Die vorherrschenden Pflanzen waren *Carex* spp. und Moose.

Der Standort Kap Mamontovy Klyk wurde im Jahr 2003 im Rahmen der Expedition LENA-ANABAR 2003 beprobt (Uta Zimmermann, IfB Hamburg). Der Probenstandort lag in einer kleinen Low-Center-Polygonebene nahe dem Ostufer des Flusses Nuchcha Dzhiel (73°36'N, 117°20'O). Hier handelte es sich ebenfalls um ein Polygonzentrum, wobei das Probenmaterial einen deutlichen Unterschied zu dem Polygon auf der Insel Samoylov aufwies. Der Torf im Oberboden war stärker zersetzt und vor allem in den unteren Lagen des Profils waren deutliche Sedimenteintragerungen vorhanden. Hier wuchsen vor allem *Eriophorum* spp., *Carex* spp sowie Süßgräser und Moose.

Die Beprobung der Laptev-See wurde eigenhändig von dem Forschungsschiff Ivan Keriev aus durchgeführt (TRANSDRIFT-X, Aug. 2003). Es wurden sowohl Proben aus dem Delta nahen Gebiet bei Tiksi entnommen, welches durch die Einmündung der Lena einen Brackwasser Charakter aufwies und viel organisches Material enthielt, wie auch aus dem nördlichen Teil der Laptev-See, der durch das Nordpolar Meer beeinflusst wird.

3.2.1 Das Lena-Delta

Das Mündungs-Delta der Lena gehört mit einer Größe von über 30.000 km² (ARE und REIMNITZ, 2000) zu einer der größten Deltalandschaften der Erde. Von West nach Ost hat das Delta eine Ausdehnung von ca. 230 km und von Nord nach Süd etwa 150 km. Nach dem Passieren dieses weit verästelten Flusssystemes erreicht das Wasser der Lena die Laptev-See, ein Randmeer des Arktischen Ozeans.

Das Quellgebiet der Lena ist das Baikargebirge westlich des Baikalsees. Die Lena fließt von dort aus zuerst in westlicher Richtung entlang dem Mittelsibirischen Bergland und mündet nach 4.400 km in die nordsibirische Laptev-See. Die Luft-Temperaturen im Delta liegen im Jahresdurchschnitt bei -14,7°C. Während der Wintermonate von Ende September bis Ende Mai liegen die Temperaturen zwischen -30°C und -48°C. Die neunwöchige Sommerperiode ist durch Temperaturen von +7°C bis zu +18°C gekennzeichnet (WAGNER et al., 2002). Das Klima im Lena-Delta ist geprägt durch kühle Sommer, die lediglich von Mitte Juni bis

Mitte August reichen. Die Winter zeichnen sich durch sehr niedrige Temperaturen weit unter -20°C aus. Unter solchen extremen Bedingungen können nur verhältnismäßig wenige Pflanzenarten überdauern. Daher besteht die Vegetation meist aus Pflanzengesellschaften, die von Zwergsträuchern, Sauergräsern, Wollgräsern, Moosen und Flechten dominiert werden (SCHULTZ, 1995).

3.2.2 Die Insel Samoylov im Lena-Delta

Die Insel Samoylov ist im aktiven südlichen jüngsten (8.000-9.000 Jahre alt) Teil des Lena-Deltas (Abbildung 3-4). Sie hat eine Fläche von etwa 1.200 ha, der höchste Punkt befindet sich 12 m über dem Meeresspiegel.

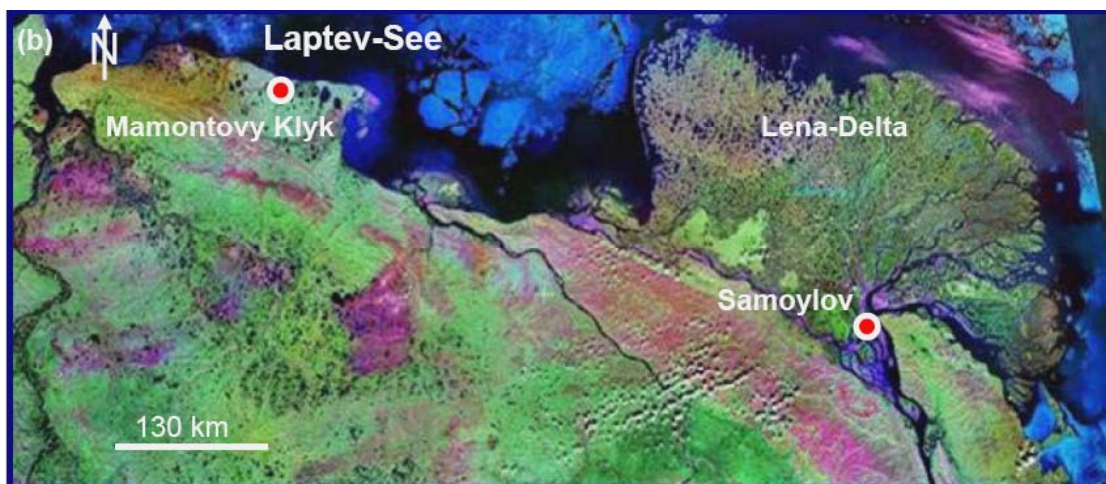


Abbildung 3: Die Küstenregion der Laptev-See, Probenahmeorte Samoylov und Mamontovy Klyk. Satellitenbild: NASA: Earthwind



Abbildung 4: Luftbild der Insel Samoylov (Foto: C.Wille)

Die Insel Samoylov lässt sich grob in zwei geomorphologische Zonen einteilen: Der östliche Teil der Insel ist durch eine mittel-holozäne Flußterrasse charakterisiert. Charakteristisch für diese vorgelagerten Inseln sind Torflagen mit dazwischen liegenden schluffig-sandigen Sedimentablagerungen. Diese nehmen auf Samoylov etwa 70 % der Inselfläche ein. Die Ost- und Südseite der Insel ist durch massive Erosion geformt und hat eine 8-12 m hohe Steilküste ausgebildet. Die Westküste ist durch Überflutungen und rezente Akkumulation von Sedimenten geprägt.

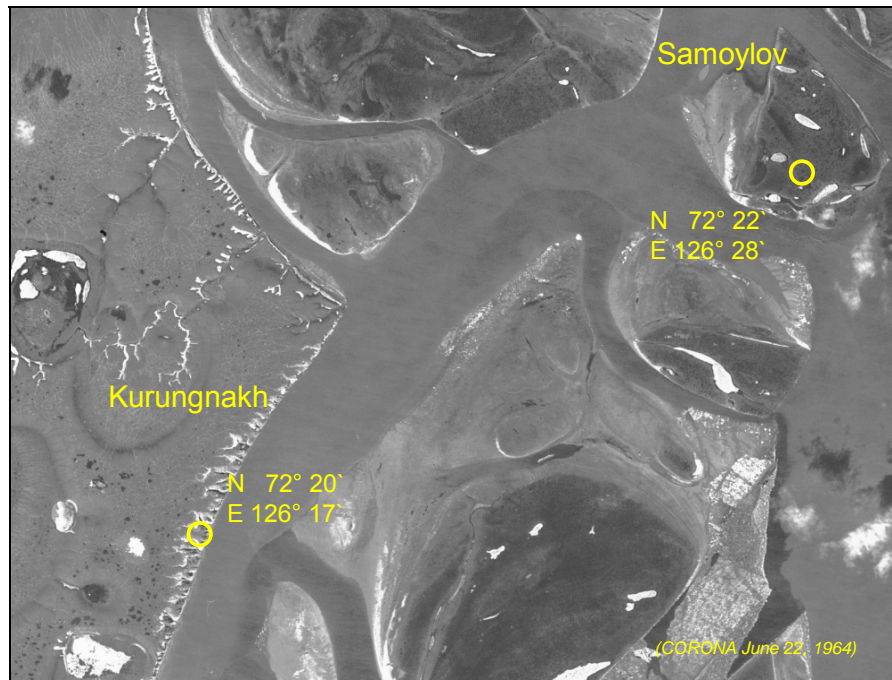


Abbildung 5: Satellitenbild der Insel Samoylov und Kurungnakh, die Probenahmeorte sind durch gelbe Kreise gekennzeichnet

Die Insel Kurungnakh liegt unweit von Samoylov, die Proben wurden von der Steilküste des Westufers und des Kliffs entnommen.

3.2.3 Kap Mamontovy Klyk an der Küste der Laptev-See

Das Untersuchungsgebiet liegt in der Nähe des Flusses Nuchcha Dzhielo, ungefähr 600 km nordwestlich von Tiksi, im Küstenland zwischen der Anabar-Bucht und der Olenek-Bucht. Im Süden schließt sich der Pronchishchev-Höhenzug an, der zur Küste hin sanft abfällt. Das Küstentiefland ist geprägt durch eine hügelige Ebene, die Erhöhungen von 25 bis 35 m über dem Meeresspiegel aufweist.

Das Kap Mamontovy Klyk liegt in der Zone der subarktischen Tundra. Die mittlere Jahrestemperatur liegt bei -14°C . Im Winter beträgt die mittlere Lufttemperatur in etwa

-22°C, wobei es Minima unter -35°C geben kann. Die mittlere Sommertemperatur liegt zwischen +5°C bis +10°C. Die mittlere Niederschlagsmenge beträgt ungefähr 250 mm im Jahr, wobei der größte Teil als Regen im Sommer fällt.

3.2.4 Die Laptev-See

Die Laptev-See mit dem angrenzenden sibirischen Hinterland ist eine Schlüsselregion für das Verständnis von Umweltveränderungen. Seit 1993 werden in diesem Gebiet multidisziplinäre Untersuchungen im Rahmen des bilateralen Verbundvorhabens „System Laptev-See“ durchgeführt (Abbildung 6).

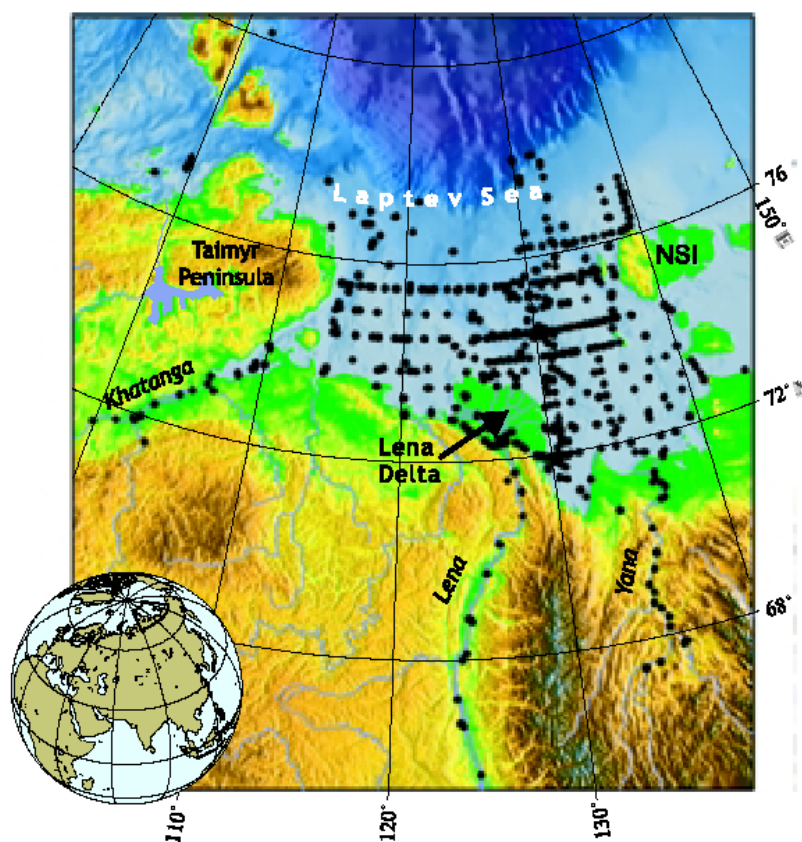


Abbildung 6: Die Laptev-See. Probenahmeorte des Projektes „System Laptev-See“ sind schwarz markiert

Die Laptev-See erstreckt sich nordwärts bis zur permanenten Eisgrenze des Nordpolarmeers und nimmt dabei eine Fläche von ca. 660.000 km² ein. Die größte bisher ermittelte Tiefe liegt 3.385 Metern unter dem Meeresspiegel. Die Probennahmeorte lagen jedoch bei 18-35 Metern Tiefe. In dieses bis zu 10 Monate im Jahr vereiste Meer mündet die Lena in einem großen Delta. Über das Lena-Delta gelangen jährlich 524 km³ Süßwasser in die Laptev-See (YE et al., 2003). Durch den hohen Süßwasser- und

Sedimenteintrag (RACHOLD et al., 1999) hat die Lena einen großen Einfluss auf das Ökosystem der Laptev-See und den daran grenzenden Arktischen Ozean (NOVIKHIN & NITISHINSKY, 2006). Benachbarte Randmeere der Laptev-See sind im Westen die Karasee und im Osten die Ostsibirische See.

Während des Meeresspiegelanstiegs der letzten Enteisungsphase ist die Laptev-See aus einer Permafrost geprägten Tundralandschaft als ausgedehntes Schelfmeer mit submarinem Permafrost hervorgegangen. Wie durch zahlreiche Studien gestützt, zeichnet sich in den letzten Jahrzehnten im gesamten Gebiet der Arktis eine große Veränderung der meteorologischen und ozeanografischen Rahmenbedingungen ab (HUBBERTEN & SCHIRRMESTER, 2006). Die Veränderungen werden besonders deutlich durch den Rückgang der Packeisbedeckung, durch einen ungewöhnlichen Anstieg der Lufttemperaturen im Winter und Frühjahr sowie einen verstärkten Zustrom atlantischer Wassermassen in den Arktischen Ozean und in die Laptev-See (RIGOR & COLONY, 1997).

Es wird postuliert, dass diese Veränderungen auch zu einer Destabilisierung des Permafrostes in der Laptev-See führen werden, da der submarine Permafrost hier über weite Gebiete direkt auf der Meeresbodenoberfläche liegt oder nur von einer dünnen Decke mariner Sedimente geschützt wird. Da geochemische Prozesse auch in Permafrostgebieten teilweise von mikrobiologischen Prozessen gesteuert werden, liegt für die Dynamik der Stoffkreisläufe in Permafrostgebieten auch ein besonderes Augenmerk auf der Leistung der Mikroorganismen.

3.3 Das Probenmaterial

Eine Aufgliederung der Probenahmeorte und Probenbezeichnungen ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Aufgliederung der Probenahmeorte und Probenbezeichnungen. Soweit nicht anders gekennzeichnet wurden die Proben im Rahmen des Verbundprojektes „System Laptev-See“ genommen.

Kulturbezeichnung und Ort der Probenahme	Profil-Struktur	
	Proben-Nummer	Tiefe [m] gemessen von der Geländeoberfläche
Kliff der Insel Samoylov; "Junger" Permafrost (2000–7000 Jahre). Activ Layer. Probenahme am 28. und 29.8.04 Boden-Profil Proben 3301 bis 3310	3301	0,8-1,0
	3302	1,4-1,5
	3303	1,9-2,0
	3304	2,4-2,5
	3305	2,9-3,0
	3306	3,5-3,6
	3307	3,9-4,0
	3308	4,5-4,6
	3309	5,0-5,1
	3310	5,5-5,6
Insel Samoylov im Lena-Delta Boden-Profil (2001) Polygon P2, vom Wall, Hang und Zentrum. Proben 6675-6682 Proben von Dr. Dirk Wagner	6675-6682	Auftauhorizont 0-5 cm
Insel Samoylov im Lena-Delta Boden-Profil (2004) Polygon P1 vom Wall, Hang und Zentrum Proben W1-3, H1-3 und C1-3	Proben-Nummer	Tiefe [cm]
	Wall W1	0-5
	W2	8,5-13,5
	W3	17-22
	Hang H1	0-5
	H2	6-11
	H3	12-17
	Zentrum C1	0-5
	C2	12-17
	C3	24-29
Kurungnakh, Nordsibirien Bohrkern (2001) Proben 1051, 1052, 1066 Proben von Dr. Dirk Wagner	1051	Oberer Auftauhorizont
	1052	90 cm
	1066	5 m

Mamontovy Klyk Profil eines Kliffs, sehr alte Permafrosthorizonte Proben 100-128 Proben von Uta Zimmermann	0-5 cm
Mamontovy Klyk Boden-Profil vom Thermoerosionstal (2003) Proben 207-1 bis-10 Proben von Uta Zimmermann	0-5 cm
Sedimente der Laptev-See (Aug. 2003). Transsekt vom Delta bis zum nördlichen Teil, der durch das angrenzende Nordpolarmeer beeinflusst wird. Proben S1-S11	obere 10 cm des Sediments der Laptev- See (Nordpolarmeer)
Sedimente des Lena-Flusses (Nordsibirien)	0-5 cm

4 Material und Methoden

4.1 Methodenüberblick

Um nach Möglichkeit die gesamte Diversität von NOB im Habitat bestimmen zu können, wurden klassische Anreicherungskulturen und physiologische Untersuchungen mit molekularbiologischen Techniken kombiniert. Die Kultivierung und Isolierung von chemolithoautotrophen Bakterien aus dem natürlichen Habitat heraus ist sehr kompliziert und zeitaufwendig. Dennoch ist eine Reinkultur Grundvoraussetzung für die physiologische Charakterisierung. Um die Funktion des Bakteriums im Ökosystem umfassend zu verstehen, muss demnach auch in Zukunft mit klassischen physiologischen Anreicherungs- und Kultivierungs-Methoden gearbeitet werden. Viele Untersuchungen werden durch die Anwendung molekularbiologischer Techniken schneller und manchmal überhaupt erst möglich. Dennoch bergen gerade die modernen Methoden viele Fehlerquellen und lassen Raum für Fehlinterpretationen. Die DGGE und TGGE haben sich bewährt, um ein Screening nach bekannten Bakteriengattungen auch bei größeren Probenanzahlen durchzuführen zu können. Der Anreicherungsprozess der Bakterien kann durch ein TGGE-Monitoring begleitet werden. In Abbildung 7 ist der Ablauf der Untersuchungen und die Kombination aus klassischen und molekularbiologischen Techniken dargestellt.

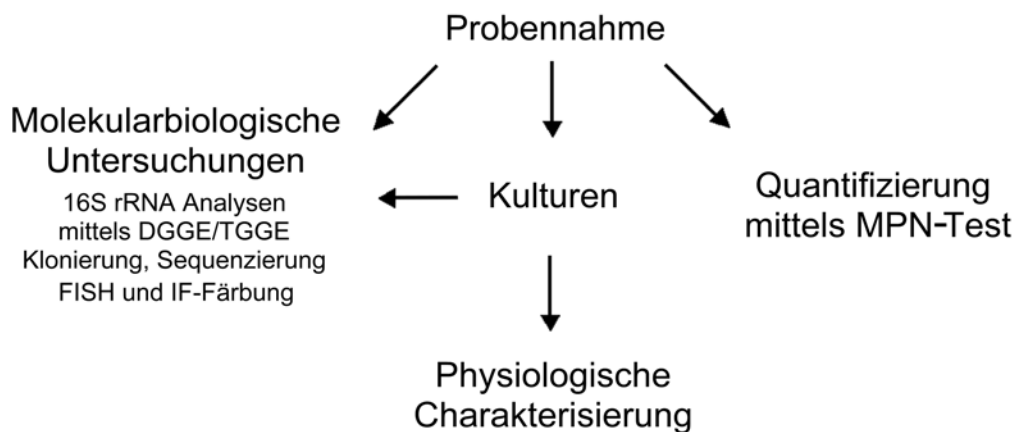


Abbildung 7: Kombination aus klassischen und molekularbiologischen Techniken: Ablauf der Untersuchungen

4.2 Verwendete Bakterienstämme

Die für TGGE-Analysen verwendeten Referenzstämme sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Sie wurden von der Stammsammlung der Abteilung Mikrobiologie der Universität Hamburg zur Verfügung gestellt. Des Weiteren wurden Anreicherungen von Dr. Spieck und Dr. Lebedeva verwendet.

Tabelle 2: Nitrit oxidierenden Kulturen aus der Stammsammlung der Universität Hamburg

Kulturbezeichnung	Entnahmestelle der Probe	Quelle/Referenz
<i>Nitrospira</i>		
A17 ' <i>Candidatus Nitrospira defluvii</i> '	Belebtschlamm aus der Kläranlage Dradenau, Hamburg	(Bartosch et al. 1999, Spieck et al. 2006)
EL42	Wasser-Heizungssystem in Moskau, T=42°C	Dr. Elena Lebedeva, Winogradsky Institute of Microbiology, Russian Academy of Science
GAll	Aus der heißen Carbonat-Quelle des Garga-Flusses am Baikalsee. Aus einer Bakterienmatte entnommen. T=51°C, pH 8,5	
GA4a	Sedimentprobe aus einem Teich des Garga-Flusses, T=48°, pH 8,5	
GA9-4	Aus dem Garga-Fluss am Baikalsee, T=46°C, pH 8,5.	
<i>Nitrobacter</i>		
5/F3	Bodenprobe vom Auftauhorizont des Permafrostbodens in Sibirien. Samoylov, Lena Delta, Russland	Dr. Dirk Wagner; AWI Potsdam (BARTOSCH et al., 2002)
111, 112, 113	Aus einer 40.000 Jahre alten Sedimentschicht des Permafrostbodens aus der Kolyma-Indigirka Tiefebene, Russland, Anreicherung von H. Janssen	H. Janssen, 1994 (BARTOSCH et al. 1999)
BS5/6	Erzmine in Rumänien, Baia Sprie	Dr. Eva Spieck

4.3 Probennahme

An den genommenen Bodenproben wurden chemische und molekularbiologische Analysen durchgeführt. Es wurde zunächst der pH-Wert bestimmt und der Gehalt an Ammonium, Nitrit und Nitrat mittels HPLC gemessen. Zur Quantifizierung der Nitrifikanten wurden MPN-Reihen angelegt sowie Anreicherungskulturen beimpft. Die DNA wurde sowohl direkt aus den Proben isoliert, wie auch im späteren Verlauf aus den Anreicherungskulturen. Nach durchgeführter Teilamplifikation des 16S rRNA Gens wurden die Amplifikate mittels DGGE/TGGE aufgetrennt, sequenziert und phylogenetisch eingeordnet.

Die Proben des ersten Profils stammten aus einem von KUTZBACH (2000) untersuchten und beschriebenen Profil eines *Typic Historthel* (nach SOIL SURVEY STUFF, 1998) eines Polygonzentrums der Insel Samoylov. Die Probennahme wurde Anfang August 2002 im Rahmen der Expedition LENA 2002 durchgeführt (WAGNER et al., 2002). Im Rahmen der Expedition Lena-Anabar 2003 wurden Bodenproben eines Polygonzentrums (*Typic Aquiturbel*), in einer kleinen Ebene am Ostufer des Flusses Nuchcha Dzhielo (Kap Mamontovy Klyk) liegend, genommen. Alle Proben für die bodenmikrobiologischen und molekularbiologischen Analysen wurden luftdicht im gekühlten oder gefrorenen Zustand in NALGENE®-Gefäßen transportiert.

Für die Beprobung der Laptev-See wurden im Rahmen der TRANSDRIFT-X (2003) Expedition Sedimentproben sowie Freiwasserproben entnommen. Mittels Backengreifer wurden die oberen 10-15 cm des Sediments aufgenommen und in sterile NALGENE®-Gefäße überführt. Des Weiteren wurde Seewasser aus verschiedenen Tiefen filtriert und mit Wasser aus der entsprechenden Tiefe aufgenommen. Die Proben wurden dem Habitat entsprechend während des gesamten Transports bei 5°C gehalten, um die an Kälte angepassten Bakterien nicht zu schädigen.

4.4 Flüssig- und Festmedien

Die verwendeten Chemikalien für die Zusammensetzung der Medien wurden, soweit nicht anders gekennzeichnet, von der Firma Merck bezogen. Alle folgenden Lösungen wurden 30 min bei 112°C und 0,5 bar Überdruck im Dampfautoklaven sterilisiert.

Reinheitsagar modifiziert nach STEINMÜLLER (1976)

Agar	15,0 g
NaCl	0,50 g
KH ₂ PO ₄	1,00 g
Fleischextrakt	5,00 g
Caseinhydrolysat	5,00 g
Hefeextrakt	1,00 g
Aqua deion. ad 1000 ml	
pH 7,3	

Hefeboullionmedium

NaCl	0,58 g
Bacto-Pepton	0,50 g
Hefeextrakt	0,50 g
Fleischextrakt	5,00 g
Aqua deion. ad 1000 ml	
pH 7,3	

4.4.1 Nährmedien für AOB

Medien für terrestrische und limnische AOB

Mineralisches Medium (1mM Ammonium)

NH ₄ Cl	54 mg
KH ₂ PO ₄	54 mg
KCl	74 mg
MgSO ₄ + 7 H ₂ O	49 mg
NaCl	584 mg
CaCO ₃	5 g
oder CaCl ₂	147 mg
HEPES-Puffer	3 g
Spurenelemente	1 ml
Kresolrot	1 ml
Aqua deion. ad 1000 ml	

Das Medium wurde entweder mit CaCO₃ oder CaCl₂ und HEPES angesetzt. Kresolrot wurde nur für ungepufferte Medien verwendet.

Mineralisches Medium für marine AOB (2mM)

NH ₄ Cl	0,11 g
KH ₂ PO ₄	0,05 g
HEPES-Puffer	3,00 g
Kresolrot	1 ml
Meerwasser (Nordsee)	50 ml (75 %), 1000 ml (100 %)
Aqua deion. ad 1000 ml	

4.4.2 Nährmedien für NOB

Die Zusammensetzung der marinen Medien erfolgte nach WATSON et al. (1986). Die terrestrischen und limnischen Medien wurden nach BOCK et al. (1992) und EHRICH et al. (1995) angefertigt. Die Bakterienkulturen wurden, je nach Bedarf in 300 ml Erlenmeyerkolben mit 150 ml mineralischem Medium oder in 1.000 ml Kolben mit 300 ml mineralischem Medium, im Dunkeln angezogen. Die verwendeten Kulturen wurden über einen Zeitraum von 10-60 Wochen kultiviert. Die Anzucht-Temperatur von *Nitrospira*-Isolaten bzw. -Kulturen variierte je nach Herkunft der Organismen von 4°C bis 55°C (siehe Tabelle 2). Die Substratkonzentration des Mediums betrug 0,2-2 g NaNO₂/l. Sobald das Substrat verbraucht war, wurde je nach Kultur 5-10 mal eine der Ausgangskonzentration entsprechende Menge NaNO₂-Lösung in das Nährmedium hinzugegeben. Danach war eine Überimpfung in frisches Medium notwendig. Die Reinkulturen wurden regelmäßig auf Reinheitsagar und in Hefebouillon auf Verunreiniger überprüft.

Medien für terrestrische und limnische NOB**10x Spurenelemente-Lösung**

MnSO ₄ x H ₂ O	0,338 g
H ₃ BO ₃	0,494 g
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,431 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0,371 g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	9,73 g
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	9,73 g
Aqua deion. ad 1000 ml	

10x Mineralisches Medium

NaNO ₂	0,20 - 2,00 g
CaCO ₃	0,07 g
NaCl	5,00 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,50 g
KH ₂ PO ₄	1,50 g
Spurenelemente	10 ml
Aqua deion. ad 1000 ml	

Nach dem Autoklavieren pH 7,4-7,6 mit KOH oder NaOH

Agaroseplatten für NOB

NaNO ₂	0,40 g
CaCO ₃	0,01 g
NaCl	1,00 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,10 g
KH ₂ PO ₄	0,30 g
Spurenelemente	2,0 ml
Agarose	24 g
Aqua deion. ad 2000 ml	
pH 8,6 mit KOH oder NaOH	

Mineralisches Medium für marine NOB**10x Spurenelemente-Lösung**

Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	25 mg
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	500 mg
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	5 mg
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	250 mg
Aqua deion. ad 1000 ml	

10x Mineralisches Medium

NaNO ₂	4,0 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	50 mg
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1,0 g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	10 mg
KH ₂ PO ₄	17 mg
marine Spurenelementelösung	10 ml
Meerwasser (Nordsee)	700 ml
Aqua deion.	300 ml
pH 7,0 mit HCL einstellen	

Agaroseplatten für marine NOB

Stammlösung NOB	200 ml
marine Spurenelementelösung	2 ml
Seewasser	400 ml
Aqua deion.	400 ml
Agarose	24 g
pH 7,0 mit HCL einstellen.	

4.5 Kulturführung von Nitrit oxidierenden Bakterien

Die Kulturbedingungen für die Rein- und Anreicherungskulturen der untersuchten Bakterien sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Kulturbedingungen für Rein- und Anreicherungskulturen der untersuchten Nitrit oxidierenden Bakterien

Kulturbezeichnung	Anzuchtstemperatur [°C]	NaNO ₂ -Konzentration NaNO ₂ [g/l]
Reinkulturen		
<i>Nitrospira moscoviensis</i> M-1 DSM 10036 (EHRICH et al. 1995)	37	0,2
<i>Nitrospira marina</i> 295 ATCC 43039 (WATSON et al. 1986)	28	0,2 (marin)
<i>Nitrobacter hamburgensis</i> X 14 DSM 10229 (BOCK et al. 1983)	28	2
<i>Nitrobacter winogradskyi</i> Engel DSM 10237 (WINSLOW et al. 1917)	28	2
<i>Nitrobacter vulgaris</i> Z DSM 10236 (BOCK et al. 1990)	28	0,2
<i>Nitrobacter alkalicus</i> AN4 (SOROKIN et al. 1998)	28	0,2
<i>Nitrobacter</i> sp. BS5/6	28	0,2
<i>Nitrobacter winogradskyi</i> 297 (Stammsammlung Universität Hamburg, Abteilung Mikrobiologie)	28	0,2 (marin)
<i>Nitrobacter winogradskyi</i> 311 (Stammsammlung Universität Hamburg, Abteilung Mikrobiologie)	28	0,2 (marin)
<i>Nitrococcus mobilis</i> 231 (WATSON und WATERBURY 1971)	28	0,2 (marin)
<i>Nitrospina</i> sp. 347	28	0,2 (marin)
Anreicherungen		
A17 'Candidatus Nitrospira defluvii'	28	0,2
EL42	42	0,2
GAll	55	0,02
GA4a	48	0,02
GA9-4	42	0,02
5/F3	28	0,2
Profil Samoylov, Kulturen 6675-6682	10, 17	0,02-0,2
Profil Samoylov, Kultur 6678a	10	0,02
Profil Samoylov, Kultur 6678b	17	0,02
Profil Samoylov, Kulturen W1-3, H1-3, C1-3	10, 17	0,02
Profile Mamontovy Klyk MAK 207-1-10; 100-110	10, 17	0,02
Profil Lena- Kliff, Kulturen 3301-3310	10, 17	0,02
Kurungnakh, Kulturen 1052 und 1066	4, 10, 22, 28	0,02
Profil Laptev-See, Kulturen S1-S11	-2, 4, 10, 22, 28	0,02-0,2
Kulturen 111, 112, 113	28	0,2

4.6 Most-Probable-Number (MPN) Test

Der Most-Probable-Number Test ist ein statistisches Verfahren zur Quantifizierung von Bakterien in Naturproben mittels Verdünnungsreihen (ALEF, 1991). Für den MPN-Test wurden 3 g Probenmaterial auf 5 ml Mineralmedium beimpft (Zusammensetzung siehe Nährmedien) und mit jedem Schritt der Verdünnung 1:10 in drei Parallelen verdünnt und bei 10°C, 17°C und 22°C im Dunkeln inkubiert. Nach 6-27 Wochen wurden die Verdünnungsreihen ausgewertet. Bei NOB-MPN Reihen wurde überprüft, ob Nitrit im Medium verbraucht wurde, während bei den AOB auf die Bildung von Nitrit als Produkt der Oxidation vom Ammonium getestet wurde. Entsprechend der Umrechnungstabelle konnten so ungefähre Zellzahlen pro Gramm Trockengewicht der Probe ermittelt.

Bodenproben

Für die Anreicherung der NOB aus Böden wurden die beschriebenen Mineralmedien verwendet. Die Kultivierung erfolgte bei 10°C und 17°C.

Sedimentproben aus der Laptev-See

Um nach Möglichkeit die unterschiedlichen Salzgehalte in der Laptev-See zu berücksichtigen, wurden Medien mit einem Seewasseranteil von 70 % und 100 % gewählt. Die Kultivierung erfolgte bei 10°C und 17°C.

4.7 Quantifizierung von Ammonium, Nitrit und Nitrat

Tüpfeltest

Das Wachstum der Bakterienkulturen wurde alle 2-3 Tage mit dem Nitrit-Tüpfeltest qualitativ auf Nitritverbrauch oder Bildung überprüft. Ein Tropfen Tüpfelreagenz wurde auf ein Filterpapier gegeben, mittels Impföse eine kleine Kulturprobe steril entnommen und in das Tüpfelreagenz gegeben. Eine Rotfärbung zeigte die Gegenwart von Nitrit an. Gegebenenfalls wurde mit Teststreifen (Fa. Merck) die Nitratkonzentration gemessen.

Tüpfel-Reagenz zum NO₂⁻-Nachweis

Sulfanilamid	4,0 g
ortho-Phosphorsäure	10 ml
N-(1naphthyl)-ethylendiamin-dihydroxychlorid	0,2 g
MilliQ-Wasser ad 100 ml	

Die Lösung wurde im lichtdichten Behälter bei 4°C gelagert. Um die Stickstoffverbindungen Nitrit, Nitrat und Ammonium genau quantifizieren zu können, wurden Messungen mit der HPLC durchgeführt.

4.7.1 Quantifizierung von Ammonium

Die Quantifizierung wurde nach der Methode von CORBIN (1984) durchgeführt. Diese Methode basiert auf einem indirekten Nachweis der Ammonium-Ionen durch Reaktion mit β -Mercaptoethanol und Phtaldialdehyd zu einem N-substituierten 1-(2-Hydroxyethyl)-Thioisindol.

Bei einer Wellenlänge von 420 nm wird das Derivat in einen angeregten Zustand überführt. Bei Rückkehr des Thioisindols in den Grundzustand kann die Lichtemission bei 470 nm gemessen werden. Die Intensität der Fluoreszenz verhält sich proportional zur Menge der derivatisierten Ammoniumionen. Durch Umrechnung der Emission in mV kann so der Peak dargestellt werden. Die zu messende Probe wurde kurz abzentrifugiert, um Zellen und Schwebeteilchen zu entfernen. Dann wurden 25 μ l des Überstandes in einer Glasampulle mit 475 μ l Derivatisierungsreagenz versetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Es wurde ein Autosampler (Modell 460, Fa. Kontron) genutzt, um 50 μ l der Probe in die HPLC-Trennsäule (125 mm, 4,6 mm, Nucleosil Fa. Bischof) zu injizieren. Die Auftrennung der Probe erfolgte bei einem Durchfluss des Laufmittels von 1 ml pro Minute unter einem durchschnittlichen Druck von ca. 110 bar (HPLC-Pumpe 420, Fa. Kontron). Die Fluoreszenz des angeregten Ammonium-Derivates konnte bei 470 nm mittels eines Fluorimeters (SFM 25, Fa. Kontron) detektiert werden. Die Emissionswerte wurden in Millivolt umgesetzt und in Form eines Peaks dargestellt (Datensystem 450, Fa. Kontron). Mit Hilfe der Retentionszeit wurde der Ammonium-Peak identifiziert und durch Integration die Konzentration errechnet. Nach 15 Proben erfolgte eine neue Eichung des Systems durch die Messung entsprechender Ammoniumstandards.

Derivatisierungsreagenz (OPA)

Phtaldialdehyd	540 mg
Ethanol (abs.)	10 ml
β -Mercaptoethanol	50 μ l
Phosphatpuffer, pH 7,3	0,2 M
MilliQ-Wasser ad 100 ml	

Laufmittel

Phosphatpuffer, 20 mM, pH 7,3	500 ml
Acetonitril	500 ml

4.7.2 Quantifizierung von Nitrit und Nitrat

Die Bestimmung von Nitrit und Nitrat erfolgte durch HPLC Messung nach einer Methode von MEINCKE et al. (1992). Die Methode beruht auf der Ionenpaarchromatographie. Die in der Probe enthaltenen Nitrit- und Nitrationen bilden als Anionen mit dem im Laufmittel gelösten Tetrabutylammonium-Kationen schwach polare Ionenpaare. Diese Ionenpaare treten aufgrund der hydrophoben Eigenschaften der Butylreste mit der hydrophoben stationären Phase der Säule in Wechselwirkung. Bedingt durch die unterschiedliche Affinität zum Säulenmaterial wurden die Nitrit- und Nitrationen nacheinander eluiert. Die Detektion der Nitrit- und Nitrationen erfolgte fotometrisch bei 225 nm. Die Kulturflüssigkeit wurde abzentrifugiert, um Zellen und Schwebeteilchen zu entfernen. Dann wurden 500 µl des Überstandes in eine Glasampulle pipettiert. Von einem Autosampler (460, Fa. Kontron) wurden 50 µl der Probe auf die HPLC-Trennsäule (125 mm, 4,6 mm, Hypersil 125 5 C 18, Fa. Bischof) übertragen. Die Auftrennung der Probe erfolgte bei einem Laufmittelfluss von 1 ml pro Minute und einem durchschnittlichen Druck von 80 bar (HPLC Pumpe 420, Fa. Kontron). Der nachgeschaltete UV-Detektor 430 (Fa. Kontron) ermittelte die Änderung der Absorption bei 225 nm. Das Messsignal (in mV) wurde als Peak dargestellt. Über die Retentionszeiten wurde der Nitrit- und Nitratpeak identifiziert und durch Integration der Peakflächen die jeweiligen Konzentrationen bestimmt (Datensystem D 450, Fa. Kontron). Eine regelmäßige Kalibrierung des Systems erfolgte mit Nitrit-/Nitrat-Standardlösungen.

Laufmittel

Tetrabutylammoniumhydrogensulfat, 5 mM, pH 7,3	90 % v/v
Methanol	10 % v/v

4.8 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Für die elektronenmikroskopische Untersuchung wurden die Bakterien nach SPURR (1969) eingebettet. Die Kultur wurde bei 9.000 Upm für 30 min abzentrifugiert (Zentrifuge: Kontron Hermle Centrikon H 401, Rotor 12.500). Das Pellet wurde mit 2,5 % Glutaraldehyd in 75 mM Cacodylatpuffer (Arsenatpuffer 100 mM, $C_2H_6AsNaO_2$) für 2 Stunden auf Eis fixiert. Nach mehrfachem Waschen der Probe mit Cacodylatpuffer wurde das Pellet in 2 % Agar-Noble in Cacodylatpuffer resuspendiert und in Würfel mit 2 mm Kantenlänge geschnitten. Die Probe wurde über Nacht bei 4°C in 1 % Osmiumtetroxid in Cacodylatpuffer kontrastiert. Nach viermaligen Waschen mit Cacodylatpuffer wurden die Proben mit steigender Acetonkonzentration (15, 39, 50, 70, 90, 100 %) für je 10 min bei 4°C und zweimal für 10 min mit 100 % Aceton bei Raumtemperatur inkubiert (Tabelle 4).

Tabelle 4: Einbettungs-Schema nach Spurr

Spurr/Aceton 100 %	Inkubationszeit [h]
1/3	2
1/1	2
3/1	17
100 % Spurr	2,5
100 % Spurr	6

Die Probe wurde danach in eine Silikonform eingebettet und mit Spurr überschichtet.
Die Polymerisation erfolgte für 24 Stunden bei 70°C.

Spurr Einbettungsgemisch (LVG = Low Viscosity-Gemisch)

VCD (E.R.L. 4206, Vinylcyclohexendioxid)	5,0 g
D.E.R. 736 (Diglycidether)	3,0 g
NSA (Nonenyl-Bersteinsäureanhydrid)	13,0 g
DMAE (S-1, Dimethylaminoethanol)	0,2 g

Zuerst wurde VCD, D.E.R. 736 und NSA gut vermischt und dann unter Rühren DMAE dazugegeben.

Die Ultradünnschnitte wurden mit einem Ultramikrotom (OmU2, Fa.Reichert-Jung) und einem Diamantmesser (Fa. Diatomee) angefertigt. Die 50 bis 70 nm dünnen Schnitte wurden mit Movital (Polyvinylformaldehyd in 0,25 % Chloroform) befilmten Kupfernetzchen (300 mesh) aufgelegt. Mit 5 % Uranylacetat in Methanol (Watson, 1985) und Bleicitrat (Reynolds, 1963) wurde zehn Minuten nachkontrastiert. Dann konnten die Proben mit dem Transmissions-Elektronenmikroskop (Model Leo 906E) untersucht werden.

4.9 Molekularbiologische Untersuchungen

4.9.1 DNA Isolierung und Aufreinigung

Wie DEGRANGE & BARDIN, (1995) bereits feststellten, ist die DNA-Extraktion von chemolithoautotrophen Nitrifikanten aus Bodenmaterial besonders schwierig. Aufgrund der Bindung der DNA-Moleküle an Tonpartikel des Bodens sowie anderen Biomolekülen wurden enorme Verluste bei der Extraktions-Ausbeute festgestellt (ZHOU et al., 1996). Durch den Vergleich der klassischen Phenol-Chloroform Extraktion und modernen Silica-Membran Systemen sowie mechanischen Aufschluss-Verfahren konnte jedoch eine beachtliche Verbesserung der Qualität und Ausbeute extrahierter DNA festgestellt werden (DEGRANGE & BARDIN, 1995; PICARD et al., 1992; TSAI et al., 1992).

Die DNA-Extraktion aus Bodenproben wurde mit dem Soil-Extraction-Kit und dem Powersoil-Extraction-Kit der Firma MoBio laut Anleitung durchgeführt. Hierbei handelt es sich um einen mechanischen Aufschluss mit sogenannten Microbeats, kleinen Kügelchen, die Zellmembranen durch starkes 10-minütiges Whirlmixen aufsprengen. Zusätzlich wird die Zellmembran durch Lysozym destabilisiert. Die Proteine werden ausgefällt und die DNA zusätzlich auf einer Silica-Membran mit Ethanol gereinigt. Es wurden je nach Bodenbeschaffenheit 0,2-0,8 g Probenmaterial eingewogen. Für die Extraktion von Kulturen wurde das Microbial-Extraction Kit der Firma MoBio eingesetzt. Für TGGE-Analysen, bei denen auch semi-quantitativ die Bakteriengemeinschaft in Anreicherungskulturen erfasst werden sollte, wurden einheitlich 15 ml Kulturmedium abzentrifugiert und für die DNA-Extraktion verwendet. Die untersuchten Nitrit oxidierenden Anreicherungskulturen wurden nach fünfmaliger vollständiger Oxidation des im Mineralmedium enthaltenen Nitrits (0,3 mM) abzentrifugiert und die DNA extrahiert.

4.9.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Qualität der PCR-Produkte ist für anschließende Analyse-Techniken wie die TGGE von großer Bedeutung. Wichtig ist es ein komplettes Bild der Eubakteriengemeinschaft zu erhalten und nicht eine bevorzugte Amplifikation einzelner Stämme. Es ist bekannt, dass die PCR-Bedingungen und auch Zusätze wie Rinderserum Albumin (BSA) und DMSO starken Einfluss auf die Produktausbeute, Qualität und Selektivität haben. Der Anteil an Verunreinigungen in der extrahierten DNA-Lösung wurde durch spezielle Extraktionsverfahren reduziert, dennoch muss von einer starken Inhibierung der PCR ausgegangen werden. Im Boden vorkommende biologische Substanzen wie Fulvinsäure, Huminsäure und Tannin sowie auch mineralische Tonpartikel inhibieren die PCR (KREADER, 1996). Um die optimalen Bedingungen zu ermitteln, wurden im Besonderen für das Eubakterien-Primerset, unterschiedliche Annealing-Temperaturen sowie BSA und DMSO als sogenannte Enhancer getestet (NAGAI et al., 1998; ISHII et al., 2001; RALSER et al., 2003). Mittels der Temperatur Gradienten Gelelektrophorese (TGGE) konnten die unterschiedlichen Wirkungen der genannten Parameter evaluiert werden, und die Vielfalt und Qualität des entstandenen Bandenmusters verglichen werden.

Neben Lesefehlern von Taq-Polymerasen (MUYZER et al., 1998, MADIGAN et al., 2001) kann es während einer PCR auch zu einer Bildung von DNA-Chimären (KOPCZYNSKY et al., 1994) und DNA-Heteroduplexmolekülen (JENSEN und STRAUS, 1993) kommen. Diese Probleme der Bildung falscher von der ursprünglichen DNA abweichender PCR-Produkte müssen bei allen Analysen der Amplifikate berücksichtigt werden.

Die Konzentration eingesetzter DNA wurde zuvor über den Vergleich mit dem Mengenstandard im Agarose-Gel oder durch fotometrische Messung der DNA-Lösung bestimmt und entsprechend verdünnt. Für das Eubakterien-spezifische Oligonukleotidprimerset Eub341F+GC und Eub907R (MUYZER & RAMSING, 1995) wurde ein Touch-Down-PCR-Programm gewählt. Durch das schrittweise Herabsetzen der Annealingtemperatur von 60°C auf 53°C wird eine gleichmäßige Amplifikation unterschiedlichster Template-DNA gewährleistet (DON et al., 1991).

Die PCR erfolgte im Personal cycler™ der Firma Biometra im 50 µl Ansatz in einem 0,2 ml PCR-Tube (Fa. Peqlab, Thermotube). In dem PCR-Gefäß wurde PCR-Wasser (Sigma, nuklease- und pyrogenfrei, steril filtriert) vorgelegt und mit dem PCR-Gemisch sowie 0,2-2 µl DNA-Extrakt gemischt. Die Programme, die Magnesiumkonzentration sowie die verwendeten Taq-Polymerasen und Puffer wurden entsprechend der Anwendungen und unterschiedlichen auch neu abgeleiteten Primerpaare angepasst.

In einer Elektrophorese mit einem 2 % Agarosegel wurden die Amplifikate auf Konzentration und Basenzahl überprüft. Das Gel wurde wie zuvor beschrieben angesetzt. Als Längenstandard diente eine DNA-Leiter (PEQLAB, DNA-Ladder 50 bp-1000 bp), mit der die genauen Basenpaarlängen der Amplifikate ermittelt werden konnten. Für die Elektrophorese wurden 1,5 µl PCR-Produkt und 1,5 µl Schwerelösung gemischt. Bei der Verwendung der GoTaq™ Polymerase (Fa. Promega) konnten die PCR-Produkte direkt aufgetragen werden. Nach 60 min bei 68 V war die Auftrennung abgeschlossen und es konnte mit Ethidiumbromid gefärbt werden, um die DNA sichtbar zu machen.

