

Nitrospira

Schlüsselorganismus der Nitritoxidation in gemäßigten und extremen Lebensräumen

Dissertation

Zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften
des Fachbereichs Biologie, der Fakultät für Mathematik,
Informatik und Naturwissenschaften,
der Universität Hamburg

vorgelegt von

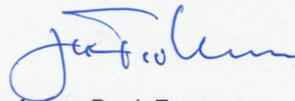
Sandra Off

aus Hamburg

Hamburg, Mai 2012

Genehmigt vom Fachbereich Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Frau Priv.-Doz. Dr. E. SPIECK
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Professor Dr. W. STREIT
Tag der Disputation: 29. Juni 2012

Hamburg, den 15. Juni 2012



Professor Dr. J. Fromm
Vorsitzender des Promotionsausschusses
Biologie

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGEN UND BEGRIFFE	V
ZUSAMMENFASSUNG	VI
SUMMARY	VIII
1 EINLEITUNG	2
1.1 Anthropogener Stickstoffeintrag	2
1.2 Toxizität von Ammoniak und Nitrit	2
1.3 Abwasserreinigungs-Anlagen	4
1.4 Nitrifikation	4
1.5 Nitrit-oxidierende Bakterien	8
1.6 Die Gattung <i>Nitrospira</i>	10
1.7 Die Nitritoxidoreduktase von <i>Nitrospira</i>	12
1.8 Zielsetzung	15
2 MATERIAL UND METHODEN	16
2.1 Bakterien	16
2.2 Kulturbedingungen	19
2.2.1 Lösungen und Nährmedien	19
2.3 Kulturführung	23
2.3.1 Anzucht	23
2.3.2 Reinheitskontrolle	23
2.3.3 Abernten der Arbeitskulturen	24
2.3.4 Selektive Anreicherung und Isolierung von <i>Nitrospira</i>	24
2.3.4.1 Percollgradient	25
2.3.4.2 Verdünnungsreihen	26
2.4 Physiologische Untersuchungen	26
2.4.1 Temperaturoptima	26

2.4.2	pH-Optimum	27
2.4.3	Toleranz gegenüber verschiedenen Nitritkonzentrationen	27
2.4.4	Überlebensfähigkeit von <i>Nitrospira</i> im Hungerzustand	28
2.5	Analytische Nachweismethoden	29
2.5.1	Qualitative Nitritbestimmung	29
2.5.1.1	Nitrit- und Nitratbestimmung mittels HPLC	29
2.5.2	Zellzahlbestimmung mit der MPN-Methode	30
2.6	Untersuchung von Nukleinsäuren	30
2.6.1	Isolierung von genomischer DNA	30
2.6.2	Agarosegelelektrophorese	31
2.6.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	32
2.6.3.1	Verwendete Primer und Reaktionsbedingungen	32
2.6.4	Reinigung der PCR-Produkte	34
2.6.5	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP)	34
2.6.6	Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (DGGE)	34
2.7	Klonierung	37
2.7.1	Transformation und Kultivierung von <i>E. coli</i>	37
2.7.2	Identifizierung rekombinanter Transformanden mittels Blau / Weiß-Screening	38
2.7.3	Isolierung von Plasmiden	38
2.8	Sequenzvergleiche und Stammbauberechnungen	38
2.8.1	Sequenzvergleiche (Alignment)	38
2.8.2	Stammbauberechnungen	38
2.9	Isolierung der Nitritoxidoreduktase (Nxr)	39
2.9.1	Zellaufschluss	39
2.9.2	Identifizierung der Nxr-Proteine	40
2.9.2.1	Trennung des Rohextraktes mittels FPLC	40
2.9.2.2	Bestimmung des Proteingehaltes	41
2.9.2.3	Bestimmung der Nitritoxidaseaktivität	41
2.9.2.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	42
2.9.2.5	Identifizierung der Gamma-Untereinheit der Nxr	44
2.10	Mikroskopische Untersuchungen	44
2.10.1	<i>In situ</i> -Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden	44
2.10.2	Elektronenmikroskopie	46

2.10.2.1	Transelektronenmikroskopie (TEM).....	46
2.10.2.2	Negativkontrastierung.....	48
2.10.3	Rasterelektronen-Mikroskopie (REM)	49
3	PUBLIKATIONEN	50
3.1	Temperature influences the population structure of nitrite-oxidizing bacteria in activated sludge	50
3.2	Enrichment and physiological characterization of a novel <i>Nitrospira</i> -like bacterium obtained from a marine sponge	51
3.3	Isolation and characterization of a novel thermophilic nitrite-oxidizing bacterium from a geothermal spring	52
4	ERGEBNISSE.....	53
4.1	Diversität von <i>Nitrospira</i> : Phylogenetische Zuordnung von NOB-Anreicherungen und neuen Reinkulturen	53
4.1.1	Screening von Anreicherungskulturen nach verschiedenen NOB.....	53
4.1.2	DGGE- Technik	60
4.1.3	Phylogenetische Untersuchungen auf Grundlage von 16S rRNA Gensequenzen	68
4.1.4	Gen der Beta-Untereinheit der Nxr (NxrB) als phylogenetischer Marker....	71
4.2	Die Isolierung von <i>Nitrospira defluvii</i> : Zusammenspiel von klassischer Mikrobiologie und molekularen Methoden.....	74
4.2.1	Einfluss von organischen Substanzen auf das Wachstum von <i>Nitrospira defluvii</i>	77
4.3	Physiologie von <i>Nitrospira</i> : Anpassung an moderate und extreme Lebensräume	78
4.3.1	Bildung von extrapolymere Substanzen unter Stress.....	78
4.3.2	Hungertest: Überdauern ohne Substrat-/Energiezufuhr	82
4.3.3	Substratoptimum und -toleranz.....	83
4.3.4	pH-Optimum	85
4.4	<i>Nitrospira</i> in Konkurrenz zu anderen NOB in Süßwasser-Aquakulturanlagen.....	88
4.4.1	Einfluss des erniedrigten pH-Wertes	92
4.4.2	Einfluss des erhöhten Mangangehaltes	94
4.5	Die Nitritoxidoreduktase: Untersuchungen zum Schlüsselenzym von <i>Nitrospira</i>	96
4.5.1	Isolierung der Nitritoxidoreduktase (Nxr)	96
4.5.2	Identifizierung der Gamma-Untereinheit der Nxr	101

5	DISKUSSION	104
5.1	Die Diversität der Gattung <i>Nitrospira</i>	104
5.1.1	Phylogenetische Untersuchungen auf Grundlage von 16S rRNA Gensequenzen	105
5.1.2	NxrB als phylogenetischer Marker	107
5.2	Isolierung von <i>Nitrospira defluvii</i>	108
5.3	Physiologie von <i>Nitrospira</i>	109
5.3.1	Bildung von extrapolymere Substanzen unter Stresseinwirkung	110
5.3.2	Anpassung an geringe Sauerstoff- und Substratverhältnisse	111
5.3.3	Anpassung an ungünstige pH- und Temperaturbedingungen.....	113
5.4	<i>Nitrospira</i> in Konkurrenz zu anderen NOB in Süßwasser-Aquakulturanlagen.....	115
5.5	Das Schlüsselenzym der Nitritoxidation.....	116
6	LITERATURVERZEICHNIS	120
7	ANHANG	134

Abkürzungen und Begriffe

Abb.	Abbildung
ad	auffüllen auf
Amo	Ammoniak-Monooxygenase
AmoA	Alpha-Untereinheit der Ammoniak-Monooxygenase
AOA	Ammoniak-oxidierende Archaeen
AOB	Ammoniak-oxidierende Bakterien
Aqua bidest.	doppelt deionisiertes Wasser
Aqua dest.	deionisiertes Wasser
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serum Albumin (Rinderalbumin)
Da	Dalton (relative Molekülmasse)
DGGE	Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPS	Extrazelluläre polymere Substanzen
EUB	Eubakterien
Fa.	Firma
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
ICM	intracytoplasmatische Membran
MPN	Most Probable Number
Nb	<i>Nitrobacter</i>
NOB	Nitrit-oxidierende Bakterien
Ns / Nsp	<i>Nitrospira</i>
Ntoga	<i>Candidatus Nitrotoga</i>
Nxr	Nitritoxidoreduktase
NxrA	Alpha-Untereinheit der Nitritoxidoreduktase
NxrB	Beta-Untereinheit der Nitritoxidoreduktase
ORF	potentieller Protein codierender Sequenzabschnitt
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
REM	Raterelektronenmikroskopie
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Analyse
RNA	Ribonukleinsäure
16S rRNA	16S Untereinheit der ribosomalen RNA
SBR	Sequencing Batch Reactor
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBAHS	Tetrabutylammoniumhydrogensulfat
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
Upm	Umdrehung pro Minute
active layer	sommerliche Auftauschicht über dem Permafrost im Wirkungsbereich der Kryoturbation
SBR-Anlage	Kläranlage nach dem Belebtschlammverfahren, in dem die biologische Reinigung in einem Becken stattfindet und chargenweise (batch-) betrieben werden

Zusammenfassung

Nitrit-oxidierende Bakterien der Gattung *Nitrospira* sind für den zweiten Schritt der Nitrifikation verantwortlich. Sie weisen charakteristisch eine hohe Flexibilität und Diversität auf, die im Rahmen dieser Arbeit genauer untersucht wurde. Durch Optimierung der Kultivierungsbedingungen wurden 24 neue Anreicherungen aus den unterschiedlichsten Lebensräumen wie Permafrost beeinflussten Böden, Wüstenböden, geothermalen Quellen und Süßwasser-Aquakulturen gewonnen und phylogenetisch eingeordnet. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Zuordnung der 16S rRNA Gensequenzen der Anreicherungskulturen innerhalb der Untergruppen nicht habitatspezifisch ist. Ausnahmen bilden einzig der marine Cluster IV und der moderat thermophile Cluster VI. Für Untersuchungen der Verwandtschaftsverhältnisse anhand eines funktionellen Gens ist das der Beta-Untereinheit der Nitritoxidoreduktase (NxrB) nur eingeschränkt verwendbar, da die Phylogenie der Stammbäume basierend auf der 16S rRNA und der NxrB heterogen ist. Anhand der Aminosäuresequenz der NxrB können jedoch Hinweise auf markante physiologische Eigenschaften wie die Anpassung an trockene Habitate gewonnen werden.

In Kooperation mit der russischen Kollegin Dr. Elena Lebedeva ist es gelungen, eine neue Art (*Nitrospira calida*), die aus geothermalen Quellen stammt, zu isolieren und zu beschreiben. Des Weiteren wurde ein Vertreter von *Nitrospira* aus dem Mesohyl des marinen Schwammes *Aplysina aerophoba* im Labor kultiviert und charakterisiert. Physiologische Vergleiche von *Nitrospira*-Kulturen haben gezeigt, dass diese Nitritoxidanten eine hohe Anpassung an niedrige Sauerstoff- und Substratkonzentrationen aufweisen. Hinsichtlich des Einflusses des pH-Wertes auf das Wachstum von *Nitrospira* konnte festgestellt werden, dass diese Bakterien empfindlich gegenüber sauren pH-Werten reagieren und unterhalb eines pH-Wertes von 6 in einer Mischkultur von *Nitrobacter* verdrängt wurden. Zusätzliche Untersuchungen zur ökologischen Nischenbildung haben ergeben, dass die Temperatur einen wesentlichen Einfluss auf die Zusammensetzung der Nitrit-oxidierenden Gemeinschaft im Belebtschlamm hat. Während *Candidatus Nitrotoga* bei niedrigen Temperaturen bis 22 °C aktiv ist, zeigt *Nitrospira* ein breites Temperaturspektrum von 10 - 32 °C. *Nitrobacter* lässt sich dagegen vorzugsweise ab 17 °C anreichern. Diese Differenzierung ermöglicht eine Koexistenz aller drei Gattungen im selben Lebensraum mit jahreszeitlich schwankenden Temperaturen. Auch in einer Süßwasser-Aquakulturanlage tritt diese Koexistenz der genannten drei Gattungen auf. Weiterführende Untersuchungen haben gezeigt, dass ein leicht saurer pH-Wert von 6,8 und

ein erhöhter Mangangehalt im Wasserkreislauf der Anlage geringe Selektionsvorteile für *Candidatus Nitrotoga* gegenüber *Nitrospira* darstellen.