4.9.2.1 Verwendete Primer und Reaktionsbedingungen

Es wurde mit Eubakterien-Primern (Tabelle 5) sowie mit gattungsspezifischen Primern (Tabelle 6) gearbeitet. Die daraus erstellten Primerkombinationen sind in Tabelle 7 zusammengefasst. Das in dieser Arbeit häufig für TGGE-Analysen verwendete Eubakterien-Primerset Eub341F/Eub907R (MUYZER, 1998) amplifizierte in der PCR ein Fragment, welches bei *E. coli* zwischen den Positionen 341 bis 907 des 16S rDNA-Genes liegt. Innerhalb dieses Bereiches ist auch die hypervariable V3-Region des Gens. Für TGGE-Analysen und phylogenetische Stammbaumanalysen ist dieser Bereich von großer Bedeutung. Besonders für die Analysen nahe verwandter Stämme bieten die hypervariablen Bereiche des 16S rRNA Gens wichtige Unterscheidungsmerkmale. Für neu entwickelte Primersets, die zur gattungsspezifischen Detektion eingesetzt werden sollten, musste dies jedoch nicht zwingend berücksichtigt werden.

Tabelle 5: Sequenzen und Bezeichnungen der verwendeten Eubakterien-Primer

Bezeichnung	Sequenz 5' - 3'	Ziel	Literatur
Eub341 F	CCTACGGGAGGCAGCAG	Eubakterien	Muyzer et al. 1998
Eub907 R	CCGTCAATTCTTTGAGTTT	Eubakterien	
Eub907 F	AAACTCAAAGGAATTGAC	Eubakterien	
Eub27 F	AGAGTTTGATC(AC)TGGCTCAG	Eubakterien	Lane, 1991
Eub517 F	CCAGCAGCCGCGGTAAT	Eubakterien	
Eub517 R	ATTACCGCGGCTGCTGG	Eubakterien	
Eub1100 F	CAACGAGCGCAACCC	Eubakterien	
Eub1100 R	GGGTTGCGCTCGTTG	Eubakterien	
Eub1492 R	ACGG(CT)TACCTTGTTACGACTT	Eubakterien	

Tabelle 6: Sequenzen und Bezeichnungen der verwendeten spezifischen Primer und Sonden. Veränderte Primer sind mit einem * gekennzeichnet. Sonden mit sind mit einem + markiert. Verwendete GC-Klammer 5'cgcccgccgcgcccggcgggcgggggcgggggcacgggggg3'

Bezeichnung	Position	Sequenz 5' - 3'	Ziel	Literatur
+Bet42a	42	GCCTTCCCACTTCGTTT	<i>Betaproteobacteria</i>	Mobarry et al. 1996
+NTG840 R	835	CTAAGGAAGTCTCTCCC	Betaproteobakterium ' <i>Candidatus</i> <i>Nitrotoga arctica</i> '	Neu entwickelt
NTG200 F	211	CTCGCGTTTTCGGAGCGG		
Nit3 R	1119	CCTGTGCTCCATGCTCCG	<i>Nitrobacter</i>	Schramm et al. 1998
Nit3 F	1119	CGGAGCATGGAGCACAGG	<i>Nitrobacter</i>	Schramm et al. 1998
Deg R	1372	TTTTTTGAGATTTGCTAG	<i>Nitrobacter</i>	Degrange & Bardin, 1995
*DEG2 R	1370	GGTTTTTTGAGATTTGCTAG GGG	<i>Nitrobacter</i>	Verändert, Ursprung Degrange & Bardin, 1995
Nb1000 R	977	TGCGACCGGTCATGG	<i>Nitrobacter</i>	Mobarry et al. 1996
*Nb1000g F	978	CCATGACCGGTCGCAG	<i>Nitrobacter</i>	Verändert, Ursprung Mobarry et al. 1996
Nsp60-k F	98	CGGGTGAGGAATACATGG	<i>Nitrospira</i>	Neu entwickelt
Nsp60-l F	92	GGCGAACGGGTGAGGAATA CATGGG	<i>Nitrospira</i> , keine marinen	Neu entwickelt
S11-460 F	460	CCTTTGTGAGGAAAGAT	<i>Nitrospira</i> , marine Kultur S11	Neu entwickelt
S11-634 R	634	AGGCGGTTGGGTAAGCCT		
F2-460 F	460	CTTTCATGAGGAAAGATAA	<i>Nitrospira</i> , marine Kultur F2 und andere marine	Neu entwickelt
F2-634 R	634	AGGCGGTTGGGAAAGCCT		
Nsp662 R	664	GGAATCCGCGCTCCTCT	<i>Nitrospira</i>	Hovanec & De Long, 1996
NspnGr F	532	GTAACACGGAGGGGGCG	<i>Nitrospira gracilis</i>	Neu entwickelt
Nspn 347-2 R	1013	GACCCTATTTCTAGGGCT	<i>Nitrospira 347</i>	Neu entwickelt
FN1-55 F	56	CGCCTTTCTTCGGAAAGGT	<i>Nitrococcus mobilis</i>	Neu entwickelt
FN4-210 F	216	ACCGATGGATGAGCCCG	<i>Nitrococcus mobilis</i>	Neu entwickelt
RN5-455 R	463	GTCAAACATCGAGGTAT	<i>Nitrococcus mobilis</i>	Neu entwickelt
RN5-564 R	575	TATTCGACCGCCTACATGC G	<i>Nitrococcus mobilis</i>	Neu entwickelt

NSO190 F	190	GGAGAAAAGCAGGGGATCG	<i>Nitrosomonas</i>	Mobarry et al. 1996 Burrell et al. 2001
NitB R	1220	TTACGTGTGAAGCCCTACC CA	<i>Nitrosomonas</i> und <i>Nitrosospira</i>	Voytek & Ward 1995
NSV443 R	443	CCGTGACCGTTTCGTTCCG	<i>Nitrosospira</i> , <i>Nitrosolobus</i> , <i>Nitrosovibrio</i>	Mobarry et al. 1996
NSCMA R	1015	CCTTCGCCTCTCAGCAAAG	<i>Nitrosococcus</i> <i>oceani</i>	Neu entwickelt
+Arc915	915	GTGCTCCCCGCCAATTCC T	<i>Archaeen</i>	Tay et al. 2004

PCR Reaktionsgemische

Die verwendeten Primerkombinationen und entsprechende Programmabläufe sind in Tabelle 7 zusammengefasst. Für die universellen Eubakterien-Primersets sowie für die spezifischen Primerkombinationen wurde der Reaktionsansatz R1 für Naturproben und R2 für Kulturen entsprechend Tabelle 8 variiert. Bei der Amplifikation von DNA, die aus Naturproben extrahiert wurde, konnten höhere Ausbeuten bei dem Einsatz einer Hotstart-Polymerase (Genecraft, Biothermstar™) erzielt werden. Durch den Hotstart konnte auch die Bindung der Primer für gattungsspezifische Amplifikationen verbessert werden. Für PCR-Produkte gattungsspezifischer Amplifikationen die im Anschluss sequenziert werden sollten, wurde aufgrund der besseren Qualität ebenfalls ein Hotstart in der PCR durchgeführt.

Tabelle 7: Verwendete Primerpaare und entsprechende PCR-Bedingungen. St.1-3 Standardprogramme; HS, Hotstart; TDH, Touchdown Programm mit Hotstart; RA, Reamplifikation

Primerpaar	Ziel	Annealing [°C]	PCR-Programm	MgCl [mM]
Eub341 F-GC, Eub907 R	Eubakterien	(TDH)	(TDH)	4
Eub341 F, Eub907 R	Eubakterien	55	(RA)	4
Alle Eubakterien-Primerkombinationen	Eubakterien	55	(St.1)	4
Eub341 F, Nit3 R	<i>Nitrobacter</i>	58	(St.3), (HS)	3
Nit3 F, Deg2 R	<i>Nitrobacter</i>	56	(HS)	3
Nb1000g F, Deg2 R	<i>Nitrobacter</i>	58	(St.3), (HS)	3
Eub341 F, Eub517 F, NitB R	<i>Nitrobacter</i>	59	(HS)	3
Eub341 F, Nsp662 R	<i>Nitrospira</i>	64,2	(St.3), (HS)	4
S11(F2)-460 F, S11 (F2)-634 R oder Nsp662 R	<i>Nitrospira</i> Kultur S11/F2	64,2	(St.3), (HS)	4
Nsp60F-I F, 662 R	<i>Nitrospira</i> keine marinen	64	(St.3), (HS)	4
FN1-55 F, RN5-564 R	<i>Nitrococcus mobilis</i>	58,5	(HS)	3
NspnGr F, Eub907 R	<i>Nitrospina gracilis</i>	56,2	(HS)	3
Eub341 F, Nspn 347-2 R	<i>Nitrospina 347</i>	57	(HS)	3
NTG200 F, NTG840 R	Betaproteobakterium ' <i>Candidatus Nitrotoga arctica</i> '	58	(St.2), (HS)	3
NSO190 F, NitB R	<i>Nitrosomonas</i>	59	(HS)	3
Eub517 F, NitB R	<i>Nitrosomonas</i> und <i>Nitrospira</i>	58,5	(HS)	3
Eub27 F, NSV443 R	<i>Nitrospira</i> , <i>Nitrosolobus</i> , <i>Nitrosovibrio</i>	59	(HS)	3
EUB 27 F, NSCMA R	<i>Nitrosococcus oceani</i>	57	(HS)	3

In Tabelle 8 sind die verwendeten Reaktionszeiten der PCR dargestellt. Bei einem Hotstart wurde entsprechend den Angaben des Herstellers der erste Kochschritt der Reaktion bei 96°C für 6 min durchgeführt. Extrahierte und aufgereinigte DNA aus den TGGE-Profilen wurde, um PCR-Fehler gering zu halten, nur kurz reamplifiziert. Alle PCR-Läufe endeten mit einer finalen Elongation von 4 min bei 72°C.

Tabelle 8: Programmabläufe für die PCR

Bezeichnung	Kochen	Annealing	Elongation	Zyklen
Standard (St.1)	50 s	60 s	60 s	30
Standard (St.2)	50 s	40 s	60 s	30
Standard (St.3)	40 s	40 s	40 s	30
Touch-Down mit Hotstart (TDH)	6 min, 60 s	60 s	60 s	1-20 Annealing Temp. 60°C minus 0,5°C/Zyklus
				21-30 Annealing Temp. 55°C
Hotstart (HS)	6 min, 50 s	40 s	40 s-60 s	30
Reamplifikation (RA)	40 s	30 s-40 s	40 s-60 s	15-20

Für schwer zu amplifizierende DNA aus Bodenproben, wurde als PCR-Additiv Rinder Serum Albumin (BSA) eingesetzt (200 ng/µl). Durch BSA sollte die Inhibierung durch biologische Substanzen und andere Verunreinigungen minimiert werden. Wie sich am Anfang der Untersuchungen zeigte, erniedrigte der Einsatz von BSA stark die Spezifität der Reaktion. Bei gattungsspezifischen Amplifikationen konnte entsprechend kein BSA zur Verbesserung der Produktausbeute zugegeben werden. Die Nested-PCR bietet den Vorteil einer hohen Produktausbeute mit BSA, ohne unspezifische Amplifikate zu erhalten. In der ersten PCR wurde unter Nutzung von BSA die 16S rDNA aller Proteobakterien stark amplifiziert, in einer weiteren PCR wurde dann ohne Zusatz von BSA spezifisch amplifiziert. Nachdem der erste PCR-Ansatz mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und über ein Spinsäulensystem (Agarose/PCR Extraction-Kit, Fa. Avegene, Taiwan) aufgereinigt wurde, konnten 0,1 µl des PCR-Ansatzes in der zweiten PCR eingesetzt werden. Alternativ wurde das PCR-Produkt der ersten Reaktion direkt über ein Spinsäulensystem aufgereinigt. Aufgrund einer festgestellten Minderung der Produktausbeute bei Verwendung einer GC-Klammer für DGGE/TGGE-Analysen wurden Reamplifikationen der TGGE DNA-Banden mit dem gleichen Primern, jedoch ohne GC-Klammer durchgeführt.

R1: Eubakterien-Primerset für Naturproben

10x PCR-Puffer (Promega)	5,0 µl
dNTP-Mix (2mM/Nukleotid)	6,0 µl
MgCl ₂ -Lösung (25mM)	4,5 µl
Oligonukleotidprimer I (F)	2,0 µl
Oligonukleotidprimer II (R)	2,0 µl
Hot-Start Taq-Polymerase (~5U/µl)	0,25 µl
Proben-DNA	0,2-1,6 µl
PCR-Wasser ad 50 µl	

R2: Eubakterien-Primerset für Kulturen

10x PCR-Puffer (Promega)	5,0 µl
dNTP-Mix (2mM/Nukleotid)	6,0 µl
MgCl ₂ -Lösung (25mM)	4,0 µl
Oligonukleotidprimer I (F)	2,0 µl
Oligonukleotidprimer II (R)	2,0 µl
Taq-Polymerase (~5U/µl)	0,25 µl
Proben-DNA	0,2-1,6 µl
PCR-Wasser ad 50 µl	

Um das amplifizierte DNA-Fragment auf die richtige Länge zu überprüfen, wurde eine Agarose-Gelelektrophorese mit DNA-Leiter (50-1000 bp) als Standard bei 68 V für zwei Stunden durchgeführt.

2.0 % Agarosegel

1xTAE-Puffer	100 ml
Low EEO Agarose (Sigma)	2,0 g

Die Verwendung einer GC-Klammer sollte das Ergebnis der anschließenden DGGE verbessern, indem sie als Hochtemperatur-Schmelzdomäne fungierte (SHEFFIELD et al. 1989, 1992). Die Schmelzeigenschaften der DNA wurden so verändert, dass eine vollständige Auftrennung des Doppelstranges in einzelsträngige, im denaturierenden Gel nicht analysierbare DNA, inhibiert wurde.

Alle Lösungen wurden auf Eis gelagert. In einem sterilen PCR-Tube wurde pyrogen- und nukleasefreies PCR-Wasser vorgelegt und mit dem Reaktionsgemisch und DNA-Extrakt vermengt. Die PCR-Produkte wurden bis zur Weiterverwendung bei 4°C oder -20°C gelagert.

4.9.3 Agarose Gelelektrophorese

Um die Konzentration an extrahierter DNA abschätzen zu können, wurde eine Agarose-Gelelektrophorese mit Mengenstandard durchgeführt. Eine Agarosekonzentration von 0,8 % eignet sich um die genomische DNA im Gel zu separieren, während PCR-Produkte bei einer Agarosekonzentration von 0,8 % die beste Auftrennung zeigten. Die Agarose wurde in 1x TAE-Puffer gelöst, in einem Mikrowellengerät erhitzt und im Wasserbad auf 60°C abgekühlt, um in den horizontalen Gelträger (Biorad, Wide Mini-Subcell) gegossen zu werden. Nach 20 min war das Gel ausgehärtet und der 1x TAE-Puffer konnten in die Pufferkammer gegeben werden. Nach Entnahme des Kammes konnten die Geltaschen mit den Proben beladen werden. Bei jeder Elektrophorese diente DNA-Standard (Peqlab, peqGold DNA-Sizer III) als Mengen-Referenz. Über eine Dauer von 30-60 min wurden die DNA-Moleküle der Elektrophorese bei 68-85 V ausgesetzt (Biorad, 300xi).

Um die DNA-Banden sichtbar zu machen, folgte eine 15-minütige Inkubation in einer Ethidiumbromid-Färbewanne. Nachdem das Gel kurz in MilliQ-Wasser gespült worden war, konnte es auf dem Transilluminator-Tisch (Phase, TFX 35M) betrachtet und zur Dokumentation fotografiert werden (Sony, Video Graphic Printer VP-890-CE).

Anhand eines optischen Vergleiches der Bandenintensitäten konnte abgeschätzt werden, welches Volumen der jeweiligen DNA-Lösungen für die anschließende PCR eingesetzt werden musste.

25x TAE-Puffer für Agarose-Gele und DGGE

Tris-(hydroxy)-aminomethan	121,0 g
EDTA (Titriplex III)	9,3 g
Essigsäure	28,55 ml
MilliQ-Wasser ad 1000 ml	

pH 7,8 mit Essigsäure einstellen.

10x TBE-Puffer für TGGE

Tris-(hydroxy)-aminomethan	121,0 g
EDTA (Titriplex III)	9,3 g
Essigsäure	28,55 ml
MilliQ-Wasser ad 1000 ml	

pH 7,8 mit Essigsäure einstellen.

Die DNA-Extrakte wurden im 0,8 % Agarosegel bei 68 V eine Stunde aufgetrennt. Somit konnte die DNA-Konzentration in der Lösung anhand des Vergleiches mit einem DNA-Mengenstandard ermittelt werden.

0,8 % Agarosegel

1x TAE-Puffer	100 ml
Low EEO Agarose	0,80 g

Schwerelösung für Agarosegele

Bromphenolblau	0,25 g
Saccharose	40,0 g
MilliQ-Wasser ad 100 ml	

Ethidiumbromidfärbelösung

Ethidiumbromid	300 µg
MilliQ-Wasser ad 100 ml	

Die Färbelösung wurde im lichtdichten Behälter bei Raumtemperatur gelagert.

4.9.4 Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (DGGE)

Durch diese Elektrophorese-Technik ist es möglich, die Schmelzeigenschaften der 16S rDNA-Teilamplifikate von verschiedenen untersuchten Bakterien zu vergleichen, wodurch Hinweise auf die Sequenzähnlichkeit der untersuchten 16S rDNA-Teilamplifikate gewonnen werden (TESKE et al., 1994; MUYZER et al., 1998). Die denaturierende Wirkung und damit das Öffnen der Wasserstoffbrücken zwischen den beiden Einzelsträngen des DNA-Moleküls hängt primär von dem Mengenverhältnis der dreifachen Wasserstoffbindung zwischen Guanin und Cytosin und der zweifachen Adenosin-Thymin Wasserstoffbindung ab. Das Schmelzverhalten des gesamten doppelsträngigen DNA-Moleküls ist jedoch auch von übergeordneten Schmelzdomänen abhängig. Bei der Betrachtung von Schmelzdomänen wird der gegenseitige Einfluss der Basen eines größeren Bereiches betrachtet, denn die Denaturierung zweier Basen ist im starken Maße auch von ferner gelegenen Basen abhängig.

Anhand des sequenzspezifischen Schmelzverhaltens von 16S rDNA-Fragmenten im denaturierenden Gel kann die Diversität von Bakterienpopulationen untersucht werden. Das Schmelzverhalten der amplifizierten DNA-Fragmente ist entsprechend der Variation in der Sequenz verschieden. Um einen Hinweis auf den zu wählenden Harnstoff/Formamid-Gehalt zu bekommen, ist es möglich, ein Perpendikulargel anzufertigen (MUYZER et al. 1998). Alternativ wurde über eine Internetdatenbank (NCBI-Genbank, www.ncbi.nlm.nih.gov) eine Computeranalyse angefertigt. In der Datenbank sind alle veröffentlichten 16S rDNA-Sequenzen von beschriebenen Bakterienstämmen gespeichert. So konnte der GC-Gehalt der in Reinkultur vorliegenden Arten der Nitrit oxidierenden Bakterien als vergleichende Größe für die Schmelzeigenschaften der DNA-Fragmente herangezogen werden.

Beispielhaft wird die Ermittlung des GC-Gehaltes per Computerdatenbank an der Reinkultur *Nitrobacter hamburgensis* (AC-Nr. L11663) dargestellt. Die mit dem Eubakterien-Primerset amplifizierte 598 bp lange Teilsequenz von *Nitrobacter hamburgensis* liegt bei *E. coli* zwischen den Positionen 341 bis 907 und lautet:

```
5'- cgcccgccgcgcgcggcgggcgggcgggggcagggggcctacgggagggcagcagtggggaatatt
ggacaatgggcgaaagcctgatccagccatgccgcgtgagtgatgaaggccctaggggtgaaagctctttgtcgggaagataatgacg
gtaccgcaagaataagccccggctaactcgtgccagcagccgcggaatacgaaggggctagcgttgctcggaaactcactggcgtaaa
gggtgcgtaggcgatcttaagtcaggggtgaaatcctggagctcaactccagaactgccttgatactgaaggcttgagttcgggagaggt
gagtggaactgcgagtgtagaggtgaaattcgtagatattcgcaagaacaccagtggcgaaggcggctactggcccgatactgacgctg
aggcacgaaagcgtggggagcaaacaggattagataccctggtagtcacgcgtaaacgatgaatgccagccgtagtggggttactcac
tagtggcgcagctaacgcttaagcattccgcctggggagtagcggtcgcaagattaaaactcaaaggaattgac- 3'
```

598bp, GC-Gehalt 56,52 %

Die Ansatzstellen der Primer wurden unterstrichen. Die angefügte 40 bp GC-Klammer ist kursiv dargestellt. Anhand des Computer-Programms (SeqQC, Version 2.1) konnte die Anzahl der Basen sowie der GC-Anteil der 16S rDNA-Fragmente bestimmt und verglichen werden. Ein höherer GC-Gehalt bedingt eine stärkere Bindungskraft zwischen den Basen und erhöht den Schmelzwert der DNA, so dass sie verhältnismäßig spät denaturiert. In der DGGE-Analyse kann der denaturierende Harnstoff/Formamid-Gradient entsprechend dem berechneten GC-Gehalt angepasst werden.

Für die Durchführung der DGGE wurde eine vertikale Pufferkammer (Biorad, Protean II) in einem 10 Liter Wasserbad installiert. Die verwendeten Glasplatten, Spacer und der Gelkamm (Biorad, 25 Taschen 1,5 mm) der Anlage wurden vor Versuchsbeginn mit Ethanol gereinigt. Die auf Eis gelagerten Greiner-Röhrchen mit den beiden vorgelegten Acrylamid-Lösungen wurden nach Zugabe von 50 µl APS und 10 µl TEMED in den Gradienten-Mischer gegeben. Nachdem der Gradient über einen Schlauch mit aufgesetzter Injektionsnadel zwischen die Glasplatten eingelaufen war, konnten 10 ml Sammelgel mit 30 µl APS und 15 µl TEMED vermengt und vorsichtig über das noch flüssige Trenngel geschichtet werden. Nach 120 min bei Raumtemperatur war das Gel auspolymerisiert. Um ein Einstürzen der fragilen Gel-Taschen beim Entfernen des Gelkammes zu verhindern, wurde 1x TAE-Puffer am oberen Rand zwischen die Glasplatten pipettiert.

Aus dem Vergleich der Bandenintensität bei der Überprüfung der PCR-Produkte im Agarose-Gel (siehe Kapitel 3.4.1) konnte abgeschätzt werden, in welchen Volumina die einzelnen Proben in der DGGE aufzutragen waren. So konnte eine homogene Bandenintensität verschiedener Proben in der DGGE erreicht werden. Es wurden je nach

Ertrag der PCR 4-25 µl PCR-Produkt eingesetzt und im Verhältnis 1:2 mit 2x Ladepuffer vermengt. Mit Hilfe von Gel-Ladespitzen (Roth) konnte nun die Probe aufgetragen werden. Leere Geltaschen wurden mit 25 µl Ladepuffer (1x konz.) gefüllt, um eine gleichmäßige Verteilung der Ionenkonzentration über das gesamte Gel zu gewährleisten. Das mit den Proben beladene Gel wurde nun langsam in die bereits auf 60°C temperierte Pufferkammer eingesetzt. Nun konnte die Spannungsquelle (Biorad, 300xi) angeschlossen werden. Um ein Ausspülen der Proben zu verhindern, wurde die Elektrophorese 10 min bei 200 V durchgeführt. Nachdem die DNA-Moleküle in das Gel eingelaufen waren, erfolgte eine Absenkung der Spannung auf 100 V und eine peristaltische Pumpe (Masterflex) wurde zur Durchmischung des Puffers zugeschaltet. Die angelegte Spannung von 100 V wurde über einen Zeitraum von 18 h konstant gehalten.

Nach Beendigung der Gelelektrophorese konnte die obere Glasplatte unter Verwendung von Aqua deion. vorsichtig entfernt werden. Um ein Einreißen des Geles zu vermeiden, wurden überstehende Taschenelemente abgetrennt. Das Gel konnte nun zur Anfärbung der Banden im Ethidiumbromid-Färbebad 20-30 min inkubiert werden. Nach kurzem Schwenken in einem Aqua deion.-Bad konnte das Gel zur Betrachtung und Fotografie auf den Transilluminatortisch gebracht werden.

Der bei der DGGE-Analyse verwendete denaturierende Harnstoff-Formamid-Gradient wurde ausgehend von zwei unterschiedlich konzentrierten Stammlösungen angefertigt. So konnte der Gradient durch Veränderung des Mischungsverhältnisses variiert werden.

Aus den Stammlösungen wurde ein Ansatz mit einem 40 % Harnstoff-Formamid-Gehalt (Lösung A) und ein Ansatz mit 70 % Harnstoff-Formamid-Gehalt (Lösung B) hergestellt. Entsprechend der untersuchten Proben wurde die Harnstoff/Formamid Konzentration durch ein anderes Mischungsverhältnis der Lösungen A und B im Verlauf der Untersuchungen variiert.

Stammlösung 1 (Acrylamidlösung mit 0 % Harnstoff-Formamid):

40 % Acrylamidlösung (Biorad, 37,5 AA : 1 BIS)	15 ml
1x TAE-Puffer	85 ml

Stammlösung 2 (Acrylamidlösung mit 100 % Harnstoff-Formamid):

40 % Acrylamidlösung (Biorad, 37,5 AA : 1 BIS)	15 ml
1x TAE-Puffer	35 ml
Formamid	40 ml
Harnstoff	42 g

Lösung A 40 % Harnstoff-Formamid-Gehalt

12,6 ml Stammlösung 1
8,4 ml Stammlösung 2

Lösung B 70 % Harnstoff-Formamid-Gehalt

6,3 ml Stammlösung 1
14,7 ml Stammlösung 2

Das Mischungsverhältnis für Stammlösung 1 und 2 lässt sich anhand der standardisierten Formel nach MUYZER et al. (1998) berechnen:

$$(100 - X) \cdot V / 100 + X \cdot V / 100 = V_{\text{Stammlös.1}} + V_{\text{Stammlös.2}} \quad (1:1) = V_{X\%}$$

Dabei gibt X als Platzhalter den minimalen bzw. maximalen Wert des einzustellenden Gradienten in Prozent an. Variabel ist auch das Volumen des Geles, V bezeichnet die Hälfte des gesamten Gelvolumens.

Das Gelvolumen betrug insgesamt 42 ml. Für einen Gradienten mit 40-70 % Harnstoff-Formamid-Anteil wurde je ein 21 ml Ansatz mit 40 % (12,6 ml Stammlösung 1 + 8,4 ml Stammlösung 2) und 70 % Harnstoff-Formamid-Anteil (6,3 ml Stammlösung 1 + 14,7 ml Stammlösung 2) im Greiner-Röhrchen vorgelegt. Mit dem Gradientenmischer (Fa. Biorad, Gradient-mixer 2) konnte so ein linearer Harnstoff-Formamid-Gradient gegossen werden. Zusätzlich wurden als Sammelgel 10 ml einer Acrylamidlösung ohne denaturierenden Harnstoff- und Formamid-Anteil aus der Stammlösung 1 entnommen. Die auf diese Weise angefertigten Lösungen waren 3 Wochen bei 4°C lagerungsfähig. Ausgefallener Harnstoff konnte durch Erwärmung und leichtes Rühren wieder in Lösung gebracht werden. Alle Lösungen wurden vor dem Gießen 10 Minuten entgast.

Die Polymerisation der Gele erfolgte nach Zugabe der Starterreagenzien Ammoniumpersulfat (APS) und N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED). Bei Raumtemperatur war das Gel nach zwei Stunden auspolymerisiert.

Ammoniumpersulfat (APS)

Ammoniumpersulfat (Serva)	1,00 g
MilliQ-Wasser	10,00 ml

Die Lösung wurde aliquotiert und bei -20°C bis zu 2 Wochen gelagert. TEMED wurde gebrauchsfertig von der Fa. Biorad bezogen und bei Raumtemperatur gelagert. Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit DGGE-Ladepuffer vermengt.

DGGE-Ladepuffer (1x konzentriert)

Bromphenolblau	0,05 g
Saccharose	40,00 g
Na-EDTA (Titriplex III)	2,92 g
Natriumdodecylsulfat	0,50 g
MilliQ-Wasser ad 100 ml	

Der Ladepuffer wurde in einfacher und doppelter Konzentration angesetzt und bei -20°C in Aliquots gelagert.

4.9.5 Temperatur Gradienten Gelelektrophorese (TGGE)

Die TGGE beruht auf dem gleichen Prinzip der teilweisen Denaturierung der DNA wie bei der DGGE. Der Effekt der Denaturierung wird ebenso durch die Zugabe von Harnstoff und Formamid im Acrylamidgel erreicht, jedoch nicht wie bei der DGGE durch einen chemischen Gradienten bei konstanten 59-60°C, sondern durch einen Mikroprozessor gesteuerten Temperaturgradienten. Die drei Faktoren Harnstoff, Formamid und Temperatur sind demnach gleich, jedoch ist das Anlegen eines Temperaturgradienten genauer und vor allem reproduzierbarer als ein, mit einem Gradientenmischer erzeugter, chemischer Gradient im Gel. Durch die Zugabe der Denaturantien im Gel wird das Aufschmelzen der DNA begünstigt, so dass die maximale Temperatur im Gradienten niedriger gewählt werden kann. Dies ist notwendig, da zu hohe Temperaturen über 75°C das Gel, welches nicht im Puffer gelagert ist, schnell austrocknen und unbrauchbar werden lassen.

Für die TGGE wurde das Gerät TGGE MAXI von der Firma Biometra benutzt. Durch Verwendung des Computerprogrammes MELT konnte vor der Elektrophorese das Schmelzverhalten des PCR Produktes analysiert werden. Auf diese Weise ist eine schnelle Näherung der optimalen Laufbedingungen gewährleistet. Zusätzlich wurden auch Perpendikularele angefertigt, um den optimalen Temperatur Gradienten zu bestimmen. Die Durchführung der Elektrophorese wurde entsprechend der Anleitung durchgeführt, wobei statt eines TAE-Puffers ein TBE-Puffer verwendet wurde. Die Färbung der DNA im Gel wurde mit Ethidium-Bromid durchgeführt, da hier bessere Ergebnisse bei anschließenden Sequenzierungen erreicht wurden. Hierzu musste das Gel entsprechend von der Trägerfolie gelöst werden. Die Dokumentation der Gele wurde entsprechend der DGGE durchgeführt.

Die Laufzeit betrug bei komplexen Populationsanalysen aufgrund der unbekannt und sehr unterschiedlichen Laufverhalten der PCR Produkte 18 Stunden. Um einen möglichst großen Bereich abzudecken, wurde ein Temperatur Gradient von 40°C-72°C gewählt. Bei

bekanntem Laufverhalten der Proben oder sehr kurzen PCR Produkten konnte die Laufzeit auf bis zu drei Stunden verkürzt und der Temperatur Gradient entsprechend angepasst werden. Je größer die Spanne zwischen minimaler Temperatur, also am Anfang des Elektrophorese-Tisches und maximaler Temperatur ist, desto schlechter ist die Auftrennung nahegelegener Banden. In der folgenden Tabelle sind die Elektrophorese Parameter, der mit unterschiedlichen Primern amplifizierten PCR Produkte dargestellt (Tabelle 9). Da sich das Laufverhalten der marinen Stämme auch bei Verwendung des gleichen Primerpaares signifikant von dem der terrestrischen und limnischen unterschied, wurden die Laufbedingungen entsprechend variiert.

Tabelle 9: Elektrophorese Bedingungen für die TGGE

Primerpaar	Temperaturgradient [°C]	Laufzeit [h]	Spannung [V]
Eub357 F, Eub907 R	40-72	18	115
Eub357 F, Nsp662 R terrestrisch und limnisch	45-64	3 oder 18	300 oder 115
Eub357 F, Nsp662 R marin	42-74	3 oder 18	300 oder 115
Nit3 F, Deg R	42-69	5 oder 18	300 oder 115

Zusammensetzung des Acrylamidgels

Harnstoff	22 g
Acrylamidlösung 35:1	10 ml
Formamid (40 %)	10 ml
TBE-Puffer (10-fach)	7,5 ml
Glycerol (40 %)	2,5 ml
MilliQ-Wasser	5,2 ml

Die fertige Lösung wurde entgast, mit 100 µl TEMED und 65 µl APS-Lösung versetzt und über eine Spritze mit langer Kanüle zwischen die präparierten Glasplatten gegeben.

TBE Tankpuffer (10-fach)

Borsäure	40 g
Tris	12,5 g
EDTA	62 g
MilliQ-Wasser ad 1000ml	

Ladepuffer

Bromphenol Blau	15 mg
EDTA	2 g
TBE(10-fach)	15 ml
MilliQ-Wasser ad 100 ml	

Die PCR-Produkte wurden im Verhältnis 5:1 mit Ladepuffer versetzt und aufgetragen. Das maximale Volumen betrug 7,5 µl. Wenn nötig, wurden die PCR-Produkte über das MoBio PCR-Kit aufgereinigt und aufkonzentriert.

4.9.6 16S rDNA Klonierung und Sequenzierung

Die Amplifikate (3 µl) wurden in einem Ligationsansatz mit 1 µl T4 Ligase (1 U/µl), 10 fach Puffer, 1 µl pGEM-T Vektor (50 ng) (Fa. Promega, Germany) und 4 µl PCR-Wasser versetzt. Die Ligation wurde bei 4°C für 14 Stunden durchgeführt. 1 µl Ligationsansatz wurde zu den kompetenten *E.coli* Zellen (50 µl, auf Eis gelagert) hinzugegeben und 30 min inkubiert. Es folgte der Hitzeschock bei 42°C für 30 s, bevor die Zellen erneut 2 min auf Eis gelagert wurden. Zu dem Ansatz wurden 20 µl SOB-Medium gegeben. 20 µl des Ansatzes wurden auf einer LB/Amp-Platte ausgestrichen und bei 36°C für 14 Stunden inkubiert. Die bei 4°C gelagerte Platte konnte nun auf positive Klone untersucht werden. Die ausgewählten Kolonien wurden auf 4 ml LB/amp Medium bei 36°C schüttelnd für 12 Stunden inkubiert. Mit Hilfe der Vektoren Primer SP6 und T7 konnte das Insert amplifiziert werden. Mit Hilfe der Eubakterien-Primer (27 F, 341 F/R, 517 F/R, 907 F/R, 1100 F/R, 1492 R) konnte das nahezu komplette 16S rRNA Gen sequenziert werden.

SOB-Medium

Bacto-Trypton	20 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	0,5 g
MilliQ-Wasser ad 1000 ml	
pH 7,0	

LB/amp-Medium

Bacto-Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
Ampicillin	100 mg
MilliQ-Wasser ad 1000 ml	
pH 7,0	

LB/amp-Agarplatten

Bacto-Trypton	1,0 g
Hefeextrakt	0,5 g
NaCl	1,0 g
Agar	1,5 g
Ampicillin	15 mg
IPTG	0,4 mg
X-Gal	50 mg
MilliQ-Wasser ad 100 ml	
pH 7,0	

Bei SOB und LB-Medien wurden Ampicillin, IPTG und X-Gal erst nach dem autoklavieren steril filtriert hinzugegeben.

4.9.7 16S rRNA-Gen Sequenzvergleiche (Alignment)

Für das Alignment wurden bekannte Sequenzen aus der Internet-Datenbank NCBI.net mit den neu erhaltenen Sequenzen verglichen und in einem PC-Programm (Bioedit, V.2.3) angeordnet, so dass sich homologe oder identische Basen an der gleichen Position befanden. Für diesen Zweck wurde auch das ARB-Software-Paket (LUDWIG et al., 2003, <http://www.arb-home.de>) verwendet. Es enthält Programme (ARB-EDIT), die das Alignment automatisch berechnen. Mit Hilfe der Internetdatenbank (NCBI-Genbank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) und dem 16S Ribosomal Database Project II (RDP-II; <http://rdp.cme.msu.edu/index.js>) (COLE et al., 2007) konnten erhaltene Sequenzen zugeordnet werden. Um mögliche DNA-Chimären, die während der Multitemplate-PCR entstehen können ausfindig zu machen, wurden die Funktion „ChimeraCheck“ des RDP-II Servers (<http://www.rdp.cme.msu.edu/cgi/chimera.cgi>) genutzt.

4.9.8 Stammbauberechnung

Die phylogenetischen 16S rRNA-Analysen wurden anhand der distanzbasierenden, Neighbor-Joining (NJ) und merkmalsbasierenden Maximum-Parsimony und Maximum-Likelihood Verfahren berechnet (KNOOP & MÜLLER, 2006).

Von den Clustering-Algorithmen die keine molekulare Uhr berücksichtigen zählt Neighbor-Joining (SAITOU et al., 1987) zu den am häufigsten verwendeten. Es ist ein schnelles Verfahren um einen Minimum-Evolution-Baum zu erhalten. Voraussetzung ist, dass die Distanzmatrix die tatsächlichen evolutiven Distanzen wiedergibt. Bei der Neighbor-Joining Methode werden Baumtopologien als optimal bewertet, wenn die Abstände der Matrix am besten mit den jeweiligen Astlängen übereinstimmen. Um stochastische Fehler gering zu halten, wurde das Bootstrap-Verfahren angewandt. Hierzu wurden 1000 mögliche Bäume

berechnet und die prozentualen Wahrscheinlichkeiten der Äste (größer als 50 %) im Bootstrap-Baum zusammengefasst.

Maximum-Parsimony-Verfahren folgen dem Prinzip, dass die kleinste Anzahl an Merkmalsübergängen als optimal gilt. Im Gegensatz zu Distanz-Matrix Methoden werden hier die eigentlichen Sequenzdaten bewertet. Das Maximum-Parsimony-Verfahren sucht nach Baum-Topologien mit einer minimalen Gesamt-Baum-Länge und der geringst möglichen Anzahl an Mutationen.

Bei dem Maximum-Likelihood-Verfahren werden verschiedene Modelle zur Sequenzevolution genutzt. Parameter wie das Verhältnis von Transversion zu Transition, der Konservierungsgrad an bestimmten Positionen oder die Wahrscheinlichkeit für Konservierung im Gegensatz zur Mutation werden berücksichtigt. Wie bei Maximum-Parsimony-Verfahren werden diskrete Merkmale untersucht und nicht - wie bei den Distanzmethoden - ermittelte Matrizen.

4.9.9 Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung (FISH)

Die *in-situ* Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden wurde mit der 16S rRNA Sonde NSP662 für *Nitrospira moscoviensis* (JURETSCHKO et al., 1998) durchgeführt.

PBS-Puffer

NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	1,44 g
MilliQ-Wasser ad 100 ml	
pH 7,5	

4 % Formaldehydlösung

PBS-Puffer (60°C)	25 ml
Paraformaldehyd	1 g
1 M NaOH	20 µl
pH-Wert 7,5	

Hybridisierungspuffer

5 M NaCl	360 µl
1 M Tris/HCl, pH 7,2	40 µl
20 % Formamid	400 µl
10 % SDS	2 µl
MilliQ-Wasser ad 2 ml	

Waschpuffer

5 M NaCl	2150 μ l
1 M tris/0,25 M EDTA, pH7,2	1000 μ l
10 % SDS	50 μ l
MilliQ-Wasser ad 50 ml	

Die Zellen aus der Bakterienkultur wurden 10 min abzentrifugiert und in 50 μ l 2 % NaCl-Lösung resuspendiert. Die Suspension wurde im Verhältnis 1:3 mit 4 % Formaldehyd versetzt und 1 h auf Eis fixiert. Nach dem Abzentrifugieren wurden die Zellen mit PBS-Puffer durch erneute Zentrifugation gewaschen. Zuletzt wurden die Bakterien mit je 100 μ l PBS und -20°C kaltem Ethanol versetzt und 18 h bei -20°C gelagert.

Die fixierten Bakterienzellen wurden auf einen Objektträger mit sechs Reaktionsfeldern gegeben und in einer Ethanolreihe dehydriert. Es wurden anschließend 8 μ l Hybridisierungspuffer auf die Proben pipettiert und 1 μ l Oligo-Nukleotidsonden-Lösung darin suspendiert. Zur Hybridisierung wurden die Objektträger in 20 ml PS-Röhrchen mit feuchtem Labor-Papier in einer Hybridisierungskammer bei 46°C für 1,5 h inkubiert. Durch Zugabe von 50 ml Waschpuffer in das PS-Röhrchen wurden die Objektträger 20 min im Wasserbad bei 48°C gewaschen, um das Formamid und die nicht gebundenen Sonden zu entfernen.

5 Ergebnisse

5.1 Quantifizierung von AOB und NOB anhand des MPN-Tests

Mittels der MPN-Technik wurde ein Überblick über die Quantität der nitrifizierenden Bakterien in den permafrostbeeinflussten Gebieten Sibiriens erhalten. Bodenproben sowie die Sedimente der Lena wurden bei 10°C inkubiert. Die Bakterien in den marinen Verdünnungsreihen wurden bei 10°C und 17°C angezogen. Aufgrund des langsamen Wachstums der Bakterien wurden die MPN-Reihen erst nach 6-27 Wochen ausgewertet. Bei MPN-Reihen von NOB wurde überprüft, ob Nitrit im Medium verbraucht wurde, während bei den AOB auf die Bildung von Nitrit getestet wurde. Entsprechend der Umrechnungstabelle konnten so ungefähre Zellzahlen pro Gramm Trockengewicht in der Probe ermittelt werden. Hierbei muss der methodische Fehler, der bei der MPN-Verdünnungstechnik von den häufig in Mikrokolonien vorliegenden Bakterien entsteht, berücksichtigt werden. Es ist bekannt, dass die realen *in-situ* Zellzahlen um den Faktor 100-1000 höher sein können.

5.1.1 Samoylov; Kliff (Proben 3301-3310)

In allen Proben des Profils konnten Nitrifikanten detektiert werden (Tabelle 10). Aufgrund des langsamen Wachstums bei der Inkubationstemperatur von 10°C wurde der Test auf 23 Wochen erweitert. Für die AOB konnten signifikant unterschiedliche Zellzahlen für die einzelnen Proben ermittelt werden, sie variierten zwischen $1,2 \cdot 10^1$ bis $1,9 \cdot 10^4$ Zellen/g TG.

Die höchsten Zellzahlen nitrifizierender Bakterien wurden im untersten Bereich der Steilküste gemessen (Probe 3310). Die ermittelten Zellzahlen pro Gramm Trockengewicht der NOB lagen bei $2,7 \cdot 10^2$ bis $7,3 \cdot 10^3$. Es bleibt zu berücksichtigen, dass alle Proben nur wenige Zentimeter (15-30 cm) unter der Oberfläche genommen wurden. Die angegebenen Tiefen beziehen sich auf die Geländeoberfläche der abfallenden Steilküste.

Tabelle 10: Kliff-Samoylov Tiefenprofil. Zellzahlen von AOB und NOB; n.n. nicht nachweisbar

Probe	Tiefe unter der Geländeoberfläche [m]	AOB [Zellen/g TG]	NOB [Zellen/g TG]
3301	0,8 - 1,0	$1,2 \cdot 10^1$	n.n.
3302	1,4 - 1,5	$1,3 \cdot 10^3$	$2,3 \cdot 10^3$
3303	1,9 - 2,0	$1,5 \cdot 10^1$	n.n.
3304	2,4 - 2,5	$4,6 \cdot 10^1$	$2,7 \cdot 10^2$
3305	2,9 - 3,0	$4,2 \cdot 10^3$	$2,0 \cdot 10^3$
3306	3,5 - 3,6	$9,0 \cdot 10^2$	$3,8 \cdot 10^3$
3307	3,9 - 4,0	$2,7 \cdot 10^1$	$5,7 \cdot 10^3$
3308	4,5 - 4,6	$2,0 \cdot 10^2$	$2,1 \cdot 10^3$
3309	5,0 - 5,1	n.n.	$3,0 \cdot 10^2$
3310	5,5 - 5,6	$1,9 \cdot 10^4$	$7,3 \cdot 10^3$

5.1.2 Samoylov; Polygonstruktur P1 (Proben W1-3, H1-3, Z1-3)

Obwohl für die Proben dieses Profils die Inkubation des MPN-Tests auf 17 Wochen angelegt wurde, waren die ermittelten Zellzahlen des Bodenprofils sehr niedrig und teils mit der MPN-Methode nicht nachweisbar. Die höchste Zellzahl für AOB konnte in der Kultur Hang2 (6-11 cm) mit $5,1 \cdot 10^2$ Zellen/g TG ermittelt werden (Tabelle 11). NOB konnten hingegen in lediglich drei der neun Proben in sehr geringen Zellzahlen nachgewiesen werden. Es muss bedacht werden, dass diese Proben gefroren von Sibirien nach Deutschland transportiert wurden und daher andere Voraussetzungen galten wie für die Proben 3301-3310 aus Samoylov.

Tabelle 11: Samoylov Polygon-Profil P1. Zellzahlen von AOB und NOB, n.n. nicht nachweisbar

Probe	Tiefe [cm]	AOB [Zellen/g TG]	NOB [Zellen/g TG]
Wall1	0-5	$5,0 \cdot 10^2$	$4,3 \cdot 10^2$
Wall2	8,5-13,5	$2,2 \cdot 10^1$	n.n.
Wall3	17-22	$1,1 \cdot 10^1$	n.n.
Hang1	0-5	$6,9 \cdot 10^1$	$1,2 \cdot 10^1$
Hang2	6-11	$5,1 \cdot 10^2$	$2,3 \cdot 10^2$
Hang3	12-17	$1,0 \cdot 10^2$	n.n.
Zentrum1	0-5	$2,6 \cdot 10^1$	n.n.
Zentrum2	12-17	n.n.	n.n.
Zentrum3	24-29	$1,8 \cdot 10^1$	n.n.

5.1.3 Mamontovy Klyk (Proben MAK 207-1 bis MAK 207-10)

Die ermittelten Zellzahlen der nitrifizierenden Bakterien im Thermoerosionstal aus Mamontovy Klyk (Tabelle 12) fielen ebenfalls sehr niedrig aus. Die Ergebnisse zeigen, dass in der Struktur des Thermoerosionstals, wie zuvor im Polygon aus Samoylov mehr nitrifizierende Bakterien im Hangbereich des Polygons zu finden waren. Es muss wiederum bedacht werden, dass diese Proben im gefrorenen Zustand von Sibirien nach Deutschland transportiert wurden.

Tabelle 12: Polygonprofil aus Mamontovy Klyk. Zellzahlen von AOB und NOB. n.n. nicht nachweisbar. Probennahme August 2004

Probe [Tiefe 0-5 cm]	AOB [Zellen/g TG]	NOB [Zellen/g TG]
MAK 207-1 Wall	$4,2 \cdot 10^2$	$4,2 \cdot 10^1$
MAK 207-2 Wall	$9,4 \cdot 10^2$	$5,2 \cdot 10^1$
MAK 207-3 Wall	$2,0 \cdot 10^2$	n.n.
MAK 207-4 Hang	n.n.	n.n.
MAK 207-5 Hang	$1,5 \cdot 10^3$	$6,5 \cdot 10^2$
MAK 207-6 Hang	$3,6 \cdot 10^3$	$7,1 \cdot 10^2$
MAK 207-7 Zentrum	$9,4 \cdot 10^2$	$2,1 \cdot 10^2$
MAK 207-8 Zentrum	$1,4 \cdot 10^2$	n.n.
MAK 207-9 Zentrum	$1,5 \cdot 10^2$	$6,5 \cdot 10^1$

5.1.4 Sedimente des Lena-Flusses

In den Sedimenten der Lena konnten Zellzahlen von $4,8 \cdot 10^3$ Zellen/g TG für AOB und $5,1 \cdot 10^3$ Zellen/g TG für NOB ermittelt werden.