Die im Genom codierte Resistenz gegenüber Acriflavin wurde erfolgreich eingesetzt, um die letzten Begleitorganismen zu hemmen und eine Reinkultur von *Nitrospira defluvii* zu erhalten. Mit dieser konnten physiologische Untersuchungen zum mixotrophen Wachstum durchgeführt werden. Dabei zeigte sich, dass *N. defluvii* durch Zugabe von Pyruvat schneller wachsen kann als im rein mineralischen Medium. Weiterhin wurde eine Zunahme an extrapolymere Substanzen festgestellt, wenn Zellen von *N. defluvii* Stressfaktoren wie einer hohen Nitritkonzentration (30 mM) oder dem Antiseptikum Acriflavin ausgesetzt wurden. Aus der Reinkultur von *N. defluvii* und zusätzlich von *Nitrospira moscoviensis* konnte der Enzymkomplex der Nitritoxidoreduktase (Nxr) erfolgreich isoliert werden. Ein rein mechanischer Zellaufschluss resultierte in einer intakten und aktiven Nxr, die mittels Zentrifugation und anschließender FPLC (fast performance liquid chromatography) von größeren Membranfragmenten und anderen Proteinen getrennt werden konnte. Bemerkenswert war dabei die Anreicherung der spezifischen Aktivität der Nxr-Fractionen bis zu 23-fach im Vergleich zu den Rohextrakten. Zusätzlich zu den bekannten Alpha- und Beta-Untereinheiten der Nxr wurde in der aktiven Fraktion die putative Gamma-Untereinheit mit einem relativen Molekulargewicht von 34 kDa identifiziert. Sie codiert für eine transmembrane Domäne, die als Membrananker der Nxr dienen könnte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die Aussage, dass *Nitrospira* in vielen moderaten und extremen Lebensräumen der Schlüsselorganismus der Nitritoxidation ist. Die größere Anzahl an Referenzorganismen und die neu erlangten Erkenntnisse über die Physiologie und Biochemie von *Nitrospira* ermöglichen weiterführende Experimente, um die Wissenslücke zu *Nitrobacter* zu schließen.

Summary

The genus *Nitrospira* belongs to the nitrite-oxidizing bacteria, which are responsible for the second step of nitrification. In this work their characteristic high level of flexibility and diversity has been studied in culture. By optimizing the culture conditions, 24 new enrichments from different habitats such as permafrost affected soils, desert soils, geothermal springs and freshwater aquacultures were obtained and classified phylogenetically. It could be shown that the assignment of the 16S rRNA gene sequences of the enrichment cultures within the subgroups is not habitat specific with the exceptions of the marine cluster IV and the moderately thermophilic cluster VI. For studies of the relationships on basis of a functional gene, the beta-subunit of the nitrite oxidoreductase (NxrB) is only partially applicable, since the phylogeny of the trees based on 16S rRNA- and the NxrB-sequences is heterogeneous. However, based on the amino acid sequence of NxrB, indications for physiological properties such as adaptations to arid habitats were obtained.

In cooperation with the Russian colleague Dr. Elena Lebedeva from the Winogradsky Institute of Microbiology in Moscow, a new species (*Nitrospira calida*), which originates from a geothermal spring, was successfully isolated and described. Furthermore, a representative of *Nitrospira* from the mesohyl of the marine sponge *Aplysina aerophoba* was cultivated in the laboratory and characterized. Physiological studies of *Nitrospira*-cultures have shown that these nitrite-oxidizing bacteria possess a high adaptation to low oxygen and substrate concentrations. Regarding the influence of pH on the growth of *Nitrospira*, it was found that these bacteria are sensitive to acidic pH values. In a mixed culture with *Nitrobacter* bacteria of the genus *Nitrospira* were replaced below a pH value of 6. Additional studies on the ecological niche formation have shown that the temperature has a significant influence on the composition of the nitrite-oxidizing community in activated sludge. While the cold adapted *Candidatus Nitrotoga* is active at low temperatures up to 22 °C, *Nitrospira* shows a wide temperature range of 10 - 32 °C for growth. However, *Nitrobacter* can be enriched preferably above 17 °C. The different temperature profiles explain that several nitrite-oxidizing bacteria can survive in distinct ecological niches. a coexistence of the three genera (*Nitrospira*, *Nitrobacter* and *Candidatus Nitrotoga*) was also found in a freshwater aquaculture. Further studies have shown that a slightly acidic pH of 6.8 and increased manganese content in the water cycle of the aquaculture represent selective advantages for *Candidatus Nitrotoga* compared to *Nitrospira*.

The genome encoded resistance against acriflavine was used successfully to inhibit the last accompanying heterotrophic organisms and to obtain a pure culture of *Nitrospira defluvii*. This culture was used for physiological studies about mixotrophic growth. It was found that *N. defluvii* can grow faster by the addition of pyruvate than in purely mineral medium. An increase in extra-polymeric substances was noted, when cells of *N. defluvii* were exposed to stress factors such as high nitrite concentration (30 mM) or the antiseptic acriflavine. In biochemical experiments, the Nxr of *N. defluvii* and *Nitrospira moscoviensis* could be successfully isolated. A purely mechanical cell disruption resulted in an intact and active Nxr, which could be separated from large membrane fragments and other proteins. Noteworthy was the accumulation of the specific activity of the Nxr fractions up to 23-fold compared to the crude extracts. In addition to the known alpha- and beta-subunits of the Nxr in the active fraction, the putative gamma subunit with a relative molecular weight of 34 kDa was identified. It encodes for a transmembrane domain that could serve as a membrane anchor of the Nxr.

The results of this study support the statement that *Nitrospira* is the key organisms of nitrite oxidation in many moderate and extreme habitats. The larger number of reference organisms and the newly acquired knowledge about the physiology and biochemistry of *Nitrospira* allows further experiments to close the knowledge gap to *Nitrobacter*.

1 Einleitung

1.1 Anthropogener Stickstoffeintrag

Stickstoff ist neben Sauerstoff, Wasserstoff und Kohlenstoff eines der vier dominierenden Elemente der Biosphäre. Stickstoffhaltige Verbindungen in Nucleinsäuren und Proteinen sind essentiell für alle Lebewesen.

Durch anthropogene Einflüsse wie Überdüngung, Intensivtierhaltung, Nutzung fossiler Brennstoffe und den stetig steigenden Mengen von Abwässern gehören Stickstoffverbindungen nicht mehr zu den wachstumsbegrenzenden Faktoren in der Umwelt (GALLOWAY und COWLING, 2002). Heutzutage stammt mehr als Hälfte des gebundenen Stickstoffs, der jährlich in den globalen Kreislauf eingetragen wird, aus anthropogenen Prozessen (KLOTZ und STEIN, 2008). Der Großteil des Stickstoffs gelangt bei der Produktion von Ammoniak als Düngemittel durch das Haber-Bosch Verfahren in den globalen biogeochemischen Stickstoffkreislauf. Aber auch die Kultivierung von Leguminosen, zum Beispiel Sojabohnen, die in Symbiose mit stickstofffixierenden Knöllchenbakterien (Rhizobien) wachsen, trägt zur Erhöhung von bioverfügbaren Stickstoffverbindungen bei. Dieser vermehrte Eintrag von gebundenem Stickstoff führt zur Störung des ökologischen Gleichgewichts. Was zu einer Eutrophierung und zur Hypoxie (Sauerstoffarmut) aquatischer Systeme führen kann (DIAZ und ROSENBERG, 2008).

1.2 Toxizität von Ammoniak und Nitrit

Die Stickstoffverbindungen Ammoniak (NH_3) bzw. Ammonium (NH_4^+) und Nitrit (NO_2^-) wirken als Toxine für Wasserlebewesen (CAMARGO und ALONSO, 2006). Zusätzlich können erhöhte Konzentrationen an Nitrit und Nitrat (NO_3^-) im Trinkwasser schwere Gesundheitsschäden bei Lebewesen auslösen (FAN und STEINBERG, 1996; WARD et al., 2005; CAMARGO et al., 2005).

Ammoniak entsteht hauptsächlich durch den Prozess der Desaminierung. Die giftige Wirkung von Ammoniak beruht im Wesentlichen auf der Schädigung von Nerven- und Muskelzellen. Nahezu alle biologischen Membranen sind aufgrund der geringen Größe des Moleküls sowie

seiner Lipidlöslichkeit für Ammoniak durchlässig. Neben der Veränderung des pH-Wertes in den Zellen löst Ammoniak durch oxidative Decarboxylierung der Metaboliten Pyruvat und α -Ketoglutarat eine Störung des Citratzyklus aus (McKAHN und TOWER, 1961). Ammoniak hat eine weitaus höhere Toxizität als Ammonium. Das Verhältnis von Ammoniak zu Ammonium ist dabei vom pH-Wert abhängig, aber auch von der Temperatur (RANDALL und TSUI, 2002).

Nitrit ist das Salz der salpetrigen Säure (HNO_2). Die Säure ist ein Mutagen und somit toxisch für alle Lebewesen. Sie wirkt als Katalysator bei diversen Umwandlungsreaktionen. So entstehen durch die Abspaltung von Ammoniak (Desaminierung) und anschließender Isomerisierung aus der Nukleinbase Cytosin \rightarrow Uracil, aus Adenin \rightarrow Hypoxanthin und aus Guanin \rightarrow Xanthin. Bei einer folgenden Replikation kann es aufgrund der Umwandlungen zu Fehlpaarungen der DNA kommen (SINGER und GRUNBERGER, 1983).

Salpetrige Säure liegt im Wasser in einem vom pH-Wert, der Temperatur, der Wasserhärte, dem Salzgehalt sowie dem hydrostatischen Druck abhängigem Gleichgewicht mit Nitrit vor (COLT und TCHOBANOGLOUS, 1976). Ihr Anteil nimmt im Gegensatz zum Ammoniak bei sinkenden pH-Werten zu. Je niedriger der pH-Wert ist, desto höher ist der Anteil an salpetriger Säure.

Nitrit wird als Zusatz in zahlreichen Lebensmitteln zur Konservierung und zum Erhalt der Rosafärbung von Fleisch eingesetzt (Pökelsalz). Gelangt durch diese Lebensmittel und vor allem durch die Umwandlung von nitratreicher Nahrung durch Mikroorganismen im Darm zuviel Nitrit in den Blutkreislauf, wird es aktiv von Chlorid-Ionentransportern durch die Blutzellenmembranen geschleust. Im Inneren der Erythrozyten wirkt Nitrit oxidierend auf die vier Eisenatome des Hämoglobins. Das entstehende so genannte Methämoglobin kann nicht mehr oxygeniert werden und es kommt zu einer Methämoglobinämie. Das Blut kann keinen Sauerstoff mehr transportieren und es tritt eine Blausucht mit den Folgen einer gefährlichen Sauerstoffunterversorgung auf (MEINELT et al., 1997).

Die Wichtigkeit der Eliminierung anorganischer Stickstoffverbindungen unterstreicht den Wert einer leistungsfähigen biologischen Abwasserreinigung in kommunalen Kläranlagen, aber auch in Biofiltern von Fischzuchtanlagen.

1.3 Abwasserreinigungs-Anlagen

In kommunalen Abwasserreinigungsanlagen werden anorganische Stickstoffverbindungen fast vollständig abgebaut. Ein Beispiel für eine moderne Abwasserbehandlung ist der Klärwerksverbund Köhlbrandhöft und Dradenau in Hamburg. Die Reinigung findet in drei Stufen statt (HAMBURG WASSER, 2011):

- 1) mechanische Reinigung: Im Klärwerk Köhlbrandhöft wird durch Rechenanlagen, Sandfang und Vorklärbecken ein Großteil der im Abwasser enthaltenen Schmutzfracht entfernt.
- 2) biologische Reinigung: In dieser Stufe werden die im Abwasser enthaltenen Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen abgebaut. Der Vorgang erfolgt durch Mikroorganismen im Rahmen ihrer Stoffwechselprozesse.
- 3) Nährstoffelimination: In der letzten Reinigungsstufe wird Phosphor dem Abwasser durch chemische Fällung entzogen.

1.4 Nitrifikation

Die Nitrifikation ist ein essentieller Teil des Stickstoffkreislaufes (Abbildung 1). Die mikrobielle Oxidation von Ammoniak zu Nitrat wird als autotrophe Nitrifikation bezeichnet. Sie wird durch zwei distinkte Gruppen von Mikroorganismen katalysiert. In der Regel sind diese beiden Gruppen *in situ* so stark miteinander assoziiert, dass sich Nitrit nicht akkumulieren kann. In der ersten Stufe der Nitrifikation setzen Ammoniak-oxidierende Bakterien und Archaeen (AOB und AOA) Ammoniak über das Zwischenprodukt Hydroxylamin zu Nitrit um (HOLLOCHER et al., 1981). Das entstehende Nitrit dient als Substrat für Nitrit-oxidierende Bakterien (NOB), die Nitrit zu Nitrat, dem Endprodukt der aeroben Nitrifikation, oxidieren.