5.1.5 Sedimente der Laptev-See

Die Kultivierung der marinen Nitrifikanten für den MPN-Test erfolgte bei 10°C und 17°C für 22 Wochen. Um nach Möglichkeit die unterschiedlichen Salzgehalte in der Laptev-See zu berücksichtigen, wurden Medien mit einem Seewasseranteil von 70 % und 100 % gewählt. Um die Ergebnisse zu verfestigen, wurde in zwei aufeinander folgenden Jahren eine Beprobung durchgeführt. Es konnten in fast allen Sedimentproben NOB und AOB angereichert werden. Die Zellzahlen der AOB variierten zwischen 100 und $1,0 \cdot 10^2$ Zellen/g Trockengewicht. Für beide Gruppen der Nitrifikanten konnten im Durchschnitt sehr ähnliche Zellzahlen ermittelt werden. Die Zellzahlen sind bei einer Kultivierungs-Temperatur von 10°C höher ausgefallen als bei 17°C (Tabelle 13; Tabelle 14). Wie aus den Ergebnissen zu entnehmen ist, hatte der unterschiedliche Salzgehalt keinen Einfluss auf die ermittelten Zellzahlen.

Tabelle 13: Zellzahlbestimmung von AOB aus Sedimenten der Laptev-See mittels MPN-Technik. Zellen/g Trockengewicht. Probentiefe 5-15 cm. k.W kein Wachstum. k.T kein Test durchgeführt

Probe	AOB 10°C [Zellzahl/g TG] Seewasser-Anteil im Medium		AOB 17°C [Zellzahl/g TG] Seewasser-Anteil im Medium	
	100 %	70 %	100 %	70 %
Probennahme 2003				
1S	$5,5 \cdot 10^2$	$5,5 \cdot 10^2$	$6,8 \cdot 10^1$	k.W
3S	$7,2 \cdot 10^2$	$5,5 \cdot 10^2$	$1,9 \cdot 10^1$	$3,6 \cdot 10^1$
5S	$1,0 \cdot 10^3$	$1,0 \cdot 10^3$	k.W	k.W
7S	$3,5 \cdot 10^2$	$3,5 \cdot 10^2$	$3,5 \cdot 10^1$	$3,5 \cdot 10^2$
10S	$8,2 \cdot 10^2$	$8,2 \cdot 10^2$	$5,2 \cdot 10^2$	$8,2 \cdot 10^2$
Probennahme 2004				
0405	k.T	$7,4 \cdot 10^1$	k.T	k.T
0408	k.T	$1,9 \cdot 10^1$	k.T	k.T
0409	k.T	$1,1 \cdot 10^1$	k.T	k.T
0410	k.T	$1,50 \cdot 10^1$	k.T	k.T
0412	k.T	$4,80 \cdot 10^1$	k.T	k.T
0423	k.T	$6,4 \cdot 10^2$	k.T	k.T
0443	k.T	$2,2 \cdot 10^1$	k.T	k.T
0444	k.T	$1,5 \cdot 10^1$	k.T	k.T
0445	k.T	k.T	k.T	k.T

Tabelle 14: Zellzahlbestimmung von NOB aus Sedimenten der Laptev-See mittels MPN-Technik. Zellen/g Trockengewicht. Probentiefe 5-15 cm. k.W kein Wachstum. k.T kein Test durchgeführt

Probe	NOB 10°C [Zellzahl/g TG] Seewasser-Anteil im Medium		NOB 17°C [Zellzahl/g TG] Seewasser-Anteil im Medium	
	100 %	70 %	100 %	70 %
Probennahme 2003				
1S	$1,0 \cdot 10^2$	$5,2 \cdot 10^1$	$3,6 \cdot 10^1$	$5,5 \cdot 10^2$
3S	$3,6 \cdot 10^1$	$4,4 \cdot 10^2$	k.W	k.W
5S	k.W	k.W	k.W	k.W
7S	$2,9 \cdot 10^1$	k.W	$2,9 \cdot 10^1$	k.W
10S	$2,4 \cdot 10^2$	$2,4 \cdot 10^2$	$9,7 \cdot 10^2$	$5,0 \cdot 10^2$
Probennahme 2004				
0405	k.T	$7,4 \cdot 10^1$	k.T	k.T
0408	k.T	$8,4 \cdot 10^1$	k.T	k.T
0409	k.T	$6,5 \cdot 10^1$	k.T	k.T
0410	k.T	$8,2 \cdot 10^1$	k.T	k.T
0412	k.T	$2,9 \cdot 10^2$	k.T	k.T
0423	k.T	$7,4 \cdot 10^1$	k.T	k.T
0443	k.T	$5,7 \cdot 10^1$	k.T	k.T
0444	k.T	$1,5 \cdot 10^2$	k.T	k.T
0445	k.T	$8,9 \cdot 10^1$	k.T	k.T

5.2 Anreicherung und Kultivierung von NOB

Durch die Nutzung selektiver flüssiger Mineralmedien konnten NOB aus den Tundrenböden Sibiriens, Sedimenten der Lena sowie der Laptev-See angereichert werden. Die Anpassung der Mineralmedien an geringe Substratmengen und die Kultivierung bei niedrigen Temperaturen sollte sicherstellen, dass alle Gattungen der NOB bei diesen Kultivierungsbedingungen wachsen. So war es möglich, nicht nur Vertreter der Gattung *Nitrobacter* anzureichern, sondern auch *Nitrospira*-ähnliche Bakterien (Tabelle 15). Wie auch aus den molekularbiologischen 16S rRNA Analysen hervorging, konnte ein bisher unbekanntes Bakterium (Samoylov 6678/80; '*Candidatus Nitrotoga arctica*'; ALAWI et al., 2007) aus der Klasse der *Betaproteobacteria* angereichert und kultiviert werden (Vergleich: TGGE-Analysen, Kapitel 5.3.4).

Tabelle 15: Kulturen von NOB aus den Tundra Böden Sibiriens sowie Sedimenten der Laptev-See

Kulturbezeichnung	In Kultur seit	Kultivierungs-Temperatur [°C]	NO ₂ ⁻ [mM]
Profil Samoylov 6675-6682	2002	4-17	0,3
Profil Samoylov W1-3, H1-3, C1-3	2004	17-22	0,3
Profil Lena-Kliff 3301-3310	2004	4-22	0,3
Kurungnakh 1052 und 1066	2002	17-22	0,3
Mamontovy Klyk 207-1 bis 10, 100-128	2003	4-22	0,3
Nb.111, Nb.112, Nb.113	1994	28	3
5 / F3	1998	28	3
Profil Laptev-See F2	2003	-2 bis 22	3
Profil Laptev-See S1-S11	2003	-2 bis 22	0,3-3

Es zeigte sich, dass ein Wachstum bei 22°C zwar meist zu einer erhöhten Nitrit Oxidationsrate führte, jedoch auch immer andere Bakteriengruppen wie Denitrifikanten in der Kultur stark angereichert wurden. Bei den marinen Kulturen Laptev-See S11 und F2 konnte Aktivität bei Temperaturen von -2°C nachgewiesen werden, dies bedeutete aber auch eine Abnahme der Stoffwechselleistung. So konnten von der Kultur Laptev-See S11 bei einer Inkubationstemperatur von -2°C zugesetzte 300 µM Nitrit binnen 32 Tagen, statt 25 (bei 4°C), vollständig zu Nitrat oxidiert werden. Die Kultivierung und Anreicherung dieser chemolithoautotrophen Bakterien war aufgrund des ohnehin langsamen Wachstums dieser Bakteriengruppe bei niedrigen Temperaturen besonders erschwert. Wie bereits für NOB bekannt ist, war ein Wachstum auf Agarplatten nur vereinzelt möglich.

Die Kultur Samoylov 6678/80 konnte über Plattenverfahren weiter angereichert werden, Reinkulturen wurden jedoch nicht erhalten. Die marine Kultur Laptev-See S11 aus den Sedimenten der Laptev-See zeigte nach sechs-wöchiger Inkubation bei 17°C ein Wachstum auf NOB-Agarose-Platten. Hierbei konnte keine einheitliche Kolonieform ausgemacht werden, sondern stets nur Mischkolonien. Durch Anreicherung einer dieser Mischkolonien gelang es aus der Kultur S11 ein weiteres marines NOB, die Kultur Laptev-See F2 anzureichern. Wie durch TGGE-Analysen bestätigt, unterscheidet sich der Umweltklon in Kultur F2 von dem Hauptvertreter in Kultur Laptev-See S11 sowohl physiologisch wie auch phylogenetisch.

5.2.1 Charakterisierung von Anreicherungskulturen aus Böden

Anreicherungskulturen von NOB wurden bei Temperaturen von 4°C bis 28°C inkubiert. Es zeigte sich, dass die Kulturen aus den permafrostbeeinflussten Böden Sibiriens über einen breiten Temperaturbereich Aktivität aufwiesen. Eine exakte Bestimmung von Wachstumsoptima war nur eingeschränkt möglich, da häufig eine Koexistenz mehrerer NOB Stämme und Gattungen in einer Kultur zu beobachten war. Es konnten nicht nur *Nitrobacter*- und *Nitrospira*-ähnliche Bakterien nebeneinander in der Kultur beobachtet werden, sondern zusätzlich ein bisher unbekanntes Betaproteobakterium (Vergleich: TGGE-Analysen, Kapitel 5.3.4). Somit war es nur durch den Vergleich mit dem TGGE-Screening möglich, Aussagen über den optimalen Temperaturbereich der verschiedenen Stämme zu machen.

Die *Nitrobacter*-ähnlichen Bakterien zeigten ein Temperaturoptimum bei 22-28°C und konnten mit wesentlich höheren Nitritkonzentrationen im Medium angereichert werden (Tabelle 15). Die Eigenschaft der Psychrotoleranz war nicht so stark ausgeprägt wie bei den *Nitrospira*-ähnlichen Bakterien. In 10°C-Kulturen setzten sich Bakterien der Gattung *Nitrospira* und 'Candidatus Nitrotoga arctica' durch. Das Temperaturoptimum von Stämmen der Gattung *Nitrospira* lag bei 17°C-22°C. Bei Temperaturen über 28°C wurde die Nitritoxidation von *Nitrospira*-ähnlichen Stämmen inhibiert.

Eine ausgeprägte Anpassung an Kälte zeigte das Nitrit oxidierende Bakterium 'Candidatus Nitrotoga arctica' (ALAWI et al., 2007). Mit einem Temperaturoptimum von 10°C bis 17°C ist es besser an niedrige Temperaturen angepasst als die bekannten Arten der NOB. Eine Kultivierung bei Temperaturen von 28°C führte bereits zum Absterben der Bakterien. Die Substratkonzentration im Medium wurde wie bei den *Nitrospira*-ähnlichen Kulturen auf 300 µM im Medium festgelegt, um ein Überwachsen der Kulturen mit *Nitrobacter*-ähnlichen Bakterien zu verhindern. Das Bakterium zeigte chemolithoautotrophe Eigenschaften, es

konnte bisher ausschließlich im mineralischen Medium ohne organische Bestandteile kultiviert werden. Maximale Umsatzraten wurden bei Nitritkonzentrationen von 0,3 mM bis 1,2 mM gemessen. Ein Wachstum im Medium mit organischen Zusätzen ohne Nitrit war nicht möglich. '*Candidatus Nitrotoga arctica*' konnte in den flüssigen mineralischen Medien sowie auf Agarplatten kultiviert werden. In Abbildung 8 ist das Temperaturoptimum der Kultur dargestellt (Tina Sanders, 2006. Diplomarbeit).

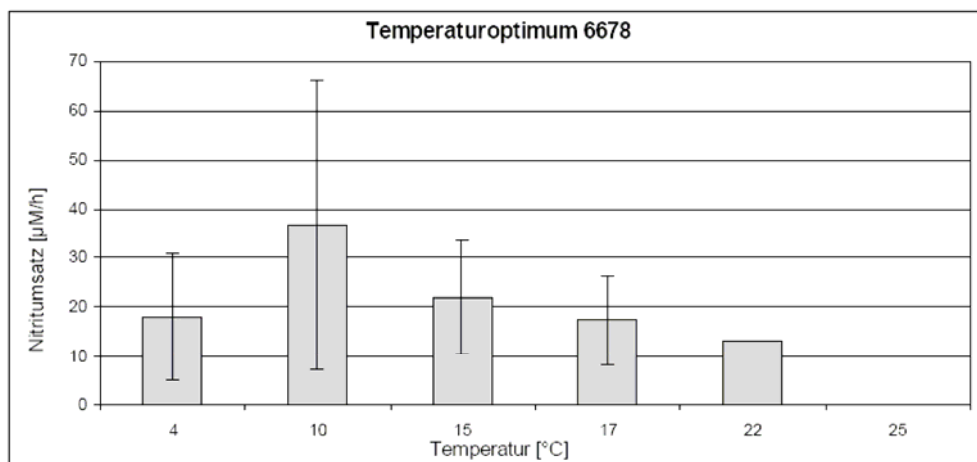


Abbildung 8: Temperaturoptimum der Kultur 6678 '*Candidatus Nitrotoga arctica*'; Untersuchungen von Tina Sanders, 2007

5.2.2 Charakterisierung von marinen Anreicherungskulturen

Um die Temperaturoptima und Stoffwechselleistungen der marinen NOB aus den Laptev-See Sedimenten zu beurteilen, wurde der Substratumsatz bei unterschiedlichen Temperaturen untersucht.

Eine Bestimmung der Zellzahl für das Inokulum ist bei den NOB Kulturen in flüssigen Medien nicht möglich gewesen. Die Bakterienzellen waren meist zu Mikrokolonien aggregiert, so dass eine Bestimmung über Zählkammern nicht durchführbar war. Des Weiteren sind Proteinmessungen aufgrund der geringen Zellzahlen von chemolithoautotrophen Nitrifikanten in Mischkulturen auch keine Alternative für die Ermittlung der Zellzahl in den Proben. Eine Kultur konnte neben den molekularbiologischen teils semi-quantitativen Techniken wie FISH, PCR und TGGE entsprechend nur über den Substratumsatz quantifiziert werden (POLLARD, 2006). Für die Bestimmung des Temperaturoptimums wurde eine Vorkultur von 10°C gewählt, in neues Medium überimpft und bei den entsprechenden Temperaturen inkubiert.

Untersuchung der NOB-Kultur Laptev-See S11

Wie aus Abbildung 9 hervorgeht, konnten bei 22°C und 28°C in 12 Tagen die zugesetzten 300 µM Nitrit vollständig oxidiert werden. Auffällig war, dass bei 4°C noch 80 % der maximal gemessenen Umsatzrate (bei 28°C) erreicht wurden. Es waren nur geringe Unterschiede in der Aktivität der Bakterien bei Temperaturen zwischen 10-28°C festzustellen. Ein Wachstum war auch bei -2°C möglich, die Umsatzraten nahmen jedoch entsprechend weiter ab (Tabelle 16).

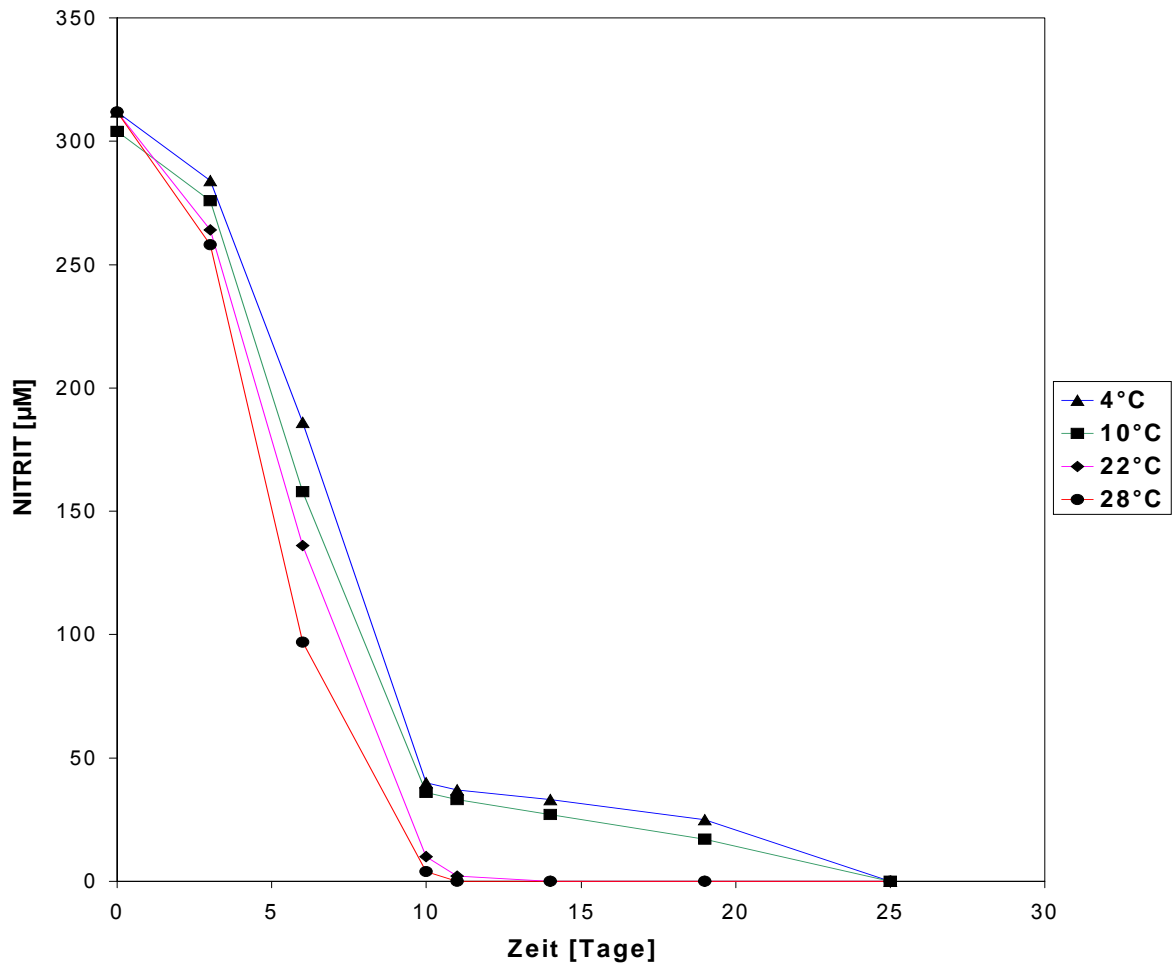


Abbildung 9: Substratumsatz der Kultur Laptev-See S11 bei unterschiedlichen Temperaturen

Untersuchung der NOB-Kultur Laptev-See F2

Wie aus Abbildung 10 hervorgeht, konnten bei 22°C und 28°C in 14 Tagen die zugesetzten 800 µM Nitrit vollständig oxidiert werden. Bei 4°C und 10°C ist zu erkennen, dass die Bakterien eine etwa 30-tägige Lag-Phase aufwiesen. Die Umsatzrate ist bei 4°C verglichen mit 28°C um ca. 75 % geringer. Auch bei 10°C betrug der Stoffumsatz lediglich 38 % des

höchsten Wertes bei 28°C. Bei einer Kultivierungstemperatur von -2°C wurde eine Umsatzrate von unter 10 µM/Tag gemessen (Tabelle 16).

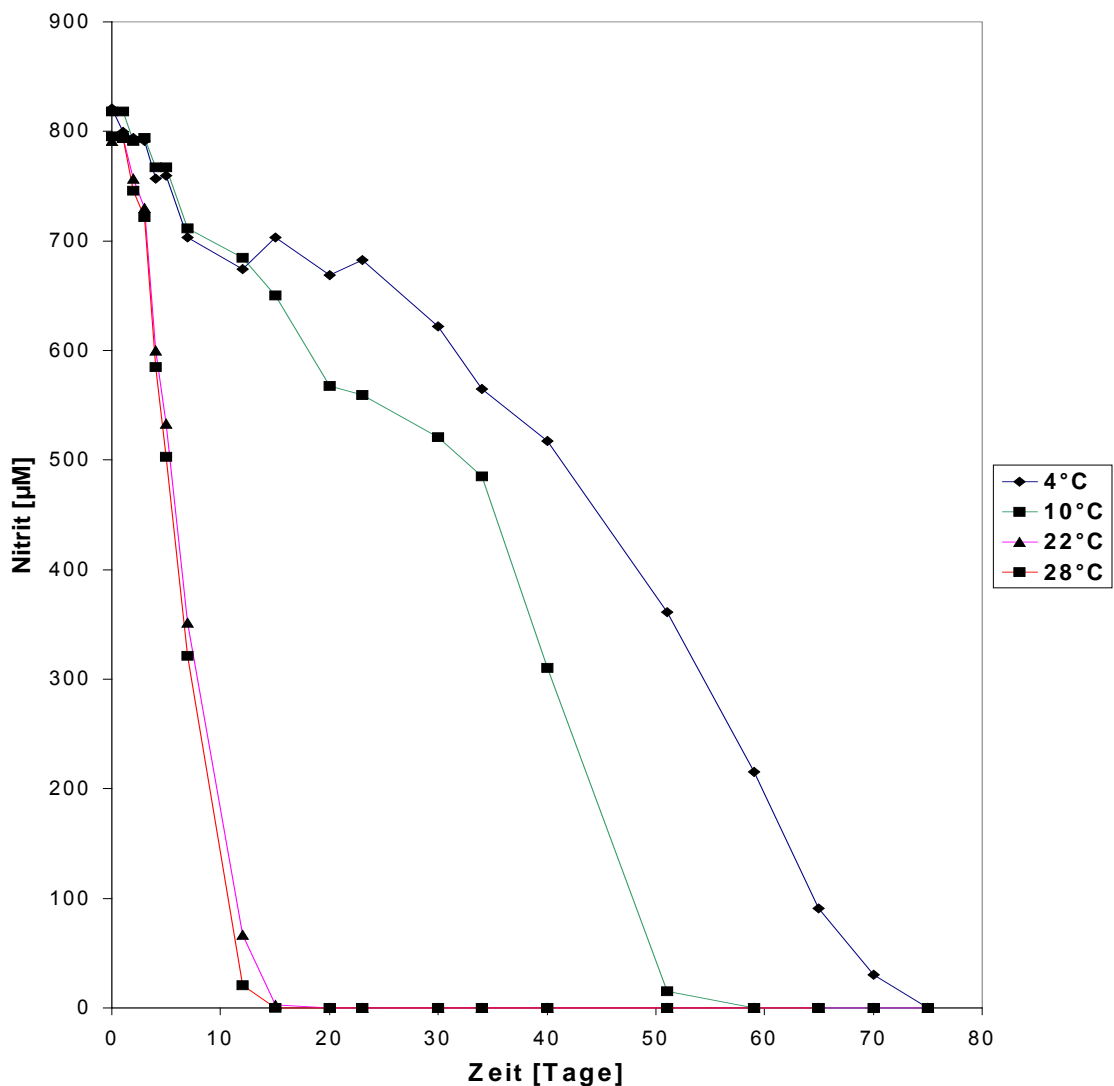


Abbildung 10: Substratumsatz der Kultur Laptev-See F2 bei unterschiedlichen Temperaturen

Vergleicht man die Kulturen Laptev-See S11 und F2, wird der Unterschied in der Anpassungsfähigkeit an niedrige Temperaturen deutlich (Tabelle 16; Abbildung 11). Während die Kultur S11 ein breites Spektrum von 4-28°C abdeckte, war bei Kultur F2 eindeutig eine Anpassung an Temperaturen um 28°C zu erkennen. Die Kultur F2 zeichnete sich durch doppelt so hohe Umsatzraten aus und konnte bei wesentlich höheren Nitritkonzentrationen als die Kultur S11 kultiviert werden (Tabelle 16).

Tabelle 16: Substratumsätze in der Log-Phase der marinen Anreicherungskulturen S11 und F2 bei unterschiedlichen Temperaturen (k.T. kein Test durchgeführt)

Kultur	Umsatz [Nitrit $\mu\text{M}/\text{Tag}$]				
	-2°C	4°C	10°C	22°C	28°C
S11	18	29	34	36	36
F2	<10	17	28	67	73

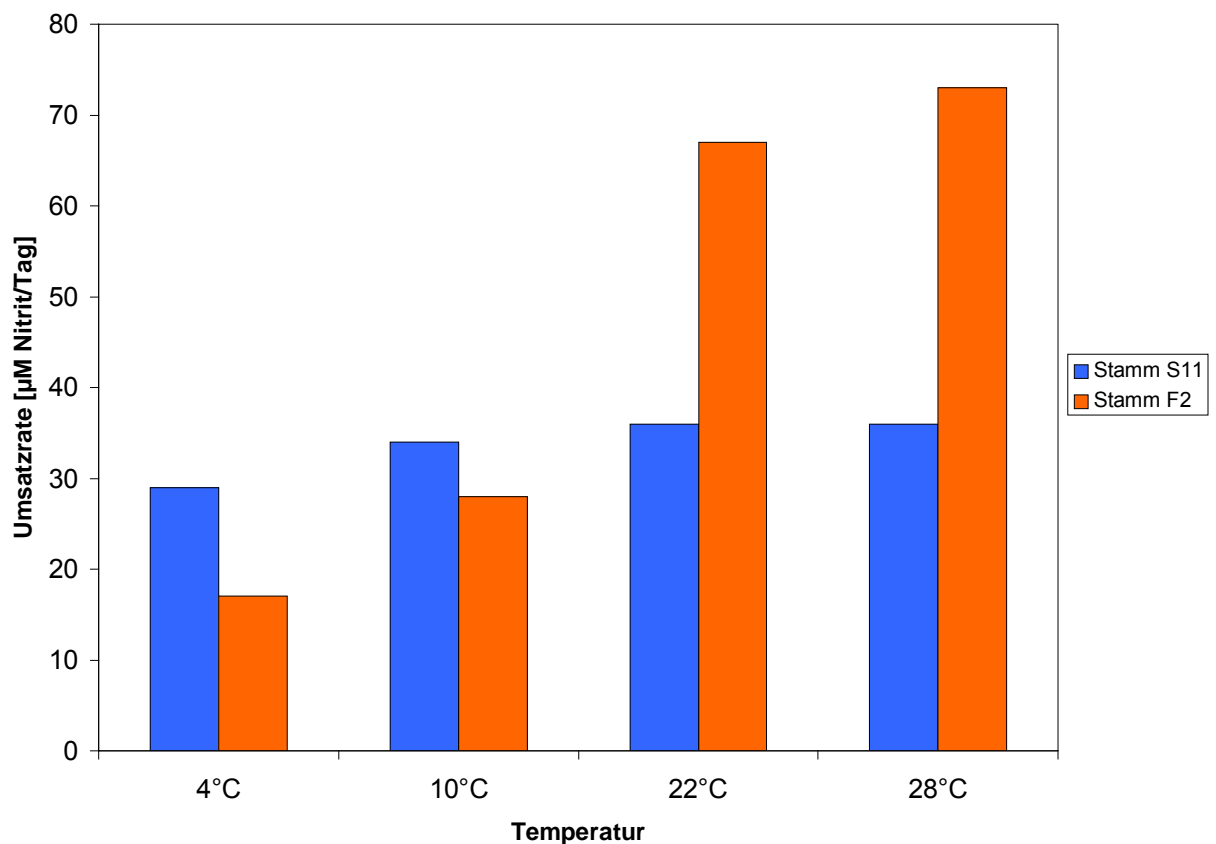


Abbildung 11: Substratumsätze in der Log-Phase der marinen Anreicherungskulturen S11 und F2 bei unterschiedlichen Temperaturen

Marine AOB Anreicherungskultur Laptev-See AOB-S11

Die AOB Kulturen wurden bei 4, 10, 17 und 28°C angezogen (Abbildung 12). Auffällig war, dass die Bakterien bereits bei 28°C die Ammoniakoxidation eingestellt hatten. Wie bereits für Vertreter der NOB Gattungen *Nitrobacter* und *Nitrospira* festgestellt, waren die Bakterien zwar bei 4°C und 10°C noch aktiv, die höchste Oxidationsrate wurde jedoch bei 22°C erzielt.

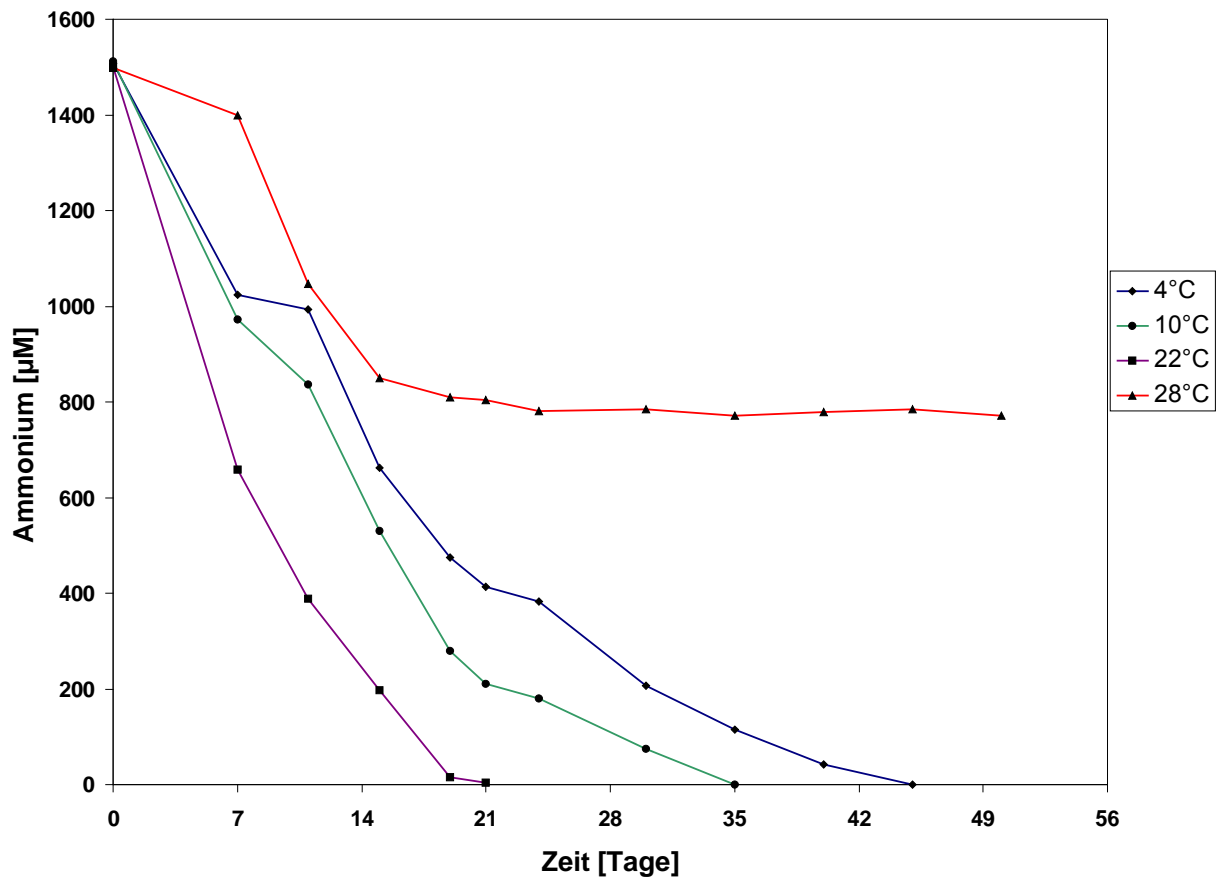


Abbildung 12: Ammonium-Verbrauch der Kultur Laptev-See AOB-S11 (Vorkultur von 17°C) angereichert aus submarinen Permafrost-Sedimenten der Laptev-See bei 4, 10, 17 und 28°C

5.3 Molekularbiologische Untersuchungen

5.3.1 DNA Extraktion aus Böden, Sedimenten und Kulturen

Die Ausbeute der extrahierten DNA wurde durch eine Agarosegel-Elektrophorese überprüft. Ein Größen- und Mengenstandard diente als Referenz. Diese Überprüfung war wichtig, um die richtige Menge von 100-200 ng/ml DNA in der PCR einzusetzen. Es konnte sowohl aus den Rein- und Anreicherungskulturen sowie aus allen Naturproben ausreichend DNA extrahiert werden. Es ist jedoch deutlich geworden, dass speziell Zellwände der Gattung *Nitrobacter* schwerer zu lysieren waren als die anderer NOB. Durch eine 15-minütige Erhitzung der Proben auf 65°C vor dem mechanischen Aufschluss mittels sogenannter Microbeats konnte dieses Problem jedoch verringert werden.

5.3.2 Anpassung der PCR-Bedingungen

Der durchgeführte sechsminütige Hotstart bei 96°C führte verglichen mit einem normalen PCR-Lauf zu einer höheren Spezifität und Produktausbeute der PCR. Auch die durchgeführten Sequenzierungen der PCR-Produkte wiesen auf eine höhere Spezifität bei der Amplifikation hin.

Das eingesetzte Rinder Serum Albumin (BSA) (200-400 ng/μl) eignete sich als PCR-Additiv für schwierig zu amplifizierende DNA aus Bodenproben und erbrachte merklich höhere Ausbeuten in der PCR als DMSO (Abbildung 13). Auch bei Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen von BSA und DMSO konnte dies bestätigt werden (nicht dargestellt). Neben der Beurteilung der Produktausbeute und Fragmentlänge im Agarosegel konnte durch Nutzung der TGGE-Technik auch die Vielfalt des Bandenmusters von Naturproben untersucht werden (Abbildung 14). Hierdurch konnte gezeigt werden, dass bei Verwendung von DMSO die Amplifikation der unterschiedlichen Templates nicht gleichmäßig abläuft. Vielmehr wurden dominante Templates bevorzugt amplifiziert, so dass Templates, die in nur geringer Konzentration in der Naturprobe vorlagen, kaum noch zu detektieren waren. Die Verwendung von BSA hatte hingegen positive Effekte auf die partielle Amplifikation der 16S rRNA Gene einer komplexen Bakterienpopulation. Es konnte nicht nur die Produktausbeute gesteigert werden, auch die für Populationsanalysen wichtige gleichmäßige Amplifikation aller Templates in der Probe konnte verbessert werden. Wie aus den Untersuchungen hervorgeht, wäre eine Amplifikation von DNA aus Böden und marinen Sedimenten ohne BSA als PCR-Additiv nicht möglich gewesen. Es konnte jedoch festgestellt werden, dass der Einsatz von BSA bereits bei Konzentrationen von 100 ng/μl die Spezifität der Reaktion stark herabsetzte, und bei semi-spezifischen Amplifikationen nicht eingesetzt werden sollte. Es sollte auch berücksichtigt werden, dass die festgestellte gleichmäßige Amplifikation unterschiedlicher Templates nicht unbedingt der ursprünglichen Populationsverteilung entspricht. Bei Verwendung doppelt spezifischer Primersets konnte jedoch bei Einsatz von lediglich 100 ng/μl kein negativer Effekt auf die Spezifität festgestellt werden. Für die Amplifikation von DNA aus Naturproben hatte sich die Kombination einer zweistufigen Nested-PCR mit Hotstart bewährt. In der ersten PCR wurde mit dem Eubakterien-Primerset (Eub341F/Eub907R) ein Touchdown-Annealing Programm gewählt und BSA hinzugegeben. In der zweiten PCR konnte dann mit gattungsspezifischen Primern ohne BSA erneut amplifiziert werden.

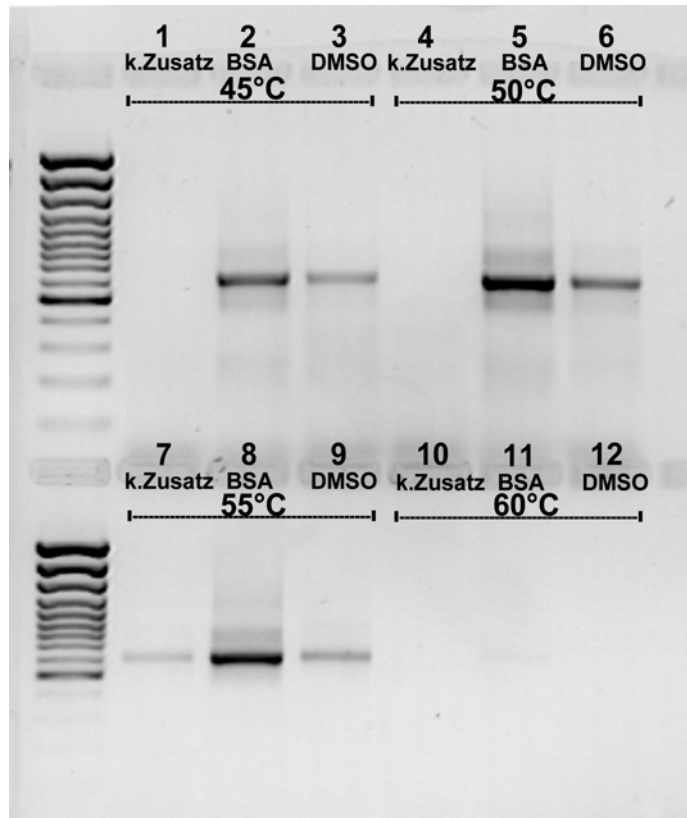


Abbildung 13: Verwendung unterschiedlicher Annealing-Temperaturen sowie BSA und DMSO als Reaktionszusätze für die PCR. Überprüfung der Konzentration und Länge der PCR-Produkte im 2 %igen Agarose Gel

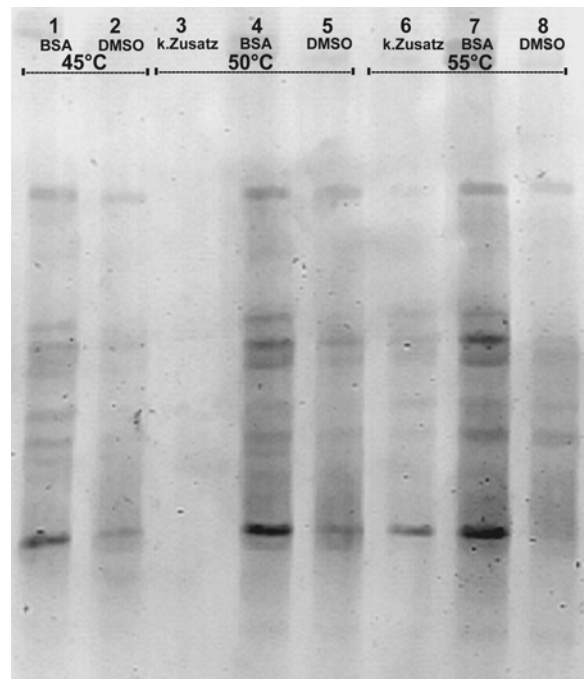


Abbildung 14: TGGE-Profil. Verwendung unterschiedlicher Annealing-Temperaturen sowie BSA und DMSO als Reaktionszusätze für eine Multitemplate-PCR. Überprüfung der Konzentration und Diversität des amplifizierten Bandenmusters

5.3.3 Evaluierung neuer gattungsspezifischer Primersets

Für eine schnelle taxonomische Zuordnung der NOB in Naturproben und Kulturen wurde ein PCR-Screening durchgeführt. Nach Datenbankabgleichen und Anwendung bekannter Primerkombinationen erschien es teilweise notwendig, bekannte Primer zu modifizieren, von bekannten FISH-Sonden abzuleiten oder gänzlich neue Primer zu entwickeln. Durch Verwendung von Anreicherungskulturen der Stammsammlung der Universität Hamburg standen Informationen über bisher unveröffentlichte 16S rRNA Sequenzen zur Verfügung, so dass neue mögliche Primerpositionen zuverlässiger festgelegt werden konnten (Tabelle 6, Seite 40).

Nach dem Alignment aller im Internet verfügbaren Ziel-Sequenzen wurde durch den Abgleich mit der BLASTn Funktion der NCBI-Genbank (Genbank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), und dem Programm „Probe Match“ des RDP-II Servers (<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>) die Spezifität der gewählten Primerposition überprüft. Die neuen Primersets wurden anhand von Referenzstämmen auf ihre Spezifität in der PCR getestet. Die PCR-Bedingungen wurden durch Nutzung eines Gradienten Thermocyclers (Fa. Biometra; Modell, Gradient) und Anpassung der Magnesium-Chlorid-Konzentration abgestimmt.

Es konnten für alle NOB, auch für die bisher wenig untersuchten Gattungen *Nitrospina* und *Nitrococcus* Primerkombinationen entwickelt werden. Des Weiteren wurden Primersets für Ammoniakoxidanten und das neue Nitrit oxidierende Betaproteobakterium 6678/80 eingesetzt. Neue Primersets konnten durch umfangreiche Untersuchungen unterschiedlicher zur Verfügung stehender Reinkulturen, oder definierter Bodenproben auf hohe Spezifität angepasst werden. In Tabelle 17 sind die neu entwickelten spezifischen 16S rRNA Primer mit den entsprechenden Sequenzen aufgelistet.

Für die spezifische Amplifikation des 16S rRNA Gens der Gattung *Nitrobacter* eignete sich am besten die Primerkombination Nb1000gF (modifiziert nach Mobarry et al., 1996) mit Deg2R (modifiziert nach DEGRANGE & BARDIN, 1995) (vergl. Tabelle 6). Die durch Verlängerung der Primerposition hervorgerufene verbesserte Abstimmung der Annealing Temperaturen führte zu einer hohen Spezifität in der PCR. Der Primer DegR von DEGRANGE & BARDIN, (1995) wurde lediglich um fünf Guanin verlängert, um eine bessere Abstimmung der Annealing Temperaturen mit den entsprechenden vorwärts Primern Nit3F und Nb1000gF zu erzielen. Die ursprünglich von MOBARRY et al. (1996) entwickelte CY3-Sonde Nb1000 konnte durch Verlängerung um ein Guanin als Primer angepasst werden. Die anderen verwendeten Primerkombinationen sind für die Detektion

von *Nitrobacter* ebenfalls geeignet, zeigten jedoch bei Sequenzierung der PCR-Produkte mehr unspezifische Bindungen auf (nicht dargestellt).

Tabelle 17: Sequenzen und Bezeichnungen der entwickelten spezifischen Primer und Sonden. Veränderte bekannte Primer sind mit einem * gekennzeichnet. FISH-Sonden sind mit einem + markiert

Bezeichnung	Position	Sequenz 5´- 3´	Ziel	Literatur
+NTG840 R	835	CTAAGGAAGTCTCCTCCC	Betaproteobakterium ' <i>Candidatus</i> <i>Nitrotoga arctica</i> '	Neu entwickelt
NTG200 F	211	CTCGCGTTTTCGGAGCGG		
*DEG2 R	1370	GGTTTTTTGAGATTTGCTAG GGG	<i>Nitrobacter</i>	Verändert, Ursprung Degrange & Bardin. 1995
*Nb1000g F	978	CCATGACCGGTGCGCAG	<i>Nitrobacter</i>	Verändert, Ursprung Mobarry et al. 1996
Nsp60-k F	98	CGGGTGAGGAATACATGG	<i>Nitrospira</i>	Neu entwickelt
Nsp60-l F	92	GGCGAACGGGTGAGGAATA CATGGG	<i>Nitrospira</i> , keine marinen	Neu entwickelt
S11-460 F	460	CCTTTGTGAGGAAAGAT	<i>Nitrospira</i> , marine Kultur S11	Neu entwickelt
S11-634 R	634	AGGCGGTTGGTAAGCCT		
F2-460 F	460	CTTTCATGAGGAAAGATAA	<i>Nitrospira</i> , marine Kultur F2 und andere marine	Neu entwickelt
F2-634 R	634	AGGCGGTTGGGAAAGCCT		
NspnGr F	532	GTAACACGGAGGGGGCG	<i>Nitrospira gracilis</i>	Neu entwickelt
Nspn 347-2 R	1013	GACCCTATTTCTAGGGCT	<i>Nitrospira 347</i>	Neu entwickelt
FN1-55 F	56	CGCCTTCTTCGGAAAGGT	<i>Nitrococcus mobilis</i>	Neu entwickelt
FN4-210 F	216	ACCGATGGATGAGCCCG	<i>Nitrococcus mobilis</i>	Neu entwickelt
RN5-455 R	463	GTCAAACATCGAGGTAT	<i>Nitrococcus mobilis</i>	Neu entwickelt
RN5-564 R	575	TATTCGACCGCTACATGC G	<i>Nitrococcus mobilis</i>	Neu entwickelt
NSCMA R	1015	CCTTCGCCTCTCAGCAAAG	<i>Nitrosococcus oceani</i>	Neu entwickelt

Für die Gattung *Nitrospira* wurde zu Anfang, das in früheren eigenen Untersuchungen entwickelte, semi-spezifische Primerset Eub341F/Nsp662R eingesetzt (M. Alawi, 2003. Diplomarbeit). Wie sich jedoch bei Untersuchungen mit komplexen Bakterienpopulationen in Naturproben zeigte, konnte die Spezifität der Reaktion vereinzelt nicht aufrechterhalten werden. Um jedoch auch in Naturproben *Nitrospira*-ähnliche Bakterien detektieren zu können, wurden weitere spezifische Primerkombinationen getestet. Für die gattungsspezifische Amplifikation wurde das Primerset Nsp60-kF/Nsp662R verwendet, es lieferte ein 566 bp langes Fragment, in dem auch die für Stammbaumanalysen wichtige hypervariable V3-Region enthalten war. Durch eine Veränderung des Nsp60-kF Primers wurde der nur für terrestrische und limnische Nitrospiren (Cluster I, II, und V, DAIMS et al., 2001) entwickelte Primer Nsp60-lF abgeleitet. Zu berücksichtigen ist, dass neben den

marinen Stämmen (Cluster IV) auch die beiden Umweltklone (Cluster III) der Nullarbor caves (AF317762 und AF317764) nicht amplifiziert werden. Um bei der Detektion zwischen den beiden Stämmen Laptev-See F2 und S11 unterscheiden zu können, eigneten sich die neuen Primersets S11-460F, S11-634R, F2-460F und F2-634R. Die Primer F2-460F/F2-634R erfassten neben *Nitrospira marina* auch diverse andere Umweltklone, jedoch nicht die Subgruppe des Stammes Laptev-See S11 (vergl. Seite 92, Abbildung 30).

Für die bisher wenig untersuchten Gattungen *Nitrospina* und *Nitrococcus* konnten ebenso Primersets entwickelt werden. Hierbei muss jedoch berücksichtigt werden, dass nur sehr wenige 16S rRNA Sequenzen dieser Gattungen bekannt sind und somit die Gefahr besteht, dass die Primer nur die bekannten Spezies erfassen. Für eine semi-spezifische Amplifikation der Reinkultur *Nitrospina gracilis* und der Reinkultur *Nitrospina* 347 (Dr. E. Spieck) konnten die Primer (NspnGrF und Nspn 347-2R) erfolgreich eingesetzt werden. Für *Nitrococcus mobilis* wurden verschiedene Primerkombinationen auf Spezifität getestet, die Kombination der Primer FN1-55F mit RN5-564R erbrachte die besten Ergebnisse (nicht dargestellt).