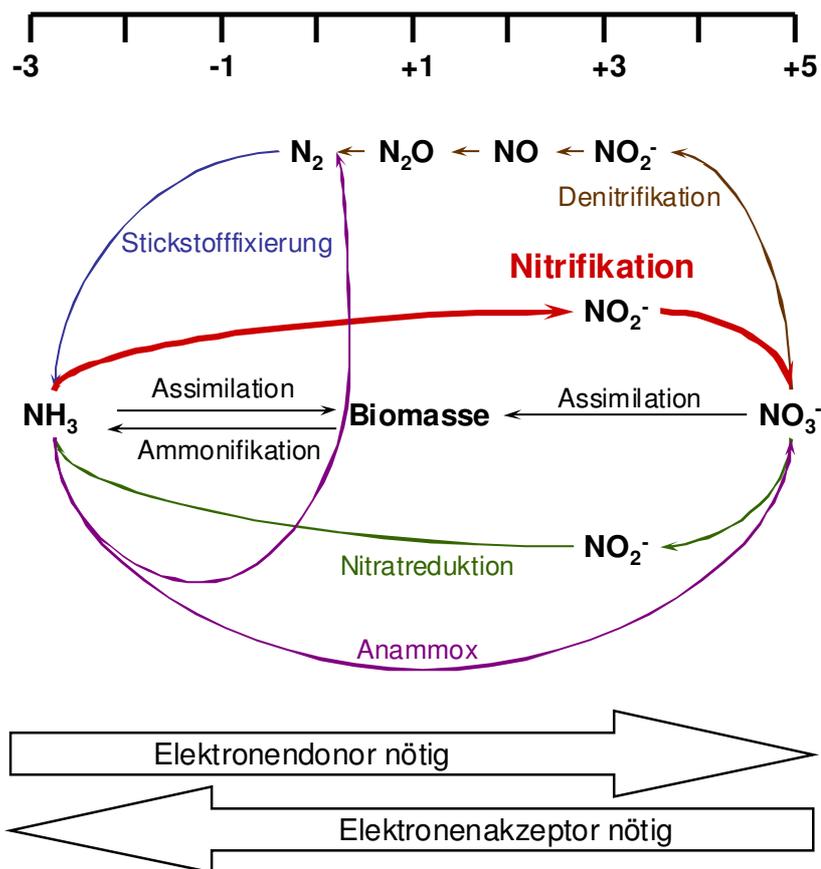


Abbildung 1: Schematische Darstellung des biogeochemischen Zyklus des Stickstoffumsatzes. Oberhalb des Kreislaufes sind die Oxidationsstufen des Stickstoffs der darunter liegenden Verbindungen angegeben.

Alle bekannten Ammoniak-oxidierenden Bakterien (AOB) gehören zu den Klassen der Beta- und Gammaproteobakterien. Die Gattungen *Nitrosomonas* (einschließlich *Nitrosococcus mobilis*), *Nitrosolobus*, *Nitrosospira*, und *Nitrosovibrio* werden den Betaproteobakterien zugeordnet (TESKE et al., 1994; PURKHOLD et al., 2003). Organismen der Gattung *Nitrosococcus* bilden einen Zweig innerhalb der Klasse der Gammaproteobakterien (PURKHOLD et al., 2000).

Die Ammoniak-oxidierenden Archaeen (AOA) werden den kürzlich vorgeschlagenen *Thaumarchaeota* zugeordnet (BROCHIER-ARMANET et al., 2008; SPANG et al., 2010). Die Entdeckung der AOA beruht auf dem Vorkommen von archaealer 16S rRNA im Zusammenhang mit Genen, die für Enzyme zur Oxidation von Ammoniak zu Hydroxylamin kodieren (TREUSCH et al., 2005). Kurz darauf konnte ein chemolithoautotroph wachsendes Archaeon isoliert und beschrieben werden, welches Ammoniak zu Nitrit oxidiert (KÖNNECKE et al., 2005).

Im Gegensatz zu den Ammoniakoxidanten sind noch keine Archaeen entdeckt worden, die den zweiten Schritt der Nitrifikation (Oxidation von Nitrit zu Nitrat) katalysieren. Nitrit-oxidierende Bakterien können phylogenetisch in fünf Gruppen eingeteilt werden (WATSON et al., 1989). Die Gattung *Nitrobacter* gehört zu den Alphaproteobakterien (WINOGRADSKY, 1892; STACKEBRANDT et al., 1988), die neu entdeckte Gattung *Candidatus Nitrotoga* zu den Betaproteobakterien (ALAWI et al., 2007) und die Gattung *Nitrococcus* zu den Gammaproteobakterien (WATSON und WATERBURY, 1971; TESKE et al., 1994). Die Gattung *Nitrospina* wurde vorläufig in die Klasse der Deltaproteobakterien eingliedert. Des Weiteren befindet sich deutlich abgegrenzt von den Proteobakterien die Gattung *Nitrospira*. Sie gehört zum Phylum *Nitrospirae* (EHRICH et al., 1995). In Abbildung 2 sind alle zurzeit bekannten Reinkulturen bzw. beschriebene Anreicherungskulturen von AOA, AOB und NOB in einem phylogenetischen Stammbaum dargestellt.

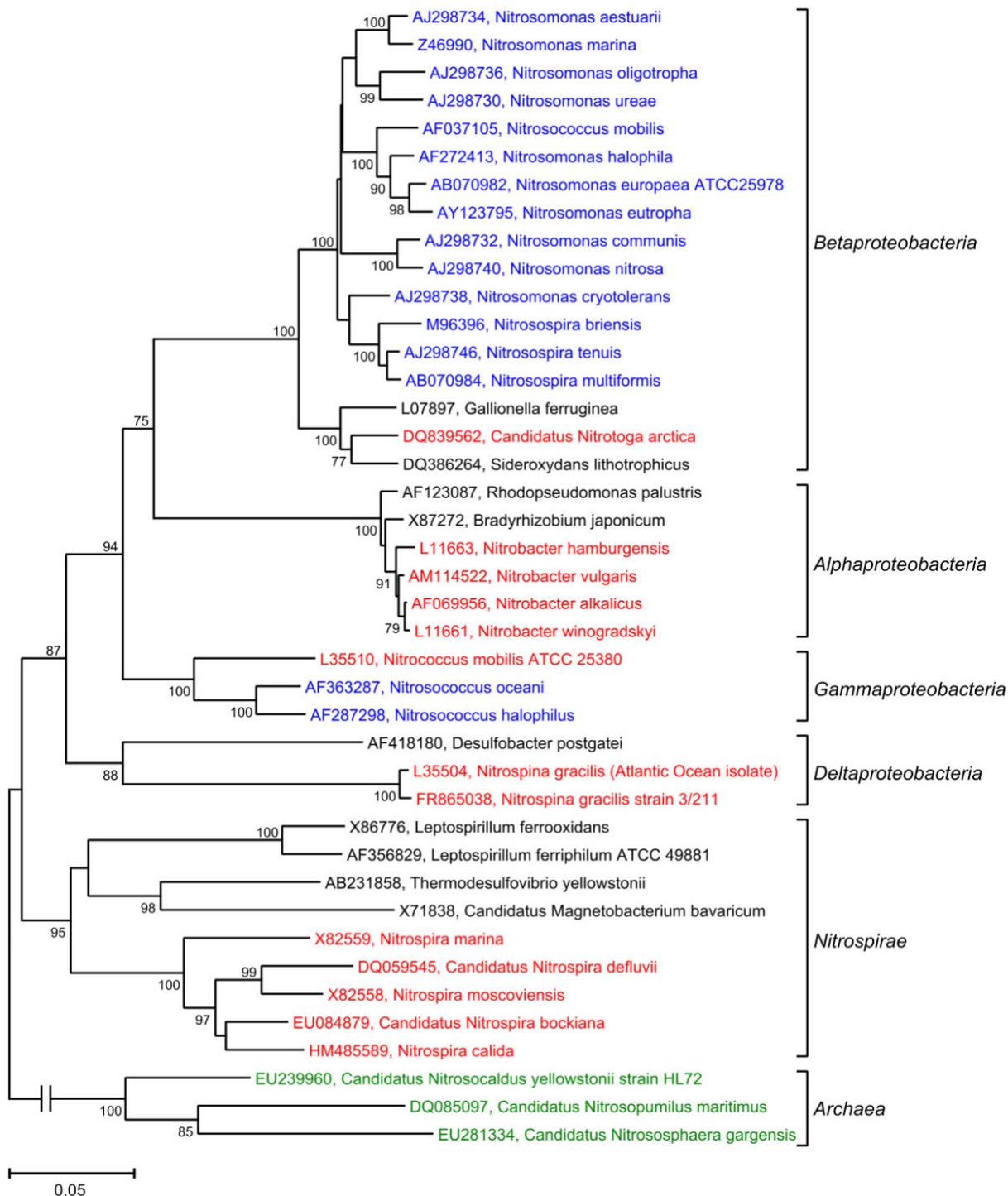
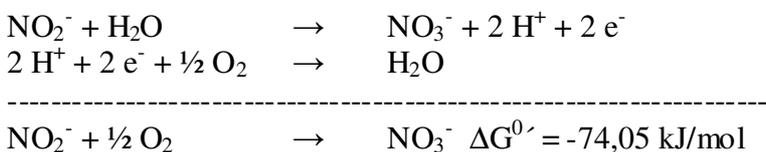


Abbildung 2: Phylogenetischer Baum aller Reinkulturen bzw. beschriebener Anreicherungen an Nitrifikanten. AOA sind grün markiert, AOB blau und NOB rot. Die verwandtschaftliche Abhängigkeit wurde auf Basis der 16S rRNA Gensequenz mit Hilfe des *Neighbor Joining*-Algorithmus ermittelt. Der Skalierungsbalken entspricht einem Sequenzunterschied von 5 %.

1.5 Nitrit-oxidierende Bakterien

NOB sind Gram-negative, chemolithoautotroph wachsende Bakterien, die Nitrit als Energiequelle und Kohlenstoffdioxid (CO₂) als Haupt-Kohlenstoffquelle nutzen. Basierend auf früheren Klassifizierungen wurden NOB anhand ihrer Morphologie, dem Vorhandensein charakteristischer intracytoplasmatischer Membranstrukturen (WATSON et al., 1989) und distinkten Fettsäureprofilen (LIPSKI et al., 2001) eingeteilt. Die meisten Erkenntnisse über die Physiologie und Biochemie Nitrit-oxidierender Bakterien wurden durch Organismen der Gattung *Nitrobacter* gewonnen (ALEEM und ALEXANDER, 1960; BOCK et al., 1988). Beobachtungen aus diesen Forschungen können jedoch nicht auf alle NOB übertragen werden. Untersuchungen zu den biochemischen Eigenschaften anderer Gattungen von NOB sind äußerst spärlich.

Die chemische Grundlage für die Energiegewinnung aus der Oxidation von Nitrit zu Nitrat wird in der nachstehenden Formel beschrieben (BOCK und WAGNER, 2006). Mit Wasser als Quelle für das zusätzliche Sauerstoffatom in Nitrat werden zwei Elektronen bei der Reaktion abgespalten. Die Bildung von Nitrat wird durch das Schlüsselenzym der NOB katalysiert, der Nitritoxidoreduktase (Nxr).



Da Sauerstoff im letzten Schritt der Oxidation als Elektronenakzeptor benötigt wird, ist die Nitritoxidation strikt aerob. Abgesehen von der oben genannten aeroben Reaktion sind mehrere andere metabolische Eigenschaften der NOB bekannt. *Nitrobacter* zum Beispiel kann unter anoxischen Bedingungen denitrifizieren (FREITAG et al., 1987; BOCK et al., 1988). Des Weiteren kann *Nitrospira moscoviensis* mit Wasserstoff als Elektronendonator unter Ausschluss von Sauerstoff Nitrat als Elektronenakzeptor benutzen (EHRICH et al., 1995).

Über 80 % der Energie, die aus der Oxidation von Nitrit gewonnen wird, wird für die CO₂-Fixierung verbraucht (BÖMEKE, 1954). Außerdem ist das Redoxpotenzial der NO₂⁻/NO₃⁻ Paare mit +420 mV außerordentlich hoch. So sind die NOB, wie auch die AOB und besonders die AOA, extrem langsam wachsende Organismen mit Generationszeiten, die unter lithoautotrophen Wachstumsbedingungen von 10 h für *Nitrobacter vulgaris* (BOCK et al., 1990) bis 90 h für *Nitrospira marina* reichen (WATSON et al., 1986).

1890 wurde zum ersten Mal chemolithoautotrophes Wachstum von Winogradsky beschrieben. In der damals entdeckten Gattung *Nitrobacter* sind bis heute vier Arten bekannt: *N. winogradskyi* (WINSLOW et al., 1917), *N. hamburgensis* (BOCK et al., 1983), *N. vulgaris* (BOCK et al., 1990) und *N. alkalicus* (SOROKIN et al., 1998). Einige Vertreter von *Nitrobacter* sind in der Lage, neben Kohlenstoffdioxid auch andere Kohlenstoffquellen zu nutzen und somit mixo- oder heterotroph zu wachsen. Heterotrophes Wachstum unter Verwendung von Acetat, Formiat und Pyruvat als Kohlenstoffquelle sowie Hefeextrakt und Pepton als Stickstoffquelle konnte für *N. winogradskyi* Stamm *agilis* (formal *N. agilis*; BOCK, 1976) nachgewiesen werden. *N. hamburgensis* zeigt unter mixotrophen Bedingungen (gleichzeitige Nutzung von Nitrit und organischen Kohlenstoffverbindungen) eine höhere Wachstumsrate als unter rein autotrophen oder heterotrophen Bedingungen (BOCK et al., 1983).

Von der Gattung *Nitrococcus* ist mit *Nitrococcus mobilis* nur eine Art beschrieben worden (WATSON und WATERBURY, 1971). In der Gattung *Nitrospina* konnten bis heute zwei Arten differenziert werden: *Nitrospina gracilis* und *Nitrospina* 347 (WATSON und WATERBURY, 1971; SPIECK und BOCK, 2005). Vertreter beider Gattungen wurden bisher nur in marinen Habitaten nachgewiesen (SPIECK und BOCK, 2005).

Nitritoxidanten der Gattung *Candidatus Nitrotoga* konnten aus zwei verschiedenen Habitaten angereichert werden. Der erste Vertreter dieser Gattung wurde in Bodenproben im Permafrost der sibirischen Arktis nachgewiesen und nach dem kalten Fundort *Candidatus Nitrotoga arctica* benannt (ALAWI et al., 2007). Eine weitere Anreicherung konnte aus Belebtschlamm der Hamburger Kläranlage gewonnen werden (ALAWI et al., 2009).

Erst kürzlich wurde eine neue Gattung an NOB entdeckt. *Nitrolancetus* aus dem Phylum *Chloroflexi*, in dem bisher kein Nitrifikant gefunden wurde, konnte aus Belebtschlamm eines Bioreaktors in den Niederlanden isoliert werden (SOROKIN, noch nicht publiziert). *N. hollandicus* wächst bei einer Temperatur um die 60 °C und unterscheidet sich in seinen zellulären und physiologischen Merkmalen erheblich von anderen NOB (DAIMS, 2012).

Die bislang größte Diversität auf Basis von 16S rRNA Genanalysen wurde in der Gattung *Nitrospira* gefunden. Wegen der langwierigen Ansätze, die notwendig sind, die meisten Mitglieder dieser Gattung zu kultivieren, ist der Wert dieser NOB lange Zeit unterschätzt worden. Nach der Entdeckung des ersten *Nitrospira*, des marinen *N. marina* (WATSON et al., 1986), verging fast ein Jahrzehnt bis zur Beschreibung der zweiten Art *N. moscoviensis*

(EHRICH et al., 1995). Dieser Organismus wurde von einer korrodierten Rohrleitung des Moskauer Heizungssystems isoliert und deutete somit bereits die physiologische Vielseitigkeit innerhalb der Gattung an. Mit dem Fortschritt der kultivierungsunabhängigen molekularen Techniken wurde die Bedeutung von *Nitrospira* in einer großen Vielfalt an natürlichen und künstlichen Lebensräumen offensichtlich.

1.6 Die Gattung *Nitrospira*

Nitrit-oxidierende Bakterien der Gattung *Nitrospira* sind die Schlüsselorganismen in vielen Ökosystemen. Aufgrund ihres außerordentlich langsamen Wachstums jedoch sind sie eine schwer zu kultivierende Gruppe der NOB, da sie leicht von anderen heterotroph wachsenden Organismen verdrängt werden, sofern genügend Organik vorhanden ist.

Auf dem phylogenetischen Niveau wurde die Gattung *Nitrospira* ursprünglich in vier Untergruppen eingeteilt (DAIMS et al., 2001). Die Cluster zeichneten sich durch ihre enge physiologische Verwandtschaft hinsichtlich ihrer Habitate aus. Heutige Erkenntnisse erweitern diese angenommenen Zusammenhänge. Die Untergruppen teilten sich bis vor wenigen Jahren wie folgt auf: Cluster I: *Nitrospira* aus Belebtschlamm mit *Candidatus N. defluvii*; Cluster II: Umwelt- und einige Abwassersequenzen mit *N. moscoviensis*; Cluster III enthält Sequenzen vom Nullarbor Höhlensystem (HOLMES et al., 2001) und von vereinzelt Tiefseesedimenten (SANTELLI et al., 2008). In dieser Untergruppe sind bis heute keine Reinkulturen vorhanden. Die marine Untergruppe IV konnte in Untercluster IVa und IVb gespalten werden. IVa enthält zum größten Teil frei lebende marine Organismen, die eng mit *N. marina* verwandt sind. In der Untergruppe IVb kommen symbiotische Vertreter von *Nitrospira* aus Schwämmen und anderen sessilen Meerestieren vor. In den letzten Jahren wurde die Zahl der Cluster innerhalb der Gattung durch die erfolgreiche Kultivierung moderat thermophiler *Nitrospira* auf VI erweitert (MAIXNER, 2009). Es wäre interessant zu untersuchen, ob diese enorme phylogenetische Diversität unterschiedliche physiologische Eigenschaften von *Nitrospira* widerspiegelt.

Nitrospira gilt in einer Vielzahl von Habitaten als dominierender Nitritoxidant. Sie sind die wichtigsten NOB in marinen Fischzuchtanlagen (FOESEL et al., 2008; KEUTER et al., 2011) und in Süßwasser-Aquakulturen (SUGITA et al., 2005). Außerdem ist *Nitrospira* vorherrschend in verschiedenen Böden (BARTOSCH et al., 2002) und Sedimenten (LI et al.,

1999; TODOROV et al., 2000; STEIN et al., 2001) sowie in Aquarienfiltern (HOVANEC et al., 1998), Biofilmen an Höhlenwänden (z.B. HOLMES et al., 2001; CHEN et al., 2009) und verschiedenen thermischen Quellen (HIRAYAMA et al., 2005; KANOKRATANA et al., 2004; LEBEDEVA et al., 2005; WEIDLER et al., 2007). Ein weiteres Vorkommen von *Nitrospira* beschreibt erstmals die Nitritoxidation innerhalb von Lebewesen. Anhand molekularer Methoden wurde *Nitrospira* in marinen Schwämmen und Korallen gefunden (HENTSCHEL et al., 2002; TAYLOR et al., 2007). Mit spezieller Bedeutung aus der Sicht der biologischen Anwendung von Nitrit-oxidierenden Bakterien sind *Nitrospira*-ähnliche Organismen die wirtschaftlich bedeutendsten Nitritoxidanten innerhalb von kleineren Bioreaktoren (BURRELL et al., 1998; SCHRAMM et al., 1998) und in der Abwasserreinigung (JURETSCHKO et al., 1998; DAIMS et al., 2001; JURETSCHKO et al., 2002).

Die Anpassung verschiedener Stämme von *Nitrospira* an ihre Habitate ist außergewöhnlich. So reicht das Temperaturspektrum der Vorkommen nachgewiesener Vertreter dieser Gattung von um den Gefrierpunkt im sibirischen Permafrost (BARTOSCH et al., 2002; ALAWI, 2007) bis zu einer 59 °C heißen Quelle des Garga-Flusses am Baikalsee (LEBEDEVA et al., 2005). Rein molekularbiologisch durch Sequenzanalysen wurden *Nitrospira*-ähnliche Bakterien in heißen Radonquellen bis zu 63 °C (ANITORI et al., 2002) und im Minenwasser einer japanischen Goldmine von bis zu 69 °C (HIRAYAMA et al., 2005) gefunden. Einige Lebensräume stellen neben der extremen Temperatur noch andere Herausforderungen an die Bakterien. Trotz der stark eingeschränkten Wasserverfügbarkeit konnte *Nitrospira* sogar in Wüstenböden Namibias (WATSON et al., 1986) nachgewiesen werden. Hinsichtlich des pH-Wertes kommen Vertreter der Gattung *Nitrospira* ebenfalls an außergewöhnlichen Standorten vor. So wurde in einem israelischen Bioreaktor bei einem pH-Wert von 4,3 *Nitrospira* angereichert (TARRE und GREEN, 2004). Eine Angabe über *Nitrospira*-ähnliche DNA-Sequenzen aus einem alkalischen Habitat gibt es bis jetzt noch nicht.

Bakterien der Gattung *Nitrospira* können an diesen zum Teil extremen Standorten nur durch schützende Eigenschaften überleben. Eine solche Anpassung könnte die Bildung so genannter EPS (extrapolymere Substanzen) sein. Diese Matrix fördert die Agglutination der Bakterien und bildet ähnlich einer Ummantelung eine Schutzschicht. Auch kompatible Solute tragen zum Schutz gegen Gefrieren und Austrocknen bei (LIN, 1994). Allerdings wurden diese bisher nur in *Nitrobacter* nachgewiesen. Formen von Dauerstadien sind von *Nitrospira* nicht bekannt. Es gibt jedoch Hinweise, dass einzelne Vertreter dieser Gattung bei Stress ihre

Morphologie ändern. So nehmen die länglich gedrehten Zellen von *Candidatus N. bockiana* unter Stress kokkoide Formen an (LEBEDEVA et al., 2005; SPIECK, persönliche Mitteilung).

Noch ist das physiologische und biochemische Wissen über *Nitrospira* begrenzt, da es eines enormen Zeitaufwandes bedarf, um diese anspruchsvollen Organismen zu züchten. Allerdings konnten Genomanalysen von *Candidatus N. defluvii*, die von Daims und Wagner (Universität Wien) initiiert wurden, dazu beitragen, das Wissen über die Stoffwechselwege von *Nitrospira* zu erweitern. Im Unterschied zu anderen nitrifizierenden Bakterien enthält *Nitrospira* eine andersartige Atmungskette und fixiert Kohlendioxid nicht wie *Nitrobacter* über den Calvincyclus, sondern über den reversen Tricarbonsäurezyklus (rTCA) (LÜCKER, 2010). Aufgrund der Empfindlichkeit gegenüber Sauerstoff einiger am rTCA beteiligter Enzyme, nahm man lange Zeit an, dass der Zyklus auf anaerobe oder mikroaerophile Bakterien beschränkt sei. Neben den unterschiedlichen Wegen der CO₂-Fixierung zeigen *Nitrospira* und *Nitrobacter* deutliche biochemische Unterschiede im Enzym für die Nitritoxidation.

1.7 Die Nitritoxidoreduktase von *Nitrospira*

Das Schlüsselenzym der chemolithotrophen Nitritoxidation ist die Nitritoxidoreduktase (Nxr). Zur Vereinheitlichung der Begriffe wird das Nitrit-oxidierende System von *Nitrospira* ebenfalls Nitritoxidoreduktase genannt, obwohl eine Reduktaseaktivität der Nxr für diese Gattung noch nicht eindeutig bewiesen werden konnte (STARKENBURG et al., 2006). Die Nxr gehört zu den Dimethylsulfoxid-Reduktasen (DMSO-Reduktasen) der Molybdopterin-haltigen Enzyme (MEINCKE et al., 1992). Andere verwandte Mitglieder dieser strukturell und funktionell diversen Enzymfamilie sind zum Beispiel die dissimilatorischen Nitratreduktasen wie die Chlorat-, Selenat- oder auch Arsenat-Reduktasen (McDEVITT et al., 2002; THORELL et al., 2003). Die meisten Vertreter dieser Gruppe bestehen aus mindestens zwei Untereinheiten. Die Alpha-Untereinheit beinhaltet das aktive Zentrum mit der Substratbindungsstelle und dem Molybdopterin-Kofaktor. Die Beta-Untereinheit, in der sich zahlreiche Eisen-Schwefel-Cluster befinden, ist für den Transport von Elektronen zwischen der Alpha-Untereinheit und weiteren Untereinheiten sowie der Elektronentransportkette zuständig (KIRSTEIN und BOCK, 1993; ROTHERY et al., 2008). Dieser funktionelle Aufbau ist in der oben genannten Enzymfamilie stark konserviert (KISKER et al., 1998). Ein experimenteller Nachweis für die genaue Lokalisation der Substratbindungsstelle in der Alpha-Untereinheit steht noch aus.

Die meisten Studien über die Struktur und Funktion der Nxr wurden mit verschiedenen Stämmen der Gattung *Nitrobacter* durchgeführt (SUNDERMEYER-KLINGER et al., 1984; MEINCKE et al., 1992). In Abwesenheit von Sauerstoff kann die Nxr von *Nitrobacter* Nitrat zurück zu Nitrit bzw. auch zu gasförmigen Distickstoffoxid (N_2O) reduzieren, wenn Elektronen aus organischen Substanzen zur Verfügung stehen (FREITAG et al., 1987; BOCK et al., 1988). Demnach ist die Nitritoxidation in *Nitrobacter* ein reversibler Prozess (SUNDERMEYER-KLINGER et al., 1984). Die Nxr spielt somit eine zusätzliche Rolle bei der Denitrifikation.