Um ein umfangreiches Screening der Anreicherungskulturen und Naturproben auch nach dem neu entdeckten Nitrit oxidierenden Betaproteobakterium 6678/80 'Candidatus Nitrotoga arctica' durchführen zu können, wurde ein spezifisches Primerset (NTG200F/NTG840R) sowie eine FISH-Sonde entwickelt und getestet. Der entwickelte Primer NTG200F erfasste neben der Zielsequenz lediglich die beiden nächstverwandten Umweltsequenzen. Der Primer, beziehungsweise die FISH-Sonde NTG840R wurde weniger spezifisch gewählt, die Sequenz würde auch an andere nahverwandte Umweltsequenzen hybridisieren.

Für die Gattungen der AOB bewährte sich der Einsatz bekannter spezifischer Primer (Tabelle 6). Durch Kombination mit Eubakterien-Primern konnten auch neue semi-spezifische Primersets eingesetzt werden. Das für die Gattung *Nitrosococcus* entwickelte Primerset Eub27F/NSCMAR zeigte bei den PCR-Analysen eine spezifische Amplifikation des 16S rRNA Genabschnitts der einzigen verfügbaren Reinkultur *Nitrosococcus oceani* (BESS & O'MULLAN, 2002) auf.

5.3.4 TGGE-Analysen

Die über die PCR amplifizierten 16S rRNA Teilsequenzen der Bakteriengemeinschaft verschiedener Standorte in Sibirien wurden mittels TGGE und vergleichsweise mit der DGGE nach ihrem sequenzspezifischen Schmelzverhalten aufgetrennt. Durch die

Auftrennung der PCR-Produkte konnte die Diversität der in der jeweiligen Probe befindlichen Eubakterien aufgezeigt werden. Die Laufweite der Referenzen im Gel konnte Hinweise auf das Vorhandensein unterschiedlicher Nitrit oxidierender Gattungen geben. Eine Zuordnung der Banden ist jedoch gerade bei *Nitrospira* besonders schwierig, da diese Gattung aufgrund der großen Varianzen einen sehr weiten Bereich im Gel einnimmt. Um die Präsenz der NOB zu überprüfen, wurden auch spezifisch für die Gattungen *Nitrospira* und *Nitrobacter* amplifizierte 16S rDNA Fragmente mittels TGGE analysiert.

5.3.4.1 Gattungsspezifische TGGE-Analysen

Wie bereits aus DGGE-Analysen bekannt war, wiesen die 16S rDNA Teilamplifikate von Vertretern der Gattung *Nitrobacter* und *Nitrospira* sehr unterschiedliche Schmelzverhalten und somit Bandenprofile auf. Wenn spezifisch nur eine Gattung der NOB untersucht werden sollte, wurden Anpassungen der Methode notwendig. Durch Einstellung des Temperaturgradienten konnte das Trennverhalten häufig verbessert werden. Bei Naturproben mit komplexen Bakterienpopulation konnte das Problem sehr nahe gelegener Banden jedoch nicht gänzlich gelöst werden. So wurden gattungsspezifische Primersets für die Gattungen *Nitrobacter* und *Nitrospira* entwickelt und erfolgreich angewandt. Da die untersuchten Rein- und Anreicherungskulturen der Gattung *Nitrobacter* auf der Ebene des 16S rRNA Gens kaum Unterschiede aufweisen, ist eine sehr feine Auftrennung mittels Elektrophorese notwendig. Eine Trennung mit dem chemischen Gradienten der DGGE ist häufig unzureichend. Die TGGE-Technik war jedoch sensibel genug, um die oft nur in wenigen Basen abweichenden PCR-Produkte, sequenzspezifisch aufzutrennen (Abbildung 15).

Um die Detektion von *Nitrobacter* zu vereinfachen, wurde das *Nitrobacter* semi-spezifische Primerset Eub517F/Deg2R verwendet. In Abbildung 16 ist ein *Nitrobacter*-spezifisches TGGE-Profil dargestellt. Aus vier unterschiedlichen Proben vom Tundraboden Sibiriens konnten auf diese Weise *Nitrobacter*-ähnliche 16S rDNA Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt werden. Mit diesem Primerset konnten größere Probenmengen direkt mittels PCR-Nachweis untersucht werden. Die Anreicherungen PF111 und PF113 aus einer Sedimentschicht des Permafrostbodens der Kolyma-Indigirka Tiefebene (Anreicherung, H. Janssen) zeigten drei unterschiedliche Banden und damit drei bisher nicht charakterisierte *Nitrobacter* Stämme auf. In der Kultur 5/F3, vom Auftauhorizont eines permafrostbeeinflussten Tundrabodens (Anreicherung, Dr. E. Spieck; BARTOSCH et al., 2002), konnte eine Bande im Bereich der Referenzen *Nb. hamburgensis* und *Nb. winogradskyi* detektiert werden. Bei BS5/6 handelt es sich um eine Reinkultur (sulfidische Erzmine, Rumänien) aus der Stammsammlung der Universität Hamburg.

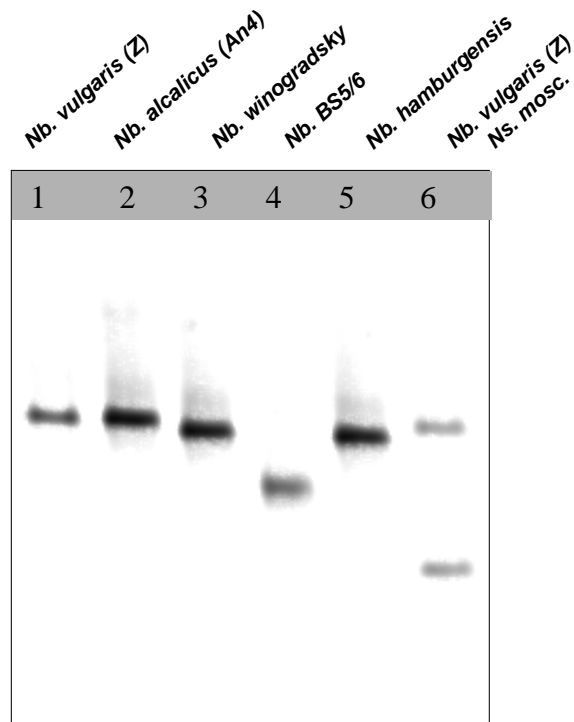


Abbildung 15: TGGE-Profil von Reinkulturen der Gattung *Nitrobacter* (Spur 1-6). Spur 6 *Nb. vulgaris* und *Ns. mosc.* (untere Bande). Die Teilamplifikation des 16S rRNA Gens wurde mit dem Eubakterien-Primerset Eub341F/Eub907R durchgeführt

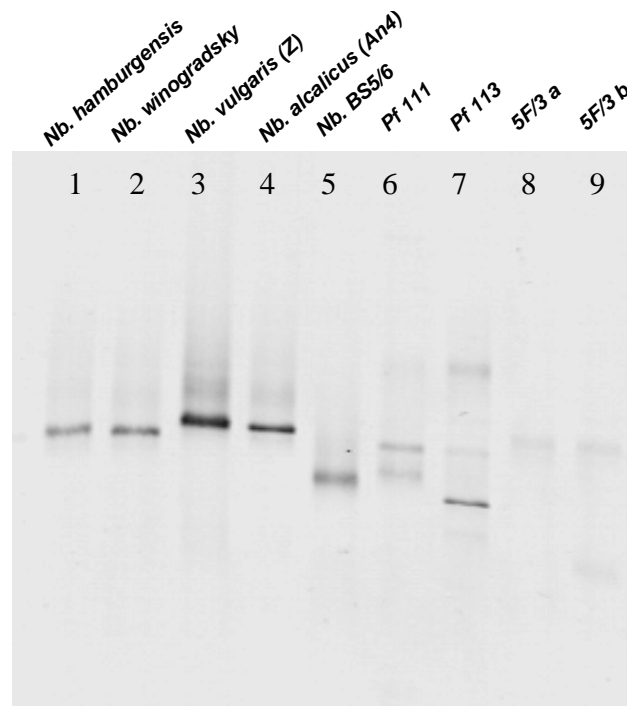


Abbildung 16: TGGE-Profil von Reinkulturen (Spur 1-5) und Anreicherungskulturen (Spur 6-9) der Gattung *Nitrobacter*. Die Teilamplifikation des 16S rRNA Gens wurde mit dem *Nitrobacter* semi-spezifischen Primerset Eub517F/Deg2R durchgeführt

Innerhalb der Gattung *Nitrospira* sind relativ große Unterschiede auf dem 16S rRNA Gen typisch. Diese Gattung ist phylogenetisch sehr tief verwurzelt. Auf untersuchten Teilamplifikaten von 640 bp Länge sind Übereinstimmungen in der Basenabfolge von lediglich 96 % festzustellen. Somit wurde deutlich, dass es für Analysen sogar innerhalb einer Gattung der NOB von Vorteil ist, den Temperaturgradienten entsprechend anzupassen, um eine optimale Auftrennung zu erhalten. Auf die Ergebnisse bei der Verwendung des *Nitrospira* semi-spezifischen Primersets Eub341F/Ns662R für TGGE-Analysen wird im Verlauf der Analyse der unterschiedlichen Profile eingegangen.

5.3.4.2 Samoylov; Bodenprofil der Polygonstruktur P1

Untersuchung der Naturproben

Bei der Untersuchung der Polygonstruktur P1 wurden TGGE-Analysen unter anderem direkt mit PCR-Produkten aus Naturproben durchgeführt. Die Vielfalt der mit dem Eubakterien-Primer amplifizierten Bakterien war jedoch so hoch, dass eine Analyse nur bedingt möglich war (Abbildung 17). Bis zu 30 verschiedene Banden konnten in einzelnen Proben nachgewiesen werden. Da bereits aus anderen Analysen bekannt war, dass sich das Schmelzverhalten der PCR-Produkte unterschiedlicher Gattungen stark ähnelt, konnten nur vereinzelt Rückschlüsse auf das Vorhandensein von NOB geschlossen werden. Die Zellzahl und damit die Menge an extrahierter DNA aus den Proben vom Hang lag bei allen Analysen unter der vom Zentrum und dem Wall des Polygons. Abweichungen des TGGE-Profiles von Proben aus unterschiedlichen Tiefen wurden nicht festgestellt. Durch die Anfertigung von Anreicherungskulturen und die Verwendung gattungsspezifischer Primer konnten deutlichere Ergebnisse gewonnen werden.

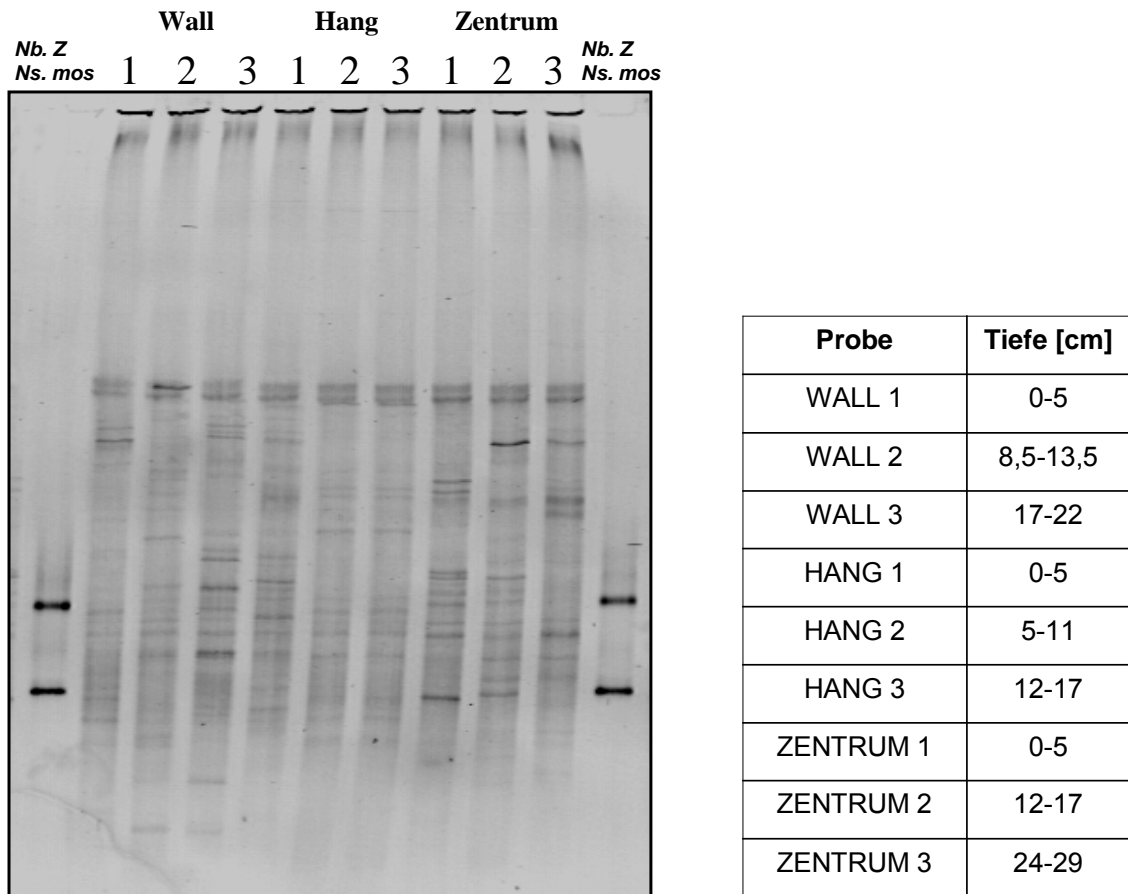


Abbildung 17: TGGE-Profil von Bodenproben der Polygonstruktur P1 aus Samoylov. Spur 0 und 10 = *Nb. vulgaris*, *Ns. moscoviensis* (untere Bande). Die Teilamplifikation des 16S rRNA Gens wurde mit dem Eubakterien-Primerset Eub341F/Eub907R durchgeführt

Untersuchung der Anreicherungskulturen von NOB

Die untersuchten Kulturen wurden über eine Dauer von 12 Wochen bei 17°C inkubiert. Nach fünf-facher vollständiger Oxidation des zugesetzten Nitrits (300 µM) wurde die DNA extrahiert. Es konnten in diesem Profil vier unterschiedliche Arten der Gattung *Nitrospira* detektiert werden (Abbildung 18). In den Kulturen aus dem Polygon-Zentrum (Zentrum 2-3) konnten sogar drei unterschiedliche *Nitrospira*-ähnliche Bakterien zusammen in einer Kultur nachgewiesen werden. Die Anreicherungen aus dem Wall sowie 1 und 2 aus dem Hang wiesen zwar *Nitrobacter*-ähnliche Banden auf, die anschließende Sequenzierung zeigte jedoch, dass es sich hierbei auch um *Nitrospira*-ähnliche Bakterien handelte (Tabelle 18).

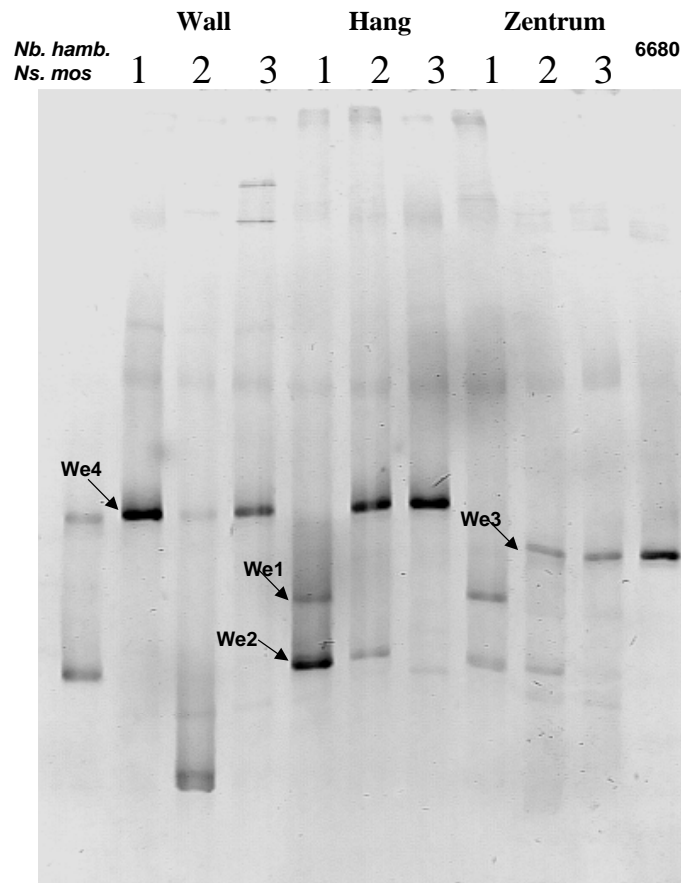


Abbildung 18: TGGE-Profil von Anreicherungskulturen (17°C) des Bodenprofils P1 aus Samoylov (Spur 2-10). Die Pfeile markieren die extrahierten und sequenzierten DNA-Banden Spur 0 = *Nb. hamburgensis* (obere Bande), *Ns. moscoviensis* (untere Bande). 6680 = *Candidatus Nitrospira arctica*. Die Teilamplifikation des 16S rRNA Gens wurde mit dem Eubakterien-Primerset Eub341F/Eub907R durchgeführt

Tabelle 18: Taxonomische Zuordnung von 16S rRNA Sequenzen. Kulturen von der Polygonstruktur P1 Samoylov (Eubakterien-Primerset, 640bp)

DNA-Bande	Proben-bezeichnung	Höchste Übereinstimmung bei Sequenzvergleichen	Prozentuale Übereinstimmung
We1	Zentrum 2, 3	' <i>Candidatus Nitrospira defluvii</i> '	98
We2	Hang 1, 2	<i>Nitrospira moscoviensis</i>	94
We3	Wall 2	<i>Nitrospira moscoviensis</i>	94
We4	Wall 2	<i>Nitrospira moscoviensis</i>	93

Verwendung eines für *Nitrospira* semi-spezifischen Primerpaares

Die Auswertung von TGGE-Analysen komplexer Bakterienpopulationen in Naturproben und Kulturen, die sich erst im anlaufenden Prozess der Anreicherung befanden, war aufwendig. Daher wurde zusätzlich für *Nitrospira* ein TGGE-Profil mit semi-spezifisch (Eub341F/Nsp662R) amplifizierten PCR-Produkten durchgeführt (Abbildung 19). Als Referenz diente *Nitrospira moscoviensis*.

Es wurden die gleichen vier *Nitrospira*-ähnlichen Sequenzen wie in dem Eubakterien-Profil (Abbildung 18) detektiert (Tabelle 19). In jeder Kultur konnten *Nitrospira*-ähnliche Bakterien angereichert werden. Darüber hinaus konnte im Hang und im Zentrum des Polygons eine Koexistenz drei unterschiedlicher *Nitrospira*-Subspezies nachgewiesen werden.

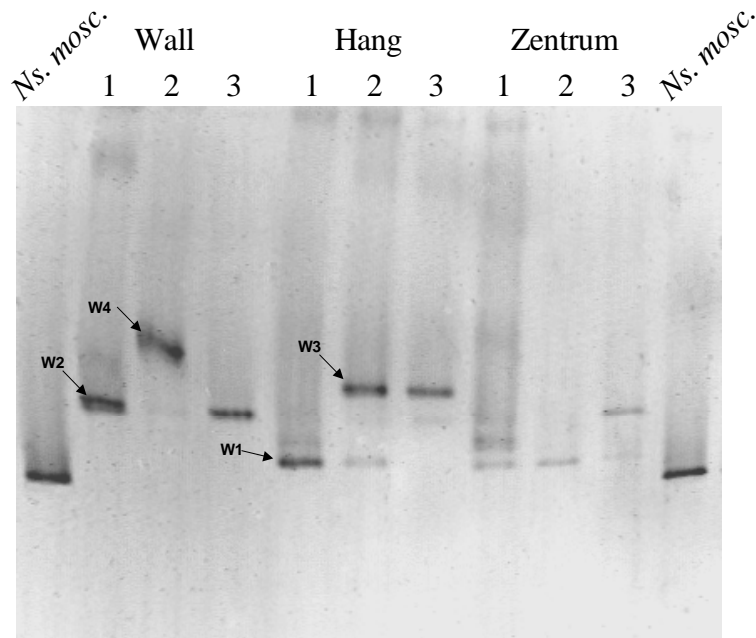


Abbildung 19: *Nitrospira*-spezifische TGGE von *Ns. moscoviensis* (Spur 0) und Anreicherungskulturen (17°C) der Polygonstruktur P1 auf Samoylov (Spur 2-10). Die Ziffern markieren die extrahierten und sequenzierten DNA-Banden

Tabelle 19: Taxonomische Zuordnung von 16S rRNA Sequenzen. Kulturen von der Polygonstruktur P1 Samoylov (*Nitrospira*-spezifisch, 320bp)

Bezeichnung	Proben-Nummer	Höchste Übereinstimmung bei Sequenzvergleichen	Prozentuale Übereinstimmung
W1	W1-3, H1-3, C1, C3	' <i>Candidatus Nitrospira defluvii</i> '	99
W2	H1,2, C3	<i>Nitrospira moscoviensis</i> , Gall, Ga9-4	96
W3	H2, H3	<i>Nitrospira moscoviensis</i>	95
W4	W2	Anreicherung Lebedeva EL42 <i>Nitrospira moscoviensis</i> ' <i>Candidatus Nitrospira defluvii</i> '	95 91 89

5.3.4.3 Samoylov; Bodenprofil der Polygonstruktur P2

In den 4°C Kulturen konnte eine geringere Banden-Diversität festgestellt werden als bei den 10°C und 17°C Kulturen. Bemerkenswert ist, dass bei 4°C keine bekannten Nitrit oxidierenden Gattungen nachgewiesen werden konnten. Eine der stärksten und häufigsten Banden (E10) wurde einem unbekanntem Bakterium der Klasse der *Betaproteobacteria* zugewiesen (im weiteren Verlauf Betaproteobakterium 6678/80 bzw. 'Candidatus Nitrotoga arctica' genannt). Dieses Bakterium konnte auch in den Kulturen von 10°C und 17°C identifiziert werden. Da die Bande des 16S rDNA Fragments ein sehr ähnliches Schmelzverhalten wie jenes von *Nitrobacter* und einigen *Nitrospira* Stämmen aufwies, war es kompliziert zwischen diesen Banden zu differenzieren. Darüber hinaus konnten neue Stämme der Gattung *Nitrospira* (E1 und E6) in den 10°C und 17°C Profilen detektiert werden (Tabelle 20). Die anderen identifizierten Bakterien (E2, E3, E4, E5, E7, E8 und E9) weisen laut Literatur auf denitrifizierende Aktivitäten hin oder haben einen heterotrophen Stoffwechsel.

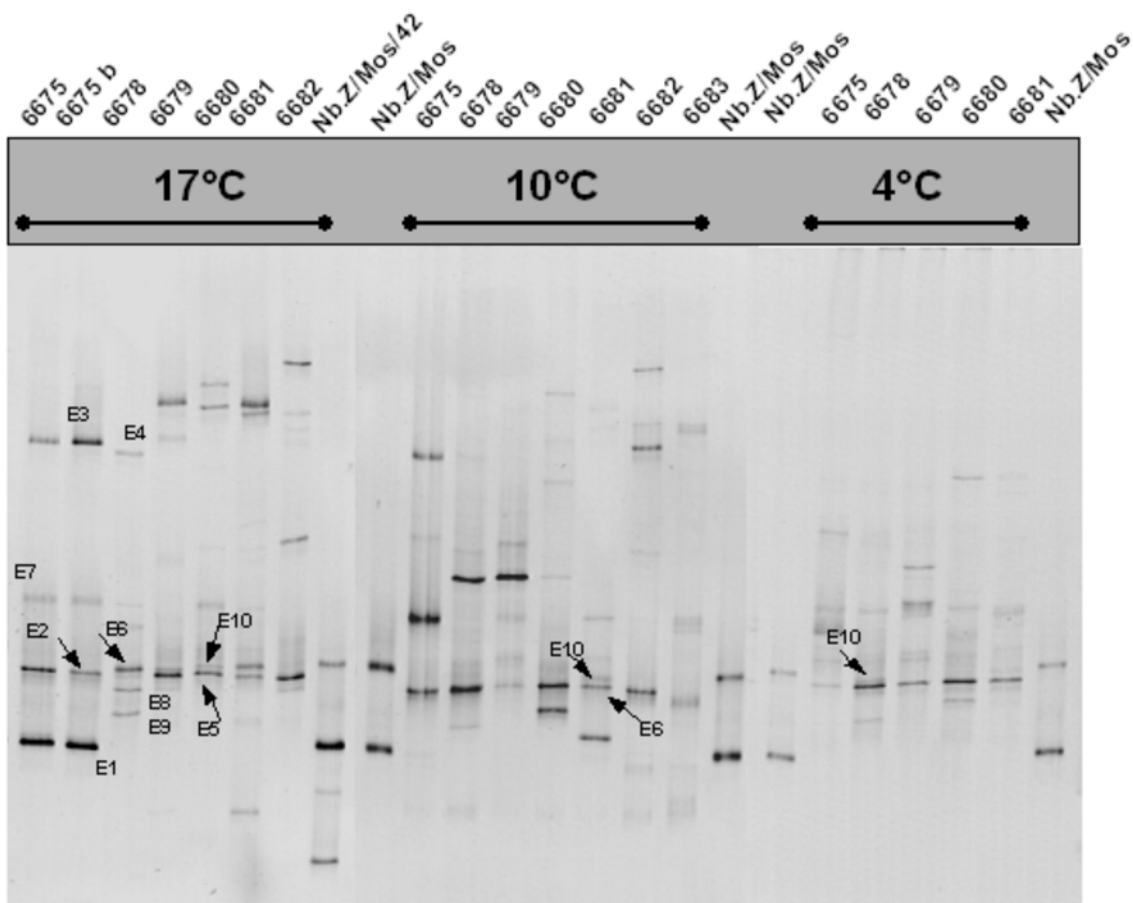


Abbildung 20: TGGE-Profil (3 Gele) von Nitrit oxidierenden Anreicherungskulturen der Polygonstruktur P2 auf Samoylov. Aufgetrennt sind die Bodenproben 6675-6682 angereichert bei 4, 10 und 17°C. Als Standard diente *Nb. vulgaris* (obere Bande) und *Ns. moscoviensis* (Mitte) sowie die Anreicherung EL42 (untere Bande). Ziffern bezeichnen extrahierte und sequenzierte DNA Banden. Die Teilamplifikation des 16S rRNA Gens wurde mit dem Eubakterien-Primerset Eub341F/Eub907R durchgeführt

Tabelle 20: Taxonomische Zuordnung von 16S rRNA Sequenzen. Kulturen von der Polygonstruktur P2 Samoylov. NOB sind hervorgehoben (Eubakterien-Primerset, 640bp)

Bezeichnung der extrahierten DNA-Bande	Proben-Nummer	Höchste Übereinstimmung bei Sequenzvergleichen
E1	6675	'Candidatus Nitrospira defluvii'
E2	6675	<i>Sterolibacterium denitrificans</i>
E3	6675	<i>Chloroflexi bacterium</i>
E4	6678	<i>Chlorobi bacterium</i>
E5	6680	Polaromonas sp. 'hydrogenovorans'
E6	6678	<i>Nitrospira moscoviensis</i>
E7	6675	<i>Janthinobacter spec.</i>
E8	6678	<i>Acidovorax avenae subsp. citrulli</i>
E9	6678	<i>Lysobacter spec.</i>
E10	6675-6680	Unkultivierte <i>Betaproteobacteria</i> ('Candidatus Nitrotoga arctica')

Nach einjähriger Anreicherung der NOB bei 10°C wurde der Versuch wiederholt (Abbildung 21). Das bereits in den ersten Anreicherungen detektierte Betaproteobakterium 6678/80 ('*Candidatus Nitrotoga arctica*') konnte sich in dem mineralischen Medium bei 10°C am besten durchsetzen und war in den Proben 6675-6680 nachweisbar (Tabelle 21). In den chemoorganotrophen Ansätzen ohne Nitrit (Spur 3 u. 5), wurde das Bakterium jedoch im Wachstum gehemmt und war kaum noch zu detektieren.

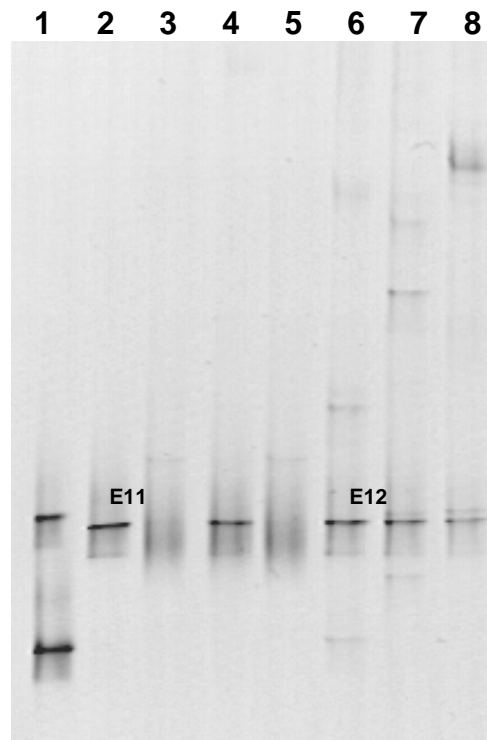


Abbildung 21: DGGE-Profil, Samoylov Polygon P2. Anreicherung bei 10°C. Spur 1 = *Nb. hamburgensis* (obere Bande), *Ns. moscoviensis* (untere Bande) 2 = 6680 autotroph; 3 = 6680 chemoorg.; 4 = 6680 autotroph; 5 = 6680 chemoorg; 6 = 6675 autotroph; 7 = 6678 autotroph, 8 = 6679 autotroph. Beschriftung bezeichnet extrahierte und sequenzierte DNA-Banden

Tabelle 21: Taxonomische Zuordnung von 16S rRNA Sequenzen. Kulturen von der Polygonstruktur P2 Samoylov (Eubakterien-Primerset, 640bp)

Bezeichnung der extrahierten DNA-Bande	Proben-Nummer	Höchste Übereinstimmung bei Sequenzvergleichen
E11	6675-6680	Unkultivierte <i>Betaproteobacteria</i> (' <i>Candidatus Nitrotoga arctica</i> ')
E12	6675-6680	Unkultivierte <i>Betaproteobacteria</i> (' <i>Candidatus Nitrotoga arctica</i> ')

5.3.4.4 Samoylov; Kliff (Proben 3301-3310)

Die TGGE-Analyse von Naturproben des Kliffs auf Samoylov zeigte eine ähnlich komplexe Eubakteriengemeinschaft wie das untersuchte Profil P1 aus Samoylov (Anhang Seite 139, Abbildung 38). Der Nachweis von NOB in den Naturproben wurde daher zusätzlich mit gattungsspezifischen Primern mittels PCR durchgeführt (Seite 86, Kapitel 5.3.5). Die Untersuchung der Anreicherungskulturen lieferte jedoch eine weitere Bestätigung für das Vorhandensein von bisher nicht charakterisierten NOB aus der Klasse der *Betaproteobacteria* (Abbildung 22). In den 10°C Kulturen konnten über TGGE-Analysen nur sehr schwach NOB der Gattung *Nitrospira* detektiert werden, während das Betaproteobakterium weiter angereichert worden ist. In den untersuchten 17°C Kulturen konnten insgesamt drei unterschiedliche Sequenzen der Gattung *Nitrospira* detektiert werden (Tabelle 22). Eine klare Verteilung der verschiedenen Subspezies innerhalb des Profils konnte nicht festgestellt werden.

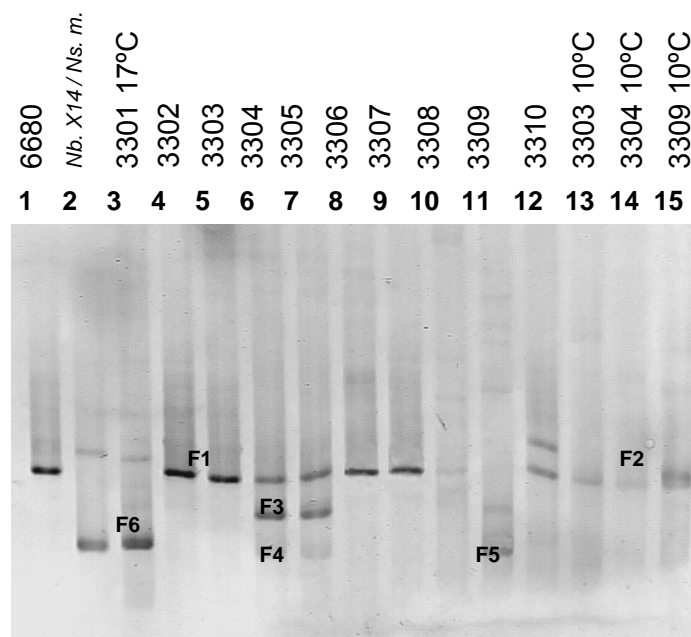


Abbildung 22: TGGE-Profil von Nitrit oxidierenden Anreicherungskulturen des Kliffs auf Samoylov. Spur 1 = NOB Betaproteobakt. 6678/80; Spur 2 = *Nb. hamburgensis* (X14, obere Bande) und *Ns. moscoviensis*; Spur 3-12 = Anreicherung 4°C 3301-3310 aus unterschiedlicher Tiefe vom Kliff auf Samoylov, Spur 13-15 = Anreicherungen 10°C. Die Amplifikation des 16S rRNA Gens wurde mit dem Eubakterien-Primerset durchgeführt

Tabelle 22: Taxonomische Zuordnung von 16S rRNA Sequenzen. Kulturen vom Kliff auf Samoylov (Eubakterien-Primerset, 640bp)

Bezeichnung der extrahierten DNA-Bande	Proben-Nummer	Höchste Übereinstimmung bei Sequenzvergleichen
F1	3301-3310	<i>Nitrospira moscoviensis</i>
F2	3301-3310	Unkultivierte <i>Betaproteobacteria</i> (<i>'Candidatus Nitrotoga arctica'</i>)
F3	3304-3305, 3309	<i>Nitrospira moscoviensis</i>
F4 wie F5, F6	3301, 3304-3305, 3309	<i>Nitrospira moscoviensis</i>

Die taxonomischen Analysen der Kulturen wurden nach einer einjährigen Anreicherung bei 10°C wiederholt (Abbildung 23). Hierbei zeigte sich, wie schon in den Profilen aus Samoylov, dass *Nitrobacter* und *Nitrospira*-ähnliche Bakterien nicht mehr detektierbar waren. In den Kulturen konnte lediglich das Betaproteobakterium 6678/80 (*'Candidatus Nitrotoga arctica'*) sowie schwächere Banden meist denitrifizierender Bakterien nachgewiesen werden.

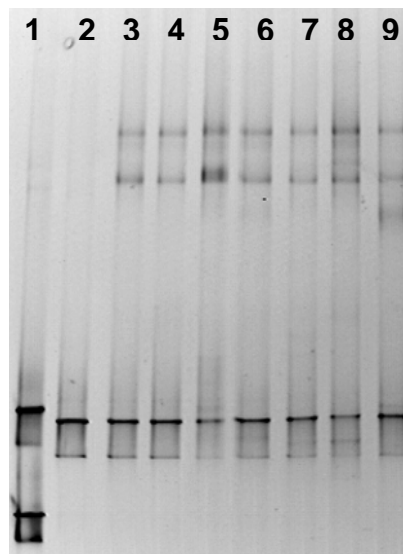


Abbildung 23: DGGE-Profil von Nitrit oxidierenden Anreicherungskulturen des Kliffs auf Samoylov. Spur 1 = *Nb. hamburgensis* (obere Bande) und *Ns. moscoviensis*; Spur 2 = Kultur 6680 (*'Candidatus Nitrotoga arctica'*); Spur 3-9 = Anreicherung 10°C 3303-4, 3306-10. Die Amplifikation des 16S rRNA Gens wurde mit dem Eubakterien-Primerset durchgeführt

5.3.4.5 Kurungnakh (Proben 1051, 1052 und 1066) und Lena-Sedimente

Die untersuchten Anreicherungskulturen aus Kurungnakh zeigten eine sehr heterogene NOB Gemeinschaft (Abbildung 24). Es konnte neben NOB der Gattungen *Nitrobacter* und *Nitrospira* auch das Betaproteobakterium 6678/80 (*'Candidatus Nitrotoga arctica'*) detektiert

werden. In der 17°C Kultur 1051 konnten *Nitrospira*-ähnliche Bakterien anhand des Vergleiches mit der Referenz im Gel und auch über die Sequenzierung nachgewiesen werden (Tabelle 23). Diese *Nitrospira*-ähnliche Bande ist bei der 10°C Kultur nicht mehr nachweisbar. Die Bande des Nitrit oxidierenden Betaproteobakteriums ist jedoch bei beiden Temperaturen angereichert worden. *Nitrospira*-ähnliche Bakterien konnten auch in der 17°C Kultur 1052 detektiert werden, aber auch hier war die Anreicherung von *Nitrospira* in der 10°C und 4°C Kultur nicht möglich und das Betaproteobakterium 6678/80 lieferte das stärkste Signal. Da in dem TGGE-Profil der 10°C Kultur die Bande von *Polaromonas spec.* sehr dominant ausfiel, war eine Detektion von NOB bei dieser Bandenlaufweite nicht möglich. Bei der 28°C Kultivierung konnten keine NOB nachgewiesen werden. In der Probe 1066 konnten bei Inkubationstemperaturen unter 22°C *Nitrospira*-ähnliche Bakterien nachgewiesen werden. Bei 17°C und 22°C war in diesen Profilen auch die Anreicherung von *Nitrobacter*-ähnlichen Bakterien möglich. In der Anreicherung von NOB aus Sedimenten der Lena konnte die Sequenz eines *Nitrospira*-ähnlichen Bakteriums nachgewiesen werden. Das nächstverwandte taxonomisch beschriebene Bakterium war laut Datenbankanalysen '*Candidatus Nitrospira defluvii*'.

Um den Anreicherungsprozess zu beobachten, wurde nach weiteren 12 Monaten der Kultivierung und Überimpfung auf selektiven Mineralmedien erneut ein TGGE-Profil angefertigt (Abbildung 25). Es konnte im Verlauf der Anreicherung eine Veränderung der Populationsstruktur in der Kultur 1052 festgestellt werden, jedoch waren neben dem Nitrit oxidierenden Betaproteobakterium diverse andere Bakteriengruppen detektierbar (Tabelle 24).

Auch die Kultur 1066 zeigte ein anderes TGGE-Profil als zum frühen Zeitpunkt des Anreicherungsprozesses. Eine zuvor in der Kultur nachgewiesene *Nitrospira*-ähnliche Sequenz (Tabelle 22, D11) konnte nicht mehr detektiert werden, jedoch eine andere Sequenz in der parallelen Kultur 1066a (G5). Eine weitere Kultur 1066b zeigte eine sehr gute Anreicherungsqualität, die bereits aus dem vorigen Profil bekannte *Nitrobacter*-ähnliche Sequenz dominierte sehr stark, DNA-Banden anderer Bakterien lagen unterhalb der Nachweisgrenze.

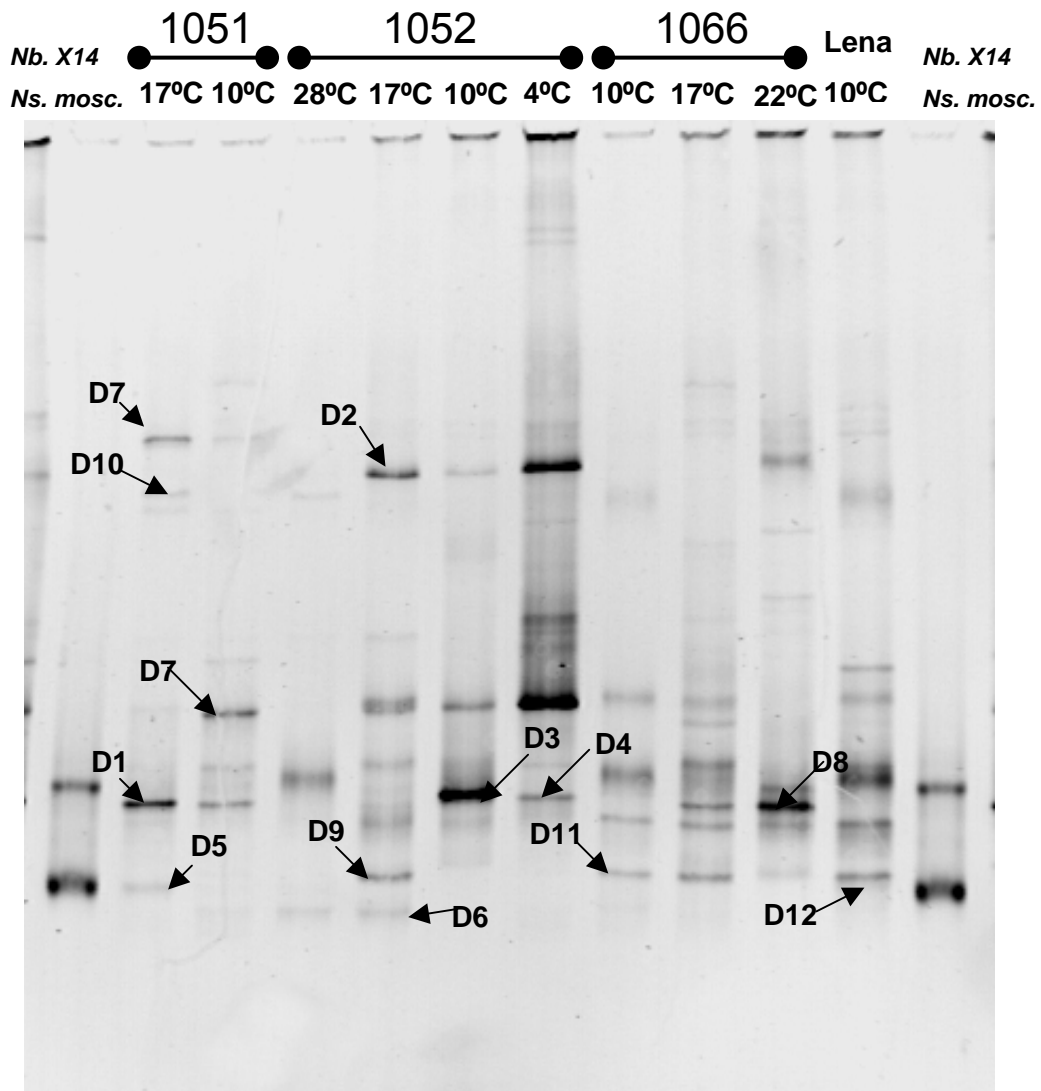


Abbildung 24: TGGE-Profil von NOB Kulturen aus Kurungnakh sowie Sedimenten der Lena. Referenz *Nb. hamburgensis* (X14, obere Bande) und *Ns. moscoviensis*. Die Amplifikation des 16S rRNA Gens wurde mit dem Eubakterien-Primerset Eub341F/Eub907R durchgeführt. Ziffern bezeichnen extrahierte und sequenzierte DNA-Banden

Tabelle 23: Taxonomische Zuordnung von 16S rRNA Sequenzen. Kulturen vom Bodenprofil Kurungnakh und Sedimenten der Lena. NOB sind hervorgehoben (Eubakterien-Primerset, 640bp)

DNA-Bande	Proben-Nummer	Höchste Übereinstimmung bei Sequenzvergleichen	Prozentuale Übereinstimmung
D1 wie D4	1051 (17°C)	Betaproteobakterium 6678/80 (<i>'Candidatus Nitrotoga arctica'</i>)	97
D2	1052 (17°C)	<i>Betaproteobacteria</i> , denitrifizierend	99
D3	1052 (10°C)	<i>Polaromonas</i> sp. 'hydrogenovorans'	99
D5	1051 (17°C)	<i>'Candidatus Nitrospira defluvii'</i>	98
D6	1052 (17°C)	<i>Arthrobacter</i> sp. Tibet-IIR23	99
D7	1051 (17°C)	<i>Nitrosomonas halophila</i>	93
D8	1066alt (10°C)	<i>Nitrobacter spec.</i>	100
D9 wie D11	1066 (10,17,22°C) 1052	<i>Nitrospira moscoviensis</i>	97
D10	1051 (17°C)	<i>Janthinobacterium agaricidamnorum</i>	99
D12	Lena	<i>Nitrospira moscoviensis</i>	97

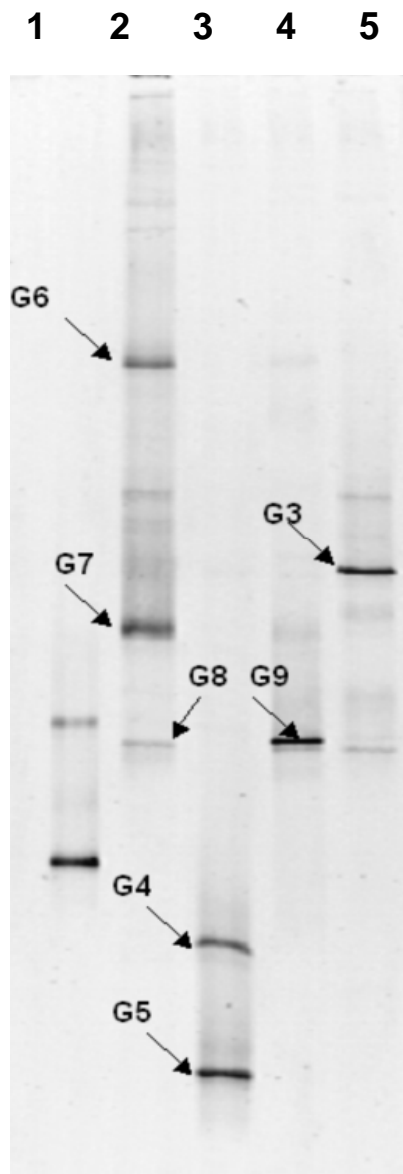


Abbildung 25: TGGE-Profil. Folgekulturen der Proben aus Kurungnakh; Spur 1 = *Nb. hamburgensis* (obere Bande), *Ns. moscoviensis*; 2 = 1052 10°C; 3 = 1066a 10°C; 4 = 1066b 10°C; 5 = 1052 4°C. Ziffern bezeichnen extrahierte und sequenzierte DNA-Banden. Die Amplifikation des 16S rRNA Gens wurde mit dem Eubakterien-Primerset Eub341F/Eub907R durchgeführt

Tabelle 24: Taxonomische Zuordnung von 16S rRNA Sequenzen. Kulturen vom Bodenprofil aus Kurungnakh. NOB sind hervorgehoben (Eubakterien-Primerset, 640bp)

Bezeichnung der DNA-Bande	Proben-Nummer	Höchste Übereinstimmung bei Sequenzvergleichen
G3	6679 (4°C)	<i>Janthinobacter spec.</i>
G4	1066 (10°C)	<i>Nocardioides kribbensis</i>
G5	1066 (10°C)	<i>Nitrospira spec. Gall</i>
G6	1052 (10°C)	<i>Chloroflexi spec.</i>
G7	1052 (10°C)	<i>Janthinobacter spec.</i>
G8	1052 (10°C)	Betaproteobakterium 6678/80 (<i>Candidatus Nitrotoga arctica</i>)
G9	1066 (10°C)	<i>Nitrobacter spec.</i>

5.3.4.6 Sedimente der Laptev-See

In dem folgenden TGGE-Profil sind sowohl Naturproben als auch marine Anreicherungskulturen von NOB analysiert worden (Abbildung 26). In den Anreicherungskulturen Laptev-See F2 und S11 konnten die gleichen Sequenzen detektiert werden, die auch in den Naturproben des Transsektes nachgewiesen werden konnten. In der Kultur S11 sind beide Sequenzen enthalten, während in der Kultur F2 nur ein Stamm angereichert wurde (Tabelle 25).