Die Nxr von *Nitrospira* ist ein membranassoziierter Proteinkomplex. Durch eine Reihe von Zentrifugationsschritten und Membranpräparationen wurde das Nitrit-oxidierende System von *Nitrospira moscoviensis* isoliert (SPIECK et al., 1998). Monoklonale Antikörper (Hyb-3), die ursprünglich die Beta-Untereinheit der Nxr (NxrB) von *Nitrobacter* erkannten, wurden eingesetzt, um putative NxrB Proteine im Membranextrakt zu identifizieren. Typisch für die Enzymfamilie enthielt die gleiche Proteinfraction neben der Beta-Untereinheit auch die größere Nxr Alpha-Untereinheit (NxrA) sowie zwei weitere Proteine unbekannter Funktion. Mit einer relativen molekularen Masse von etwa 130 kDa ist die NxrA ähnlich der von *Nitrobacter*. Die NxrB von *Nitrospira* ist dagegen mit nur etwa 46 kDa deutlich kleiner als die NxrB von *Nitrobacter* (65 kDa) (BARTOSCH et al., 1999). Dieser Unterschied und die Anwesenheit der zwei weiteren unbekannt Proteine im Extrakt der Membranfraktion von *N. moscoviensis* lassen darauf schließen, dass sich die beiden Nitrit-oxidierenden Systeme von *Nitrospira* und *Nitrobacter* in ihrer Zusammensetzung und wahrscheinlich hinsichtlich ihrer funktionellen Eigenschaften unterscheiden (SPIECK et al., 1998). Immunologische Experimente zeigten, dass die Nxr von *Nitrospira* in einem hexagonalen Muster angeordnet ist. Anders als die Nxr von *Nitrobacter*, die sich an der cytoplasmatischen Seite der Zellmembran befindet, zeigt die Nxr von *Nitrospira* in den periplasmatischen Raum (SPIECK et al., 1996). Die Lokalisation der Nxr auf der periplasmatischen Seite hat einige Vorteile für *Nitrospira*. So ist für die Nitritoxidation kein Transport von Nitrit bzw. Nitrat über die Membran hinweg nötig, da die Reaktion im Periplasma stattfindet. Im Gegensatz dazu ist *Nitrobacter* mit einer cytoplasmatisch lokalisierten Nxr abhängig von einem Nitrit-/Nitrat-Transport über die Cytoplasmamembran (STARKENBURG et al., 2006). Man kann demnach davon ausgehen, dass sich die beiden Nitrit oxidierenden Systeme von *Nitrospira* und *Nitrobacter* konvergent entwickelt haben (MAIXNER, 2009).

Mit Hilfe der monoklonalen Antikörper von *Nitrobacter* konnten die *nxr* Gene im Genom von *Candidatus Nitrospira defluvii* identifiziert werden (MAIXNER, 2009). Das Genom enthält jeweils zwei Kopien von *nxrA* und *nxrB*, die in zwei Genclustern (*nxrA1B1* und *nxrA2B2*) kolokalisiert sind. Die beiden *nxrA*-Kopien haben eine Aminosäureähnlichkeit von 87 %, während die beiden *nxrB*-Kopien identisch sind. Interessant wäre zu wissen, ob die Unterschiede in der Primärstruktur der NxrA einen funktionellen Effekt auf zum Beispiel die Substrataffinität ausüben. ORFs für unterschiedliche Regulatoren in der Nähe der beiden Gencluster weisen auf eine differenzierte Expression von *nxrA1B1* und *nxrA2B2* hin (DAIMS et al., 2011). Für *Candidatus N. defluvii* weichen die berechneten Massen der NxrA und NxrB mit 129 kDa und 50 kDa etwas von den experimentell bestimmten Massen mit 130 kDa und 46 kDa für *N. moscoviensis* ab (SPIECK et al., 1998). Erst vor kurzem wurde die Entdeckung von vier möglichen Kandidaten für die Gamma-Untereinheit der Nxr beschrieben (LÜCKER, 2010). Jedes dieser Proteine enthält Häm-Moleküle und eine Transmembrandomäne, von der angenommen wird, dass sie als Anker des Nxr-Komplexes in der Cytoplasmamembran dient. Drei dieser Proteine haben eine hohe Ähnlichkeit zu den Gamma-Untereinheiten bekannter Mitglieder der DMSO-Reduktase-Familie. Die angenommene molekulare Masse ist mit 30 - 34 kDa ähnlich der eines unbekanntes Proteins aus dem Membranextrakt von *N. moscoviensis* (29 kDa) (SPIECK et al., 1998). Ein weiteres Protein könnte ebenfalls ein Kandidat für die Gamma-Untereinheit der Nxr sein. Dieses Protein ist ein c-Typ Cytochrom und enthält wahrscheinlich zwei Bindungsstellen für Häm-Moleküle. Auch dieses Protein hat mit 67 kDa eine ähnlich große molekulare Masse wie eines der uncharakterisierten Hauptproteine im Membranextrakt von *N. moscoviensis* (62 kDa) (SPIECK et al., 1998). Keines der putativen *nxC* Gene ist nah den Genclustern *nxrA1B1* oder *nxrA2B2* lokalisiert. Um ein umfassendes Bild des Aufbaus und der Funktionsweise der Nxr zu erhalten, muss daher noch die genaue Zusammensetzung der Untereinheiten sowie deren biochemische Mechanismen geklärt werden.

1.8 Zielsetzung

Um die Bedeutung der Gattung *Nitrospira* als Schlüsselorganismen der Nitritoxidation in gemäßigten und extremen Lebensräumen zu erforschen, sollte/n:

- 1) Anreicherungskulturen von Nitrit-oxidierenden Bakterien aus moderaten und extremen Lebensräumen taxonomisch untersucht und eingeordnet werden. Dazu wurden klassische und molekularbiologische Methoden kombiniert. Es wurde dabei der Frage nachgegangen, ob die physiologischen Eigenschaften innerhalb eines Clusters ähnlich sind. Proben aus folgenden Habitaten standen zur Verfügung: marine und terrestrische Kulturen aus Permafrost- und Tundragebieten in Nordost-Sibirien; moderat thermophile Stämme aus heißen Quellen am Baikalsee und im Yellowstone Nationalpark; Nitrit-oxidierende Bakterien aus Gesteinsproben und aus Wüstenböden Namibias und Südafrikas; Kulturen aus der Movile-Höhle, deren Sauerstoffpartialdruck sehr niedrig ist; Nitritoxidanten aus einem sauren Biofilter; Anreicherungen aus dem Mesohyl des Mittelmeerschwammes *Aplysina aerophoba*; mehrere Proben im Jahresverlauf 2010 - 2011 aus einer Süßwasser-Aquakulturanlage; sowie noch zahlreiche weitere Kulturen z.B. aus der Ostsee oder verschiedenen Aquarien.
- 2) die weitere selektive Anreicherung des Stammes *Candidatus Nitrospira defluvii* erfolgen, um eine Reinkultur zu erhalten.
- 3) neue Arten von *Nitrospira* in Bezug auf die Standortfaktoren physiologisch charakterisiert werden. Dieses könnte Aufschluss über die Zusammenhänge zwischen dem jeweiligen Lebensraum und der Anpassung von *Nitrospira* geben.
- 4) anhand von Reinkulturen biochemische Untersuchungen am Nitrit-oxidierenden System der verschiedenen *Nitrospira*-Arten durchgeführt werden. Dafür müsste der Enzymkomplex möglichst schonend isoliert und dann hinsichtlich seiner Untereinheiten untersucht werden. Die so ermittelten Daten könnten mit bekannten Genomsequenzen verglichen werden, um zum Beispiel die Gamma-Untereinheit zu identifizieren, und so einen Beitrag zur Klärung der Funktionsweise dieses vielseitigen Systems zu leisten.

2 Material und Methoden

2.1 Bakterien

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden Untersuchungen mit folgenden Nitrit-oxidierenden Kulturen durchgeführt (Tabellen 1a und 1b).

Tabelle 1a: Nitrit-oxidierende Bakterien aus der Stammsammlung der Universität Hamburg; Reinkulturen und beschriebene hoch angereicherte Kulturen.

Kulturbezeichnung	Entnahmestelle der Probe	Referenz
<i>Nitrospira moscoviensis</i> M DSM 10036	Eisenrohr, Heizungssystem Moskau	Ehrich et al., 1995
<i>Candidatus Nitrospira bockiana</i> 42	Heizungssystem Moskau	Lebedeva et al., 2008
<i>Nitrospira calida</i> 10	Biofilmmatte in geothermaler Quelle, Gorjachinsk	Lebedeva et al., 2011
<i>Nitrospira marina</i> 295 ATCC 43039	Oberflächenwasser Golf von Maine, Atlantik, USA	Watson et al., 1986
<i>Candidatus Nitrospira defluvii</i> A17	Belebtschlamm, Klärwerk Dradenau, Hamburg	Bartosch et al., 1999 Spieck et al., 2006 diese Arbeit
<i>Nitrobacter hamburgensis</i> X 14 DSM 10229	Boden, alter botanischer Garten, Hamburg	Bock et al., 1983
<i>Nitrobacter vulgaris</i> Z DSM 10236	Sandfilter Wasserwerk, Hamburg	Bock et al., 1990
<i>Nitrobacter alcalicus</i> AN4	Sediment von Salzseen und Salzböden in Sibirien und Kenia	Sorokin et al., 1998
<i>Nitrobacter winogradskyi</i> Engel DSM 10237	Bodenprobe	Winslow et al., 1917

Tabelle 1b: Nitrit-oxidierende Bakterien aus der Stammsammlung der Universität Hamburg; Anreicherungskulturen.

Kulturbezeichnung	Entnahmestelle der Probe	
MAK 106		Tiefe: 12,4 m
MAK 107	Mamontovy Klyk, Nordsibirien, „alter“ Permafrost (20.000 – 40.000 Jahre) Boden-Profil vom Thermoerosionstal Proben von Dr. Zimmermann (2003)	7,8 m
MAK 109		12,7 m
MAK 207.6		0 – 5 cm
3301 AT	Kliff der Insel Samoylov; „junger“ Permafrost (2000 – 7000 Jahre), aktive Layer, Boden-Profil Proben von Dr. Alawi (28. und 29.08.2004)	0,8 – 1,0 m
3304 AKT		2,4 – 2,5 m
3305 AT		2,9 – 3,0 m
3309 AKT		5,0 – 5,1 m
LD 01		Wall 1 0 – 5 cm
LD 02		Wall 2 8,5 – 13,5 cm
LD 03		Wall 3 17 – 22 cm
LD 04	Insel Samoylov im Lena-Delta Boden-Profil vom Wall, Hang und Zentrum des Polygons P1 Proben von Dr. Ganzert (2004)	Hang 1 0 – 5 cm
LD 05		Hang 2 6 – 11 cm
LD 06		Hang 3 12 – 17 cm
LD 07		Zentrum 1 0 – 5 cm
LD 08		Zentrum 2 12 – 17 cm
LD 09	Zentrum 3 24 – 29 cm	
6678	Insel Samoylov im Lena-Delta Boden-Profil des Polygons P2 Proben von Dr. D. Wagner (2001)	Auftauhorizont
6680		0 – 5 cm
S 11	Sedimente der Laptev-See, Transsekt vom Delta bis zum nördlichen Teil, der durch das angrenzende Nordpolarmeer beeinflusst wird Proben von Dr. Alawi (August 2003)	Obere 10 cm des Sediments der Laptev- See (Nordpolarmeer)
F 2, Q 2		
Lena	Sedimente aus dem Mündungsgebiet des Flusses, Sibirien Probe von Dr. Alawi (August 2003)	
Schwamm N	Schwammgewebe (Mesohyl), <i>Aplysina aerophoba</i> Gewebeprobe von der Forschungsgruppe von Prof. Hentschel (April 2003)	3 bis 15 m Offshore (Banyuls sur Mer, Frankreich)
Schwamm D		
Schwamm Aa01		
Poel 2b	Ostsee, Insel Poel, Grottes Kamrad, 9 cm unter der Wasseroberfläche, Sediment; Proben von Frau Soltau (15. Oktober 2005)	
Vilm	Ostsee, Insel Vilm, Küstenwasser / Ufersediment Probennahme durch Dr. Keuter (April 2007)	
AG 1	Meerwasseraquarien	
AG 3	Proben von Dr. Sanders (Februar 2006)	
Aqua-Süß	Süßwasseraquarium, Tonzylinder aus Biofilter Probennahme diese Arbeit (Februar 2007)	

Kulturbezeichnung	Entnahmestelle der Probe	
Ns Shelly	Biofilmprobe aus einem sauren Bioreaktor pH 3,5; Probe Dr. Tarre (Juni 2004)	
BS 10 °C alt		
BS 10 °C	Belebtschlamm, Klärwerk Hamburg, Dradenau	
BS 17 °C	Proben von Frau Kaya (Mai und November 2006)	
BS 28 °C		
LUA 8 / c-3	Gesteinsproben, Prüfkörper des Landesuntersuchungsamtes Nordrheinwestfalen,	
LUA 16 / a-3	(2003)	
EL 9	Strontiumcarbonat haltiges Erz mit Barit von Erzhalde in Ostsibirien Probe von Dr. Lebedeva (Februar 2005)	
Mov 3		Oberflächenwasser, Luftraum
Mov 6	Movile-Höhle in Rumänien (zum Aufbau des Höhlensystems siehe SARBU et al., 1994)	Übergangzone
Mov II 9	Proben von Prof. Sand (25.08.2002)	2. Luftglocke, aerob
Mov II 10		2. Luftglocke, anaerob
Namibia 74		0 - 5 cm ohne Biokruste
Namibia 80	Wüstenboden	Biokruste
Südafrika 83	Proben von Dr. Fiencke (2004)	0 - 1 cm mit Biokruste
Südafrika 85		1 - 10 cm
Ga 3a		Grün-gelbe Biomatte mit oberen Sedimenten (49° C, pH 8,9)
Ga 3b	Warme Quelle des Garga-Flusses am Baikalsee	Sediment unterhalb der Biomatte (56 – 59 °C, pH 8,5)
Ga 4a	Proben von Dr. Lebedeva (August 2001)	Quellteich, Sediment unterhalb der Biomatte (48 °C, pH 8,5)
Ga II		Grün-gelbe Biomatte in 30 cm Tiefe (51 °C)
Yellowstone	Heiße Quellen, Yellowstone Nationalpark	Lower Geyser Basin
Beryl Spring	Proben von Prof. M. Wagner (2001)	Beryl Spring
Aquakultur HW	Süßwasser-Aquakulturanlage in Deutschland (Oktober 2010 bis Juli 2011)	

Die Kulturen AG 1, AG 3, Süßwasser Aquarium, Vilm und die Aquakultur HW wurden im Rahmen dieser Arbeit angezogen sowie die Reinkultur *Nitrospira defluvii* erhalten. Alle anderen Ausgangskulturen wurden von Frau Spieck (Universität Hamburg, Biozentrum Klein Flottbek, Abteilung Mikrobiologie und Biotechnologie) und Frau Lebedeva (Winogradsky Institut für Mikrobiologie, Moskau, Russland) freundlicherweise zur Verfügung gestellt und im Laufe der Arbeit angereichert und untersucht.

2.2 Kulturbedingungen

2.2.1 Lösungen und Nährmedien

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht gesondert vermerkt, von den Firmen Merck (Darmstadt, Deutschland), Serva (Heidelberg, Deutschland), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Difco (Detroit, USA) oder Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) bezogen. In der Regel wurden Chemikalien nicht unter dem Reinheitsgrad „pro analysi“ oder „reinst“ verwendet.

Die verwendeten Lösungen und Medien sind im Buch „Methods in Enzymology“ (SPIECK und LIPSKI, 2011) zusammengefasst. Im Folgenden sind die wichtigsten Medien zum Teil mit leichten Abänderungen aufgeführt.

Medium I: Mineralisches Nährmedium zur Anzucht von Nitritoxidanten (modifiziert nach BOCK et al., 1983)

Stammlösung (10-fach):	CaCO ₃	0,07 g
	KH ₂ PO ₄	1,50 g
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,50 g
	NaCl	5,00 g
	Aqua dest.	ad 1000 ml
Spurenelemente-Lösung:	CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,025 g
	FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,973 g
	H ₃ BO ₄	0,050 g
	MnSO ₄ x H ₂ O	0,034 g
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4 H ₂ O	0,037 g
	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,043 g
	0,01 M HCl	ad 1000 ml
Medium I:	Nitrit	0,1 – 30 mM
	Spurenelemente	1 ml
	Stammlösung	100 ml
	Aqua dest.	ad 1000 ml

Der pH-Wert wurde mittels NaOH oder KOH auf 8,4 eingestellt.

Medium II: Mineralisches Nährmedium zur Anzucht von marinen Nitritoxidanten (modifiziert nach WATSON und WATERBURY, 1971)

Stammlösung (10-fach):	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,05 g
	FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,01 g
	KH ₂ PO ₄	0,02 g
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1,00 g
	Seewasser (70 %)	ad 1000 ml

Spurenelemente-Lösung :	CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,001 g
	CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,006 g
	MnCl ₂ x 4 H ₂ O	0,050 g
	Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,025 g
	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,025 g
	Aqua dest.	ad 1000 ml

Medium II:	Nitrit	0,1 – 30 mM
	Spurenelemente	1 ml
	Stammlösung	100 ml
	Seewasser (70 %)	ad 1000 ml

Der pH-Wert wurde mittels HCl auf 6,5 eingestellt. Das Ostsee- bzw. Nordseewasser wurde vor Gebrauch filtriert (Faltenfilter 310, Porengröße 10 – 20 µm, VWR, Leuven, Belgien).

Medium III: Mixotrophes Nährmedium zur Anzucht von Nitritoxidanten (modifiziert nach BOCK et al., 1983)

Medium III:	Nitrit	0,3 – 3,0 mM
	Hefextrakt	0,15 g
	Pepton	0,15 g
	Natriumpyruvat	0,06 g
	Spurenelemente (Medium I)	1 ml
	Stammlösung (Medium I)	100 ml
	Aqua dest.	ad 1000 ml

Der pH-Wert wurde mittels NaOH oder KOH auf 8,6 eingestellt.

Medium IV: Acides Nährmedium zur Anzucht von Nitritoxidanten (modifiziert nach HANKINSON und SCHMIDT, 1988)

Stammlösungen:	1. KH_2PO_4	2,72 g
	2. K_2HPO_4	3,48 g
	3. $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0,25 g
	Na_2EDTA	0,33 g
	4. $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0,34 g
5. $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	4,00 g	

Die Stammlösungen wurden zu je 100 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt und durch 0,2 μm Porenfilter steril filtriert.

Spurenelemente-Lösung:	$\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	0,001 g
	$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$	0,002 g
	$\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$	0,030 g
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0,010 g
	$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0,010 g
	Aqua dest.	ad 100 ml

Medium IV:	Nitrit	1,0 – 5,0 mM
	Spurenelemente	1 ml
	Stammlösungen	1. 1 ml
		2. 4 ml
		3. 1 ml
		4. 1 ml
5. 5 ml		
Aqua dest.	ad 1000 ml	

Der pH-Wert wurde mittels HCl auf 5,0 eingestellt.

Medium V: Kontrollmedium für heterotrophe Organismen (Hefewasserbouillon)

Medium V:	Hefextrakt	0,5 g
	Pepton	0,5 g
	Fleischextrakt	0,5 g
	NaCl	0,6 g
	Aqua dest.	ad 1000 ml

Der pH-Wert wurde mittels NaOH oder KOH auf 7,4 eingestellt.

Medium VI: Kontrollmedium für marine heterotrophe Organismen

Medium VI:	Hefeextrakt	1,50 g
	Pepton	1,50 g
	Natriumpyruvat	0,05 g
	Spurenelemente (Lösung III)	1 ml
	Stammlösung (Lösung IV)	100 ml
	Seewasser (70 %)	ad 1000 ml

Der pH-Wert wurde mittels HCl auf 6,0 eingestellt.

Medium VII: festes Kontrollmedium (Reinheitsagar)

Medium VII:	Fleischextrakt	0,50 g
	Casamino Acids	0,50 g
	Hefeextrakt	0,10 g
	KH ₂ PO ₄	0,10 g
	NaCl	0,01 g
	Agar Agar	15,0 g
	Aqua dest.	ad 1000 ml

Der pH-Wert wurde mittels NaOH oder KOH auf 7,4 eingestellt.

Alle beschriebenen Nährmedien wurden zur Sterilisation 20 Minuten bei 1,0 bar Überdruck und 121 °C autoklaviert.

Für Zusätze zum Medium zur Überprüfung des Wachstums unter Einfluss verschiedener Kohlenwasserstoffe als alternative Kohlenstoffquelle zum im Medium gelösten Kohlendioxid wurden Stammlösungen von jeweils 0,5 M hergestellt. Als Zusätze dienten die Natriumsalze von Formiat, Acetat, Pyruvat, Fumarat und Succinat. Die Zusätze wurden separat wie oben beschrieben autoklaviert.

2.3 Kulturführung

2.3.1 Anzucht

Zwischenkulturen mit Nitrit-oxidierenden Bakterien aus terrestrischen Habitaten wurden in Erlenmeyerkolben mit Medium I je nach Kultur bei 10 °C bis 56 °C im Dunkeln inkubiert. Nach einer etwa vierwöchigen Startphase wurde ca. einmal wöchentlich das Vorhandensein von Nitrit überprüft. Je nach Bedarf wurde dann Nitritlösung zugesetzt. Kulturen aus marinen Habitaten wurden in Medium II angezogen. Die Temperatur lag bei diesen nicht höher als 28 °C. Zwischenkulturen von sauren Probenorten stammend wurden in Medium III kultiviert.

Nitritlösung

NaNO ₂	17,25 g
Aqua dest.	ad 100 ml

Sterilisation 20 Minuten bei 1,0 bar Überdruck und 121°C.

Zur Massenanzucht wurden Kulturen in 3 Liter Erlenmeyerkolben mit 1,5 Liter Medium I oder in 5 Liter Steilbrustflaschen mit 4 Liter Medium I angezogen. Sie wurden jeweils mit etwa 50 ml einer gut wachsenden Zwischenkultur beimpft. Den Kulturen wurde regelmäßig je nach Verbrauch Nitritlösung zugesetzt. Zur Sicherstellung der Sauerstoffversorgung wurden die Kulturen ab dem ersten Nitritverbrauch auf einem Magnetprüher (IkaMeg[®] Reo, Fa. IKA-Labortechnik, Staufen) gerührt.

Eine Anzucht von Nitrit-oxidierenden Bakterien auf Festmedien erfolgte in Petrischalen in einer so genannten feuchten Kammer bei 28 °C im Dunkeln. Dazu wurde dem Medium I oder II 12 g/l Agarose vor dem Autoklavieren zugesetzt.

2.3.2 Reinheitskontrolle

Die Kulturen wurden je nach Bedarf auf heterotrophe Begleitorganismen überprüft. Dazu wurden Reagenzgläser gefüllt mit 5 ml Medium V bzw. VI mit 100 µl Kulturlösung beimpft und bei 28 °C inkubiert. Die Kulturen galten als rein, wenn nach zwei Wochen keine Trübung in den Hefebouillon- bzw. in den Seewasser-Reinheitskontrollröhrchen zu erkennen war.

Mit Hilfe von Festmedien konnte der Grad der Verunreinigung abgeschätzt werden. Dazu wurden Petrischalen mit Medium VI angefertigt und mit Kulturlösung beimpft. Die Inkubation erfolgte bei 28 °C im Dunkeln. Nach etwa ein bis zwei Wochen konnte anhand der vorkommenden Kolonien die Quantität der heterotrophen Bakterien grob bestimmt werden.

2.3.3 Abernten der Arbeitskulturen

Kulturen wurden geerntet, wenn sie sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Die Zellen wurden in einer Kühlzentrifuge (Rotor: F10S 6x500Y; Zentrifuge: Sorvall[®] RC 5C Plus, Kendros Heraeus, Fa. Thermo Fisher Scientific inc., Waltham, USA) bei 4 °C und 10.000 Upm für 20 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 0,9 % Natriumchloridlösung bzw. 2,0 % für marine Kulturen aufgenommen und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Es folgten zwei Waschschrte (15 min bei 13.000 Upm) mit der jeweiligen Natriumchloridlösung in einer Tischzentrifuge (Centrifuge 5415R, Eppendorf). Je nach Weiterverwendung der Zellen wurden diese entweder in einem geeigneten Puffer resuspendiert, eingefroren bei -20 °C oder direkt für die DNA-Isolation eingesetzt.

2.3.4 Selektive Anreicherung und Isolierung von *Nitrospira*

Nitrit-oxidierende Bakterien werden durch das Zusammenspiel unterschiedlicher Methoden hoch angereichert. Zahlreiche Verdünnungsschritte und Filtrationen wurden mit der Durchführung von Percollgradienten kombiniert. Behandlungen mit Penicillin-Derivaten (in den Konzentrationen von 20 – 50 µg/ml) zur Hemmung der heterotrophen Bakterien wurden mehrmals durchgeführt.