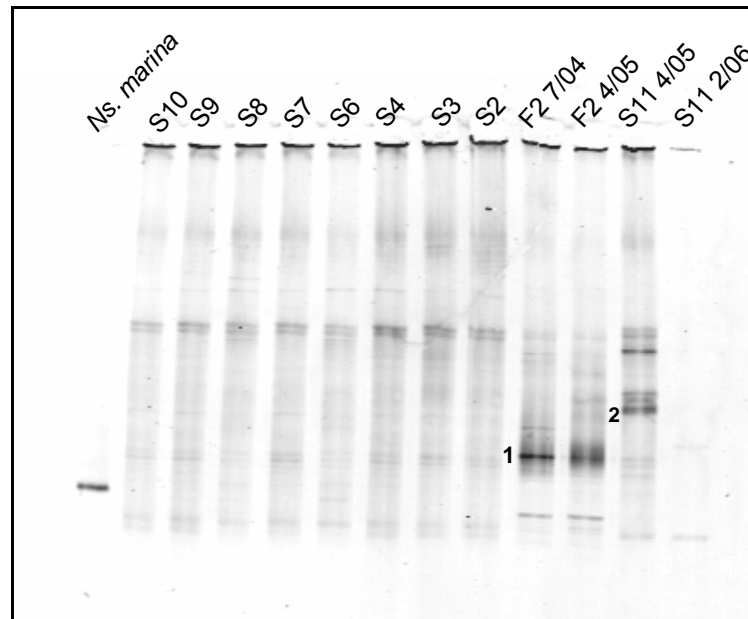


Abbildung 26: TGGE-Profil von PCR-Produkten aus Naturproben (S2, S3-S10) und Kulturen der Laptev-See (F2 und S11). *Nitrospira marina* als Referenz. Ziffern bezeichnen extrahierte und sequenzierte DNA-Banden. (Eubakterien-Primerset, 640bp)

Tabelle 25: Taxonomische Zuordnung von 16S rRNA Sequenzen. Kulturen von den Sedimenten der Laptev-See. (Eubakterien-Primerset, 640bp)

Bezeichnung der DNA-Bande	Höchste Übereinstimmung bei Sequenzvergleichen	Sequenz-bezeichnung
1	<i>Nitrospira marina</i>	Laptev-See F2
2	<i>Nitrospira marina</i>	Laptev-See S11

Um die Untersuchungen der beiden neuen marinen NOB zu beschleunigen, wurde das *Nitrospira* semi-spezifische Primerset eingesetzt. In Abbildung 27 sind die PCR-Produkte des Primersets EUB341F/Nsp662R dargestellt. Hierbei zeigte sich, dass die beiden Kulturen S11 und F2 je einen unterschiedlichen *Nitrospira*-ähnlichen Stamm enthalten. Die Sequenzen der Reinkultur *Ns. marina* und der Anreicherungen Laptev-See S11 und F2 wiesen starke Abweichungen auf, so dass sie im TGGE-Profil anhand der Laufweite voneinander zu trennen waren.

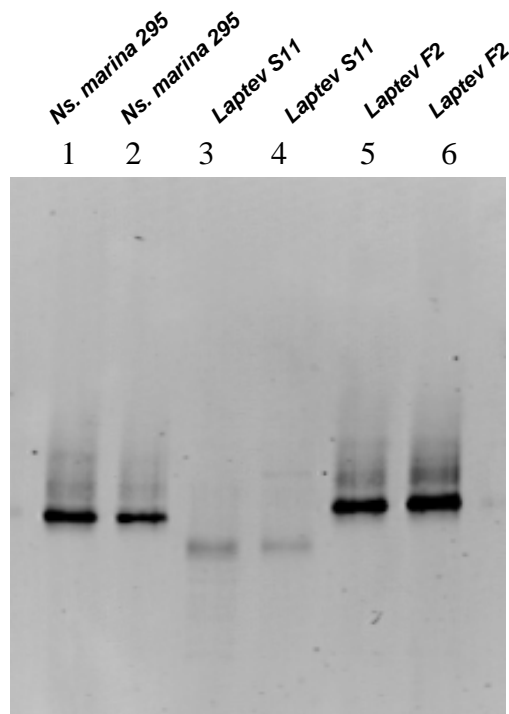


Abbildung 27: *Nitrospira*-spezifisches TGGE-Profil von den Kulturen F2 und S11 aus Sedimenten der Laptev-See. *Nitrospira marina* als Referenz

5.3.5 Gattungsspezifisches 16S rRNA Gen-Screening

Mittels 16S rRNA Analysen von Naturproben und Anreicherungskulturen konnte die Diversität von NOB in permafrostbeeinflussten Gebieten aufgedeckt werden. Entscheidend war, dass mit der TGGE-Technik und der Verwendung universeller Eubakterien-Primern auch Bakterien und Gattungen detektiert wurden, die noch nicht bekannt waren. Anhand der so erhaltenen Sequenzen wurden neue im Besonderen für dieses Habitat abgestimmte Primerkombinationen entwickelt und die Gesamtheit der Proben nach NOB gescreent. In der Tabelle 26 sind die Ergebnisse des Screenings dargestellt. Es konnten *Nitrobacter*- und *Nitrospira*-ähnliche Bakterien wie auch '*Candidatus Nitrotoga arctica*' nachgewiesen werden. Auffällig ist, dass *Nitrobacter* selten bei Temperaturen unter 10°C angereichert werden konnte. Bei niedrigen Temperaturen von 4-10°C konnte sich *Nitrospira* gegenüber *Nitrobacter* in den Kulturen durchzusetzen. Temperaturen über 22°C wirkten bei allen *Nitrospira*-ähnlichen Bakterien sowie für die neue Art der *Betaproteobacteria* bereits inhibierend.

Auch an anderen Probenahmeorten konnte das Vorkommen mehrerer *Nitrospira* und *Nitrobacter*-ähnlicher Bakterien nebeneinander im gleichen Habitat aufgezeigt werden. Nur der Selektionsdruck durch Temperatur und Substratangebot ermöglichte es, einzelne

Stämme in einer Kultur anzureichern. Mit Hilfe der TGGE-Technik konnten in einigen Proben bis zu drei verschiedene 16S rRNA Sequenzen der Gattung *Nitrospira* detektiert und sequenziert werden. Es wurden verschiedene Primerkombinationen für die gattungsspezifische Amplifikation verwendet (vergl. Seite 42, Kap. 4.9.2.1, Tabelle 7). Mit denen zum PCR-Nachweis eingesetzten semi-spezifischen Primern für die marinen Gattungen *Nitrococcus* und *Nitrospina* konnte in keiner der Proben ein Signal erhalten werden. Für die Kultur Samoylov 6680 (*Candidatus Nitrotoga arctica*) sowie Laptev-See S11 und F2 wurde zusätzlich anhand von je fünf selektierten Klonen eine vollständige Klonierung des 16S rRNA Gens durchgeführt.

Tabelle 26: Gattungsspezifisches 16S rRNA Gen-Screening der Proben aus Sibirien. Dargestellt sind die Ergebnisse für *Nitrospira*, *Nitrobacter* und des neuen Nitrit oxidierenden Betaproteobakteriums. Nachweis in Naturproben und Anreicherungen. (Freies Feld) kein Test durchgeführt, (+) positiver Nachweis, (-) negativer Nachweis

Proben	<i>Nitrospira</i>				<i>Nitrobacter</i>					Klon 6678/6680; <i>'Candidatus Nitrotoga arctica'</i>			
	Natur- probe	Anreicherung			Natur- probe	Anreicherung				Natur- probe	Anreicherung		
		4°C	10°C	17°C		4°C	10°C	17°C	22°C		4°C	10°C	17°C
6675	+	+	+	+	+	-	+	-		+	-	+	-
6678	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	
6679	+	+	+	+	+	-	-	+	-		+	+	+
6680	+	+	+	+	-	-	-	-		+	+	+	-
6681	+	+	+	+	-	-	-	-		+	+	+	-
6682	+	+	+	+		-	-	-		+	-	+	-
6683	+	+	+	+		-	+	-		+	-	-	
Wall 1	+		+	+		-		+					+
Wall 2	+		+	+		+		+					+
Wall 3	+		+	+		+		+					+
Hang 1	+		+	+		-		-					+
Hang 2	+		+	+		-		-					+
Hang 3	+		+	+		-		-					+
Zentrum 1	+		+	+		-		-					-
Zentrum 2	+		+	+		-		-					+
Zentrum 3	+		+	+		-		-					+
Samoylov Kliff													
3301		-		+		-		+			+	+	+
3302		+		+		-		-			-	+	+
3303		-		+		-		-			+	+	+
3304		+		+		-		-			+	+	+
3305		-		+		-		-			-	+	+
3306		-		+		-		-			-	+	+
3307		-		+		-		-			+	+	+
3308		+		+		-		-			+	+	+
3309		+		+		-		-			+	+	+
3310		-		+		-		-			-	+	+
Kurungnakh													
1051				+	+			+					+
1052	-			+	+		+	+					+
1066	-			+	+		+	+	+				-
Mamontovy Klyk													
105				+			-					-	
106				+			-					-	
107				+			-					-	
109		+	+		-		-			-	+		
207-2	+			+	-			-		-			-
207-6	+			+	+			-		-			-
207-8	+			+	+			-		-			-
207-9	+			+	-			-		-			-
Lena Sedimente													
Lena			+	+	-		-			-		-	

5.4 Taxonomie der NOB, Stammbaumanalysen

5.4.1 Taxonomie der *Nitrobacter*-ähnlichen Sequenzen

In dem Stammbaum (Abbildung 28) wurden *Nitrobacter*-ähnliche Sequenzen, die aus Naturproben und Anreicherungskulturen erhalten wurden, eingerechnet. Es ist zu erkennen, dass die Anreicherungskulturen aus Kurungnakh (1066) und Samoylov (5F/3) mit *Nb. vulgaris* die höchste Ähnlichkeit aufzeigten. Die NOB aus den Kulturen Pf111-113 wiesen eine nahe Verwandtschaft zu *Nb. hamburgensis* auf und sind auf dem untersuchten 16S rRNA Genabschnitt ähnlich der Reinkultur BS5/6 (Dr. E. Spieck, Universität Hamburg) aus einer rumänischen Erzmine. Da bei einigen Primerkombinationen die 16S rRNA Teilsequenz nicht lang genug war, konnten nach dem Alignment keine Sequenzabweichungen zwischen den Arten *Nb. hamburgensis*, *Nb. winogradskyi* und *Nb. alkalicus* festgestellt werden. Diese Sequenzen wurden im Stammbaum nicht berücksichtigt.

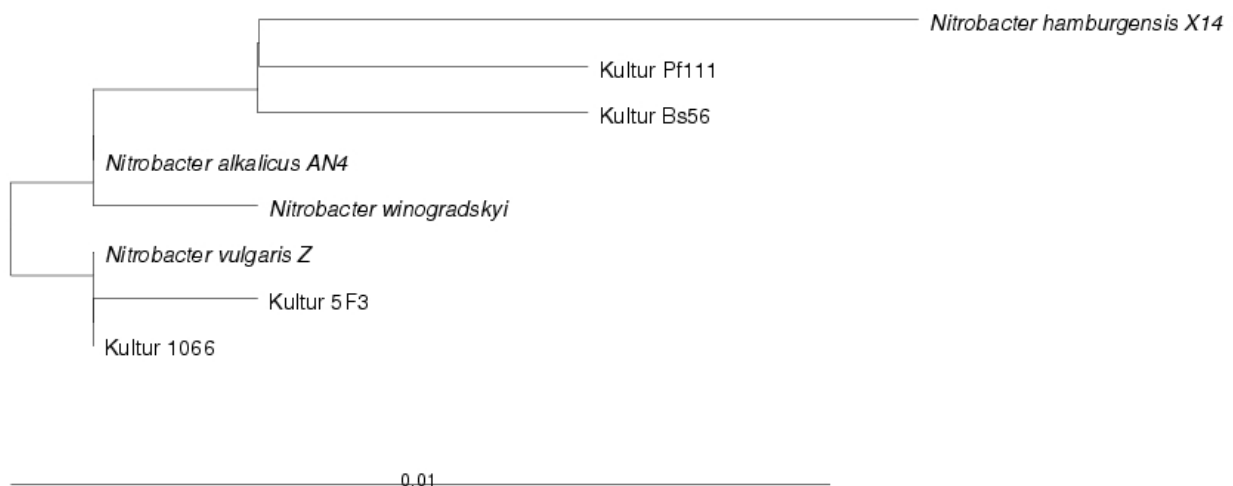


Abbildung 28: Neighbor-Joining Tree. Zuordnung der *Nitrobacter*-ähnlichen Sequenzen. 560bp des 16S rRNA Gens

5.4.2 Taxonomie der *Nitrospira*-ähnlichen Sequenzen

In dem Stammbaum (Abbildung 29) sind alle *Nitrospira*-ähnlichen Sequenzen, die in diesen Untersuchungen aus Naturproben und Anreicherungskulturen erhalten wurden, mit den beiden charakterisierten Reinkulturen *Ns. moscoviensis* und *Ns. marina* verrechnet. Des Weiteren wurden auch Anreicherungskulturen aus anderen Habitaten, wie den heißen Quellen des Garga-Flusses (LEBEDEVA et al., 2005) sowie alle verfügbaren Umweltsequenzen (>1100 bp) aus Internet-Datenbanken mit in die Analyse einbezogen. Es

zeigte sich eine beeindruckende Diversität *Nitrospira*-ähnlicher Bakterien in den Böden Sibiriens. Es wurden 10 unbekannte *Nitrospira*-ähnliche Bakterien aus den nordsibirischen Tundrenböden von Samoylov, Kurungnakh und Mamontovy Klyk, eines aus Sedimenten der Lena sowie zwei marine aus Sedimenten der Laptev-See angereichert. Die Stammbaumanalysen deuten darauf hin, dass nicht nur Stämme aus bekannten Clustern innerhalb der Gattung *Nitrospira* detektiert und angereichert wurden.

Die erhaltenen Sequenzen konnten mit einer Ausnahme zu vier der fünf bekannten *Nitrospira*-Cluster zugeordnet werden (Tabelle 27). Lediglich aus dem von DAIMS et al. (2000) beschriebenen Cluster III mit Umweltklonen aus den Nullarbor Caves (HOLMES et al., 2001) konnten keine Vertreter detektiert werden. Die Sequenz 6678b (17°C) aus Samoylov konnte nicht eindeutig einem Cluster zugewiesen werden, die Einordnung blieb daher offen.

Wie bereits aus den physiologischen Untersuchungen hervorging, sind die beiden marinen Stämme Laptev-See S11 und F2 eindeutig zu unterscheiden. Während der Stamm F2 eine hohe Ähnlichkeit mit dem 16S rRNA Gen von *Nitrospira marina* aufwies, bildete die Kultur S11 ein eigenes Cluster mit verschiedenen marinen Umweltklonen. Bereits bei der Entwicklung der spezifischen Primer für die Spezies Laptev-See S11 und F2 konnten signifikante Unterschiede der 16S rDNA Sequenz festgestellt werden. Aus dem Neighbor-Joining Tree ist die Verzweigung in zwei Cluster deutlich geworden. Auch die physiologischen Untersuchungen und die ermittelten Fettsäuremuster (Dr. Lipski, Univers. Osnabrück) wiesen eindeutig auf zwei unterschiedliche Arten hin. Es wurde bereits von DAIMS et al., (2006) vorgeschlagen, eine Erweiterung der auf die Artdefinition bezogenen Cluster-Bezeichnung IV, auf Cluster IVa und IVb vorzunehmen. *Nitrospira marina* und der Stamm Laptev-See F2 wurden dem Cluster IVa zugewiesen. Die Kultur Laptev-See S11 und drei weitere Umweltsequenzen bilden das Cluster IVb (Tabelle 27, Abbildung 30).

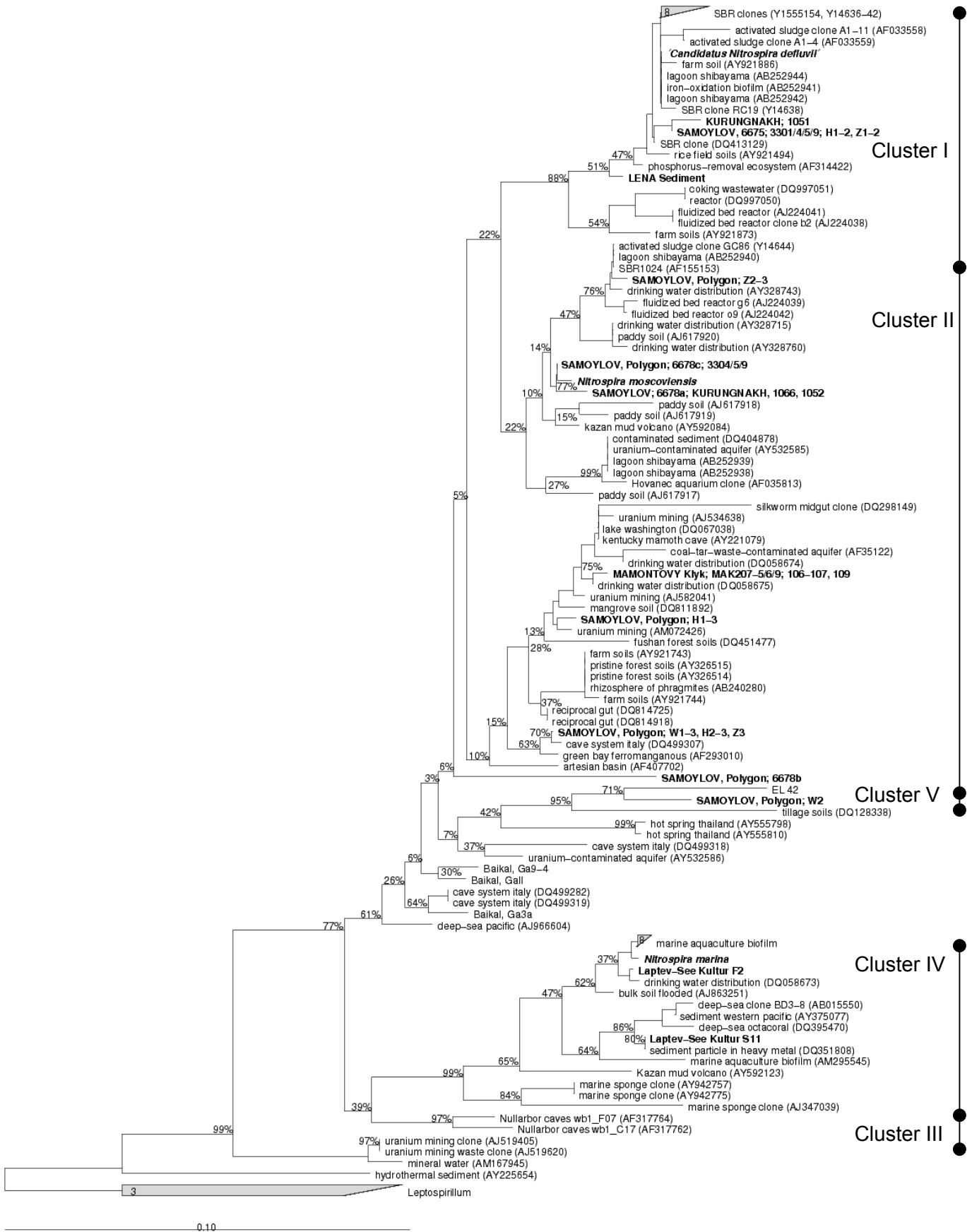


Abbildung 29: Neighbor-Joining Tree. Zuordnung der nachgewiesenen *Nitrospira*-ähnlichen Sequenzen aus permafrostbeeinflussten Böden Nordsibiriens sowie Sedimenten der Lena und der angrenzenden Laptev-See. 276 bp des 16S rRNA Gens

Tabelle 27: Taxonomische Zuordnung von 16S rRNA Sequenzen zu den bekannten Clustern der Gattung *Nitrospira*

Cluster-Einteilung (verändert nach DAIMS et al., 2001)		<i>Nitrospira</i> -ähnliche Sequenzen dieser Arbeit
I	(<i>Candidatus Nitrospira defluvii</i>)	Samoylov; 6675, 3301/4/9, H1-2, Z1-2 Kurungnakh; 1051 Lena-Sediment
II	(<i>Nitrospira moscoviensis</i>)	Samoylov; Z2-3 Samoylov; 6678c, 3304/5/9 Samoylov; 6678a, Kurungnakh; 1066, 1052 Samoylov; H1-3 Samoylov; W1-3, H2-3, Z3 Mamontovy Klyk; MAK207-5/6/9, 106-107, 109
III	(Klon Nullarbor caves)	-
IV	(<i>Nitrospira marina</i>)	Laptev-See Sedimente Kultur F2
	(Umweltklone)	
V	vorläufige Einteilung (Kultur EL42)	Samoylov; W2
	unbekannt	Samoylov; 6678b

Die über Klonierung erhaltenen 16S rRNA Sequenzen der *Nitrospira*-ähnlichen Bakterien aus den Kulturen Laptev-See S11 und F2 wurden separat in einem weiteren Stammbaum eingerechnet (Abbildung 30). Die so verglichenen Sequenzen von *Ns. marina* und Umweltsequenzen aus Datenbanken waren ca. 300 bp länger und enthielten entsprechend mehr Daten zur Berechnung von Verwandtschaften.

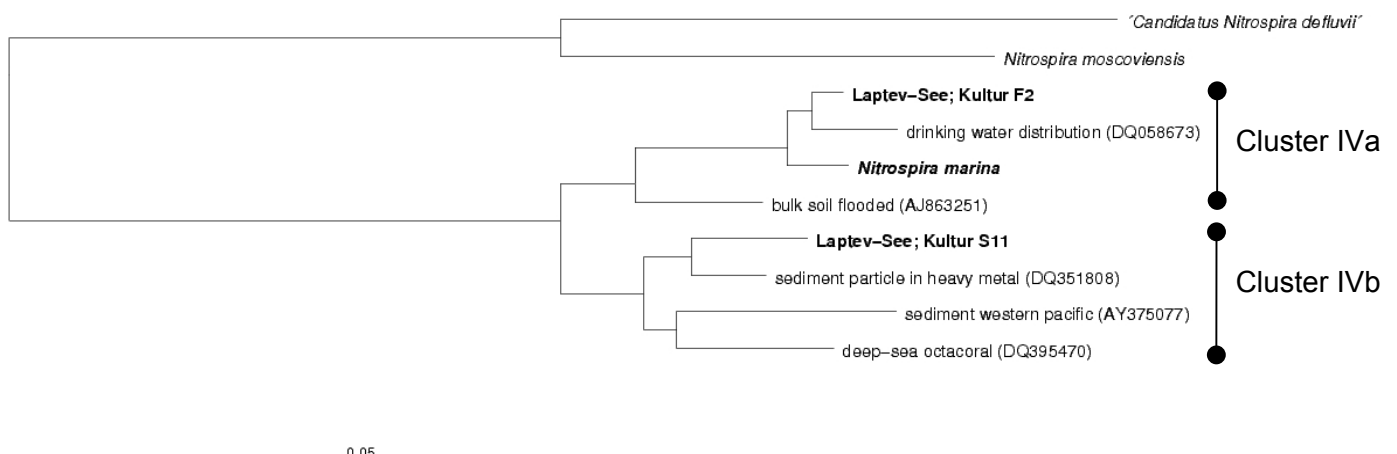


Abbildung 30: Neighbor-Joining Tree. Zuordnung der marinen *Nitrospira*-ähnlichen Sequenzen Laptev-See S11 und F2. 1460 bp des 16S rRNA Gens

5.4.3 Taxonomie des Nitrit oxidierenden Bakteriums aus der Klasse der *Betaproteobacteria* (‘*Candidatus Nitrotoga arctica*’)

In dem Neighbor-Joining Tree (Abbildung 31) sind ausgewählte Vertreter der *Betaproteobacteria* und die neue Linie des NOB eingerechnet. Die Sequenz fällt in eine Gruppe von Umweltklonen und grenzt sich deutlich von bekannten Gattungen ab. Wie aus dem Baum hervorgeht, ist das nächstverwandte Bakterium *Gallionella ferruginea* (HALBECK et al., 1993). Wie jedoch aus der angefertigten Similaritätsmatrix abzuleiten ist, handelte es sich wahrscheinlich um einen Vertreter einer neuen Gattung und nicht um ein unmittelbar mit *Gallionella ferruginea* verwandtes Bakterium. Lediglich vier der verfügbaren Umweltsequenzen fielen in das Cluster der Sequenz 6678/80 aus Samoylov.

Die vier über die Internetdatenbanken (RDP-II und NCBI) ermittelten Sequenzen mit Similaritätswerten von über 96 % wurden in einer Ähnlichkeits-Matrix berechnet (Tabelle 28). Mit lediglich 93,5 % Similarität wurde als nächstverwandtes Taxon das psychrophile Eisen-Schwefel oxidierende Bakterium *Gallionella ferruginea* ermittelt. Die nächstverwandte Umweltsequenz vom Klon Run-S67 (AC-Nr.: AB247475, LEE et al., 2006) stammt aus einem Bioreaktor zur Phosphateliminierung eingeleiteter kommunaler Abwässer in Japan. BRÜMMER et al., (2003) erhielt aus einem 16S rRNA Screening der Elbe und dem Nebenfluss Spittelwasser den Klon Elb168 (AC-Nr.: AJ421928). Für die beiden Sequenzen der nicht näher beschriebenen Umweltklone BG.g12 (AC-Nr.: DQ228379, SKIDMORE et al., 2005) aus subglazialen Wasser eines Gletschers und c5LKS43 aus Sedimenten des mesotrophen Lake Kinneret in Israel (AC-Nr.: AM086129, SCHWARZ et al., 2007) wurden bereits weit weniger Übereinstimmungen in der Basenabfolge von unter 98 % ermittelt.

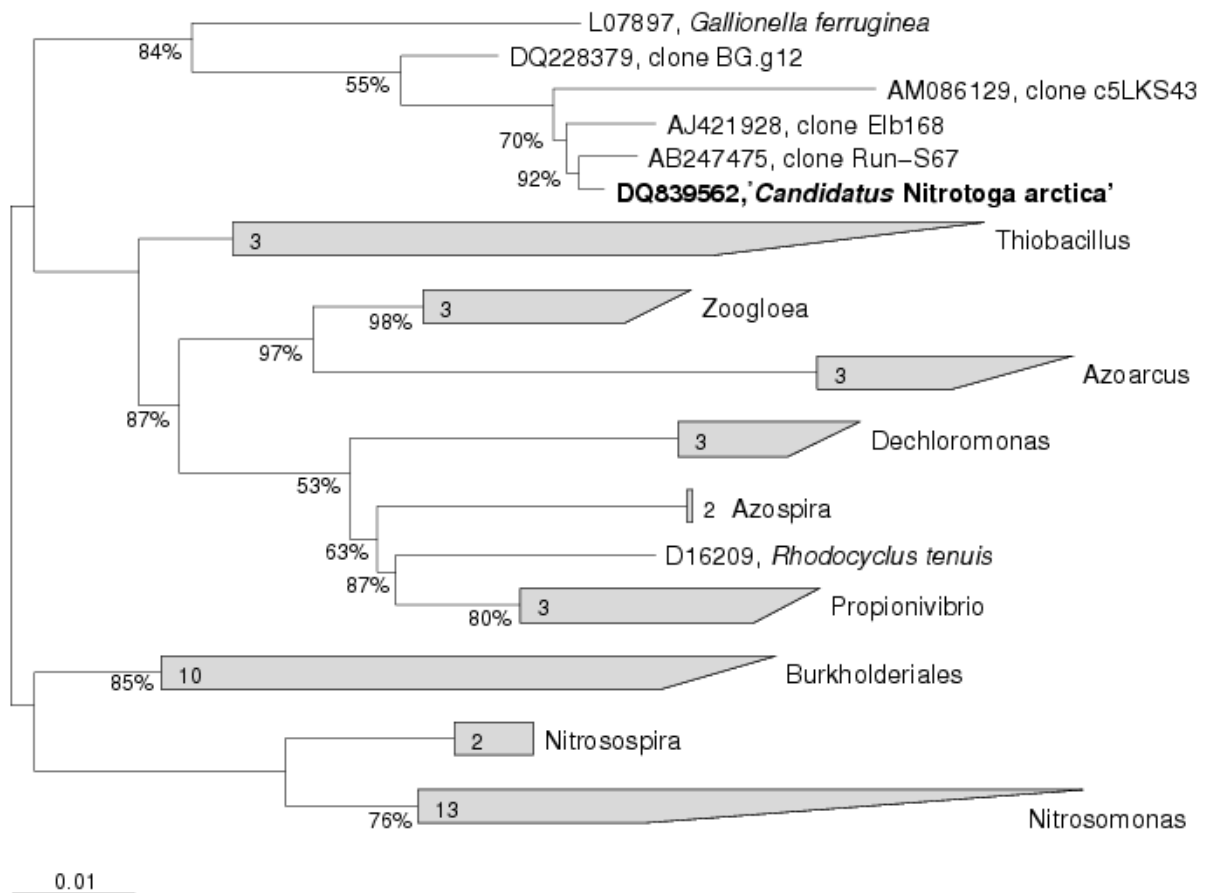


Abbildung 31: Neighbor-Joining Tree. Zuordnung des Nitrit oxidierenden Betaproteobakteriums 6680 (*'Candidatus Nitrotoga arctica'*). 1416 bp des 16S rRNA Gens

Tabelle 28: Berechnete 16S rRNA Similaritäten zwischen dem NOB Betaproteobakterium 6680 (*'Candidatus Nitrotoga arctica'*) und den nächstverwandten Sequenzen (1416 bp, verfügbare Sequenzen > 96 % Similarität)

Bezeichnung und Ursprung	16S rRNA Similarität [%] mit (<i>'Candidatus Nitrotoga arctica'</i>)
AB247475 Umweltsequenz; kommunale Abwässer	99,0
AJ421928 Umweltsequenz; Biofilm Elbe/Spittelwasser	98,8
DQ228379 Umweltsequenz; subglaziales Wasser eines Gletschers	97,8
AM086129 Umweltsequenz; Sedimente im See Kinneret	96,3
<i>Gallionella ferruginea</i>	93,5

5.5 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

5.5.1 EM von '*Candidatus Nitrotoga arctica*'

Um die Morphologie von '*Candidatus Nitrotoga arctica*' zu untersuchen wurden von Tina Sanders (T. Sanders, 2006. Diplomarbeit) Aufnahmen mittels Transmissions-Elektronen-Mikroskopie (TEM) angefertigt (Abbildung 32). Die Kultur wurde bei 10 °C inkubiert. In den TEM-Aufnahmen wurden hauptsächlich Kurzstäbchen mit stark vergrößertem Periplasma gefunden. Intracytoplasmatische Membranen (ICM's) waren nicht vorhanden. Die Ultrastruktur der Bakterienzelle weicht somit von den bekannten NOB ab.

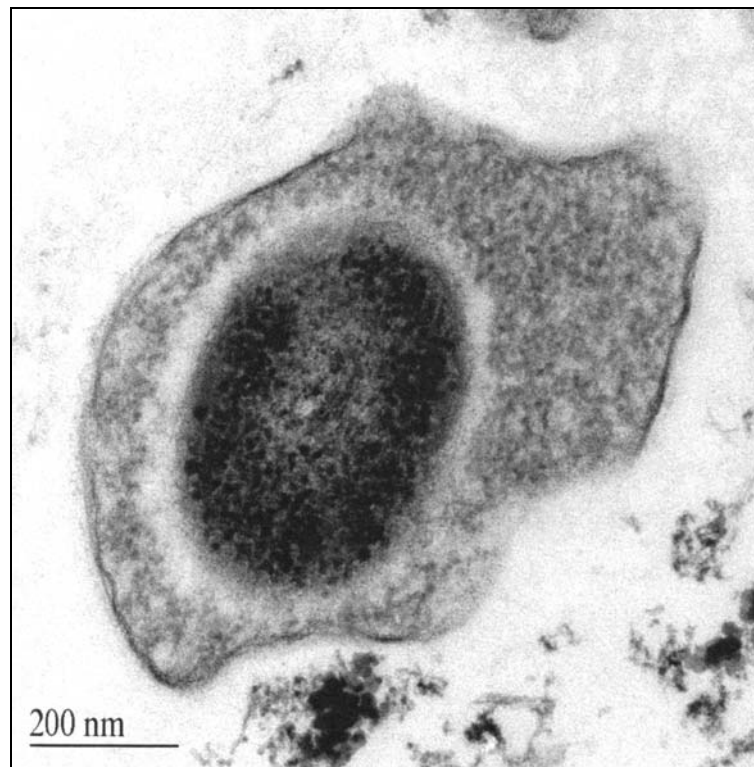


Abbildung 32: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Einzelzelle von '*Candidatus Nitrotoga arctica*'. Der Durchmesser des Cytoplasmas beträgt ca. 450 nm, der Durchmesser der gesamten Zelle ca. 900 nm. P: Periplasma, CM: Cytoplasmamembran. Größenbalken 200 nm (Aufnahme Tina Sanders)

5.5.2 EM von marinen Anreicherungskulturen

Bereits durch die lichtmikroskopische Betrachtung der Kulturen Laptev-See S11 und F2 waren Unterschiede in der Zellgestalt zu beobachten. Während in der Kultur S11 makroskopisch sichtbare Flockenstrukturen überwogen, waren in Kultur F2 nur einzelne Kurzstäbchen und stäbchenförmige Bakterien zu beobachten. Um weitreichendere Informationen über die Morphologie dieser beiden NOB zu erhalten, wurden EM-Aufnahmen angefertigt.

In der stark angereicherten Kultur Laptev-See S11 aus dem Sediment der Laptev-See dominierten Zellaggregate oder Mikrokolonien. Die Zellwände sind deutlich zu erkennen, ebenso wie eine durchgehende Abgrenzung der Kolonie nach außen hin (Abbildung 33).



Abbildung 33: Ultra-Dünnschnitt einer Mikrokolonie der marinen NOB der Kultur Laptev-See S11

Die marine Kultur F2 zeigte eine gänzlich andere Morphologie. In dieser Kultur dominieren Spirillen-ähnliche Zellformen. Kolonien wie bei Kultur S11 waren nicht zu beobachten (Abbildung 34).

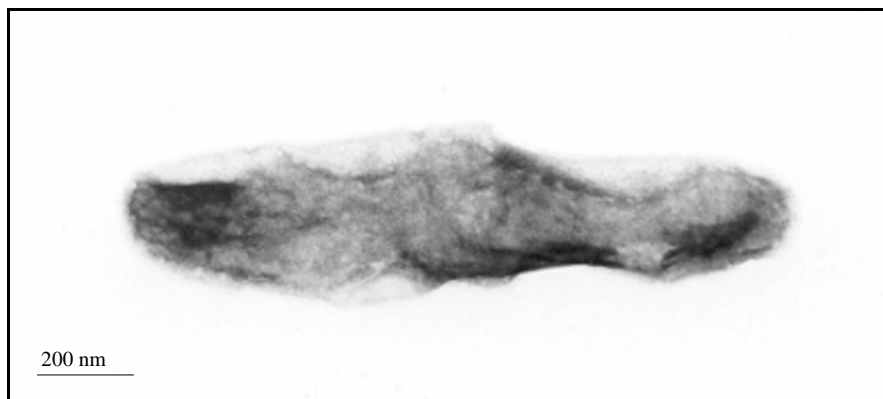


Abbildung 34: Typische Zellgestalt des marinen NOB der Kultur Laptev-See F2 (Kontrastierung mit Uranylacetat)

5.6 Identifizierung mit immunologischen Methoden

5.6.1 IF-Färbung an marinen Anreicherungskulturen

Um die taxonomische Zuordnung der NOB aus den Laptev-See Sedimenten zu untermauern, wurden Fluoreszenz markierte Antikörper gegen das Schlüsselenzym der NOB eingesetzt. In beiden Kulturen konnte die spezifische Kopplung des Antikörpers Ak153-3 nachgewiesen werden (Abbildung 35). In der Kultur F2 (22°C) konnten neben Mikrokolonien auch einzelne freie Zellen nachgewiesen werden.

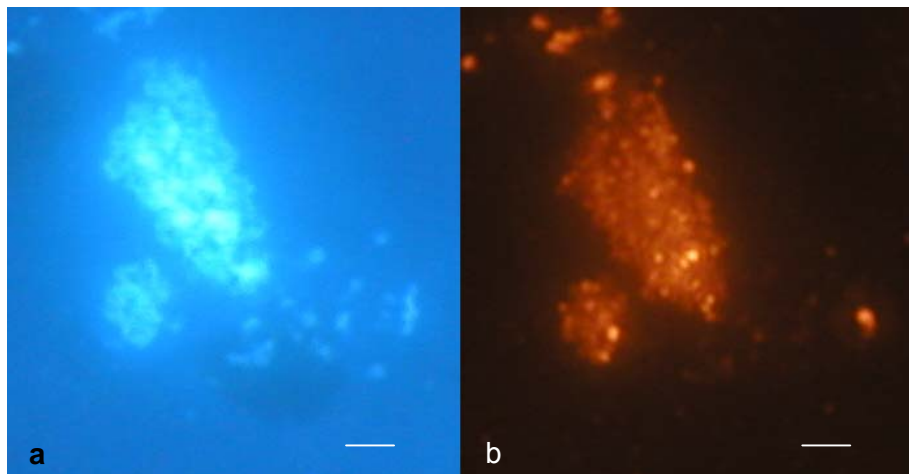


Abbildung 35: Gattungsspezifische Färbung mit dem Antikörper Ak153-3. Mikrokolonie und einzelne Zellen von NOB in der marinen Kultur F2. a: DAPI, b: Cy3 markierter Antikörper. Größenbalken 1 µm

5.7 Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung (FISH)

5.7.1 FISH mit marinen Anreicherungskulturen

Die taxonomische Zuordnung der NOB aus den Laptev-See Sedimenten wurde mittels Fluoreszenz markierten Oligonukleotid Sonden bestätigt. Sowohl in der Kultur Laptev-See S11 (22°C) (Abbildung 36, Abbildung 37) wie auch bei F2 (22°C) konnte die erfolgreiche Bindung der *Nitrospira*-spezifischen Sonde Nsp662 nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den EM-Untersuchungen dominierten in beiden Proben Mikrokolonien, nur wenige einzelne Zellen waren zu beobachten.

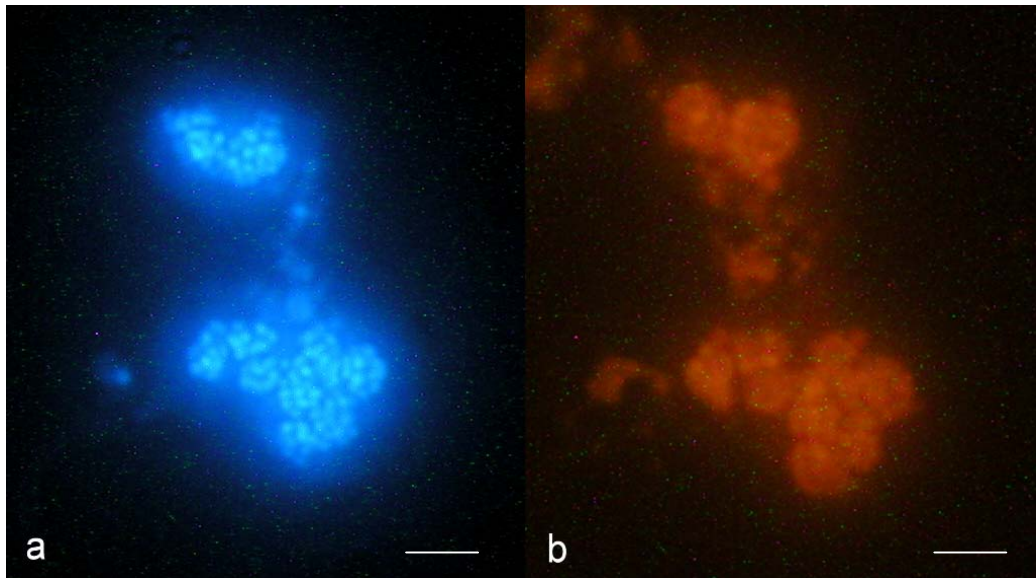


Abbildung 36: Gattungsspezifische Färbung mit der Oligonukleotid Sonde Nsp662. Mikrokolonie und einzelne Zellen NOB in der marinen Kultur Laptev-See F2. a: DAPI, b: Cy3 markierte Sonde. Größenbalken 1 μm

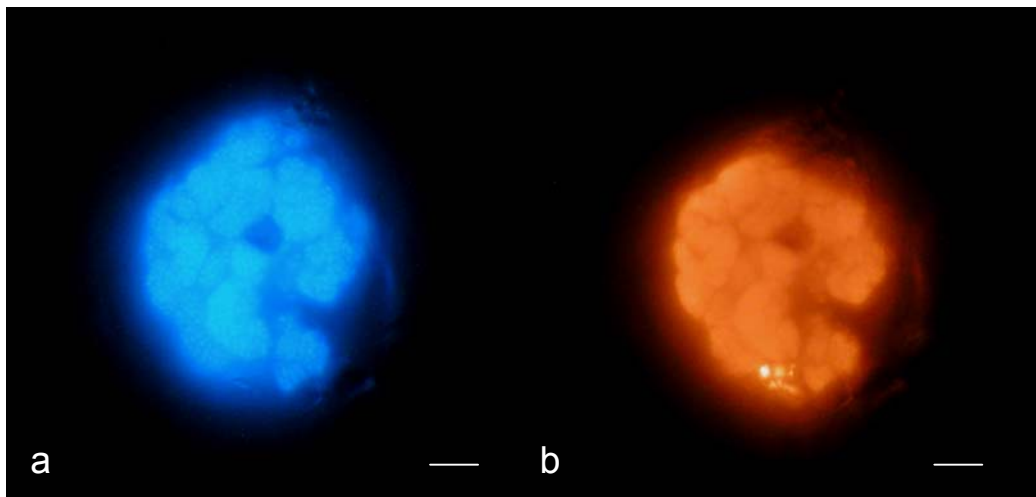


Abbildung 37: Gattungsspezifische Färbung mit der Oligonukleotid Sonde Nsp662. Mikrokolonie von NOB in der marinen Kultur Laptev-See S11. a: DAPI, b: Cy3 markierte Sonde. Größenbalken 1 μm

6 Diskussion

6.1 NOB in permafrostbeeinflussten Gebieten Sibiriens

Die Diversität chemolithoautotropher Nitrit oxidierender Bakterien (NOB) in permafrostbeeinflussten terrestrischen, limnischen und marinen Gebieten Nordsibiriens konnte anhand physiologischer und molekularbiologischer Methoden weiter aufgeklärt werden. Exemplarisch wurden Bodenprofile des Active Layers (Auftauhorizont) aus Samoylov, Kurungnakh und Mamontovy Klyk sowie Sedimente der Lena untersucht. Aufgrund der weiten Verbreitung des submarinen Permafrostes im Nordpolar Meer wurden auch Sedimente der Laptev-See beprobt.

Erstmals wurden mit diesen Untersuchungen NOB aus kalten Standorten charakterisiert. Hierbei konnte eine hohe Vielfalt der NOB nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde ein unbekanntes Nitrit oxidierendes Bakterium aus der Klasse der *Betaproteobacteria* ('*Candidatus Nitrotoga arctica*') angereichert und charakterisiert (ALAWI et al., 2007). NOB aus diesem Taxon waren bisher unbekannt.

Der Active Layer der untersuchten Böden von Samoylov erreichte Mächtigkeiten von 30-50 cm und kann besonders in den Sommermonaten beachtliche biologische Umsätze generieren (VISHNIVETSKAYA et al., 2006). Der Permafrost selbst wurde exemplarisch am Küstenaufschluss in Kurungnakh beprobt. Voraussetzung für ein Wachstum von Bakterien in tiefen Zonen des Permafrostes ist der Anteil ungefrorenen Porenwassers, der bei 2 bis 7 % liegt und zugleich als Cryoprotector gegen Eiskristalle dient (GILICHINSKY & WAGENER, 1995).

Die Relevanz von Bakterienpopulationen in den permanent gefrorenen Permafrostzonen kann sicherlich anhand der geringen Aktivitäten der angereicherten NOB bei Temperaturen um den Gefrierpunkt als sehr niedrig eingestuft werden (GOUNOT, 1986, 1991). Wohingegen der Auftauhorizont des Bodens eine große Diversität an NOB aufweist und gerade im Hinblick auf die globale Temperaturerwärmung und seit vielen Jahren gemessenen Vergrößerung der saisonalen Auftauzone (HUBBERTEN & SCHIRRMESTER, 2006) eine wichtige Funktion im globalen Stoffkreislauf einnimmt.

Durch Schmelzwasser gelangen die in dem Auftauhorizont produzierten Substrate auch in tiefere Zonen des Bodens. Nach FIEDLER et al. (2004) zeigte ein Boden im nassen Polygoncenter aus Samoylov bereits in 5 cm Tiefe Redoxpotenziale von -50 bis -150 mV. Diese niedrigen Redoxwerte bestätigen, dass Sauerstoff für NOB zu einem limitierenden

Faktor werden kann (SCHEFFER & SCHACHTSCHABEL, 2002). Für den Active Layer beschreibt KUTZBACH (2004), dass die in diesen Habitaten dominierende *Carex aquatilis* ein ausgedehntes Aerenchymgewebe in Blättern, Wurzeln und Rhizomen besitzt und daher auch Oberflächen nahen Sauerstoff in tiefere Zonen der Rhizosphäre bringen kann (KUTZBACH et al. 2004). Obwohl aus der Literatur bekannt ist, dass wenige Millimeter bis Zentimeter unter dem Wasserspiegel in Torfböden kaum noch Sauerstoff messbar ist (BENSTEAD & LLOYD, 1994), konnten NOB in Kurungnakh (Probe 1066) auch in Tiefen von fünf Metern nachgewiesen werden.

Um die Diversität und Verbreitung der NOB in Naturproben und Kulturen zu untersuchen, wurden neben Anreicherungstechniken molekularbiologische Methoden eingesetzt. Das TGGE-Monitoring der Kulturen ermöglichte eine frühzeitige Optimierung der Kultivierungsbedingungen und gab Hinweise auf die Temperaturoptima der verschiedenen Stämme. Die Ergebnisse wurden durch den Abgleich mit weiteren Methoden wie der 16S rDNA Klonierung, Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung (FISH), Immun-Fluoreszenz (IF) Färbung und Transmissions-Elektronen Mikroskopie (TEM) ergänzt.