Nitrospira defluvii weist eine Resistenz gegen den Wirkstoff Acriflavin auf (LÜCKER, 2010). Acriflavin ist ein Antiseptikum, das bei bakteriellem Befall in der Süßwasser-Aquaristik eingesetzt wird. Das kommerziell erhältliche Acriflavin ist eine Mischung aus 3,6-Diamino-10-methylacridiniumchlorid und 3,6-diaminoacridin (Proflavin). Es wird unter den Synonymen auch als Euflavin und Trypaflavin verkauft. Die Kulturführung unter Verwendung von steril filtriertem Sera baktipur[®] (Sera GmbH, Heinsberg, Deutschland) erfolgte anfangs in 100 ml Schraubdeckelflaschen.

baktipur[®]

Butylglykol	8100 mg
Acriflavin	210 mg
Methylenblau	5 mg
Aqua dest.	ad 100 ml

Sterilfiltration durch einen 0,2 µm Porenfilter.

Es wurden folgende Konzentrationen (v/v) an baktipur[®] getestet: 5 µl, 10 µl, 20 µl, 30 µl und 100 µl pro 100 ml Kultur. Nach Erhalt der Reinkultur wurden zur Aufrechterhaltung dieser, von Acriflavin in einer Konzentration von 0,21 µg pro Liter zur Kultur gegeben.

2.3.4.1 Percollgradient

Zur Anfertigung eines Percollgradienten wurden 10 ml konzentrierte Bakteriensuspension in 0,9 % Natriumchloridlösung in ein Greiner-Röhrchen pipettiert. Der Suspension wurden 5 g sterile Glasperlen (Durchmesser 1,7 – 2 mm, VWR, Darmstadt, Deutschland) zugegeben. Das Röhrchen wurde eine Stunde bei 4 °C auf einem Schüttler (3015, Fa. GFL, Burgwedel, Deutschland) intensiv bewegt und im Anschluss bei Raumtemperatur auf einem Vortex (VF2, Fa. IKA-Labortechnik, Staufen, Deutschland) nochmals für 10 min stark geschüttelt. 4 ml der Bakteriensuspension ohne Glasperlen wurden mit Percoll und Natriumchloridlösung versetzt und bei 10.000 Upm (Rotor: SS 34; Zentrifuge: Sorvall[®] RC 5C Plus, Kendros Heraeus, Fa. Thermo Fisher Scientific inc., Waltham, USA) zwei Stunden in einem geeigneten Röhrchen zentrifugiert.

35 ml insgesamt pro Ansatz

Percoll	24,5 ml
NaCl (1,5 M)	10,5 ml
Bakteriensuspension in 0,9 % NaCl (siehe 2.3.3)	4,0 ml

Die entstandene bräunliche Bande wurde entnommen und mit steriler Natriumchloridlösung (0,9 %) verdünnt. Die Suspension wurde ein weiteres Mal auf einem Vortex 10 min stark geschüttelt und anschließend in Zehnerstufen verdünnt. Mit den Verdünnungsstufen wurden Reagenzgläser gefüllt mit 5 ml Medium I angeimpft und bei 28 °C im Dunkeln inkubiert. Mit der höchsten Verdünnungsstufe, die Nitrit umsetzte, wurde weitergearbeitet.

2.3.4.2 Verdünnungsreihen

Es wurden zwei Methoden zur Erstellung von Verdünnungsreihen angewendet. Für die erste Methode wurden die Vertiefungen einer 96er Mikrotiterplatte mit jeweils 200 µl Medium I befüllt. 5 ml einer gut wachsenden Kultur wurden in ein steriles Gefäß gegeben und die Bakterienkolonien mittels Glasperlen durch intensives Schütteln zerschlagen (siehe 2.3.4.1). 20 µl der Bakteriensuspension wurden in die erste Vertiefung pipettiert, mit der Pipettenspitze vermischt und ausgehend davon 1 : 10 Verdünnungen in den folgenden Vertiefungen der Platte angefertigt. Die Mikrotiterplatte wurde gut mit Parafilm umschlossen und in einer Styroporbox (bestückt mit einem feuchten Tuch) bei 28 °C im Dunkeln für mehrere Monate inkubiert.

Für die zweite Möglichkeit, Verdünnungsreihen herzustellen, wurden 5 ml von gut wachsenden Kulturen abgenommen, in Greiner-Röhrchen überführt und die Bakterienkolonien mittels Glasperlen durch Schütteln vereinzelt (siehe oben). Ein Aliquot dieser Bakterienlösung wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit Natriumchloridlösung (0,9 %) verdünnt. Je nach Bedarf wurde dieser Schritt mehrmals wiederholt. Mit den Verdünnungsstufen wurden dann 300 ml Erlenmeyerkolben befüllt mit etwa 150 ml Medium I angeimpft. Diese wurden bei 28 °C im Dunkeln für mehrere Wochen inkubiert.

2.4 Physiologische Untersuchungen

2.4.1 **Temperaturoptima**

Wachstumsexperimente wurden in 300 ml Erlenmeyerkolben gefüllt mit 150 ml des jeweiligen Mediums (I oder II) durchgeführt. Die Kolben wurden jeweils mit dem exakt gleichen Volumen einer gut wachsenden Vorkultur angeimpft. Die Spanne an unterschiedlichen Inkubationstemperaturen betrug 4 °C bis zu 62 °C. Dafür standen Inkubationsschränke und -räume zur Verfügung. Die Kulturen wurden ohne Schütteln im Dunkeln inkubiert.

2.4.2 pH-Optimum

Der optimale pH-Wert wurde in Medium I bzw. II getestet. Das Medium wurde dafür nicht autoklaviert, sondern stattdessen der pH-Wert mit Hilfe von Salzsäure bzw. Natronlauge eingestellt und im Anschluss steril filtriert (pH 5,0 bis 9,0). Sterile Erlenmeyerkolben wurden mit gleichen Volumina des jeweiligen sterilen Mediums befüllt und mit einer gut wachsenden Vorkultur identischer Menge an Inokulum beimpft. Die Inkubation erfolgte bei dem der Vorkultur entsprechender Temperatur im Dunkeln ohne Schütteln.

Der pH-Wert der Testmedien wurde bei einigen Versuchen durch Zugabe von Phosphatpuffer stabilisiert. Dafür wurde jeweils eine 0,2 M Stammlösung von Kalium-dihydrogenphosphat und Di-Kaliumhydrogenphosphat hergestellt. Unterschiedliche Volumina dieser Lösungen wurden entsprechend dem gewünschten pH zusammengefügt, mit 100 ml dest. Wasser verdünnt, nach Bedarf mit einer der beiden Stammlösungen nachjustiert und sterilfiltriert. Im Anschluss wurde den Pufferlösungen je 800 ml phosphatfreies, steriles Medium I zugesetzt.

pH	KH_2PO_4	K_2HPO_4
5,5	95,0 ml	5,0 ml
6,0	87,7 ml	12,3 ml
6,5	68,5 ml	31,5 ml
7,0	39,0 ml	61,0 ml
7,5	16,0 ml	84,0 ml
8,0	5,3 ml	94,7 ml

Für die Messung des pH-Optimums zwischen pH 8 und 9 wurde als Puffer zum Medium anstatt Phosphat 0,05 M Kalziumkarbonat gegeben.

2.4.3 Toleranz gegenüber verschiedenen Nitritkonzentrationen

Die Toleranz gegenüber Nitrit wurde in 300 ml Erlenmeyerkolben getestet, die mit 150 ml Medium I bzw. II gefüllt wurden. Die Nitritkonzentration in den Kolben wurde durch Zugabe einer sterilen 2,5 M Natriumnitritlösung eingestellt (0,1 bis 30,0 mM). Die Kolben wurden mit der gewünschten gut wachsenden Vorkultur mit jeweils dem exakt gleichen Volumen angeimpft. Die Inkubationstemperatur entsprach der Temperatur zur Kultivierung. Die Kolben wurden nicht geschüttelt.

2.4.4 Überlebensfähigkeit von *Nitrospira* im Hungerzustand

Mit diesem Test sollte ermittelt werden, wie lange Kulturen von *Nitrospira* in der Lage sind, ohne Substratzugabe zu überleben. Zum Vergleich wurden Bakterien der Gattung *Nitrobacter* eingesetzt. Folgende Kulturen wurden getestet:

Ansatz 1:

Nitrobacter hamburgensis (Nb x14)
Nitrobacter winogradskyi (Nb wino)
Nitrospira moscoviensis (Ns M)
Candidatus Nitrospira devlunii (A 17)

Ansatz 2:

Nitrospira moscoviensis (Ns M)
Nitrobacter vulgaris (Nb Z)
Nitrobacter alcalicus (Nb AN4)
Candidatus Nitrospira bockiana (Ns 42)
Nitrospira calida (Ns 10)

Hungertest Ansatz 1:

Zum Testen der Überlebenschance von *Nitrospira* ohne Substratzufuhr (Hungerstress) wurden zwei Stämme dieser Gattung und zum Vergleich zwei Stämme der Gattung *Nitrobacter* untersucht. Jeweils im doppelten Ansatz wurden 300 ml Erlenmeyerkolben angeimpft. Die Kolben waren mit genau 100 ml des Anfangsmediums (Medium I mit 3,0 mM Nitrit) gefüllt. Das Anfangsinokulum betrug 5 ml (5 %) einer aktiven Kultur. Die Lagerung erfolgte bei 28 °C. Die Zeitmessung dem Hungerstress ausgesetzter Kulturen startete ab dem Zeitpunkt des Nitritverbrauchs: t_0 . Die Lagerung erfolgte anschließend bei 17 °C.

Am Zeitpunkt t_0 wurden zwei 100 ml Erlenmeyerkolben, gefüllt mit 50 ml Medium I mit 0,3 mM Nitrit, mit jeweils 5 ml Inokulum (10 %) angeimpft. An den Zeitpunkten 3, 6, 9 und 12 Monate wurde dieses in drei Parallelen wiederholt. Die Lagerung der kleinen Kolben erfolgte bei 28 °C. Die kleinen Kolben wurden regelmäßig in kurzen Abständen (3 - 4 Tage) auf ihren Nitritverbrauch hin untersucht. Ein Nitritverbrauch der kleinen Kolben sollte zeigen, dass in der hungernden Ausgangskultur eine Vielzahl an lebenden Zellen vorhanden waren.

Hungertest Ansatz 2:

Ähnlich wie im ersten Teil wurden auch im zweiten Teil des Hungertests jeweils doppelte Ansätze beimpft. 300 ml Erlenmeyerkolben wurden mit genau 100 ml Medium I mit 0,3 mM Nitrit für Ns 10 und Ns 42 sowie 3,0 mM Nitrit für die anderen drei Nitritoxidanten befüllt. Das Anfangsinokulum betrug 5 % aktiver Kulturen. Die Lagerung erfolgte bei 28 °C (*Nitrobacter*), 37 °C (Ns M), 40 °C (Ns 42) und 45 °C (Ns 10).

Die Messung startete mit dem Zeitpunkt des Nitritverbrauchs: t_0 . Die anschließende Lagerung unter Hungerstress wurde zur Minimierung von Verdunstungsvolumina unter verminderter Inkubationstemperatur durchgeführt: 17 °C (*Nitrobacter* und Ns M), 22 °C (Ns 42) und 30 °C (Ns 10). Nach 13 Monaten wurden mit einem Inokulum von 10 % drei zu 50 ml Medium I mit 0,3 mM Nitrit befüllte 100 ml Erlenmeyerkolben beimpft. Die Lagerung der kleinen Kolben erfolgte bei 28 °C, 40 °C bzw. 45 °C. Ein Nitritverbrauch zeigte auch hier eine ausreichende Überlebensrate der Ausgangskultur an.

2.5 Analytische Nachweismethoden

2.5.1 Qualitative Nitritbestimmung

Das Wachstum der Bakterienkulturen wurde regelmäßig mit dem Griess-Ilosvay Nitrit-Tüpfeltest (SCHMIDT und BELSER, 1994) qualitativ auf Nitritverbrauch überprüft.

Tüpfel-Reagenz

Sulfanilamid	4,0 g
ortho-Phosphorsäure	10 ml
N-Naphtyl-ethyl-diammonium-dihydrochlorid (NEDA)	0,2 g
Aqua bidest.	ad 100 ml

Die Lösung wurde im lichtdichten Behälter bei 4 °C gelagert.

2.5.1.1 Nitrit- und Nitratbestimmung mittels HPLC

Die genaue quantitative Bestimmung von Nitrit und Nitrat wurde mit Hilfe der HPLC-Technik nach einer von Meincke und Kollegen (1992) entwickelten Methode durchgeführt. Die Trennung der Anionen erfolgte über Ionenpaarchromatographie. Tetrabutylammoniumhydrogensulfat diente als Ionenpaarreagenz. Die Peakflächen korrelierten linear mit den zur Kalibrierung eingesetzten Nitrit- bzw. Nitratkonzentrationen.