6.1.1 Verbreitung von NOB in permafrostbeeinflussten Böden Sibiriens

Vergleicht man die Umweltanpassungen der NOB an extrem niedrige oder hohe Temperaturen mit anderen Arten der Bakterien und Archaeen, so kann festgestellt werden, dass unter den NOB kein psychrophiles, psychrotolerantes oder thermophiles Bakterium bekannt ist. Bei den Nitrifikanten ist die beste Anpassung an Temperaturen um 5°C bei dem marinen Ammoniak oxidierenden Bakterium *Nitrosomonas cryotolerans* beschrieben worden (JONES et al. 1988). Jedoch zeigt sich lediglich eine Toleranz gegenüber niedrigeren Temperaturen (JONES et al. 1985). Im Rahmen dieser Arbeit konnten kälteadaptierte NOB in terrestrischen, limnischen und marinen Habitaten Nordsibiriens mittels DGGE/TGGE detektiert und angereichert werden. Um einen Eindruck von der *in-situ* Quantität der NOB zu erhalten, wurden MPN-Tests mit selektiven Mineralmedien durchgeführt.

Aus dem Polygonprofil P1 (Insel Samoylov) konnten fünf und aus Profil P2 vier unterschiedliche *Nitrospira*-ähnliche Bakterien angereichert und detektiert werden. Ein spezielles Verbreitungsmuster von NOB wurde im Hinblick auf die Probentiefe festgestellt. Die einzige Sequenz, die in beiden Profilen vorkam, ist auch bei identischer Tiefe (0-5 cm) entnommen worden. Während die Proben des Profils P1 aus verschiedenen Bodenzonen (0-29 cm) entnommen wurden, sind alle Proben des Profils P2 aus 0-5 cm Tiefe. Die am häufigsten nachgewiesene Sequenz (6675) des Profils P2 konnte auch in den Proben des

gleichen Horizonts vom Profil P1 (H1-2 und Z1-2) und dem Kliff auf Samoylov (3301/4/9) nachgewiesen werden. Die Vielfalt deutet auf eine sehr feine Aufteilung der Horizonte in sogenannte Mikrohabitate hin. Eine entsprechend ausgeprägte Spezialisierung an unterschiedliche Bedingungen bei enger räumlicher Nähe wurde bereits für Bakterien der Gattung *Nitrobacter* nachgewiesen (GRUNDMANN & NORMAND, 2000). In beiden Polygonprofilen konnten Bakterien der Gattung *Nitrobacter* und *Nitrospira* sowie das Nitrit oxidierende Betaproteobakterium (6678/6680) 'Candidatus Nitrotoga arctica' nachgewiesen werden.

Nitrit oxidierende Bakterien der Gattung *Nitrobacter* konnten verstärkt im trockenen Wall der Polygonprofile aus Samoylov, aber auch in dem Bohrkern aus Kurungnakh nachgewiesen werden. Die Häufigkeit nachgewiesener *Nitrobacter*-ähnlicher Bakterien in den untersuchten Böden war bei Weitem geringer als die von Vertretern der Gattung *Nitrospira* und von 'Candidatus Nitrotoga arctica'. Dies könnte damit im Zusammenhang stehen, dass *Nitrobacter* andere Sauerstoff- und Substratkonzentrationen bevorzugt als *Nitrospira*-ähnliche Bakterien (BARTOSCH et al., 2002). *Nitrobacter* wurde entsprechend vornehmlich aus Böden isoliert (BOCK & KOOPS, 1992), während die Gattung *Nitrospira* im Hinblick auf die Vielzahl an durchgeführten Untersuchungen, eine höhere Anpassung an marine, limnische und in diesem Fall mit Staunässe gesättigter Böden aufweist. Auch aus Sedimenten der Lena konnten NOB der Gattung *Nitrospira* nachgewiesen werden.

Auffällig war die starke Präsenz von *Nitrobacter*-ähnlichen Bakterien in tieferen Zonen des Tundrabodens. In dem Bohrkern aus Kurungnakh (Probe 1051, 1 m Tiefe; 1066, 5 m Tiefe) konnten neben *Nitrospira*-ähnlichen Bakterien häufig Vertreter der Gattung *Nitrobacter* detektiert werden. In dem Profil des Thermoerosionstals von Mamontovy Klyk wurden in allen Proben *Nitrospira*-ähnliche Bakterien nachgewiesen sowie vereinzelt 'Candidatus Nitrotoga arctica'. *Nitrobacter*-ähnliche Bakterien konnten in drei der fünf Proben nachgewiesen werden.

Die über MPN-Tests ermittelten Zellzahlen von NOB der Polygonprofile P1 und P2 fielen mit maximal $4,3 \times 10^2$ Zellen/g Trockengewicht (TG) verglichen mit Böden anderer Klimazonen sehr gering aus. Auch JANSSEN (1994) erhielt bei seinen MPN-Analysen (17°C Inkubationstemperatur; 3 mM Nitrit) von NOB im Permafrost nur geringe Zellzahlen ($1,2 \times 10^1$ Zellen/g TG). Vergleicht man die Zellzahlen mit denen vom untersuchten Kliff aus Samoylov ($5,7 \times 10^3$ Zellen/g TG), so wird deutlich, dass sowohl die Transportbedingungen, wie im Besonderen auch die gewählte Substratkonzentration im Medium, den MPN-Test entscheidend beeinflussten (siehe Kap.6.1.5, Seite 110). Des Weiteren kann es zu einer Unterschätzung der *in-situ* Zellzahlen kommen, da nicht alle Bakterien in dem

bereitgestellten Medium und Laborbedingungen kultivierbar sind und die in Mikrokolonien vorliegenden Bakterien nicht gleichmäßig bei der MPN-Verdünnungstechnik verteilt werden können. Es ist daher bekannt, dass die realen *in-situ* Zellzahlen um den Faktor 100-1000 höher sein können (BELSER, 1979; PROSSER, 1982; BOTH et al., 1990; BOTH & LAANBROEK, 1991; KOOPS & POMMERENING-RÖSER, 2001). In Böden gemäßigter Zonen wurden hingegen weit höhere Zellzahlen der NOB von bis zu 10^7 Zellen/g Trockengewicht nachgewiesen (ALTMANN et al., 2003; SCHRAMM, 2003). Zu berücksichtigen bleibt, dass Bakterien aus gemäßigten Zonen möglicherweise auch einfacher zu kultivieren sind, und daher auch in MPN-Tests besser erfasst werden. Wird der MPN-Test bei niedrigen Inkubationstemperaturen durchgeführt, führt dies zu einem entsprechend verlangsamten Stoffwechsel der Bakterien. Es lag daher im eigenen Ermessen zu entscheiden, nach wie vielen Wochen oder Monaten der MPN-Test ausgewertet werden sollte. Es ist möglich, dass die Inkubationszeit nicht immer ausreichend lang gewählt wurde. Messungen mit Mikroelektroden (KOBABE et al., 2004; SCHRAMM et al., 1999) und die Real-Time PCR könnten bei Quantifizierungen von NOB in den untersuchten Böden bessere Ergebnisse liefern (HERMANSSON & LINDGREN, 2001; HARMS et al., 2003; KINDAICHI et al., 2006).

Die Untersuchungen zeigen, dass NOB der Gattungen *Nitrobacter*, *Nitrospira* sowie '*Candidatus Nitrotoga arctica*' im Auftauhorizont der Tundrenböden Sibiriens einen festen Bestandteil der Bakterienpopulation darstellen. Somit konnte auch für die Böden des sibirischen Permafrostes die wichtige Bedeutung der am Nitrifikationsprozess beteiligten Bakterien bestätigt werden. Auch in kontinuierlich gefrorenen Zonen in fünf Meter Tiefe (Kurungnakh) wurden kultivierbare NOB nachgewiesen.

Wie die Entdeckung des neuen Bakteriums '*Candidatus Nitrotoga arctica*', einer bisher unbekannten Gattung der *Betaproteobacteria* zeigte, ist die Vielfalt nitrifizierender Bakterien längst nicht aufgeklärt. '*Candidatus Nitrotoga arctica*' wurde in allen vier untersuchten Profilen nachgewiesen. Eine spezifische Verteilung in den Bodenhorizonten oder Polygonstrukturen konnte nicht festgestellt werden. Das durchgeführte PCR- und TGGE-Screening von Naturproben und Kulturen deutete auf eine ähnlich große Population wie die der *Nitrospira*-ähnlichen Bakterien hin. Datenbankabgleiche mit der Sequenz des klonierten 16S rRNA Gens zeigten, dass nahverwandte Umweltsequenzen sowohl in limnischen Gewässern aber auch in kommunalen Abwässern nachgewiesen wurden (BRÜMMER et al., 2003; SKIDMORE et al., 2005; LEE et al., 2006; SCHWARZ et al., 2007), ohne dabei die Beziehung zum Stickstoffkreislauf zu erkennen (Seite 103, Kap. 6.1.2). Infolgedessen wurde vergleichend das Hamburger Klärwerk (Dradenau) untersucht (M. Kaya, 2007. Diplomarbeit) und eine nahezu identische Sequenz nachgewiesen (siehe Anhang, Seite

140, Abbildung 39). Somit ist es möglich, dass 'Candidatus Nitrotoga arctica'-ähnliche Bakterien auch in den gemäßigten Zonen eine entscheidende Bedeutung im Stickstoffkreislauf einnehmen. Die Verbreitung und Bedeutung dieses neuen NOB kann mittels der entwickelten Primer und der FISH-Sonde künftig auch in anderen Ökosystemen untersucht werden.

6.1.2 Diversität von NOB in permafrostbeeinflussten Böden Sibiriens

Die Anzahl isolierter Nitrit oxidierender Bakterien beschränkt sich derzeit auf lediglich 11 mesophile Arten, von denen acht beschrieben sind (WATSON et al., 1989; SPIECK & BOCK, 2001). Das langsame lithoautotrophe Wachstum und die aufwendige Kultivierung bedingen die relativ geringe Anzahl verfügbarer Reinkulturen. Die Diversität von NOB wurde jedoch nicht vollständig erfasst, neue Arten wurden zuletzt auch in extremen Habitaten wie heißen Quellen nachgewiesen (LEBEDEVA et al., 2005). Neuere Untersuchungen deuten zum Beispiel darauf hin, dass auch Ammoniak oxidierende Archaeen an dem Prozess der Nitrifikation beteiligt sind (KÖNNEKE et al., 2005; FRANCIS et al., 2005).

Ziel dieser Arbeit war es, neben den physiologischen Anpassungspotenzialen der NOB auch die Verbreitung und phylogenetische Diversität zu erfassen. Frühere Studien in Permafrostgebieten Sibiriens (GILICHINSKY & WAGENER, 1995) wiesen bereits auf die Diversität und Quantität von Mikroorganismen im Permafrost hin. ZHOU et al. (1996) beschrieben ebenfalls eine große Diversität und das Vorkommen unbekannter Gattungen und Arten in Tundrenböden von Kolyma. Diese angesprochene Diversität von Bakterien in Permafrostgebieten wurde auch in dieser Arbeit bestätigt. Es konnten drei *Nitrobacter*-ähnliche sowie 13 *Nitrospira*-ähnliche Sequenzen aus Naturproben und Anreicherungen erhalten werden.

Die nachgewiesene Diversität der *Nitrobacter*-ähnlichen Bakterien erreichte bei weitem nicht die Vielfalt der *Nitrospira* Stämme, die in den permafrostbeeinflussten Böden nachgewiesen wurden. Aufgrund der hohen Ähnlichkeit der 16S rRNA Gene von Vertretern der Gattung *Nitrobacter*, lieferte die Untersuchung partieller Genabschnitte wenig Daten für die taxonomische Zuordnung. Wie aus den Neighbor-Joining und phylogenetischen Analysen hervorgeht, weisen die DNA-Sequenzen der Kulturen PF111-113 mit *Nitrobacter hamburgensis* die höchsten Übereinstimmungen auf. Die Kulturen 5F/3 und 1066 weisen hingegen auf eine hohe Verwandtschaft mit *Nitrobacter vulgaris* hin. Mehrere Untersuchungen zeigten bereits, dass *Nitrobacter*-Arten in unterschiedlichsten Bodentypen

vorkommen (DEGRANGE & BARDIN, 1995; GRUNDBACH et al., 2000), psychrotolerante Arten wie die aus den untersuchten Böden Sibiriens waren bisher jedoch unbekannt.

Überraschend war die nachgewiesene Diversität innerhalb der Gattung *Nitrospira*. Anhand von Sequenzanalysen des 16S rRNA Gens konnten 11 Stämme der Gattung *Nitrospira* in den nordsibirischen Tundra-Böden sowie eine in dem Sediment der Lena nachgewiesen werden. Hinzu kommen zwei marine Vertreter, die mit *Nitrospira marina* die höchste Übereinstimmung auf dem untersuchten Genabschnitt aufwiesen. Wie aus den Stammbaumanalysen hervorgeht, sind die unterschiedlichen Stämme nicht aus einem Cluster innerhalb der Gattung, sondern bis auf eine Ausnahme in vier der beschriebenen fünf Cluster (DAIMS et al., 2001) wieder zu finden. Die partielle 16S rRNA Sequenz der Kultur 6678b (17°C) aus Samoylov bildet ein eigenes bisher nicht beschriebenes Cluster. Die von DAIMS et al. (2001) eingeführte Unterteilung in 4 Cluster (vorläufig 5) schien zunächst jeweils eine Art der Gattung zu umfassen. Die in dieser Arbeit durchgeführten 16S rRNA Analysen lassen jedoch aufgrund der starken Sequenzabweichungen innerhalb eines Clusters vermuten, dass mehrere teils unkultivierte neue Arten in einem Cluster enthalten sind. Die endgültige Festlegung der Taxonomie, also die Definition von Art oder Stamm, kann entsprechend nur über DNA-DNA Hybridisierungen von Reinkulturen oder mittels umfangreicher Genomanalysen erstellt werden.

Am häufigsten konnten die Stämme aus dem Cluster I (*Candidatus Nitrospira defluvii*) und Cluster II (*Nitrospira moscoviensis*) detektiert werden. Die Sequenzen dieser Gruppen wurden in nahezu jedem der untersuchten Böden nachgewiesen. Auch in gemäßigten Klimazonen sowie künstlichen Systemen wie Klärwerken (DAIMS et al., 2001) sind Bakterien dieses Clusters besonders häufig zu finden. Die unterschiedlichen Temperaturbedingungen in den natürlichen Habitaten dieser Spezies verdeutlichen das hohe Anpassungspotenzial der *Nitrospira*-ähnlichen Bakterien. Da keine Reinkulturen hergestellt werden konnten, und somit mehrere Stämme in den Kulturen koexistierten, war kein Zusammenhang zwischen der phylogenetischen Gruppierung und den physiologischen Eigenschaften wie ermittelten Temperaturoptima ersichtlich. Die Präsenz von *Nitrospira*-ähnlichen Bakterien (Cluster I) in der Lena zeigt, dass auch in europäischen Flüssen, wie die von CÉBRON et al. (2003) untersuchte Seine in Frankreich nicht ausschließlich nach *Nitrobacter*-ähnlichen Bakterien gesucht werden sollte.

Bisher waren lediglich zwei Umweltsequenzen *Nitrospira*-ähnlicher Bakterien aus Cluster V bekannt. Im Bodenprofil P1 auf der Insel Samoylov konnte jedoch ein neuer Vertreter dieses Clusters gefunden werden. Informationen über Bakterien dieses Clusters sind bis heute nur von dem moderat thermophilen Stamm EL42 (LEBEDEVA et al., eingereicht)

verfügbar. Die Sequenz des anderen Umweltklons (R. Upchurch; DQ128338) wurde im Ackerboden (Griechenland) gefunden. Offenbar weisen die Arten dieses Clusters signifikant abweichende Temperaturoptima auf, und besiedeln entsprechend unterschiedliche Habitattypen.

Die Tatsache, dass die erfasste Diversität nicht ausschließlich aus unbekanntem Arten, sondern auch um bisher unbekanntem Gattungen erweitert werden konnte, ist in erster Linie den TGGE-Analysen und Hinweisen aus Fettsäure-Analysen zu verdanken. Durch die Verwendung unspezifischer Eubakterien-Primer konnte das Betaproteobakterium '*Candidatus Nitrotoga arctica*' gefunden werden (ALAWI et al., 2007). Die durchgeführte 16S rRNA-Stammbaumanalyse und das Fettsäureprofil (Dr. Lipski, Universität Osnabrück; Alawi et al., 2007) der Kultur wiesen auf eine bisher unbekanntem Linie innerhalb der *Betaproteobacteria* hin. Die Ergebnisse wurden durch 16S rDNA Klonierungen, FISH-Analysen, IF-Färbungen und mittels Elektronen Mikroskopie bestätigt.

Bei Quantifizierungen der Eubakterienpopulation in Tundra-Böden Nordsibiriens (KOBABE et al., 2004) konnte bereits dargelegt werden, dass die Klasse der *Betaproteobacteria* bis in Tiefen von 40 cm gegenüber allen anderen Klassen am stärksten vertreten ist (20 % aller Eubakterien). SCHRAMM (2003) hat bei seinen Untersuchungen von Fluss-Sedimenten bereits auf die Möglichkeit unbekannter NOB hingewiesen, konnte sie jedoch mit den bekannten Primern nicht erfassen. Durch Abgleiche mit Gen Datenbanken konnten auch Hinweise über '*Candidatus Nitrotoga arctica*'-ähnliche Umweltsequenzen gewonnen werden. Mit lediglich 93,5 % Similarität auf dem 16S rRNA Gen wurde als nächstverwandtes Taxon das Eisen-Schwefel oxidierende Bakterium *Gallionella ferruginea* (HALBECK et al., 1993) ermittelt.

Die Untersuchungen von BARTOSCH et al., (2002) berichteten über eine Koexistenz von *Nitrobacter*- und *Nitrospira*-ähnlichen Bakterien in den Böden Sibiriens. In einigen untersuchten Bodenprofilen der vorliegenden Arbeit konnten neben einem Vertreter der Gattung *Nitrobacter* auch vier weitere der Gattung *Nitrospira* und '*Candidatus Nitrotoga arctica*' im selben Habitat detektiert. Eine solche Vielfalt von NOB ist weder von Böden noch limnischen Systemen bekannt. Selbst in künstlichen Systemen wie Klärwerksanlagen konnte diese hohe Diversität nicht registriert werden (JURETSCHKO et al., 2002).

Die aufgedeckte Artenvielfalt von NOB in Tundrenböden Sibiriens könnte durch die vielen unterschiedlichen Mikrohabitate bestimmt werden. Die Bakterien besiedeln hierbei ökologische Nischen und sind auf bestimmte Parameter wie Temperatur, Sauerstoffkonzentration, Salzgehalt und Substratkonzentration spezialisiert (ANDREWS &

HARRIS, 1986; DAIMS et al., 2006; MAIXNER et al., 2006). So könnte zum Beispiel die starke Präsenz von *Nitrobacter* in den Bohrkernproben aus Kurungnakh, mit der beschriebenen Fähigkeit auch unter anaeroben Bedingungen Energie gewinnen zu können, erklärt werden. Es ist auch bekannt das *Nitrobacter* höheren Salzkonzentrationen als *Nitrospira*-ähnliche Bakterien standhält.

6.1.3 Verbreitung und Diversität von NOB in Sedimenten der Laptev-See

Die Laptev-See mit dem angrenzenden sibirischen Hinterland ist eine Schlüsselregion für das Verständnis von Umweltveränderungen (RACHOLD et al., 1999). Seit 1993 werden in diesem Gebiet multidisziplinäre Untersuchungen im Rahmen des bilateralen BMBF Verbundvorhabens „System Laptev-See“ durchgeführt (BAUCH et al., 2006; HUBBERTEN & SCHIRRMEISTER, 2006).

Die über den MPN-Test ermittelten Zellzahlen der nitrifizierenden Bakterien im Sediment, fielen mit 10^1 - 10^2 Zellen/g TG sehr niedrig aus. Wie bereits erwähnt, ist der statistische Fehler dieser Methode sehr hoch und die berechneten Zellzahlen fallen häufig zu niedrig aus (BELSER, 1979; PROSSER, 1982; BOTH et al., 1990; BOTH & LAANBROEK, 1991; KOOPS & POMMERENING-RÖSER, 2001). In der Literatur werden für NOB an der Nordseeküste und anderen Küstengebieten Europas Zellzahlen von 10^2 - 10^4 Zellen/g TG (MACFARLANE & HERBERT, 1984) und für Ammoniakoxidanten teils 10^7 Zellen/ml⁻¹ genannt (WARD et al., 1989; ZEHR & WARD, 2002). Wie bereits HERBERT (1997) diskutierte, weist die MPN-Methode für eine Zellzahlbestimmung von marinen Nitrifikanten hohe statistische Ungenauigkeiten auf. Immunfluoreszenz Färbungen (IF) der Zellen und FISH-Analysen können zwar ergänzend eingesetzt werden, jedoch ist auch für diese Techniken bekannt, dass die *in-situ* Zellzahlen unterschätzt werden (WARD, 1996). Die Quantifizierung mittels Real-Time PCR scheint die zuverlässigsten Ergebnisse zu liefern, derzeit wurde sie nur für die Untersuchung anderer Bakteriengruppen in marinen Sedimenten eingesetzt (LELOUP et al., 2007).

Im Gegensatz zu den Auftauhorizonten der Böden, wurden in den untersuchten Sedimenten der Laptev-See das gesamte Jahr über sehr konstante Temperaturen von -1,4°C bis -2,4°C gemessen (HÖLEMANN et al., 2006). Die in den Sedimenten der Laptev-See nachgewiesenen *Nitrospira*-ähnlichen Bakterien (Kultur/Klon S11 und F2) konnten anhand von Stammbaumanalysen dem Cluster IV zugeordnet werden (Abbildung 29). Die 16S rDNA Sequenzen dieser beiden NOB waren in allen Sedimentproben nachweisbar. Die aus wärmeren Ozeanen isolierten Bakterien der Gattungen *Nitrococcus* und *Nitrospina* (WATSON & WATERBURY, 1971) konnten mittels PCR nicht nachgewiesen werden.

Jedoch muss berücksichtigt werden, dass nur wenige 16S rRNA Sequenzen dieser Gattungen über Internet-Datenbanken verfügbar sind und daher möglicherweise neue Vertreter von den Primern nicht erfasst werden. Vergleichend zu den NOB wurde neben der MPN-Zellzahlbestimmung von AOB auch die Kultur Laptev-See AOB-S11 physiologisch untersucht. Die psychrotolerante Kultur war ebenso wie die nachgewiesenen NOB an die niedrigen in-situ Temperaturen angepasst. Somit ist ein vollständiger Nitrifikationsprozess in marinen Sedimenten der Laptev-See auch bei Temperaturen um den Gefrierpunkt noch möglich.

Wie bereits aus den physiologischen Untersuchungen hervorging, sind die beiden marinen Stämme Laptev-See S11 und F2 eindeutig zu unterscheiden (Abbildung 30). Während die 16S rRNA Sequenz vom Stamm F2 eine hohe Ähnlichkeit mit der von *Nitrospira marina* aufwies, bildete Stamm S11 ein eigenes Cluster mit verschiedenen marinen Umweltklonen. Bereits bei der Entwicklung der spezifischen Primer für die Stämme Laptev-See S11 und F2 konnten signifikante Unterschiede in der 16S rRNA Sequenz festgestellt werden. Aus dem Neighbor-Joining Tree ist die Verzweigung in zwei unterschiedliche Cluster deutlich geworden. Es wurde bereits von DAIMS et al. (2006) vorgeschlagen das Cluster IV in die Subgruppen IVa und IVb zu unterteilen. DAIMS et al. (2006) haben jedoch keine Angaben darüber gemacht zu welcher Subgruppe die einzige Reinkultur *Nitrospira marina* gehört. Auch die im Stammbaum der Publikation berechneten Umweltklone sind ohne AC-Nummern, so dass keine Zuordnung möglich war. Daher wurde eine eigenständige Erweiterung der Cluster-Bezeichnung IV auf Cluster IVa und IVb durchgeführt (Tabelle 27). Im Cluster IVa wurden die Sequenzen von Laptev-See F2, *Nitrospira marina* und einem Umweltklon aus einer Trinkwasseraufbereitungs-Anlage (MARTINY et al., 2005; AC-Nr.: DQ058673) sowie eine 16S rRNA Sequenz aus einem wassergesättigten Boden (GRAFF & CONRAD, 2005; AC-Nr.: DQ058673) aufgenommen. Das Cluster IVb wird durch die Spezies Laptev-See S11 und drei weiteren Umweltsequenzen aus schwermetallbelasteten Sedimenten der Nordsee (AC-Nr.: DQ351808), Sedimenten des West-Pazifik (ZENG et al., 2005; AC-Nr.: AY375077) und Tiefsee Korallen (AC-Nr.: DQ395470) gebildet.

6.1.4 Anpassung an niedrige *in-situ* Temperaturen

Die bisher charakterisierten NOB sind mesophil oder moderat thermophil (WATSON et al., 1989; EHRICH et al., 1995; LEBEDEVA et al., 2005). Über das Anpassungspotenzial der NOB an niedrige Temperaturen deutlich unterhalb von 20°C, also dem Temperaturoptimum für psychrophile und psychrotolerante Bakterien, standen bisher keine Daten zur Verfügung. Die durchgeführten Untersuchungen zeigen erstmals die Vielfalt von NOB in den kalten Gebieten der Erde auf. Es konnten Hinweise auf das hohe Anpassungspotenzial

von NOB an die Einfrier- und Auftauprozesse sowie die niedrigen Temperaturen in permafrostbeeinflussten Gebieten gewonnen werden. Es wurden sowohl psychrotolerante als auch moderat psychrophile NOB der Gattungen *Nitrobacter*, *Nitrospira* und der neuen Art '*Candidatus Nitrotoga arctica*' angereichert.

Anhand des TGGE-Monitoring der Kulturen und Aktivitäts-Tests bei verschiedenen Temperaturen (Aktivitätstest der Profile P1 und P2, Tina Sanders, 2006. Diplomarbeit) wurden für die *Nitrospira*-ähnlichen Bakterien Kardinaltemperaturen von 4°C bis 28°C nachgewiesen. Auch in den 4°C Kulturen konnten *Nitrospira*-ähnliche Bakterien detektiert werden, die Aktivität wurde jedoch stark beeinträchtigt. Infolgedessen konnte sich das Nitrit oxidierende Bakterium '*Candidatus Nitrotoga arctica*' bei Temperaturen zwischen 4, 10 und teils 17°C in den Kulturen gegenüber *Nitrobacter*- und *Nitrospira*-ähnlichen Bakterien durchsetzen. Es kann festgehalten werden, dass die *Nitrospira*-ähnlichen Bakterien ein Temperaturoptimum im unteren mesophilen Bereich aufweisen, jedoch auch bei psychrophilen Temperaturen von 4°C noch einen beachtlichen Nitritumsatz generieren und daher als psychrotolerant zu bezeichnen sind.

Bei Temperaturen von 4°C wurden von den angereicherten *Nitrospira*-ähnlichen Bakterien aus Samoylov (Profil: P1 und P2) bis zu 60 % der maximal gemessenen Umsatzrate (22°C) erreicht. Der maximale Nitritumsatz der angereicherten psychrotoleranten *Nitrospira*-ähnlichen Bakterien war mit bis zu 4.500 µM/Tag (17°C) mit der Leistung der Reinkultur *Nitrospira moscoviensis* (EHRICH et al., 1995) vergleichbar. Wie aus den Analysen jedoch deutlich wurde, bedingte diese Anpassung auch eine Empfindlichkeit gegenüber Temperaturen von über 28°C. Hingegen wurden Anreicherungen von *Nitrospira*-ähnlichen Bakterien aus heißen Quellen der Baikal Region bei Temperaturen von bis zu 55°C kultiviert (LEBEDEVA et al., 2005). Dieser breite Temperaturbereich, in denen Arten der Gattung *Nitrospira* in der Natur vorkommen, konnte durch diese Arbeit bestätigt und entsprechend ergänzt werden. In vielen terrestrischen und marinen Anreicherungen konnten mehrere NOB detektiert werden, so dass es in Einzelfällen fraglich war, ob das breite Temperaturoptimum von einer oder mehreren Arten abgedeckt wurde.

Stoffwechsel-Aktivitäten von marinen *Nitrospira*-ähnlichen Bakterien konnten noch bei Temperaturen von -2°C gemessen werden. Bei einer Kultivierungstemperatur von 22°C lag der Substratumsatz bei der marinen Anreicherungskultur F2 mit ca. 90 µM/Tag bei etwa einem Drittel des maximalen Wertes von *Nitrospira marina* mit ca. 300 µM/Tag (28°C) (WATSON et al., 1986). Vergleicht man die Kulturen Laptev-See S11 und F2, wird der Unterschied in der Anpassungsfähigkeit an niedrige Temperaturen deutlich. Während die Kultur S11 ein breites Spektrum von 4-28°C abdeckte, war bei Kultur F2 eindeutig eine

Präferenz für Temperaturen von 28°C zu erkennen. Ab 30°C aufwärts nahm die Nitrit Oxidationsrate signifikant ab, dies deutet auf die Anpassungen der beteiligten Enzyme an die kalten Temperaturen hin. Die marinen *Nitrospira*-ähnlichen Bakterien zeigten demnach trotz der konstanten *in-situ* Temperatur von ca. -2°C laut Definition lediglich psychrotolerante Eigenschaften, da ein Temperaturoptimum von über 20°C festgestellt wurde.

Auch Vertreter der Gattung *Nitrobacter* zeigten psychrotolerante Eigenschaften und konnten vereinzelt bei Inkubationstemperaturen von 4°C detektiert werden. Die Aktivität der angereicherten *Nitrobacter*-ähnlichen Bakterien erreichte bei Temperaturen unter 10°C nicht die gleiche Leistung wie *Nitrospira* Anreicherungen. Die Untersuchungen deuten darauf hin, dass *Nitrobacter*-ähnliche Bakterien vermehrt auch in tiefen Bodenhorizonten (Kurungnakh, 5 m Tiefe; Probe 1066) zu finden sind. Die Temperaturen in fünf Meter Tiefe liegen mit -12°C bis -20°C weit unter denen des Auftauhorizonts, in dem man Bakterien dieser Gattung hätte vermuten können. Möglicherweise haben Vertreter der Gattung *Nitrobacter* in diesen sauerstoffarmen Zonen eine stärkere Bedeutung als im Active Layer, obwohl das ermittelte Temperaturoptimum wesentlich höher lag. Dieser Umstand konnte bereits für andere Bakteriengruppen beschrieben werden und ist nicht ungewöhnlich (JONES et al., 1988). Berücksichtigt man die herabgesetzte Stoffwechselaktivität, die geringe Verfügbarkeit von Substraten und die eingeschränkten Möglichkeiten einer räumlichen Ausbreitung in den tiefen Zonen des dauerhaft gefrorenen Bodens, so wird deutlich, dass auch keine Notwendigkeit für einen schnellen Substratumsatz besteht.

Durch eine ausgeprägte Anpassung an niedrige *in-situ* Temperaturen zeichnete sich die Kultur 6678 mit dem in vielen Profilen nachgewiesenen Nitrit oxidierenden Betaproteobakterium (*Candidatus Nitrotoga arctica*) aus. Zwar musste ausschließlich mit Anreicherungskulturen gearbeitet werden, dennoch konnte durch das wiederholte TGGE-Screening der Kulturen gezeigt werden, dass kein bekanntes NOB angereichert wurde. Die Kultur zeigte auch bei 5°C nahezu identische Nitritumsätze wie bei einer Inkubationstemperatur von 22°C. Mit diesen Kardinaltemperaturen wies *Candidatus Nitrotoga arctica* mehr als die NOB bekannter Gattungen kältetolerante Eigenschaften auf. Aufgrund der sehr theoretisch festgelegten Definitionen der Temperaturbereiche war es nicht einfach, die kultivierten Bakterien entsprechend ihrem Optimum einzuteilen. Das Bakterium wies ein Optimum bei 10°C auf, konnte jedoch auch bei 22°C, also mesophilen Temperaturen kultiviert werden (ALAWI et al., 2007). Das Bakterium wurde daher als moderat psychrophil bezeichnet.

Die für Mikroorganismen im Permafrost postulierte Eigenschaft nicht nur zu überdauern, sondern mittels Anpassungen an die Bedingungen auch aktiven Stoffwechsel aufzuzeigen (RIVKINA et al., 2000, 2004; DEMING, 2002; GILICHINSKY, 2002, 2005; BAKERMANS et al., 2003), konnte anhand der Untersuchungen der Tundrenböden in Sibirien und Sedimenten der Laptev-See bestätigt werden.

Die durchgeführten Untersuchungen an Anreicherungskulturen können jedoch nicht vollständig die *in-situ* Bedingungen widerspiegeln. Es muss berücksichtigt werden, dass nicht immer die Temperatur, sondern auch die Substratverfügbarkeit, der Salzgehalt, die Sauerstoff- oder Kohlendioxidverfügbarkeit im Permafrost den limitierenden Faktor darstellen könnte. Wie groß die tatsächlichen Aktivitäten der nachgewiesenen Gattungen oder Arten im Habitat sind, kann daher nicht direkt abgeleitet werden.

6.1.5 Anreicherung und Kultivierung von NOB

Es wurden psychrotolerante Bakterien der Gattungen *Nitrobacter* und *Nitrospira* sowie das Nitrit oxidierende moderat psychrophile Bakterium '*Candidatus Nitrotoga arctica*' angereichert. Während *Nitrobacter*-ähnliche Bakterien nur in den Böden Sibiriens gefunden wurden, konnten Vertreter der Gattung *Nitrospira* sowohl aus Böden, wie auch Sedimenten der Lena und der Laptev-See angereichert werden. Problematisch war das Vorkommen von bis zu vier unterschiedlichen Stämmen Nitrit oxidierender Bakterien im gleichen Habitat. Einzelne zu einer Gattung zählende Stämme konnten durch den Anreicherungsprozess nicht gänzlich voneinander getrennt werden. Lediglich bei den marinen Kulturen Laptev-See S11 und F2 war eine Trennung mittels Festmedien erfolgreich.

Die Kältetoleranz einzelner Arten konnte für den Anreicherungsprozess genutzt werden, jedoch hatte eine Erniedrigung der Temperatur entsprechend auch den Wachstumsprozess der Kulturen erheblich verlangsamt. Hingegen führte die Kultivierung bei 17°C-22°C häufig zu einem verstärkten Wachstum heterotropher Begleitbakterien. So musste die Auswahl der Inkubationstemperatur unter Berücksichtigung dieser beiden Faktoren gewählt werden. Wie bereits BARTOSCH et al. (2002) beschrieben, ist neben der Kultivierungstemperatur im Besonderen auch die Substratkonzentration im Medium von entscheidender Bedeutung und kann die gezielte Anreicherung *Nitrobacter*- und *Nitrospira*-ähnlicher Bakterien beeinflussen. In früheren Untersuchungen von JANSSEN (1994) konnten aufgrund der hohen Substratkonzentration ausschließlich *Nitrobacter*-ähnliche Bakterien aus Tundrenböden Sibiriens angereichert werden. Wie jedoch von NOB aus anderen Habitaten bereits bekannt ist, führt eine hohe Nitritkonzentration zum verstärkten Wachstum der *Nitrobacter*-ähnlichen Bakterien (SPIECK et al., 1996, LEBEDEVA et al., 2005). Wie aus

den Kulturen aus Kurungnakh deutlich wurde, begünstigte die von JANSSEN verwendete Nitritkonzentration von 0,2 g/L (Natriumnitrit) im Medium und die gewählte Inkubationstemperatur von 28°C nicht nur das Wachstum von Bakterien der Gattung *Nitrobacter*, es hemmte gleichsam die Vertreter der Gattung *Nitrospira*.

Durch Herabsetzen der Nitritkonzentration im Medium (BARTOSCH et al., 2002) konnten aus den Tundrenböden auch *Nitrospira*-ähnliche Bakterien und 'Candidatus Nitrotoga arctica' in Kultur genommen werden. Auffällig war, dass mehrere Arten dieser Gattung zusammen in der gleichen Kultur vorkamen. Von der Insel Samoylov konnten entlang des Polygonprofils P1 vier verschiedene *Nitrospira*-ähnliche Bakterienarten angereichert werden. Durch die Untersuchungen wird deutlich, dass innerhalb der Gattung *Nitrospira* eine Anpassung der Bakterien nicht nur an extreme Standorte zu beobachten ist, sondern auch innerhalb eines Habitats *Nitrospira*-Arten unterschiedliche Mikrohabitate besiedeln und wie erwähnt unterschiedliche ökologische Nischen einnehmen (ANDREWS & HARRIS, 1986; DAIMS et al., 2006; MAIXNER et al., 2006).

In den Flüssigmedien waren die Bakterien in flockenförmigen heterogenen Aggregaten vorzufinden, so dass eine Vereinzelnung über Verdünnungsreihen erschwert war. Die Bemühungen, ein Wachstum auf Agaroseplatten zu ermöglichen, waren vor allem für den Anreicherungsprozess der marinen psychrotoleranten *Nitrospira*-ähnlichen Bakterien der Laptev-See erfolgreich. Die Kultur F2 zeigte zwar ein Wachstum auf Agaroseplatten, ließ sich jedoch nicht von heterotrophen Begleitbakterien trennen. Dennoch konnte auf diese Weise die Kultur F2 von der NOB Mischkultur S11 im weiteren Verlauf des Anreicherungsprozesses separiert werden. Die Kultur F2 zeichnete sich durch doppelt so hohe Umsatzraten aus und konnte bei wesentlich höheren Nitritkonzentrationen als die Kultur Laptev-See S11 kultiviert werden. Eine Präferenz gegenüber einem 70 %igen oder 100 %igen Meerwasseranteil im Medium konnte nicht beobachtet werden.

6.2 Molekularbiologische Nachweismethoden für NOB

Als Ergänzung zu den Fortschritten der klassischen Anreicherungsverfahren sind die Möglichkeiten, die phylogenetische Diversität von Bakterienpopulationen in Naturproben oder auch Anreicherungskulturen zu erfassen, durch moderne Techniken wie die PCR stark erweitert worden (AMANN et al., 1995). Untersuchungen des 16S rRNA Gens und entsprechende Datenbanken lieferten erste Primerstellen für die gattungsspezifische Amplifikation der Gattungen *Nitrobacter*, *Nitrospira* und *Nitrococcus* (WAGNER et al., 1996; HOVANEK & De Long, 1996; POMMERENING-RÖSER et al., 1996). Durch die

ansteigende Anzahl an Einträgen in den öffentlich zugänglichen Gendatenbanken war es für die angestrebten Untersuchungen in dieser Arbeit notwendig geworden, die Primerpositionen zu überarbeiten. Nunmehr können die unterschiedlichen Gattungen der NOB auch ohne den zeitraubenden Prozess der Anreicherung und Isolierung anhand eines schnellen PCR-Nachweises zuverlässiger detektiert werden.

Die molekularbiologischen Techniken lösen jedoch nicht die klassischen Anreicherungstechniken ab. Die Basis der PCR-Technik zum Nachweis von NOB beruht letztlich auf den Sequenzen isolierter und physiologisch charakterisierter Arten. Demnach besteht durch ausschließliche Verwendung molekularbiologischer Techniken die Gefahr, unbekannte Arten zu übersehen. Bei der Anreicherung von Bakterien liegt das gleiche Problem vor, auch hier kann man nicht sicherstellen, dass unbekannte Arten nicht auch andere Substrate und Kultivierungsbedingungen benötigen und entsprechend schlecht oder gar nicht wachsen. Eine Lösung bietet das TGGE-Monitoring des Anreicherungsprozesses, hier ist die Wahrscheinlichkeit unbekannte Arten oder Gattungen zu erkennen am größten. Die Kombination an gewonnenen Informationen aus den physiologischen Eigenschaften der Kultur und der taxonomischen Zuordnung auffälliger TGGE-Sequenzen mittels Sequenzierung, lieferte sehr gute Ergebnisse. Eine Veränderung in der Populationsstruktur konnte so zeitnah nachvollzogen werden. Anhand der TGGE-Analysen standen frühzeitig die Sequenzen der habitattypischen NOB zur Verfügung. Gewonnene Erkenntnisse über konservierte Bereiche auf dem 16S rRNA Gen konnten auf diese Weise für die Entwicklung neuer, teils artspezifischer Primer genutzt werden.

Da bei der Gattung *Nitrospira* bisher nur je eine terrestrische und marine Art isoliert und charakterisiert worden ist, war es für die Primerentwicklung wichtig, die Sequenzen der neuen Stämme entsprechend zu berücksichtigen. So konnte das zuvor entwickelte semi-spezifische Primerset Eub341F/Nsp662R (M. Alawi, 2003. Diplomarbeit) überarbeitet und durch den spezifischen vorwärts Primer NSP60F ergänzt werden. Hierdurch konnte die Spezifität der Amplifikation im Besonderen in Naturproben verbessert werden.

Bei den TGGE-Analysen der Bodenprofile und der Laptev-See Sedimente wurde deutlich, dass in einer Probe durchaus mehrere verschiedene Arten und Stämme der Gattung *Nitrospira* nebeneinander vorkommen. Durch diesen Umstand ist eine einfache Detektion mittels PCR nicht ausreichend. Es kann lediglich ausgesagt werden, dass *Nitrospira* in der Probe vorkommt, aber nicht wie viele verschiedene Stämme. Im Weiteren kann bei diesen Mischkulturen auch keine Sequenzierung der PCR-Produkte durchgeführt werden, ohne eine TGGE-Analyse oder Klonierung durchzuführen. Im Fall der NOB aus der Laptev-See konnte aufgrund der großen Sequenzunterschiede auf dem 16S rRNA Gen der schnelle

PCR-Nachweis dennoch durchgeführt werden. Hier war es möglich für beide neuen Stämme spezifische Primer zu entwickeln, so dass auch Naturproben schnell und differenziert untersucht werden konnten.

Von einigen Bakteriengruppen ist es bekannt, dass die 16S rRNA Gene in mehreren Kopien vorliegen. Diese Kopien weisen jedoch nur geringe Sequenzabweichungen auf. Die hohen Sequenzabweichungen der untersuchten Gene dieser Arbeit deuten demnach auf unterschiedliche Stämme und in einigen Fällen auch Arten hin. Die TGGE-Profile zeigten zudem eine spezifische Verteilung der 16S rRNA Sequenzen. Somit konnte die Präsenz mehrerer Stämme, und nicht Kopien des Gens nur eines Stammes, auch in Proben mit mehreren Sequenzen einer Bakterienart bestätigt werden.

6.2.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Für den einfachen und schnellen Nachweis von NOB in Naturproben oder Anreicherungskulturen eignete sich die Verwendung gattungsspezifischer Primersets. Von Vorteil war es, dass durch TGGE-Analysen mit Eubakterien-Primern das Spektrum der zu erwartenden Gattungen in den Proben bereits durch das Nitrit oxidierende Betaproteobakterium ergänzt werden konnte. So wurden durch Vergleich mit den Rein- und Anreicherungskulturen sowie Sequenzen aus Internet Datenbanken spezifische Primer für die Gattungen *Nitrobacter*, *Nitrospira* und das Betaproteobakterium 6678/6680 (*Candidatus Nitrotoga arctica*) angefertigt und auf ihre Spezifität getestet.

Die Extraktion einer von Inhibitoren befreiten DNA-Lösung ist aus Böden und marinen Sedimenten nur eingeschränkt möglich. Im Boden vorkommende biologische Substanzen wie Fulvinsäure, Huminsäure und Tannin sowie Tonpartikel verringern die Produktausbeute der anschließenden PCR. Auch erhöhte Salzkonzentrationen und mineralische Verbindungen in marinen Proben können die Amplifikation behindern. Mit PCR-Additiven wie BSA und DMSO kann jedoch die inhibitorische Wirkung der Verunreinigungen im Reaktionsansatz stark verringert werden (KREADER, 1996; ISHII et al., 2001; RALSER, 2003). Die polyphenolischen Verbindungen wie Huminsäuren verbinden sich über Wasserstoff-Bindungen mit dem Sauerstoff der Peptid-Bindung und inhibieren somit auch die DNA-Polymerase. Im Besonderen ist die Eigenschaft an die Phenole zu binden bei BSA bekannt (KREADER, 1996; NAGAI et al., 1998). Das in der PCR eingesetzte BSA konnte die Produktausbeute erheblich steigern. Von Bodenmaterial aus Samoylov und den Sedimenten der Laptev-See wäre eine Amplifikation der DNA ohne BSA nicht möglich gewesen. In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass der Einsatz von BSA für die PCR nicht bedingungslos empfohlen werden kann.

Genannte Veröffentlichungen, die über die Anwendung von BSA und anderen Enhancern wie DMSO, Betain und Dithiothreitol (DTT) berichten, berücksichtigen nicht ausreichend die negativen Effekte der Anwendung. Bei relativ unspezifischen Amplifikationen, wie mit dem für die TGGE-Analysen verwendete Eubakterien-Primerset (Eub341F/Eub907R) ist der Einsatz von BSA sehr sinnvoll und teilweise unverzichtbar. Mit dieser PCR sollten nach Möglichkeit alle Eubakterien erfasst werden, bei gattungs- oder artspezifischen Amplifikationen hingegen ist die Spezifität der Primerbindung entscheidend. Wie aus den eigenen Untersuchungen jedoch hervorgeht, wird die Spezifität der Primerbindung stark herabgesetzt. Die Verwendung der gattungsspezifischen Primer für die Multitemplate-PCR, wie bei den Untersuchungen der Naturproben, schließt den Einsatz auch geringer Mengen von BSA daher aus. Es konnte gezeigt werden, dass durch eine Nested-PCR der Vorteil einer verbesserten Produktausbeute mit BSA genutzt werden kann, ohne unspezifische Amplikate zu erhalten. In der ersten PCR wird unter Nutzung von BSA die 16S rRNA aller Proteobakterien stark amplifiziert, in einer weiteren PCR wird dann nach Aufreinigung der PCR-Produkte ohne Zusatz von BSA spezifisch amplifiziert.

6.2.1.1 Spezifische Primersets

Es konnten für alle vier Gattungen der NOB sowie für die bisher wenig untersuchten Gattungen *Nitrospina* und *Nitrococcus* Primerkombinationen abgeleitet werden. Des Weiteren wurde ein Primerset für das neue Nitrit oxidierende Bakterium aus der Klasse der *Betaproteobacteria* 'Candidatus Nitrotoga arctica' entwickelt und eingesetzt.

Für die Gattung *Nitrobacter* sind Primer beziehungsweise Oligonukleotid-Sonden bereits veröffentlicht, dennoch ist kein Primerpaar geeignet, alle veröffentlichten Sequenzen abzudecken. Vorgeschlagene Primerkombinationen wie die von FREITAG et al. (2005) berücksichtigen nicht die Vielfalt an bekannten Umweltsequenzen, und sind daher für die Detektion bisher unbekannter Spezies der Gattung ungeeignet. Durch Alignments auch mit den im Permafrost identifizierten *Nitrobacter*-ähnlichen Bakterien wurde deutlich, dass sich der modifizierte Primer Nb1000gF, der von der Sonde Nb1000 (MOBARRY et al., 1996) abgeleitet wurde, am besten eignete. Durch Verwendung des neuen spezifischen Primers in Kombination mit dem modifizierten Primer DEG2R (modifiziert nach DEGRANGE & BARDIN, 1995) konnten *Nitrobacter*-ähnliche Bakterien vor allem in Naturproben zuverlässiger als zuvor detektiert werden. Gute Ergebnisse konnten auch mit dem Primerpaar Eub341-F/Nit3-R erzielt werden. Für DGGE/TGGE-Analysen hat sich die Verwendung semi-spezifischer Primerkombinationen teilweise als vorteilhaft dargestellt. Es ist auf diese Weise wahrscheinlicher auch unbekannte Vertreter, mit abweichenden Sequenzen auf den konservierten Bindungsstellen der Primer, zu erfassen. Anhand der

Auftrennung der unterschiedlichen PCR-Amplifikate mittels TGGE können mögliche andere Stämme, die nicht der Gattung angehören, einfach ausselektiert werden.

Es wurden verschiedene Primerkombinationen für die spezifische Amplifikation von *Nitrospira*-ähnlichen Sequenzen veröffentlicht. Die schnell ansteigende Anzahl neuer Umwelt-Sequenzen zeigte jedoch die eingeschränkte Spezifität vieler bisher eingesetzter Primerkombinationen. Die von HALL et al. (2002) für Real-Time PCR Anwendungen verwendeten Primersequenzen für terrestrische und limnische Vertreter der Gattung aus Cluster I und II waren ungeeignet. Bei den Sequenzanalysen des Alignments mit 116 *Nitrospira*-ähnlichen Umweltsequenzen stimmten weniger als die Hälfte der Sequenzen mit denen der Primer überein. Auch die Sequenz des 16S rRNA Gens von '*Candidatus Nitrospira defluvii*' würde nicht erfasst werden. Die von DAIMS et al. (2001) für FISH-Analysen entwickelte Sonde Nspa712 erfasst neben vielen *Nitrospira*-ähnlichen Bakterien auch andere Gattungen des Phylums *Nitrospirae* und war daher für PCR Anwendungen ungeeignet. Die von SCHRAMM et al. (1998, 2000) verwendeten Sonden konnten ebenfalls nicht als mögliche Vorlage für Primer dienen, da diese Sequenzen bei den durchgeführten Alignments starke Schwächen bei den Detektionsmöglichkeiten diverser Stämme aufwiesen. Einzig die von HOVANEK & De Long (1996) verwendete Sonde Nspa662 kann zuverlässig nahezu alle *Nitrospira*-ähnlichen Bakterien aller fünf Cluster erfassen. Die Sonde wurde bereits in Verbindung mit dem Eubakterien-Primer Eub341F für DGGE-Analysen von *Nitrospira*-ähnlichen Bakterien aus moderat thermophilen Habitaten erfolgreich eingesetzt (M. Alawi, 2003. Diplomarbeit). Bei der Untersuchung von Naturproben konnten jedoch vereinzelt nicht nur PCR-Amplifikate der Zielgattung erhalten werden, sondern auch Produkte anderer Spezies. Dieser Umstand hat, wie bereits erwähnt für DGGE/TGGE-Analysen nicht so negative Auswirkungen wie für direkte PCR-Nachweise. Ungeachtet dessen wurden neue Primerkombinationen für Bakterien der Gattung *Nitrospira* getestet.

Die partiellen 16S rRNA Gene der verschiedenen Arten innerhalb der Gattung *Nitrospira* weisen, verglichen mit *Nitrobacter*, erhebliche Abweichungen von bis zu 4 % auf. Aus diesem Grund konnten Subgruppen *Nitrospira*-ähnlicher Bakterien anhand von Alignments bestätigt und entsprechend Primerpositionen festgelegt werden. Die entworfenen *Nitrospira*-spezifischen Primersets eigneten sich auch für Analysen von Naturproben. Eine besondere Spezifität bei hoher Produktausbeute zeigte das Primerset Nsp60-kF/Nsp662R. Es lieferte ein 566 bp langes Fragment, in dem auch die für Stammbaumanalysen wichtige hypervariable V3-Region enthalten ist. Der Primer Nsp60-IF eignete sich um terrestrische und limnische Vertreter der Gattung *Nitrospira* (DAIMS et al., 2000; Cluster I, II, und V, vergl. Abbildung 29) nachzuweisen. Zu berücksichtigen ist, dass marine Arten (Cluster IV)

und die beiden Umweltklone (Cluster III) der Nullarbor caves (AF317762 und AF317764) nicht amplifiziert werden. Um bei der Detektion zwischen den beiden marinen Arten Laptev-See F2 und S11 im PCR-Nachweis zu unterscheiden und den Anreicherungsprozess entsprechend genau zu beobachten, eigneten sich die neuen Primersets S11-460F/S11-634R und F2-460F/F2-634R. Wie parallel aus den physiologischen Untersuchungen und den Stammbaumanalysen hervorgeht, weist der Stamm Laptev-See F2 große Ähnlichkeiten auf dem 16S rRNA Gen mit der Reinkultur *Nitrospira marina* auf. So erfassen die Primer F2-460F/F2-634R neben *Nitrospira marina* auch diverse andere Umweltklone, jedoch nicht die Subgruppe des Stammes Laptev-See S11 (vergl. Seite 92, Abbildung 30).

Der Anreicherungsprozess der NOB konnte mit Hilfe der TGGE-Technik sehr genau verfolgt werden, so dass dominante Arten in der Kultur deutlich früher taxonomisch zugeordnet werden konnten. Durch diesen Vorteil gegenüber klassischen Methoden konnte die in vielen untersuchten Permafrost Bodenproben vorkommende klonierte 16S rRNA Sequenz des Betaproteobakteriums 6678/80 '*Candidatus Nitrotoga arctica*' detektiert werden. Die Verbreitung und Quantität dieser Sequenz in den Anreicherungskulturen, im Besonderen bei Temperaturen zwischen 4°C und 17°C, führte zu der Annahme, dass es sich um eine neue, bisher nicht beschriebene Gattung NOB handelt. Innerhalb dieser Gruppe der *Proteobacteria* waren bisher keine NOB bekannt. Dennoch war es möglich, ein Primersset zu entwickeln, welches spezifisch die 16S rRNA Sequenz auch in komplexen Metagenomen von Naturproben amplifizierte. Mit dem neuen Primersset NTG200F/NTG840R konnte nun die Gesamtheit der Proben analysiert werden und künftig auch in anderen Habitaten zur Detektion eingesetzt werden. Der entwickelte Primer NTG200F erfasste neben der Zielsequenz lediglich die beiden nächstverwandten Umweltsequenzen. Der Primer, beziehungsweise die FISH-Sonde NTG840R wurde weniger spezifisch gewählt, die Sequenz würde auch mit anderen nah verwandten Umweltsequenzen hybridisieren.

Die *Nitrobacter*- und *Nitrospira*-spezifischen Primersets eigneten sich auch für die Amplifikation der zu analysierenden PCR-Produkte für TGGE-Analysen. Der Vergleich mit bekannten Referenzorganismen ist zwar für das Monitoring von Anreicherungskulturen mit nur wenigen Bakteriengruppen geeignet, scheitert jedoch bei komplexen Bandenmustern unterschiedlichster Gattungen in Naturproben. Wie in dieser Arbeit deutlich wurde, birgt aber jede Einschränkung der detektierbaren Populationsdiversität in der Probe durch Verwendung gattungsspezifischer Primersets die Gefahr, neue bisher nicht beschriebene Arten oder gar Gattungen von NOB im natürlichen Habitat zu übersehen.

Durch die Verwendung spezifischer Primersets für die Gattungen *Nitrobacter* und *Nitrospira* konnte das komplexe Eubakterien-Bandenmuster, welches häufig in Naturproben oder Anreicherungen zu finden war, auf eine Gattung der NOB reduziert werden. Hinzu kommt, dass eine Sequenzierung des 16S rRNA Genabschnitts bisher ohne vorherige Klonierung, bei dem typischen Vorhandensein mehrerer Arten einer Gattung in der Probe, kein Ergebnis lieferte. Durch eine Auftrennung und Extraktion der spezifischen PCR-Produkte über die TGGE konnten die Arten jedoch ohne Klonierung separat sequenziert werden.

Zwar standen für die bisher wenig untersuchten Gattungen *Nitrospina* und *Nitrococcus* entsprechend wenige 16S rRNA Gensequenzen zu Verfügung, dennoch konnten neue semi-spezifische Primersets entwickelt werden. Hierbei muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Primer möglicherweise nur die bekannten Spezies erfassen. Für eine semi-spezifische Amplifikation der Reinkulturen *Nitrospina gracilis* und *Nitrospina* 347 (Dr. E. Spieck) konnten die Primer (NspnGrF und Nspn 347-2R) erfolgreich eingesetzt werden. Für die Detektion von *Nitrococcus mobilis*-ähnlichen Sequenzen wurden verschiedene Primerkombinationen auf Spezifität getestet, die Kombination der Primer FN1-55F mit RN5-564R zeigte die besten Ergebnisse.

Für die Gattungen der AOB bewährte sich der Einsatz bekannter spezifischer Primer (Tabelle 6) (VOYTEK & WARD, 1995; MOBARRY et al. 1996; BURRELL et al. 2001). Durch Kombination mit Eubakterien-Primern konnten jedoch auch neue semi-spezifische Primersets eingesetzt werden. Das für die Gattung *Nitrosococcus* entworfene Primerset Eub27F/NSCMA-R zeigte bei den PCR-Analysen eine spezifische Amplifikation des 16S rRNA Genabschnitts der einzigen verfügbaren Reinkultur *Nitrosococcus oceani*.

6.2.2 Verwendung der TGGE für Populationsanalysen

Die Temperatur Gradienten Gelelektrophorese konnte entsprechend der verwendeten Primerkombinationen und untersuchten Bakteriengruppen so eingestellt werden, dass eine optimale Auftrennung erreicht wurde. Zwar war aus eigenen DGGE-Untersuchungen das Schmelzverhalten der 16S rDNA-Amplifikate im chemischen Gradienten bekannt, dennoch musste durch diverse Versuchsreihen der Temperaturgradient und die Laufzeit der Elektrophorese angeglichen werden.

Der über einen Gradientenmischer angefertigte chemische Gradient der DGGE konnte nicht annähernd so fein eingestellt werden wie das Mikroprozessor gesteuerte Peltier-Element der TGGE. Dadurch können in der TGGE auch DNA-Banden mit sehr ähnlichem Schmelzverhalten, und damit auch der Laufweite im Gel, aufgetrennt werden. Während in

den DGGE-Gelen optimale Trennleistungen erfahrungsgemäß nur in der Mitte des Geles zu erreichen sind, kann der Trennvorgang bei der TGGE von Beginn an stattfinden und in kurzer Laufzeit zu einem Ergebnis führen. Wie aus den Untersuchungen deutlich wurde, sollte die Elektrophoresedauer bei TGGE-Analysen, bei denen Temperaturen von bis zu 75°C angelegt werden müssen, möglichst kurz gewählt werden. Eine Austrocknung beeinträchtigt die Qualität der Matrix stark und es kann keine gleichmäßige Migration gewährleistet werden. Bei Untersuchungen komplexer Bakterienpopulation, wie denen aus Böden, ist es hingegen notwendig einen möglichst weiten Gradienten anzulegen und die DNA entsprechend lange im Gel migrieren zu lassen.

Als Schlussfolgerung ist die DGGE für Analysen komplexer Population besser geeignet als die TGGE, da das in Puffer gelagerte Gel nicht austrocknen kann. Die TGGE erreicht andererseits durch den regelbaren Temperaturgradienten eine höhere Auflösung nahe gelegener Banden und man kann die Elektrophoresedauer von 16 Stunden auf drei Stunden reduzieren. Somit eignete sich die TGGE hervorragend für die Untersuchung von Anreicherungskulturen mit wenigen Bakterienarten.

Verglichen mit anderen Techniken zur Identifikation von NOB in Naturproben und Anreicherungskulturen können bei der Gradienten Gelelektrophorese große Probenvolumina, bei geringen Kosten, umfassend untersucht werden. Durch Verwendung der TGGE ist es möglich auch unbekannte Bakteriengruppen einfach zu detektieren.

Alternativ zur Anwendung der DGGE/TGGE bietet die Klonierung des 16S rRNA Gens bei einem wesentlich höheren Kosten- und Zeitaufwand mehr Möglichkeiten. Inwieweit bei einer Klonierung die Anzahl sequenzierter positiver Klone statistisch abzusichern ist, muss hierbei berücksichtigt werden, schließlich wird bei der DGGE/TGGE die Gesamtheit aller aus der Probe erhaltenen Sequenzen dargestellt.

In Kombination mit der Anreicherung auf selektiven Medien können so entscheidende Hinweise auf den Stoffwechsel und die Taxonomie auch unbekannter Arten gewonnen werden. Wie die Untersuchungen der Anreicherungskulturen gezeigt haben, übt der Anreicherungsprozess, im Besonderen die Auswahl der Mineralmedien, die Substratmenge und die Kultivierungstemperatur einen starken Selektionsdruck auf die Bakterien aus. Dennoch bleibt zu berücksichtigen, dass diese künstlichen Parameter nur einen kleinen Teil der komplexen Umweltbedingungen widerspiegeln können. Es ist daher bei jedem Anreicherungsprozess die Gefahr gegeben, die Artenvielfalt nicht komplett zu erfassen (KOOBS & POMMERENING-RÖSER, 2001). Diese Schwachstelle der klassischen Mikrobiologie kann durch die Kombination mit der TGGE-Technik stark minimiert werden.

Durch das Erfassen der gesamten *in-situ* Eubakterienpopulation können NOB, die nicht in Anreicherungskulturen überführbar waren, dennoch erkannt und taxonomisch zugeordnet werden.

Wie bei allen DNA-basierenden Methoden zur Untersuchung der Diversität von Bakterien sind auch bei der TGGE-Technik Nachteile zu erkennen. Bereits die Extraktion der DNA aus den Naturproben oder auch Anreicherungskulturen kann Einfluss auf die folgenden Untersuchungen haben. So wurde bemerkt, dass die Zellwände der untersuchten *Nitrobacter*-ähnlichen Bakterien bei Phenol-Chloroform-Extraktionen wesentlich resistenter sind als Zellen von *Nitrospira*. Durch die Verwendung der mechanischen Extraktionsverfahren konnte der Zellaufschluss jedoch verbessert werden. Von einer unterschiedlichen DNA-Ausbeute bei gleicher Zellzahl muss aufgrund der vielfältigen Anpassungsmöglichkeiten und damit Zellveränderungen beziehungsweise Biofilmbildung ausgegangen werden. Die DNA-Extraktion aus Bodenproben kann durch organisches Material oder Tonpartikel stark beeinträchtigt werden, so dass Arten die in geringen Zellzahlen vorlagen nicht mehr erfasst werden könnten. Weitere Fehlerquellen entstehen bei der Amplifikation der DNA mittels PCR. Obwohl Eubakterien-Primer für konservierte Bereiche auf dem 16S rRNA Gen eingesetzt wurden, konnte teils eine artspezifische Produktausbeute festgestellt werden, die durch Anpassung der PCR-Bedingungen reduziert wurde. Entsprechend muss berücksichtigt werden, dass auch hochkonservierte Bereiche bei einigen Bakterien Mutationen aufweisen oder der Nachbarbereich der Annealingposition des Primers durch ungünstige Basenfolge sterische Einflüsse ausübt.

Wie bereits SEKIGUCHI et al. (2001) dargelegt haben, kann es aufgrund ähnlicher Schmelzverhalten bei DGGE/TGGE-Analysen dazu kommen, dass eine Gelbande aus mehreren unterschiedlichen DNA-Fragmenten besteht. Dies konnte bei den durchgeführten Untersuchungen bestätigt werden. Neben der Problematik von Fehlinterpretation des Bandenmusters war es im Besonderen vom Nachteil, dass Sequenzierungen dieser DNA-Banden ohne eine Klonierung nicht möglich waren.

6.2.3 Identifizierung mittels IF-Färbung und FISH

Mit bereits bewährten Methoden zur Detektion von NOB konnten die verwendeten, auf der PCR basierenden Techniken, überprüft werden. Zwar war es möglich Anreicherungskulturen mittels der Immunfluoreszenz Färbung (IF) und Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung (FISH) zu untersuchen, Naturproben sind jedoch mit diesen mikroskopischen Techniken nur schwer zu analysieren.

Durch eine IF-Färbung mit dem gattungsspezifischen Antikörper AK153-3 (AAMAND et al., 1996) konnten die *Nitrospira*-ähnlichen Bakterien der marinen Kulturen Laptev-See S-11 und F2 markiert werden. Anhand der spezifischen Antikörper-Kopplung an das Nitrit oxidierende System (NOS), konnten auch die im Elektronenmikroskop beobachteten Zellformen bestätigt werden. Irreguläre Kurzstäbchen in Mikrokolonien dominierten die Kultur Laptev-See S11. In der Kultur F2 sind hingegen bei allen Techniken sowohl Mikrokolonien als auch freie Zellen beobachtet worden.

Auch die FISH-Analysen bestätigten die bereits über andere Techniken ermittelte taxonomische Gattungszuweisung der angereicherten NOB. Mit der für die Gattung *Nitrospira*-spezifischen CY-3 markierten Oligonukleotid-Sonde Nsp662, konnte der bereits aus den PCR-Analysen erbrachte Hinweis auf Vertreter dieser Gattung bestätigt werden. Nachdem über TGGE-Analysen und Klonierung des gesamten 16S rRNA Gens die Sequenz des Nitrit oxidierenden Bakteriums '*Candidatus Nitrotoga arctica*' bekannt war, konnten die beiden Primer NTG200F und NTG840R entworfen werden. Als FISH-Sonde würde die Position des Primers NTG200F eine höhere Spezifität bei der Markierung aufweisen. Es konnte jedoch mit dieser Sonde kein Signal erhalten werden, obwohl aus der gleichen Kultur die 16S rRNA Sequenz erhalten wurde. Möglicherweise sind Sekundärstrukturen der RNA für die negativen Ergebnisse verantwortlich. Mit der Oligonukleotid-Sonde NTG840 konnte '*Candidatus Nitrotoga arctica*' hingegen in unterschiedlichen Anreicherungskulturen und Naturproben der sibirischen Tundrenböden und auch in einem Klärwerk (Hamburg, Dradenau) mittels FISH-Analysen erfolgreich detektiert werden.

7 Ausblick

Die vorliegende Arbeit konnte einen Überblick über die Diversität und Verbreitung von NOB aus kalten Habitaten liefern. Die Bedeutung der einzelnen Stämme im Habitat sollte jedoch weiter aufgeklärt werden. Die physiologische Anpassung der nachgewiesenen *Nitrobacter*- und *Nitrospira*-ähnlichen psychrotoleranten Bakterien und des neuentdeckten moderat psychrophilen Bakteriums '*Candidatus Nitrotoga arctica*' könnten für Wissenschaft und Industrie von großem Interesse sein. Die Charakteristik und Schutzmechanismen kältetoleranter Enzyme dieser Bakterien sollten in weiteren Studien erörtert werden.

Wie die Untersuchungen der Kläranlage in Hamburg (Dradenau) zeigten, wurde neben den bekannten Spezies von NOB bei Temperaturen von 10°C-17°C auch '*Candidatus Nitrotoga arctica*' angereichert und detektiert. In weiteren Habitaten, auch der gemäßigten Zonen sowie künstlichen Systemen wie industriellen Anlagen zur Stickstoffeliminierung, sollte die Verbreitung und der mögliche Nutzen weiter erforscht werden. Ein Wachstum unter anaeroben Bedingungen mit Nitrat als terminalen Elektronenakzeptor sollte geprüft werden.

Die Vielzahl neuer 16S rRNA Sequenzen aus permafrostbeeinflussten Gebieten, im Besonderen von Bakterien der Gattung *Nitrospira*, zeigt auch die Grenzen von 16S rRNA Analysen auf. Gattungen, die wie *Nitrospira* phylogenetisch sehr tief verankert sind, konnten teilweise nur mit Einschränkungen mit einem Primerset erfasst werden. Gattungen wie *Nitrobacter* zeigen hingegen auf dem 16S rRNA Gen verhältnismäßig geringe Abweichungen, so dass nur wenige taxonomische Merkmalsunterschiede für Stammbaumanalysen zur Verfügung stehen. Daher sollten die Möglichkeiten von taxonomischen Untersuchungen und Nachweisen anhand des Nitrit oxidierenden Systems in weiteren Studien geprüft werden.

Die angesprochene Kopplung der Nitrifikation mit der Denitrifikation könnte aufgrund der dabei freigesetzten Treibhausgase für klimarelevante Fragestellungen von Bedeutung sein. Daher sollte auch die Diversität und Physiologie der Ammoniak oxidierenden Bakterien und der denitrifizierenden Bakterien in permafrostbeeinflussten Gebieten weiter aufgeklärt werden.

8 Literatur

- Aamand, J., Ahl, T. & Spieck, E.** 1996. Monoclonal antibodies recognizing nitrite oxidoreductase of *Nitrobacter hamburgensis*, *Nitrobacter winogradskyi*, and *Nitrobacter vulgaris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2352-2355
- Aguilar, A.** 1996. Extremophile research in the European Union: from fundamental aspects to industrial expectations. *FEMS Microbiol. Rev.* 18: 89-92
- Alawi, M.** Beispiele für die Anwendung der Denaturierenden Gradienten Gelelektrophorese (DGGE) bei der Identifizierung Nitrit oxidierender Bakterien. Diplomarbeit 2003, FB Biologie, Universität Hamburg
- Alawi, M., Lipski, A., Sanders, T., Pfeiffer, E.M. & Spieck, E.** 2007. Cultivation of a novel cold-adapted nitrite oxidizing betaproteobacterium from the Siberian Arctic. *The ISME Journal* 1: 256-264; doi:10.1038/ismej.2007.34
- Aleem, M.I.H., Hoch, G.E. & Varner, J.E.** 1965. Water as the source of oxidant and reductant in bacterial chemosynthesis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 54: 869-873
- Altmann, D., Stief, P., Amann, R., De Beer, D. & Schramm, A.** 2003. In situ distribution and activity of nitrifying bacteria in freshwater sediment. *Environ. Microbiol.* 5: 798-803
- Amann, R.I., Ludwig, W. & Schleifer, K.-H.** 1995. Phylogenetic identification and *in-situ* detection of individual cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59: 143-169
- An, S. & Joye, S.B.** 2001. Enhancement of coupled nitrification-denitrification by benthic photosynthesis in shallow estuarine sediments. *Limnol. Oceanogr.* 46: 62-74
- Andrews, J.H. & Harris, R.F.** 1986. r- and K-selection and microbial ecology. *Adv. Microb. Ecol.* 9: 99-174
- Bakermans, C., Tsapin, A. I., Souza-Egipsy, V., Gilichinsky, D.A. & Nealson, K. H.** 2003. Reproduction and metabolism at -10°C of bacteria isolated from Siberian permafrost. *Environ. Microbiol.* 5: 321-326
- Bano, N. & Hollibaugh, J.T.** 2001. Phylogenetic Composition of Bacterioplankton Assemblages from the Arctic Ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 505-518
- Bartosch, S.** 1999. Identifizierung von Nitritoxidanten mit monoklonalen Antikörpern gegen die Nitritoxidoreduktase. Ph.D. thesis. University of Hamburg, Hamburg, Germany.
- Bartosch, S., Wolgast, I., Spieck, E. & Bock, E.** 1999. Identification of nitrite-oxidizing bacteria with monoclonal antibodies recognizing the nitrite oxidoreductase. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4126-4133
- Bartosch, S., Hartwig, C., Spieck, E. & Bock, E.** 2002. Immunological Detection of *Nitrospira*-like Bacteria in Various Soils. *Microb. Ecol.* 43: 26-33
- Bauch, H.A., Kassens, H., Klyuvitkina, T., Meyer, H., Müller-Lupp, T., Polyakova, Y., Rekant, P. & Taldenkova, E.** 2006. Environmental history of the Laptev Sea: present status and future perspective. Eighth Workshop on russian-german cooperation: Laptev Sea System; St. Petersburg, Russia; Herausgeber: Sekretariat System Laptev See, Kiel, Deutschland, pp.3
- Belser, L.W.** 1979. Population ecology of nitrifying bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 33: 309-333
- Benstead, J. & Lloyd, D.** 1994. Direct mass spectrometric measurement of gases in peat cores. *FEMS Microbiol. Ecol.* 13: 233-240

- Bess, B.W. & O'Mullan, G.D.** 2002. Worldwide Distribution of *Nitrosococcus oceani*, a marine Ammonia-Oxidizing γ -Proteobacterium, Detected by PCR and Sequencing of 16S rRNA and *amoA* Genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 4153-4157
- Bock, E., Sundermeyer-Klinger, H. & Stackebrandt, E.** 1983. New facultative lithoautotrophic nitrite-oxidizing bacteria. *Arch. Microbiol.* 136: 281-284
- Bock, E., Koops, H.-P., Möller, U.C. & Rudert, M.** 1990. A new facultatively nitrite oxidizing bacterium, *Nitrobacter vulgaris* sp. nov. *Arch. Microbiol.* 153: 105-110
- Bock, E. & Koops, H.-P.** 1992. The genus *Nitrobacter* and related genera, p. 2302-2309. In Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.-H. (eds.), *The Prokaryotes*, 2nd Ed., Vol. 3, Springer-Verlag, New York
- Bock, E. & Sand, W.** 1993. The microbiology of masonry biodeterioration. *J. Appl. Bacteriol.* 74: 503-504
- Both, G.J., Gerards, S. & Laanbroek, H.J.** 1990. Enumeration of nitrite-oxidizing bacteria in grassland soils using a most probable number technique: effect of nitrite concentration and sampling procedure. *FEMS Microbiol. Ecol.* 74: 277-286
- Both, G.J., Gerards, S. & Laanbroek, H. J.** 1990. Most probable numbers of chemolithoautotrophic nitrite-oxidizing bacteria in well drained grassland soils: stimulation by high nitrite concentrations. *FEMS Microbiol. Ecol.* 74: 287-294
- Both, G.J. & Laanbroek, H. J.** 1991. The effect of the incubation period on the result of MPN enumerations of nitrite-oxidizing bacteria: theoretical considerations. *FEMS Microbiol. Ecol.* 85: 335-344
- Brümmer, I.H., Felske, A. & Wagner-Döbler, I.** 2003. Diversity and seasonal variability of beta-Proteobacteria in biofilms of polluted rivers: analysis by temperature gradient gel electrophoresis and cloning. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 4463-4473
- Burrell, P.C., Keller, J. & Blackall, L.L.** 1998. Microbiology of a nitrite-oxidizing bioreactor. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1878-1883
- Burrell, P. C., C. M. Phalen, and T. A. Hovanec.** 2001. Identification of bacteria responsible for ammonia oxidation in freshwater aquaria. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:5791-5800
- Carini, S.A., Orcutt, B.N. & Joye, S.B.** 2003. Interactions between Methane Oxidation and Nitrification in Coastal Sediments. *Geomicrobiol. Journ.* 20: 355-374
- Cébron, A., Berthe, T. & Garnier, J.** 2003. Nitrification and Nitrifying Bacteria in the Lower Seine River and Estuary (France). *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 7091-7100
- Daims, H., Nielsen, P.H., Nielsen, J.L., Juretschko, S. & Wagner, M.** 2000. Novel *Nitrospira*-like bacteria as dominant nitrite-oxidizers in biofilms from wastewater treatment plants: diversity and *in situ* physiology. *Water Sci. Technol.* 41: 85-90
- Daims, H., Nielsen, J.L., Nielsen, P.H., Schleifer, K.-H. & Wagner, M.** 2001. *In-situ* characterization of *Nitrospira*-like nitrite-oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 5273-5284
- Daims, H., Maixner, F., Lückner, S., Stoecker, K., Hace, K. & Wagner, M.** 2006. Ecophysiology and niche differentiation of *Nitrospira*-like bacteria, the key nitrite oxidizers in wastewater treatment plants. *Water Science & Technology* 54: 21-27
- De Boer, W., Klein Gunnewiek, P.J.A., Veehuis, M., Bock, E & Laanbroek, H.J.** 1991. Nitrification at low pH by aggregated chemolithoautotrophic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3600-3604
- Degrange, V. & Bardin, R.** 1995. Detection and counting of *Nitrobacter* populations in soil by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 6: 2093-2098

- Deming, J.W.** 2002. Psychrophiles in polar regions. *Curr. Opin. Microbiol.* 5: 301-309
- Diez, B., Pedros-Alio, C., Marsh, T.L. & Massana, R.** 2001. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2942-51
- Dionisi, H.M., Layton, A.C., Harms, G., Gregory, I.R., Robinson, K.G. & Sayler, G.S.** 2002. Quantification of *Nitrosomonas oligotropha*-like ammonia-oxidizing bacteria and *Nitrospira* spp. from full-scale wastewater treatment plants by competitive PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 245-253
- Don, R.H., Cox, P.T., Wainwright, B.J. Baker, K. & Mattick, J.S.** 1991. Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucl. Acids Res.* 19: 4008
- Dore, J.E. & Karl, D.M.** 1996. Nitrification in the euphotic zone as a source for nitrite, nitrate, and nitrous oxide at station ALOHA. *Limnol. Oceanogr.* 41: 1619-1628
- Dortch, Q. & Whittedge, T.E.** 1992. Does nitrogen or silcon limit phytoplankton production in the Mississippi River plume and nearby regions? *Cont. Shelf Res.* 12: 1293-1309
- Ehrich, S., Behrens, D., Lebedeva, E., Ludwig, W. & Bock, E.** 1995. A new obligately chemolithoautotrophic, nitrite-oxidizing bacterium, *Nitrospira moscoviensis* sp. nov. and its phylogenetic relationship. *Arch. Microbial.* 164: 16-23
- Falkowski, P.G., Barber, R.T. & Smetacek, V.** 1998. Biogeochemical controls and feedbacks on ocean primary production. *Science* 281: 200-206
- Feller, G., Narinx, E., Arpigny J.L., Aittaleb, M., Baise, E. Genicot, S. & Gerday, C.** 1996. Enzymes from psychrophilic organisms. *FEMS Microbiol. Rev.* 18: 189-202
- Feller, G. & Gerday, C.** 2003. Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaption. *Nature Rev.* 1: 200-208
- Fiedler, S., Wagner, D., Kutzbach, L. & Pfeiffer, E.-M.** 2004. Element Redistribution along Hydraulic and Redox Gradients of Low-Centered Polygons, Lena Delta, Northern Siberia. *Soil Science Society of America Journal* 68: 1002-1011
- Fisher, S.G. & Lerman, L.S.** 1979. Length-independent separation of DNA restriction fragments in two dimensional gel electrophoresis. *Cell* 16: 191-200
- Fisher, S.G. & Lerman, L.S.** 1983. DNA fragments differing by single basepair substitutions are separated in danaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 1579-1583
- Fisher, T., Peele, E.R., Ammerman, J.W. & Harding, L.W.** 1992. Nutrient limitation of phytoplankton in Chesapeake Bay. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 82: 51-63
- Francis, C.A., Roberts, K.J., Beman, J.M., Santoro, A.E. & Oakley, B.B.** 2005. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *PNAS* 102: 14683-14688
- Frankland, P. F., & Frankland, G. C.** 1890. The nitrifying process and its specific ferment. Part 1. *Phil. Trans. R. Soc. Biol.* 181: 107-128
- Freitag, A., Rudert, M. & Bock, E.** 1987. Growth of *Nitrobacter* by dissimilatoric nitrate reduction. *FEMS Microb. Lett.* 48: 105-109
- Freitag, T.E. & Prosser, J.I.** 2003. Community structure of ammonia-oxidizing bacteria within anoxic marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1359-71
- Fritsche, W.** 1999. *Mikrobiologie*, 2. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin

- Fukuoka, M., Fukumori, Y. & Yamanaka, T.** 1987. *Nitrobacter winogradskyi* cytochrome a_1c_1 is an iron-sulfur molybdoenzyme having hemes a and c. *J. Biochem.* 102: 525-530
- Galinski, E.A.** 1995. Osmoadaptation in Bacteria. *Adv. Microb. Phys.* 37: 273-328
- Ganzert, L., Jurgens, G., Munster, U. & Wagner, D.** 2007. Methanogenic communities in permafrost-affected soils of the Laptev Sea coast, Siberian Arctic, characterized by 16S rRNA gene fingerprints. *FEMS Microbiol. Ecol.* 59: 476-488
- Garrity, G.M. & Holt, J.G.** 2001. The road to the manual. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The archaea and the deeply branching and phototrophic bacteria* (Boone, D.R., Castenholz, R.W., Garrity, G.M., Eds.), 2nd Ed., Vol. 1, pp. 119-155. Springer-Verlag, New York, NY
- Gieseke, A., Purkhold, U., Wagner, M., Amann, R. & Schramm, A.** 2001. Community structure and activity dynamics of nitrifying bacteria in a phosphate-removing biofilm. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1351-1362
- Gilichinsky, D. A. & Wagener, S.** 1995. Microbial life in permafrost: a historical review. *Permafrost and Perigl. Process.* 6: 243-250
- Gilichinsky D. A.** 2002. Permafrost Model of extraterrestrial habitat. In: *Astrobiology - the quest for the conditions of life*; Kapitel 8; 125-142; Hrsg.: G. Horneck, C. Baumstark-Khan. Springer Verlag 2002
- Gilichinsky, D. A., Rivkina, E., Bakermans, C., Shcherbakova, V., Petrovskaya, L., Ozerskaya, S., Ivanushkina, N., Kochkina, G., Laurinavichuis, K., Pecheritsina, S., Fattakhova, R. & Tiedje, J. M.** 2005. Biodiversity of cryopegs in permafrost. *FEMS Microb. Ecol.* 53: 117-128
- Giovannoni, S. & Rappe, M.** 2000. Evolution, diversity, and molecular ecology of marine prokaryotes, Kirchmann, *Microbial ecology of the oceans*. In: Kirchmann, D.L., pp. 47-84. Wiley-Liss, New York, NY
- Gomez-Villalba, B., Calvo, C., Vilchez, R., Gonzalez-Lopez, J. & Rodelas, B.** 2006. TGGE analysis of the diversity of ammonia-oxidizing and denitrifying bacteria in submerged filter biofilms for the treatment of urban wastewater. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72: 393-400. Epub 2006 Jan 4
- Gounot, A.-M.** 1986. Psychrophilic and psychrotrophic microorganisms. *Experientia* 42; 1192-1197
- Gounot, A.-M.** 1991. Bacterial life at low temperature: physiological aspects and biotechnological implications. *J. App. Bacteriol.* 71; 386-397
- Graff, A. & Conrad, R.** 2005. Impact of flooding on soil bacterial communities associated with poplar (*Populus* sp.) trees. *FEMS Microbiol. Ecol.* 53: 401-15
- Grundmann, G.L. & Normand, P.** 2000. Microscale diversity of the genus *Nitrobacter* in soil on the basis of analysis of genes encoding rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4543-4546
- Halbeck, L., Stahl, F. & Pedersen, K.** 1993. Phylogeny and phenotypic characterization of the stalk-forming and iron-oxidizing bacterium *Gallionella ferruginea*. *J Gen Microbiol.* 139: 1531-5
- Hall, S.J., Hugenholtz, P., Siyambalapitiya, N., Keller, J. & Blackall, L.L.** 2002. The development and use of real-time PCR for the quantification of nitrifiers in activated sludge. *Water Sci. Tech.* 46: 267-272
- Hankinson, T.R. & Schmidt, E.L.** 1988. An acidophilic and neutrophilic *Nitrobacter* strain isolated from the numerically predominant nitrite-oxidizing population of an acid forest soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1536-1540
- Harms, G., Layton, A.C., Dionisi, H.M., Gregory, E.R., Garrett, V.M., Hawkins, S.A., Robinson, K.G. & Saylor, G.S.** 2003. Real-Time PCR Quantification of Nitrifying Bacteria in a Municipal Wastewater Treatment Plant. *Environ. Sci. Technol.* 37: 343-351

- Henriksen, M. & Kemp, M.** 1988. Nitrification in estuarine and coastal marine sediments. In: T.H. Blackburn and J. Sørensen, eds., *Nitrogen Cycling in Coastal Marine Environments*. Wiley-Liss, New York, pp. 207-273
- Heipieper, H.J., Meinhardt, F. & Segura, A.** 2003. The cis-trans isomerase of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas* and *Vibrio*: biochemistry, molecular biology and physiological function of a unique stress adaptive mechanism. *FEMS Microbiol. Lett.* 229: 1-7
- Herbert, R.A.** 1999. Nitrogen cycling in coastal marine ecosystems. *Fems Microb. Reviews.* 23: 563-590
- Hermansson, A. & Lindgren, P.E.** 2001. Quantification of ammonia-oxidizing bacteria in arable soil by real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 972-976
- Heuer, H., Smalla, K.** 1997. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) for studying soil microbial communities. In: van Elsas, JD, Trevors, JT, Wellington EMH, (eds) *Modern Soil Microbiology*. Marcel Dekker, New York. p. 353-373
- Hölemann, J., Wegner, C., Kirillov, S., Koldunov, N., Haas, C., Krumpen, T., Churun, V., Timokhov, L. & Kassens, H.** 2006. Eighth Workshop on Russian-German cooperation: Laptev Sea System; St. Petersburg, Russia; Herausgeber: Sekretariat System Laptev See, Kiel, Deutschland, pp.10
- Holmes, A.J., Tujula, N.A., Holley, M., Contos, A., James, J.M., Rogers, P. & Gillings, M.R.** 2001. Phylogenetic structure of unusual aquatic microbial formations in Nullarbor Caves, Australia. *Environ. Microbiol.* 3: 256-264
- Hovanec, T.A. & DE Long, E.F.** 1996. Comparative analysis of nitrifying bacteria associated with freshwater and marine aquaria. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2888-2896
- Hovanec, T.A., Taylor, L.T., Blakis, A. & DE Long, E.F.** 1998. *Nitrospira*-like bacteria associated with nitrite oxidation in freshwater aquaria. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 258-264
- Howarth, R.W.** 1988. Nutrient limitation of net primary production in marine ecosystems. *Annu. Rev. Ecol.* 19: 89-110
- Hubberten, H.-W. & Schirrmeyer, L.** 2006. Rolle des Permafrosts bei der Landschaftsbildung in der Arktis und Subarktis. Warnsignale aus den Polarregionen; Hrsg.: J. L. Lozán, H. Graßl, H.-W. Hubberten, P. Hupfer, L. Karbe, D. Piepenburg; 48-53
- Ishii, K., Fukui, M. & Takii, S.** 2000. Microbial succession during a composting process as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Jour. Appl. Microbiol.* 89: 768-777
- Ishii, K. & Fukui, M.** 2001. Optimization of Annealing Temperature To Reduce Bias Caused by a Primer Mismatch in Multitemplate PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 3753-3755
- Jackson, C.R., Roden, E.E. & Churchill, P.F.** 1998. Changes in Bacterial Species Composition in Enrichment Cultures with Various Dilutions of Inoculum as Monitored by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 5046-5048
- Jaenicke, R. & Zavodszky, P.** 1990. Proteins under extreme physical conditions. *FEBS* 268: 344-349
- Janssen, H.** 1994. Anreicherung, Isolierung und Charakterisierung nitrifizierender Bakterien aus Permafrostboden. Diplomarbeit, Universität Hamburg
- Jensen, M.A. & Straus, N.** 1993. Effect of PCR conditions on the formation of heteroduplex and single-stranded DNA products in the amplification of bacterial ribosomal DNA spacer regions. *PCR Methods Applic.* 3: 186-194

- Jetten, M. S. M., Horn, S. J. & Van Loosdrecht, M. C. M.** 1997. Towards a more sustainable municipal wastewater treatment system. *Wat. Sci. Tech.* 35: 171-180.
- Jetten, M. S. M., Logemann, S., Muyzer, G. Van Loosdrecht, M. C. M., De Vries, S., Robertson, L. A. & Kuenen, J. G.** 1997. Novel principles in the microbial conversion of nitrogen compounds. *A. van Leeuwenhoek* 72: 75-93.
- Jones, R.D. & Morita, R.Y.** 1985. Low-temperature growth and whole-cell kinetics of a marine ammonium oxidizer, *Marine Ecology Progress Series*, 21: 239-243
- Jones, R.D., Morita, R.Y., Koops, H.-P. & Watson, S. W.** 1988. A new marine ammonium-oxidizing bacterium, *Nitrosomonas cryotolerans* sp. nov. *Can. J. Microbiol.* 34: 1122-1128
- Josserand, A. & Cleyet-Marel, J.C.** 1979. Isolation from soils of *Nitrobacter* and evidence for novel serotypes using immunofluorescence. *Microb. Ecol.* 5: 197-205
- Joye, S.B. & Hollibaugh, J.T.** 1995. Influence of sulfide inhibition of nitrification on nitrogen regeneration in sediments. *Science* 270: 623-625
- Juretschko, S., Timmermann, G., Schmid, M., Schleifer, K.-H., Pommerening-Röser, A., Koops, H.-P. & Wagner, M.** 1998. Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* & *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3042-3051
- Juretschko, S., Loy, A., Lehner, A. & Wagner, M.** 2002. The Microbial Community Composition of a Nitrifying-Denitrifying Activated Sludge from an Industrial Sewage Treatment Plant Analyzed by the Full-Cycle rRNA Approach. *System. Appl. Microbiol.* 25: 84-99
- Kahlil, M.A.K. & Rasmussen, R.A.** 1992. The global source of nitrous oxide. *Journ. Geophys. Res.* 97: 14651-14660
- Kaya, M.** Charakterisierung Nitrit oxidierender Bakterien aus Belebtschlamm. Diplomarbeit 2007. Universität Hamburg
- Kelly, J.J.** 2003. Molecular techniques for the analysis of soil microbial processes: functional gene analysis and the utility of DNA microarrays. *Soil. Sci.* 168: 597-605
- Killham, K.** 1986. Heterotrophic nitrification, p. 117-126. In J. I. Prosser (ed.), *Nitrification*. IRL Press, Oxford, UK.
- Kim, D.J., Kim, T.K., Choi, E.J., Park, W.C., Kim, T.H., Ahn, D.H., Yuan Z., Blackall, L. & Keller, J.** 2004. Fluorescence in situ hybridization analysis of nitrifiers in piggyery wastewater treatment reactors. *Water Sci. Technol.* 49: 333-340
- Kindaichi, T., Ito, T. & Okabe, S.** 2004. Ecophysiological interaction between nitrifying bacteria and heterotrophic bacteria in autotrophic nitrifying biofilms as determined by microautoradiographie-fluorescence *in situ* hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 1641-1650
- Kindaichi, T., Kawano, Y., Ito, T., Satoh, H. & Okabe, S.** 2006. Population dynamics and in situ kinetics of nitrifying bacteria in autotrophic nitrifying biofilms as determined by real-time quantitative PCR. *Biotechnol. Bioeng.* 94: 1111-1121
- Knoop, V. & Müller, K.** 2006. *Gene und Stammbäume*. 1. Auflage Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin
- Knowles, R.** 1982. Denitrification. *Microbial. Rev.* 46: 43 - 70
- Knowles, R.** 2000. Nitrogen Cycle. In: Lederberg, J. (Hrsg.) *Encyclopedia of microbiology*. Academic Press, San Diego; pp. 379 – 391

Kobabe, S., Wagner, D. & Pfeiffer, E.-M. 2004. Characterization of microbial community composition of a Siberian tundra soil by fluorescence in situ hybridization. *FEMS Microb. Ecol.* 50: 13-23

Kobabe, S. 2005. Charakterisierung der mikrobiellen Lebensgemeinschaft eines sibirischen Permafrostbodens. Dissertation. Universität Potsdam.

Koike, I. & Sørensen, J. 1988. Nitrate reduction and denitrification in marine sediments. In: T.H. Blackburn and J. Sørensen, eds., *Nitrogen Cycling in Coastal Marine Environments*. Wiley, New York, pp. 251-273

Könneke, M., Bernhard, A.E., De La Torre, J.R., Walker, C.B., Waterbury, J. & Stahl D.A. 2005. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* 437: 543-546

Koops, H.-P., Pommerening-Röser, A., 2001. Distribution and Ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species. *FEMS Microb. Ecol.* 37: 1-9

Kopczynsky, E.D., Bateson, M.M. & Ward D.M. 1994. Recognition of chimeric small-subunit ribosomal DNAs composed of genes from uncultivated microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 746-748

Kreder, C. A. 1996. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 Gene 32 protein. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1102-1106.

Kumar, S., Nicholas, D.J.D., & Williams, E.H. 1983. Definitive ¹⁵N NMR evidence that water serves as a source of „O“ during nitrite oxidation by *Nitrobacter agilis*. *FEBS Lett.* 152: 71-74

Kumar, G.S., Jagannadham, M.V. & Ray, M.K. 2002. Low-Temperature-Induced Changes in Composition and Fluidity of Lipopolysaccharides in the Antarctic Psychrotrophic Bacterium *Pseudomonas syringae*. *Journal of Bacteriol.* 184: 6746–6749

Laanbroek, H.J. & Woldendorp, J.W. 1995. Activity of chemolithotrophic nitrifying bacteria under stress in natural soils. *Adv. Microb. Ecol.* 14: 275-304

Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing, p.115-175. In: E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.). *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Academic Press, Chichester, United Kingdom

Lebedeva, E.V., Alawi, M., Fiencke, C., Namsaraev, B., Bock E. & Spieck E. 2005. Moderately thermophilic nitrifying bacteria from a hot spring of the Baikal rift zone. *FEMS Microbiology Ecology* 54: 297-306

Lee, M., Nakajima, F. & Furumai, H. (NCBI-Datenbank, 2006). Phylogenetic group identification of novel polyphosphate-accumulating organisms in enhanced biological phosphorus removal processes treating domestic sewage by FISH combined with high-concentration DAPI staining. unpublished

Leloup, J., Loy, A., Knab, N.J., Borowski, C., Wagner, M. & Jorgensen, B.B. 2007. Diversity and abundance of sulfate-reducing microorganisms in the sulfate and methane zones of a marine sediment, Black Sea. *Environ. Microbiol.* 9: 131-42

Levipan, H.A., Aspe, E. & Urrutia, H. 2004. Molecular Analysis of the Community Structure of Nitrifying Bacteria in a Continuous-Flow Bioreactor. *Environ. Techn.* 25: 261-272

Lin, L. 1994. Kompatible Solute in nitrifizierenden Bakterien. Dissertation, Universität Hamburg

Lipski, A., Spieck, E., Makolla, A. & Altendorf, K. 2001. Fatty acid profiles of nitrite-oxidizing bacteria reflect their phylogenetic heterogeneity. *System. Appl. Microbiol.* 24: 377-384

Lorenzen, J., Larsen, L.H., Kjaer, T. & Revsbech, N.P. 1998. Biosensor determination of the microscale distribution of nitrate, nitrate assimilation, nitrification, and denitrification in a diatom-inhabited freshwater sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3264-3269

- Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar, Buchner, A., Lai, T., Steppi, S., Jobb, G., Forster, W., Brettske, I., Gerber, S., Ginhart, A. W., Gross, O., Grumann, S., Hermann, S., Jost, R., König, A., Liss, T., Lussmann, R., May, M., Nonhoff, B., Reichel, B., Strehlow, R., Stamatakis, A., Stuckmann, N., Vilbig, A., Lenke, M., Ludwig, T., Bode, A., & Schleifer, K. H. 2004. ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res.* 32: 1363-1371
- Macfarlane, G.T. & Herbert, R.A. 1984. Dissimilatory nitrate reduction and nitrification in estuarine sediments. *J. Gen. Microbiol.* 130: 2301-2308
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. & Parker, J. 2001. Brock Mikrobiologie, 1. Ausgabe Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin
- Maixner, F., Noguera, D.R., Anneser, B., Stoecker, K., Wegl G., Wagner, M. & Daims, H. 2006. Nitrite concentration influences the population structure of *Nitrospira*-like bacteria. *Environ Microbiol.* 8: 1487-95
- Marriley, L. & Aragno, M. 1999. Phylogenetic diversity of bacterial communities differing in degree of proximity to *Lolium perenne* and *Trifolium repens* roots. *Appl. Soil. Ecol.* 13: 127-136
- Martiny, A.C., Albrechtsen, H.J., Arvin, E. & Molin, S. 2005. Identification of bacteria in biofilm and bulk water samples from a nonchlorinated model drinking water distribution system: detection of a large nitrite-oxidizing population associated with *Nitrospira* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 8611-8817
- McCarthy, J.J. & Carpenter, E.J. 1983. Nitrogen cycling in near-surface waters of the open ocean. In: E.J. Carpenter and D.G. Capone, eds., *Nitrogen in the Marine Environment*. Academic Press, New York, pp. 487-512
- Meincke, M., Bock, E., Kastrau, D. & Kroneck, P.M.H. 1992. Nitrite oxidoreductase from *Nitrobacter hamburgensis*: redox centers and their catalytic role. *Arch. Microbiol.* 158: 127-131
- Mobarry, B.K., Wagner, M., Urbain, V., Rittmann, B.E. & Stahl, D.A. 1996. Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1354-1360
- Moeseneder, M.M, Arrieta, J.S.M., Muyzer, G., Winter, C. & Herndl, G.J. 1999. Optimization of Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis for Complex Marine Bacterioplankton Communities and Comparison with Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3518-3525
- Molina-Munoz, M., Poyatos, J.M., Vilchez, R., Hontoria, E., Rodelas, B. & Gonzalez-Lopez, J. 2007. Effect of the concentration of suspended solids on the enzymatic activities and biodiversity of a submerged membrane bioreactor for aerobic treatment of domestic wastewater. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73: 1441-51. Epub 2006 Oct 17.
- Morita, R. Y. 1975. Psychrophilic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 39: 144-167
- Morita, R. Y. 2000. Low-temperature environments. Lederberg, J. *Encyclopedia of microbiology*, Academic Press, San Diego; 86 - 92
- Mortimer, R.J.G., Krom, D.M., Harris, S.J., Hayes, P.J., Davies, E.M., Davison, W. & Zhang, H. 2002. Evidence for suboxic nitrification in recent marine sediments. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 236: 31-35
- Muyzer, G., de Waal, E. C. & Uitterlinden, A. G. 1993. Profiling a complex microbial population by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase-chain-reaction amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 695-700
- Muyzer, G. & Ramsing, N. B. 1995. Molecular methods to study the organization of microbial communities. *Water Sci. Tech.* 32: 1-9

- Muyzer, G. & Smalla, K.** 1998. Application of denaturing gel electrophoresis (DGGE) and temperature gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* 73: 127-141
- Muyzer, G., Brinkhoff, T., Nübel, U., Santegoeds, C., Schäfer, H. & Wawer, C.** 1998. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. *Mol. Microbial Ecol. Manual* 3.4.4: 1-27
- Muyzer, G.** 1999. DGGE / TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current opinion in Microbiology* 2: 317-322
- Nagai, M., Yoshida, A. & Sato, N.** 1998. Additive effects of bovine serum albumin, dithiothreitol, and glycerol on PCR. *Biochem Mol. Biol. Int.* 44: 157-163
- Nichols, D. S., Hart, P., Nichols, P. D. & McMeekin, T.A.** 1996. Enrichment of the rotifer *Brachionus plicatilis* fed an Antarctic bacterium containing polyunsaturated fatty acids. *Aquaculture* 147: 115-125
- Novikhin, A. & Nitishinsky, M.** 2006. Sources, pathways and transformation of nutrients in the Laptev Sea. Eighth Workshop on Russian-German cooperation: Laptev Sea System; St. Petersburg, Russia; Herausgeber: Sekretariat System Laptev See, Kiel, Deutschland, pp.22
- Okabe, S., Satoh, H. & Watanabe, Y.** 1999. *In situ* analysis of nitrifying biofilms determined by *in situ* hybridization and the use of microelectrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3182-3191
- Oren, A.** 1986. Intracellular salt concentrations of the anaerobic halophilic eubacteria *Haloanaerobium praevalens* and *Halobacteroides halobius*. *Can J. Microbiol.* 32: 4-9
- Orso, S., Gouy, M., Navarro, E. & Normand, P.** 1994. Molecular phylogenetic analysis of *Nitrobacter* spp. *Int. J. of Syst. Bacteriol.* 44: 83-86
- Pace, N.A., Stahl, D.A., Lane, D.J., Olsen, G.** 1986. The analysis of natural microbial communities by ribosomal RNA sequences. *Adv. Microbial. Ecol.* 9: 1-55
- Papen, H. & Butterbach-Bahl, K.** 1999. A 3-year record of nitrogen trace gas fluxes from untreated and limed soil of a N-saturated spruce and beech forest ecosystem in Germany 1. N₂O emissions. *J. Geophys. Res.-Atmos.* 104: 18487-18503
- Permafrost Subcommittee.** 1988. Glossary of permafrost and related ground-ice terms. Associate Committee on Geotechnical Research, National Research Council of Canada, Ottawa
- Phillips, C.J., Paul, E.A. & Prosser, J.L.** 2000. Quantitative analysis of ammonia oxidising bacteria using competitive PCR. *FEMS Microbiol. Ecol.* 32: 167-175
- Picard, C., C. Ponsonnet, E. Paget, X. Nesme, & P. Simonet.** 1992. Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2717-2722
- Pollard, P.C.** 2006. A quantitative measure of nitrifying bacterial growth. *Water Res.* 40: 1569-76
- Ponder, M.A., Gilmour, S.J., Bergholz, P.W., Mindock, C.A., Hollingsworth, R., Thomashow, M.F. & Tiedje, J.M.** 2005. Characterization of potential stress responses in ancient Siberian permafrost psychrotolerant bacteria. *FEMS Microbiol Ecol.* 53: 103-115
- Purkhold, U., Pommerening-Röser, A., Juretschko, S., Schmidt, M.C., Koops, H.-P. & Wagner, M.** 2000. Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and amoA sequence analysis: implications for molecular diversity surveys. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 5368-5382
- Ralsler, M., Querfurth, R., Warnatz, H.-J., Lehrach, H., Yaspo, M.L. & Krobisch, S.** 2003. An efficient and economic enhancer mix for PCR. *Biochem. and Biophys. Res. Com.* 347: 747-751

RDP-II: The ribosomal database project introducing *myRDP* space and quality controlled public data. 2007. J. R. Cole; B. Chai; R. J. Farris; Q. Wang; A. S. Kulam-Syed-Mohideen; D. M. McGarrell; A. M. Bandela; E. Cardenas; G. M. Garrity; J. M. Tiedje. *Nucleic Acids Research* 2007 35 (Database issue): D169-D172; doi: 10.1093/nar/gkl889

Regan, J. M., G. W. Harrington, and D. R. Noguera. 2002. Ammonia- and nitrite-oxidizing bacterial communities in a pilot-scale chloraminated drinking water distribution system. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 73-81

Rheinheimer, G., Hegemann, W, Raff, J. & Sekoulov, I. 1988. Stickstoffkreislauf im Wasser: R Oldenbourg Verlag GmbH, München

Rigor, I. & Colony, R. 1997. Sea-ice production and transport of pollutants in the Laptev Sea, 1979-1993. *Sci. Total Environ.* 202: 89-110

Risgaard-Petersen, N., Rysgaard, S., Nielsen, L.P. & Revsbech, N.P. 1994. Diurnal variation of denitrification and nitrification in sediments colonized by benthic microphytes. *Limnol. Oceanogr.* 39: 573-579

Rivkina, E., Gilichinsky, D., Wagener, S., Tiedje, J.M. & McGrath, J. 1998. Biogeochemical activity of anaerobic microorganisms from buried permafrost sediments. *Geomicrobiol. J.* 15: 187-193

Rivkina, E.M., Friedmann, E.I., McKay, C.P. & Gilichinsky, D.A. 2000. Metabolic activity of permafrost bacteria below freezing point. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3230-3233

Rivkina, E., Laurinavichuis, K., McGrath, J., Tiedje, J.M., Shcherbakova, V. & Gilichinsky, D. 2004. Microbial life in permafrost. *Adv. Space Res.* 33: 1215-1221

Russell, N.J. & Fukunaga, N. 1990. A comparison of thermal adaptation of membrane lipids in psychrophilic and thermophilic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 75: 171-182

Ryther, J. H. & Dunstan, W. M. 1971. Nitrogen, phosphorus, and eutrophication in the coastal marine environment. *Science* 171: 1008-1013

Saitou, R.R. & Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Ecol. Evol.* 4: 406-425

Sanders, T. Vergleichende Untersuchungen kälteliebender nitrifizierender Bakterien aus Permafrostböden im Lena Delta, Sibirien. Diplomarbeit 2006, Universität Hamburg

Santegoeds, C. M., S. C. Nold, & Ward, D.M. 1996. Denaturing gradient gel electrophoresis used to monitor the enrichment culture of aerobic chemoorganotrophic bacteria from a hot spring cyanobacterial mat. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3922-3928

Scheffer, F. & Schachtschabel, P. 2002. Lehrbuch der Bodenkunde. 15., neu bearb. und erw. Auflage v. P. Schachtschabel, H.-P. Blume, G. Brümmer, K.H. Hartge und U. Schwertmann. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart

Schirrneister, L. 2005. Dauerfrost in Sibirien: Archiv der Vergangenheit, Lebensraum der Gegenwart, Problem der Zukunft. EUCOP II 2nd European Conference on Permafrost, Potsdam, Germany, 12-16 June 2005

Schramm, A., De Beer, D., Wagner, M. & Amann, R. 1998. Identification and activities *in situ* of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. as dominant populations in a nitrifying fluidized bed reactor. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3480-3485

Schramm, A., De Beer, D., Van Den Heuvel, J.C., Ottengraf, S. & Amann, R. 1999. Microscale distribution of populations and activities of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. along a microscale gradient in a nitrifying bioreactor: quantification by *in situ* hybridization and the use of microsensors. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3690-3696

- Schramm, A., De Beer, D., Gieseke, A. & Amann, R.** 2000. Microenvironment and distributions of nitrifying bacteria in a membrane bound biofilm. *Environ. Microbiol.* 2: 680-686
- Schramm, A.** 2003. In Situ Analysis of Structure and Activity of the Nitrifying Community in Biofilms, Aggregates, and Sediments. *Geomicrobiol. Journ.* 20: 131-333
- Schwarz, J.I., Eckert, W. & Conrad, R.** 2007. Community structure of Archaea and Bacteria in a profundal lake sediment Lake Kinneret (Israel). *Syst. Appl. Microbiol.* 30: 239-254
- Seewaldt, E., Schleifer, K.-H., Bock, E. & Stackebrandt, E.** 1982. The close phylogenetic relationship of *Nitrobacter* and *Rhodopseudomonas palustris*. *Arch. Microbiol.* 13: 287-290
- Sekiguchi, H., Tomioka, N., Nakahara, T. & Uchiyama, H.** 2001. A single band does not always represent single bacterial strains in denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Biotech. Letters* 23: 1205-1208
- Sheffield, V.C., Cox, D.R. & Myers, R.M.** 1989. Attachment of a 40-bp GC rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 232-236
- Sheffield, V.C., Beck, J.S., Stone, E.M. & Myers R.M.** 1992. A simple and efficient method for attachment of a 40-base pair, GC-rich sequence to PCR-amplified DNA. *Bio. Techniques* 12: 386-387
- Simek, M.** 2000. Nitrification in soil – terminology and methodology (review). *Rostlinna Vyroba* 46: 385-395
- Siripong, S., Kelly, J.J., Stahl, D. & Rittmann, B.E.** 2006. Impact of prehybridization PCR amplification on microarray detection of nitrifying bacteria in wastewater treatment plant samples. *Environ. Microbiol.* 8: 1564-1574
- Skidmore, M., Anderson, S.P., Sharp, M., Foght, J. & Lanoil, B.D.** 2005. Comparison of microbial community compositions of two subglacial environments reveals a possible role for microbes in chemical weathering processes. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 6986-6997
- Soil Survey Staff.** 2003. Keys to Soil Taxonomy. 9th edition. United States Department of Agriculture, Natural Resources Conservation Service, Washington D.C.
- Soina, V.S., Lebedeva, E., Golyshina, O.V., Fedorov-Davydov, D.G. & Gilichinsky, D.A.** 1991. Nitrifying bacteria from permafrost deposits of the Kolyma Lowland. *Microbiologia* 60: 187-190
- Sorokin, D.Y., Muyzer, G., Brinkhoff, T., Kuenen, J.G. & Jetten, M.S.M.** 1998. Isolation and characterization of a novel facultatively alkaliphilic *Nitrobacter* species, *N. alkalicus* sp. nov. *Arch. Microbiol.* 170: 345-352
- Spieck, E., Aamand, J., Bartosch, S. & Bock, E.** 1996. Immunocytochemical detection and location of the membrane-bound nitrite oxidoreductase in cells of *Nitrobacter* and *Nitrospira*. *FEMS Microbiol. Lett.* 139: 71-76
- Spieck, E., Ehrich, S., Aamand, J. & Bock, E.** 1998. Isolation and immunocytochemical location of the nitrite-oxidizing system in *Nitrospira moscoviensis*. *Arch. Microbiol.* 169: 225-230
- Spieck, E. & Bock, E.** 2001. Genus *Nitrospira* p. 451-453. In Boone, D.R., Castenholz, R.W., Garrity, G.M., (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Ed., Vol. 1., The archaea and the deeply branching and phototrophic bacteria, Springer Verlag, New York
- Spieck, E. & Bock, E.** 2005. The Nitrifying Bacteria. In: G. M. Garrity, D. R. Boone, R. W. Castenholz, (Hrsg.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Ed, Vol 2, pp. 137-154, Springer Verlag, New York.

- Spieck, E., Hartwig, C., McCormack, I., Maixner, F., Wagner, M., Lipski, A. & Daims, H.** 2006. Selective enrichment and molecular characterization of a previously uncultured *Nitrospira*-like bacterium from activated sludge. *Environ. Microbiol.* 8: 405-415
- Spurr, A. R.** 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastr. Res.* 26: 31-43
- Steinmüller, W. & Bock, E.** 1976. Growth of *Nitrobacter* in the presence of organic matter. *Arch. Microbiol.* 108: 229-304
- Steven, B., Le´veille, R., Pollard, W.H. & Whyte, L.G.** 2005. Microbial ecology and biodiversity in permafrost. *Extremophiles* 10: 259-267
- Strauss, E.A. & Lamberti, G.A.** 2000. Regulation of nitrification in aquatic sediments by organic carbon. *Limnol. Oceanogr.* 45: 1854-1859
- Strous, M.J.A., Fuerst, E.H.M., Kramer, S., Logemann, G., Muyzer, K.T., Van de Pas-Schoonen, R.I., Webb, J.G. Kuenen & Jetten, M.S.M.** 1999. Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature* 400: 446-449
- Sundermeyer-Klinger, H., Meyer, W., Warninghoff, B. & Bock, E.** 1984. Membrane-bound nitrite oxidoreductase of *Nitrobacter*. evidence for a nitrite reductase system. *Arch. Microbiol.* 140: 153-158
- Svingor, A., Kardos, J., IHajdu, I., Nemeth, A. & Zavodszky, P.** 2001. A Better Enzyme to cope with Cold. *Journ. of Biolog. Chem.* 276: 28121-28125
- Tay, T.-L.S., Ivanov, V., Kim, I.S., Feng, L. & Tay, J.-H.** 2004. Quantification of ratios of Bacteria and Archaea in methanogenic microbial community by fluorescence in situ hybridization and fluorescence spectrometry. *World J. of Microb. and Biotechn.* 17: 583-589
- Teske, A., Alm, E., Regan, J.M., Toze, S., Rittmann, B.E. & Stahl, D.A.** 1994. Evolutionary relationships among ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria. *J. Bacteriol.* 176: 6623-6630
- Tsai, Y. L. & Olson, B.H.** 1992. Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2292-2295
- Umarov, M.M.,** 1991. Biotic sources of nitrous oxide in the context of the global budget of nitrous oxide. In: Bouwman, A.F. *Soils and the Greenhouse Effect*. Chichester: Wiley pp: 263-268
- Unell, M., Kabelitz, N., Jansson, J.K. & Heipieper, H.J.** 2007. Adaptation of the psychrotroph *Arthrobacter chlorophenolicus* A6 to growth temperature and the presence of phenols by changes in the anteiso/iso ratio of branched fatty acids. *FEMS Microbiol. Lett.* 266: 138-43
- Van Migroet, H., Cole, D.W.** 1985 Acidification sources in red alder and douglas fir soils - importance of nitrification. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 49: 1274-1279
- Vishnivetskaya, T.A., Petrova, M.A., Urbance, J., Ponder, M., Moyer, C.L., Gilichinsky, D.A. & Tiedje, J.M.** 2006. Bacterial community in ancient Siberian permafrost as characterized by culture and culture-independent methods. *Astrobiology* 6: 400-14
- Vitousek, P.M., Aber, R.W., Howarth, G.E., Likens, G.E., Matson, P.A., Schindler, D.W., Schlesinger, W.H. & Tilman, D.G.** 1997. Human alterations of the global nitrogen cycle: sources and consequences. *Ecol. Appl.* 7: 737-750
- Voytek, M.A. & Ward, B.B.** 1995. Detection of Ammonia-Oxidizing Bacteria of the Beta-Subclass of the *Proteobacteria* in Aquatic Samples with the PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1444-1450
- Wagner, M., Rath, G., Koops, H.-P., Flood, J. & Amann, R.** 1996. *In situ* analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants. *Water Sci. Tech.* 34: 237-244

- Wagner, D., Spieck, E., Bock, E. & Pfeiffer, E.M.** 2002. Microbial life in terrestrial permafrost: methanogenesis and nitrification in gelsols as potentials for exobiological processes. In: Astrobiology - the quest for the conditions of life: Kapitel 9: 143-159; G. Horneck, G. Baumstark-Kahn (Hrsg.); Springer Verlag
- Ward, B.B., Kilpatrick, K.A., Renger, E. & Eppley, R.W.** 1989. Biological nitrogen cycling in the nitracline. *Limnol. Oceanogr.* 34: 493-513
- Ward, N., F. A. Rainey, B. Goebel, & Stackebrandt, E.** 1995. Identifying and culturing the 'unculturable': a challenge for microbiologists, p. 89-110. In D. Allsopp, R. R. Colwell, and D. L. Hawksworth (ed.), *Microbial diversity and ecosystem function*. CAB International, Wallingford, United Kingdom
- Ward, B.B.** 1996. Nitrification and Denitrification: Probing the Nitrogen Cycle in Aquatic Environments. *Microb. Ecol.* 32: 247-267
- Watson, S.W. & Waterbury, J.B.** 1971. Characteristics of two marine nitrite oxidizing bacteria, *Nitrospina gracilis* nov. gen. nov. sp. and *Nitrococcus mobilis* nov. gen. nov. sp. *Arch. Microbiol.* 77: 203-230
- Watson, S.W., Bock, E., Valois, F.W., Waterbury, J.B. & Schlosser, U.** 1986. *Nitrospira marina* gen. nov. sp. nov.: a chemolithotrophic nitrite-oxidizing bacterium. *Arch. Microbiol.* 144: 1-7
- Watson, S.W., Bock, E., Harms, H., Koops, H.-P. & Hooper, A.B.** 1989. Nitrifying bacteria. p. 1808-1834. In Stanley, J.T., Bryant, M.P., Pfennig, N., Holt, J.G. (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1st Ed., Vol. 3., The Williams & Wilkins Co. Baltimore
- 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
- Wawer, C., Rüggeberg, H., Meyer, G. & Muyzer, G.** 1995. A simple and rapid electrophoresis method to detect sequence variation in PCR-amplified DNA fragments. *Nucleic Acids Res* 23: 4928-4929
- Wieland, G., Neumann, R. & Backhaus, H.** 2001. Variations of Microbial Communities in Soil, Rhizosphere and Rhizoplane in Response to Crop Species, Soil Type, and Crop Development. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 5849-5854
- Wilson, K., Sprent, J.I. & Hopkins, D.W.** 1997. Nitrification in Antarctic soils. *Nature* 385: 404
- Winogradsky, S.** 1890. Recherches sur les organismes de la nitrification. *Ann. Inst. Pasteur* 4: 213-331
- Winslow, C.E.A., Broadhurst, J., Buchanan, R.E. Jr., Krummiede, C., Rogers, L.A. & Smith, G.H.** 1917. The families and genera of the bacteria. Preliminary report of committee of the Society of American Bacteriologists on characterization and classification of bacterial types. *J. Bacteriol.* 2: 505-566
- Woese, C.R., Stackebrandt, E., Weisburg, W.G., Paster B.J., Madigan M.T., Fowler V.J., Hahn, C.M., Blanz, P., Gupta, R., Nealson, K.H. & Fox, G.E.** 1984. The phylogenie of purple bacteria: the α -subdivision. *Syst. Appl. Microbiol.* 5: 315-326
- Woese, C.R., Weisburg, W.G., Paster B.J., Hahn, C.M., Tanner, R.S., Krieg, N.R., Koops, H.-P., Harms, H. & Stackebrandt, E.** 1984. The phylogenie of purple bacteria: the β -subdivision. *Syst. Appl. Microbiol.* 5: 327-336
- Woese, C.R., Weisburg, W.G., Hahn, C.M., Paster B.J., Zablen, L.B., Lewis, B.J., Macke, T.J., Ludwig, W., & Stackebrandt, E.** 1985. The phylogenie of purple bacteria: the χ -subdivision. *Syst. Appl. Microbiol.* 6: 25-33

-
- Ye, B., Yang, D. & Kane, D.L.** 2003. Changes in Lena River streamflow hydrology: Human impacts versus natural variations. *Water Resource Res.* 39: 1200-0214
- Zehr, J.P., Ward, B.B.** 2002. Nitrogen Cycling in the Ocean: New Perspectives on Processes and Paradigms. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 1015-1024
- Zeng, R., Zhao, J., Zhang, R. & Lin, N.** 2005. Bacterial Community in sediment from the western Pacific Warm Pool and its relationship to environment. *China Environ. Sci.* 48: 282-290
- Zhou, J.-Z., Bruns, M. A. & Tiedje, J. M.** 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 461-468
- Zhou, J., Davey, M.E., Figueras, J.B., Rivkina, E., Gilichinsky, D. & Tiedje, J.M.** 1997. Phylogenetic diversity of a bacterial community determined from Siberian tundra soil DNA. *Microbiology.* 143: 3913-3919

9 Anhang

9.1 Charakterisierung der Probennahmeorte

9.1.1 Samoylov; Profil P1 (Proben W1-3, H1-3, Z1-3)

Tabelle 29: Charakterisierung vom Samoylov Polygon-Profil P1. Probennahme August 2004

Probe	Lage [cm]	Feuchte [%]	pH	Ammonium [$\mu\text{g/g TG}$]	Nitrit [$\mu\text{g/g TG}$]	Nitrat [$\mu\text{g/g TG}$]	Corg [%]	N [%]	C/N
Wall1	0-5	24,00	5,50	15,54	0,00	0,00	1,36	0,08	16,17
Wall2	8,5-13,5	33,00	5,50	4,55	0,00	0,00	2,74	0,17	15,91
Wall3	17-22	36,00	5,50	4,54	0,00	0,00	3,89	0,24	16,54
Hang1	0-5	45,00	5,00	14,05	0,00	0,00	10,59	0,35	30,1
Hang2	6-11	35,00	5,50	9,97	0,00	4,82	3,71	0,23	16,38
Hang3	12-17	34,00	5,50	3,51	0,00	0,00	1,74	0,11	16,52
Zentrum1	0-5	74,00	5,00	57,61	0,00	0,00	16,61	0,54	31,01
Zentrum2	12-17	57,00	5,00	8,70	0,00	0,00	6,2	0,22	28,39
Zentrum3	24-29	62,00	5,00	8,12	0,00	0,00	7,81	0,34	23,02

9.1.2 Samoylov; Profil P2 (Proben 6675-6683)

In in allen Proben des Polygonprofils aus Samoylov konnte Ammonium, Nitrit und Nitrat nachgewiesen werde. Eine Aggregation dieser Verbindungen war besonders im Mittelhang festzustellen (Tabelle 30).

Tabelle 30: Charakterisierung vom Samoylov-Profil P2. Probentiefe 5-15 cm. n.g. nicht gemessen. Probennahme August 2001

Probe	Lage	Feuchte [%]	pH	NH ₄ /KCl [$\mu\text{g/g TG}$]	NH ₄ /CaCl ₂ [$\mu\text{g/g TG}$]	Nitrit [$\mu\text{g/g TG}$]	Nitrat [$\mu\text{g/g TG}$]
6675	Frostriss	12,20	5,0	2,14	1,27	0,21	1,09
6676	Wall	20,40	5,5	3,40	1,43	0,25	2,28
6677	Kuppe	38,20	n.g.	2,69	1,81	0,28	1,03
6678	Oberhang	5,70	5,0	2,08	1,18	0,21	1,51
6679	Mittelhang	19,50	6,5	98,42	81,70	0,40	3,43
6680	Unterhang	27,70	6,5	6,57	1,97	0,27	4,67
6681	Unterhang	26,70	5,0	4,29	1,35	0,20	1,73
6682	Zentrum	29,70	n.g.	2,65	1,54	0,21	1,76
6683	Zentrum	25,00	n.g.	1,98	1,50	0,25	0,72

9.1.3 Samoylov; Kliff (Proben 3301-3310)

Tabelle 31: Charakterisierung des Kliffs auf Samoylov. Probennahme August 2004

Probe	Tiefe [m]	Feuchte [%]	pH	Ammonium [µg/g TG]	Nitrit [µg/g TG]	Nitrat [µg/g TG]	Corg [%]	N [%]	C/N
3301	0,8 - 1,0	48,00	5,0	6,37	0,28	1,59	8,05	0,37	21,49
3302	1,4 - 1,5	70,71	5,0	2,26	0,00	0,00	9,52	0,34	28,28
3303	1,9 - 2,0	55,11	5,0	0,00	0,00	0,00	4,89	0,28	17,58
3304	2,4 - 2,5	45,17	5,0	0,00	0,00	0,00	8,1	0,39	20,74
3305	2,9 - 3,0	40,42	6,5	1,22	0,00	0,43	3,34	0,18	18,27
3306	3,5 - 3,6	61,25	5,0	0,03	0,00	1,59	5,51	0,26	20,84
3307	3,9 - 4,0	55,99	5,0	0,00	0,00	1,27	3,79	0,2	18,82
3308	4,5 - 4,6	67,66	5,5	0,00	0,00	0,00	8,64	0,37	23,56
3309	5,0 - 5,1	77,35	5,0	0,00	0,00	0,96	5,08	0,31	23,56
3310	5,5 - 5,6	55,08	6,0	0,00	0,00	0,34	5,65	0,25	22,35

9.1.4 Mamontovy Klyk; Kliff (Proben 100 bis 110 und MAK207-1 bis 10)

Tabelle 32: Charakterisierung des Profils aus Mamontovy Klyk (Kliff). Bodenparameter. Probennahme 2003

Probe	Tiefe [m]	pH	Ammonium [µg/g TG]	Nitrit [µg/g TG]	Nitrat [µg/g TG]	Corg [%]	N [%]	C/N
100	5,3	8,0	43,73	0,00	1207,77	11,08	0,45	24,62
101	5,5	8,0	45,70	12,50	259,34	-	-	-
102	8,3	5,5	69,83	4,16	3,60	9,9	0,53	18,68
104	9,8	6,0	76,68	1,62	3,35	13,5	0,87	15,51
105	13,2	7,0	41,45	1,52	12,34	3,62	0,41	8,83
106	12,4	7,5	40,54	1,76	14,54	3,55	0,41	8,66
107	7,8	7,5	18,63	1,28	8,34	0,45	0,27	1,67
108	7	6,5	19,08	1,11	9,80	4,86	0,49	9,92
109	12,7	7,0	16,61	1,08	13,61	3,35	0,32	10,47
100	14,3	8,0	20,19	1,61	6,42	3,37	0,42	8,02

Tabelle 33: Charakterisierung des Thermoerosionstals aus Mamontovy Klyk

Probe	pH	Ammonium [µg/g TG]	Nitrit [µg/g TG]	Nitrat [µg/g TG]	Corg [%]	N [%]	C/N
207-1 Wall	5,0	25,61	0,21	4,98	9	0,56	16
207-2 Wall	5,0	27,14	0,13	4,59	-	-	-
207-3 Wall	5,5	14,97	0,00	3,84	7,42	0,59	12,52
207-4 Hang	5,0	39,91	0,06	7,39	9,5	0,75	12,96
207-5 Hang	6,5	627,65	1,18	37,85	-	-	-
207-6 Hang	6,5	94,53	1,61	10,19	-	-	-
207-7 Zentrum	5,5	202,23	2,39	0,00	40,22	1,53	26,22
207-8 Zentrum	6,5	444,61	0,99	60,68	38,83	1,57	24,75
207-9 Zentrum	5,5	77,51	0,00	0,00	-	-	-

9.1.5 Sedimente des Lena Flusses

Ammonium und Nitrit konnten nicht nachgewiesen werden, während Nitrat in einer vergleichsweise geringen Konzentration vorlag.

Tabelle 34: Charakterisierung der Sedimente des Lena Flusses

Probe	pH	Ammonium [µg/g TG]	Nitrit [µg/g TG]	Nitrat [µg/g TG]	Corg [%]	N [%]	C/N
Lena- Fluss	6,0	0,00	0,00	29,35	1,448	0,102	14,2

9.1.6 Sedimente der Laptev-See

Tabelle 35: Charakterisierung der Laptev-See Sedimente. PH-Werte, Kohlenstoff und Stickstoffgehalte. Probennahme August 2004

Probe	pH	Corg [%]	N [%]	C/N
0405	6,5	0,49	0,05	10,93
0408	6,0	1,05	0,11	9,89
0409	6,8	0,89	0,08	10,61
0410	6,5	0,35	0,03	11,06
0412	6,8	1,84	0,18	10,15
0423	6,8	1,32	0,13	10,29
0443	6,3	2,22	0,18	12,42
0444	6,8	1,47	0,14	10,69
0445	6,8	0,13	0,01	11,82

9.2 DGGE/TGGE-Analysen

9.2.1 Samoylov; Kliff (Proben 3301-3310)

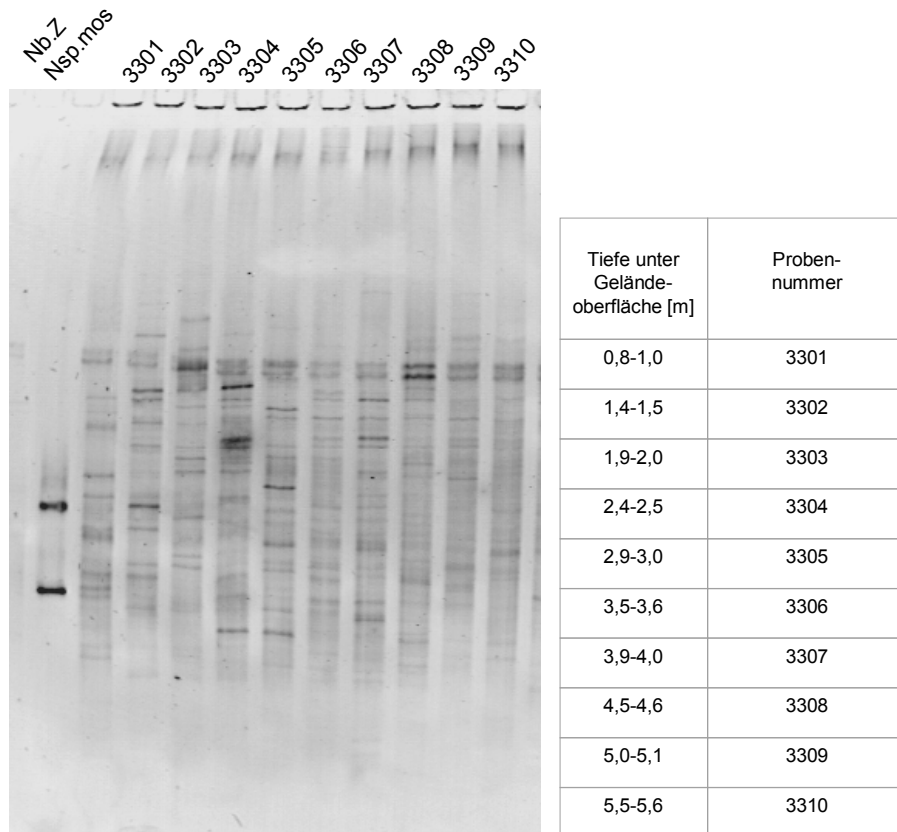


Abbildung 38: TGGE-Profil. Naturproben aus unterschiedlicher Tiefe vom Kliff auf Samoylov. Standard *Nb. vulgaris* (obere Bande) und *Ns. moscoviensis* Spur 2-10 = Naturproben 3301-3310. Die Amplifikation des 16S rRNA Gens wurde mit dem Eubakterien-Primerset durchgeführt. Probennahme 2004. Junger Permafrost (2000-7000 Jahre alt)

9.2.2 Nachweis von *Candidatus Nitrotoga arctica*-ähnlichen Bakterien im Klärwerk

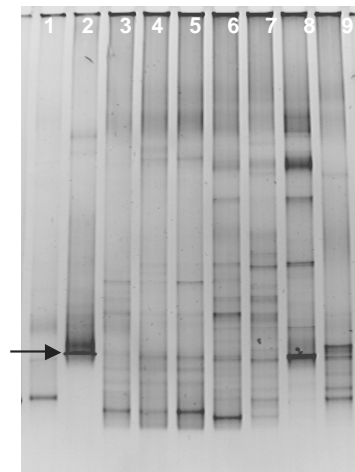


Abbildung 39: DGGE-Profil mit 16S rDNA Fragmenten aus Belebtschlammproben und Anreicherungskulturen aus dem Hamburger Klärwerk (Dradenau) (M. Kaya, 2007. Diplomarbeit). Spur 1 = *Ns. moscoviensis*, 2 = Kultur 6678 (*Candidatus Ntg. arctica*), 3-7 = Naturproben (Belebtschlamm), 8 = Kultur 10°C, 9 = Kultur 28°C. Die Amplifikation des 16S rRNA Gens wurde mit dem Eubakterien-Primerset durchgeführt.

9.3 16S rRNA Sequenzen dieser Arbeit

9.3.1 16S rRNA Sequenzen von *Nitrobacter*-ähnlichen Bakterien

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
Pf111/3  CCCCAGGTCGGAATGCTTAAAGCGTTAGCTGCGCCACTAGTGAGTAAACCCACTAACGGCTGGCATTTCATCGTTTACGGC
5F3      .....
1066      .....

      90      100     110     120     130     140     150     160
Pf111/3  GTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGTGCCTCAGCGTCAGTATCGGGCCAGTGAGCCGCCT
5F3      .....
1066      .....

      170     180     190     200     210     220     230     240
Pf111/3  TCGCCACTGGTGTTCTTGCGAATATCTACGAATTTACCTCTACACTGCGAGTTCCTCACTCCTCTCCCGAACTCAAGAT
5F3      .....
1066      .....

      250     260     270     280     290     300     310     320
Pf111/3  CCTCAGTATCAAAGGCAGTTCTGGAGTTGAGCTCCAGGATTTACCCCTGACTTAAAGACCCGCTACGCACCCTTTACG
5F3      .....
1066      .....

      330     340     350     360     370     380     390     400
Pf111/3  CCCAGTGATTCGGAGCAACGCTAGCCCCCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGGGGCTTATTCTTGCG
5F3      .....
1066      .....

      410     420     430     440     450     460     470     480
Pf111/3  GTACCGTCATTATCTTCCCGCACAAAAGAGCTTTACAACCCTAGGGCCTTCATCACTCACGCGGCATGGCTGGATCAGGC
5F3      .....
1066      .....

      490
Pf111/3  TTGCGCCCATTTGtCCAat
5F3      .....
1066      .....

```

Abbildung 40: 16S rRNA Sequenzen von *Nitrobacter*-ähnlichen Bakterien dieser Arbeit

9.3.2 16S rRNA Sequenzen von *Nitrospira*-ähnlichen Bakterien

	10	20	30	40	50	60
<i>Nitrospira moscoviensis</i>	AGGCAGCAGT	AAGGAATATT	GCGCAAT	GGGCGAAAGCCT	GAC	GCAGCGACGCCGCGTGG
SAM,6678c,3304/5/9
SAM,6678a,1066,1052	T.....C.....
SAMOYLOV_Z2-3	C.....
SAM,W1-3,H2-3,Z3
LENA Sedimente
<i>C.Nitrospira defluvii</i>
6675,3301-9,H1-2,Z1-2
KURUIGHAKH,1051	GA.....
SAMOYLOV,H1-3
MAMOHTOVY,106-107,109	C.....T.....
SAMOYLOV,6678b	GC.....GA.....T-C.....
SAMOYLOV,W2	G.....

	70	80	90	100	110	120
<i>Nitrospira moscoviensis</i>	GGGATGAAGGTCTTCGGATT	GTA AACCCCTTT	CGGGAGGGAAGATGG	AAACGGG	TAAC	
SAM,6678c,3304/5/9
SAM,6678a,1066,1052
SAMOYLOV_Z2-3	C.....
SAM,W1-3,H2-3,Z3
LENA Sedimente
<i>C.Nitrospira defluvii</i>
6675,3301-9,H1-2,Z1-2
KURUIGHAKH,1051
SAMOYLOV,H1-3
MAMOHTOVY,106-107,109
SAMOYLOV,6678b	T.....G.....
SAMOYLOV,W2

	130	140	150	160	170	180
<i>Nitrospira moscoviensis</i>	C-GTTCGGACGGTACCTCCAGAAGCAGCCACGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAA					
SAM,6678c,3304/5/9
SAM,6678a,1066,1052
SAMOYLOV_Z2-3	G.....
SAM,W1-3,H2-3,Z3
LENA Sedimente
<i>C.Nitrospira defluvii</i>	C.....
6675,3301-9,H1-2,Z1-2
KURUIGHAKH,1051	C.....
SAMOYLOV,H1-3
MAMOHTOVY,106-107,109
SAMOYLOV,6678b
SAMOYLOV,W2	GA.GG.....	A.....

	190	200	210	220	230	240
<i>Nitrospira moscoviensis</i>	TACGAAGGTGGCAAGCGTTGTT	CGGATTC	ACTGGGCGTACAGGGAGCGTAGGCCGTTGGG			
SAM,6678c,3304/5/9
SAM,6678a,1066,1052
SAMOYLOV_Z2-3
SAM,W1-3,H2-3,Z3
LENA Sedimente
<i>C.Nitrospira defluvii</i>
6675,3301-9,H1-2,Z1-2
KURUIGHAKH,1051
SAMOYLOV,H1-3
MAMOHTOVY,106-107,109
SAMOYLOV,6678b
SAMOYLOV,W2

	250	260	270
<i>Nitrospira moscoviensis</i>	TAAG-CCCT-CCGTGAAATATCC-GG-GCCT-AACC		
SAM,6678c,3304/5/9
SAM,6678a,1066,1052
SAMOYLOV_Z2-3
SAM,W1-3,H2-3,Z3
LENA Sedimente
<i>C.Nitrospira defluvii</i>
6675,3301-9,H1-2,Z1-2
KURUIGHAKH,1051
SAMOYLOV,H1-3
MAMOHTOVY,106-107,109
SAMOYLOV,6678b
SAMOYLOV,W2

Abbildung 41: 16S rRNA Sequenzen von *Nitrospira*-ähnlichen Bakterien dieser Arbeit

LPTVS11	10	20	30	40	50	60	70	80
LPTVS11	CGAACGCTGGCGGCGCGCCTAACACATGCAAGTCGAAACGAGAATCCGGGGCAACCCGGTAGTAAAGTGGCAAACGGGTGA							
LPTVF2	. . . G							
LPTVS11	90	100	110	120	130	140	150	160
LPTVS11	GGAAATACATGGGTAACCTACCCTTGAGAAGGGAATAACCCGCCGAAAGGTGAGCTAATACCCTATACGCTTTTGTCTTTA							
LPTVF2 A . C A . T G							
LPTVS11	170	180	190	200	210	220	230	240
LPTVS11	TGAAAAGCAAAGGAAAGCCAAGCCGAGGGCTTGGCACTCAAGGAGGGGCTCATGTCTCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAAC							
LPTVF2	C A G . T G . T A T							
LPTVS11	250	260	270	280	290	300	310	320
LPTVS11	GGCCTACCAAGGCTACGACGGGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGCACTGAGATACGGGCCAGACTCCTA							
LPTVF2							
LPTVS11	330	340	350	360	370	380	390	400
LPTVS11	CGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGCAAGCGACGCCCGCTGGGGGATGAAGGTTTTCCGG							
LPTVF2							
LPTVS11	410	420	430	440	450	460	470	480
LPTVS11	ATTGTAACCCCTTTGTGAGGAAAGATAAAGTGGGTAACCACTTAGACGGTACCTCAAGAAAAAGCCAGGGCTAACTTC							
LPTVF2 T . . C A G							
LPTVS11	490	500	510	520	530	540	550	560
LPTVS11	GTGCCAGCAGCCCGGTAATACGAAAGGTGGCGAGCGTTGTTCCGGATTACTGGGCGTAAAGAGGCACGTAGGGCGTTGGGT							
LPTVF2 A							
LPTVS11	570	580	590	600	610	620	630	640
LPTVS11	AAGCCTCTTGGGAAATCTCCCGGCTTAACCGGGAAAGGTGAGGGGAACACTCAGCTAGAGGACGGGAGAGGAGCGCGG							
LPTVF2 A T							
LPTVS11	650	660	670	680	690	700	710	720
LPTVS11	AATCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCGGGAAGAAGGCCCGGTGGCGAAGGCCGGCGCTCTGGAACGTACCTGAC							
LPTVF2							
LPTVS11	730	740	750	760	770	780	790	800
LPTVS11	GCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTGCACCTAAGTGTCT							
LPTVF2 G . T							
LPTVS11	810	820	830	840	850	860	870	880
LPTVS11	GGCGGTTTACCGCCGGTGCCGCAGCTAACGCAGTAAGTGCACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGG							
LPTVF2 T A . C							
LPTVS11	890	900	910	920	930	940	950	960
LPTVS11	AATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCCAGGTTGGACAT							
LPTVF2							
LPTVS11	970	980	990	1000	1010	1020	1030	1040
LPTVS11	GCTCGTGGTACGAACCTGAAAAGGTGAGGACTCTGAAAAGGAGAGCGGAGCTCAGGTGCTGCATGGCTGTCTGCTCAGCTCGTG							
LPTVF2 G C T C G							
LPTVS11	1050	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120
LPTVS11	CCGTGAGGTGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGTAACCCCTGTCTTCAAGTTGCCATCGGGTCAAGCCGAGCACTCTGGA							
LPTVF2 T A							
LPTVS11	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200
LPTVS11	GAGACTGCCCAGGATAACGGGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGTCAGCATGGCCTTTATGCCTGGGGCTACACACGTTG							
LPTVF2							
LPTVS11	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280
LPTVS11	CTACAATGACCGGTACAAAGGGTTGCAATCCCGTAAGGGGGAGCCAACTCAAAAAACCGGCCTCAGTTCAGATTGAGGT							
LPTVF2 G C G							
LPTVS11	1290	1300	1310	1320	1330	1340	1350	1360
LPTVS11	CTGCAACTCGACCTCATGAAGGTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCCGGTTGAATACGTTCCCGGGGCTTGT							
LPTVF2 C							
LPTVS11	1370	1380	1390	1400	1410	1420	1430	1440
LPTVS11	ACACACCGCCCGTACACACCAGAAAGTCAAGCTGTACCAGAAAGTCACTGGCGCCAACCCGTAAAGGGAGGCAGGTGCCCAAAG							
LPTVF2 A							
LPTVS11	1450	1460						
LPTVS11	GTATGGTTGGTAATTGGGGT							
LPTVF2							

Abbildung 42: 16S rRNA Sequenzen von marinen *Nitrospira*-ähnlichen Bakterien dieser Arbeit (Stämme S11 und F2 aus Laptev-See Sedimenten)

Danksagung

Meinen Dank möchte ich gleichermaßen Frau **Prof. Dr. Eva Maria Pfeiffer** und Frau **PD Dr. Eva Spieck** für die Themenstellung und Betreuung dieser Arbeit aussprechen. Ihre Anleitung und die vielen Anregungen aus unseren Diskussionen haben mir bei der Versuchsdurchführung entscheidend geholfen.

Herr **Prof. Dr. Wolfgang Streit** stand mir stets mit fachlichen Ratschläge zur Seite und unterstützte die Durchführung der vorliegenden Arbeit. Herrn **Prof. Dr. Eberhard Bock** danke ich insbesondere dafür, dass er mich an seinem unerschöpflichen Wissen über den mikrobiellen Stickstoffkreislauf teilhaben ließ. Bei Herrn **Prof. Dr. Wolfgang Sand** möchte ich mich für die Anleitung und Betreuung während des ersten Jahres bedanken.

Der Abteilung Mikrobiologie, im Besonderen Herrn **PD Dr. Andreas Pommerening-Röser** und Herrn **PD Dr. Stefan Schmidt** bin ich dankbar für die fachlichen Diskussionen und die angenehme Zeit im Institut.

Für die Einführung in die phylogenetischen Analyseprogramme und die DGGE-Technik möchte ich **Dr. Romana Hornek** danken. **Dr. André Lipski, Tina Sanders, Britta Soltau** und **Meral Kaya** danke ich für die konstruktive Zusammenarbeit. Für die bodenkundliche Begutachtung der Arbeit sowie viele hilfreiche Gespräche habe ich **Dr. Christian Knoblauch** zu danken. Bei **Dr. Claudia Fiencke** und **Dr. Christine Hartwig** möchte ich mich für die zahlreichen Ideen und Erklärungen zur IF-Färbung und FISH bedanken. Frau **Dr. Barbara Rudolph** und **Cyrille Claudel** gaben mir nützliche Hinweise zu molekularbiologischen Techniken. Für die Einweisung in die HPLC-Messtechnik danke ich Herrn **Peter-Georg Josza**. Frau **Dr. Elena Lebedeva** habe ich unter anderem für die Bereitstellung der Anreicherungskulturen zu danken. Mein besonderer Dank gilt Frau **Dr. Friedel Feindt**.

Die vorliegende Arbeit wurde vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (**BMBF**) im Rahmen des multidisziplinären deutsch-russischen Verbundvorhabens „System Laptev-See“ unterstützt. Für die bereitgestellten Mittel möchte ich mich an dieser Stelle bedanken.

Meinen Eltern **Angelika** und **Ali**, meinem Bruder **Malik** sowie meiner Freundin **Sonja** und allen **Freunden** danke ich für das Verständnis und die Unterstützung.