HPLC-System:	LaChrom Elite [®] HPLC-Anlage der Firma VWR (Darmstadt) mit einer Pumpe L-2130, einem Autosampler L-2200, einem Säulenofen L-2300 und einem PC mit Chrome Elite [®] Software zur Datenerfassung
Laufmittel:	5 mM TBAHS, 10 % Methanol (v/v), pH 6,4
Flussrate:	1 ml/min (Druck ca. 60-120 bar)
Trennsäule:	Hypersil ODS, LiChrospher [®] RP-18, 5 µm, 125 x 4,6 mm (Fa. Merck)
Vorsäule:	aus dem gleichen Material wie die Trennsäule
Detektion:	UV-Detektor L-2455, bei 225 nm.

2.5.2 Zellzahlbestimmung mit der MPN-Methode

Die Lebendzellzahl Nitrit-oxidierender Bakterien wurden mit Hilfe des Most Probable Number Tests (ALEF, 1991) ermittelt. Der MPN-Test ist ein statistisches Verfahren zur Quantifizierung von Bakterien in Naturproben mittels Verdünnungsreihen. Für den MPN-Test wurden aktive Kulturen mit Glasperlen versetzt und die in Kolonien vorkommenden Bakterien durch intensives Schütteln vereinzelt. Mit dem so erhaltenen Probenmaterial wurden 5 ml Medium (I, 0,3 mM Nitrit) beimpft. Bei dezimaler Verdünnung wurden pro Verdünnungsstufe drei Parallelansätze angesetzt und bei 28 °C mindestens 8 Wochen lang inkubiert. Zur Auswertung wurde das Vorhandensein von Nitrit mittels Tüpfeltest (siehe 2.5.1) geprüft. Entsprechend der Umrechnungstabelle konnten so ungefähre Zellzahlen pro eingesetzte Probenmenge ermittelt werden.

2.6 Untersuchung von Nukleinsäuren

2.6.1 Isolierung von genomischer DNA

Die genomische DNA aus den Rein- und Anreicherungskulturen wurden mit Hilfe des Kits UltraClean[™] Microbial DNA Isolation Kit MoBio (Karlsbad, CA, USA) extrahiert. Dazu wurden mindestens 10 ml Zellsuspension für 15 min bei 10.000 g (Eppendorf Biofuge) abzentrifugiert. Der Schritt wurde so lange wiederholt, bis ein kleines Pellet sichtbar wurde. Eine weitere Möglichkeit zum Erhalt genügend großer Zellmengen aus wenig bewachsenen Kulturen war die sterile Filtration durch einen kleinen 0,2 µm Filter. Der Filter wurde dann mit den ersten beiden Lösungen des genannten Kits zusammen in das Micro-Bead-Röhrchen überführt. Die anschließende DNA-Isolation erfolgte nach Herstellerangaben.

2.6.2 Agarosegelelektrophorese

Der Erfolg der DNA-Extraktionen sowohl von Reinkulturen als auch von Anreicherungen sowie der Erfolg der Amplifizierung von Nukleotiden wurden in 0,8 – 3,0 % Agarosegelen kontrolliert. Als Laufpuffer wurde einfach konzentrierter TAE-Puffer eingesetzt.

TAE-Puffer 25-fach

Tris	242,0 g
EDTA (Titriplex III)	18,6 g
Eisessig	57,1 ml
Aqua dest.	ad 2000 ml

Der pH-Wert wurde mit Essigsäure auf 7,8 eingestellt.

Agarosegele

1 x TAE-Puffer	100 ml
Agarose (Biozym LE, Hess. Oldendorf)	0,80 – 2,0 g

Ladepuffer für Agarosegele

Bromphenolblau	0,25 g
Saccharose	40,0 g
Aqua dest.	ad 100 ml

Ethidiumbromid-Färbelösung

Ethidiumbromid	300 µg
Aqua dest.	ad 100 ml

Die Färbelösung wurde im Dunkeln bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Die Agarosegelelektrophoresen wurden in einer horizontalen Elektrophoresekammer (Hoefer HE33TM, Mini Submarine Electrophoresis Unit, San Francisco, CA, USA) angefertigt. Als DNA-Standards dienten der 1 kb und 100 bp DNA-Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland). Die Auftrennung der DNA erfolgte bei einer konstanten Spannung von 90 V für 25 - 40 min (Spannungsquelle, Consort E865, Turnhout, Belgien). Das fertige Gel wurde mittels Ethidiumbromid gefärbt und mit einer Gel-Dokumentationsanlage (GelDoc 1000, Universal Hood II, BioRad, Kalifornien, USA) detektiert.

2.6.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA-Abschnitten wurden je nach Fragestellung und anschließender Verwendung des Amplifikates unterschiedliche PCR durchgeführt. Allgemein erfolgte die PCR im Personal cyclerTM der Firma Biometra (Göttingen, Deutschland) im 25 µl bzw. 50 µl Ansatz. In einem 0,2 ml PCR-Gefäß wurde ein entsprechendes PCR-Reaktionsgemisch unter Verwendung der Dream TaqTM-Polymerase (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) vorgelegt und mit 0,2 – 2 µl DNA-Extrakt gemischt. Die Programme und eventuelle Zusätze (z.B. BSA) wurden der Anwendung und den verschiedenen Primerpaaren angepasst.

PCR Reaktionsgemisch

10 x Reaktionspuffer (25 mM)	5 µl
dNTPs (2 mM)	6 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1 µl
Primer 1 (50 pmol/ml)	1 µl
Primer 2 (50 pmol/ml)	1 µl
(BSA (20 mg/ml)	0,5 µl)
Taq-Polymerase (5 u/µl) (Dream Taq TM)	0,25 µl
pyrogen- und nukleasenfreies PCR Wasser	ad 50 µl

In einer Elektrophorese mit einem 1,5 % Agarosegel wurden die Amplifikate auf Konzentration und Basenzahl überprüft (siehe 2.6.2). Für die Elektrophorese wurden 5 µl PCR-Produkt eingesetzt.

2.6.3.1 Verwendete Primer und Reaktionsbedingungen

Es wurde mit Eubakterien-Primern sowie mit gattungsspezifischen Primern gearbeitet (Tabelle 2). Für DGGE (siehe 2.6.6) wurde an den Primern Eub341F und Nsp60-k-dgF die GC-Klammer 5'- CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG – 3' verwendet.

Tabelle 2: Bezeichnung, Sequenzen und Referenzen verwendeter Primer.

Bezeichnung	Position ¹	Sequenz 5'-3'	Ziel	Annealing-Temperatur	Literatur
Eub341 F	341	CCTACGGGA GGCA GCAG	Eubakterien	56 °C	Muyzer et al., 1998
Eub907 R	907	CCGTCAATTCCTTTGAGTTT	Eubakterien		
Eub27 F	27	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	Eubakterien	55 °C	Ursprung: Lane, 1991
Eub1492 R	1492	CGGYTACCTTGTTACGAC	Eubakterien		
T7		TAATACGACTCACTATA GGG	pGEM [®] -T-Vektor	45 °C	Promega
SP6		ATTTAGGTGACACTATA GAA	pGEM [®] -T-Vektor		Promega
Nsp60-k F	98	CGGGTGA GGAATACATGG	<i>Nitrospira</i> nicht Cluster V und VI	64 °C	Alawi, 2007
Nsp60-k-dg F	98	CGGGTGA GGAA BACATGG	<i>Nitrospira</i> , auch Cluster V und VI		
Nsp662 R	664	GGAATCCGCGCTCCTCT	<i>Nitrospira</i>	56 °C	Verändert Ursprung: Alawi, 2007 Hovanec und De Long, 1996 Maixner et al., 2006
Nsp1158 R	1158	CCCGTMTCTGGGCA GT	<i>Nitrospira</i>		
Ntoga122 F	122	ATATCGGAA CGTACCCGGA	<i>Nitrotoga</i>	65 °C	Lücker, 2010
Ntoga1422 R	1422	GCTGCTTCTGGTAGAACC	<i>Nitrotoga</i>		
Nb1000g F	978	CCATGA CCGGTCGCAG	<i>Nitrobacter</i>	58 °C	Alawi, 2007 Mobarry et al., 1996 Degrange und Bardin, 1995
Deg R	1372	TTTTTTGAGATTTGCTAG	<i>Nitrobacter</i>		
nxB169 F	169 ²	TACATGTGGTGGAACA	Alle bekannten <i>Nitrospira</i> -ähnlichen <i>nxB</i>	56,2 °C	Maixner, 2009
nxB638 R	638 ²	CGGTTCTGGTCR ATCA			

1) *Escherichia coli* Nummerierung (BROSIUS et al., 1981)

2) Position relativ zum *nxB* (NIDE3256) Gen von *N. defluvii*

Als Standard-PCR wurden folgende Temperaturschritte hintereinander programmiert: Denaturierung: 95 °C 5 min; Amplifizierung (30 Zyklen): 95 °C, 50 sec; 45 - 65 °C, 50 sec; 72 °C, 90 sec; Verlängerung: 72 °C, 8 min. Die Annealingtemperatur wurde dem jeweiligen Primerpaar angepasst.

2.6.4 Reinigung der PCR-Produkte

Zur Sequenzierung und zum weiteren Einsatz von Amplifikaten als PCR-Template mussten diese gereinigt werden. Für den Einsatz als Insert in einer Klonierung wurden die DNA-Fragmente mit dem Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit der Firma Avegene (Taipei Hsien221, Taiwan) gereinigt. Für andere Anwendungen reichte auch häufig die Behandlung mit einer thermosensitiven alkalinen Phosphatase und einer Exonuklease (FastAPTM und ExoI, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland). Beide Reinigungsmethoden wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.6.5 Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP)

RFLP ist eine Methode zur Ermittlung des genetischen Fingerabdrucks. Amplikate des 16S rRNA Gens wurden dafür mit dem Restriktionsenzym HpaII (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) geschnitten und in einem hoch polymeren Agarosegel (3 %, siehe 2.6.2) aufgetrennt. Die Dokumentation erfolgte wie unter 2.6.2.

2.6.6 Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (DGGE)

Mit Hilfe der DGGE-Technik wurden Teilamplikate des 16S rRNA Gens hinsichtlich ihres Schmelzverhaltens untersucht (TESKE et al., 1994; MUYZER et al., 1998). Dadurch konnten Hinweise auf Sequenzähnlichkeiten von Mikroorganismen gewonnen und somit die Diversität von Bakterienpopulationen untersucht werden. Die denaturierende Wirkung eines linearen Harnstoff/Formamid-Gradienten in einem Polyacrylamidgel bewirkt ein Öffnen der Wasserstoffbrücken der doppelsträngigen DNA-Fragmente in Abhängigkeit vom GC-Gehalt und dem Einfluss übergeordneter Schmelzdomänen. Mit zunehmend denaturierenden Bedingungen kommt es zu einem partiellen Schmelzen der doppelsträngigen DNA. Formänderungen, wie die Bildung von einzelsträngigen Bereichen und Loops (Schlaufen), führen zu einer Reduktion der Mobilität des DNA-Fragmentes im Gel und damit zur Bildung distinkter DNA-Banden. Der verwendete Harnstoff-Formamid-Gradient wurde dem GC-Gehalt entsprechend angepasst.

Die Durchführung der DGGE erfolgte in einem DCode™ Mutation Detection System (BioRad, Hercules, Kalifornien, USA) unter Verwendung von 1,5 mm Spacer und einem 15er Gelkamm (BioRad, Hercules, Kalifornien, USA). Der bei der DGGE-Analyse verwendete denaturierende Harnstoff-Formamid-Gradient wurde ausgehend von zwei unterschiedlich konzentrierten Stammlösungen angefertigt.

Stammlösung 1 (Acrylamidlösung mit 0 % Harnstoff-Formamid)

40 % Acrylamidlösung 37,5:1 (AppliChem, Darmstadt, Deutschland)	15 ml
1-fach TAE-Puffer (siehe 2.6.2)	85 ml

Stammlösung 2 (Acrylamidlösung mit 100 % Harnstoff-Formamid)

40 % Acrylamidlösung	15 ml
Harnstoff	42 g
Formamid	40 ml
1-fach TAE-Puffer	35 ml

Aus diesen Stammlösungen konnten Ansätze mit verschiedenem Harnstoff-Formamid-Gehalt hergestellt werden. In dieser Arbeit wurden Gele mit unterschiedlichen denaturierenden Gradienten von 30 - 50 % Anfangsgehalt bis 70 - 90 % Endgehalt verwendet. Für die Polymerisierung wurden 82 µl APS und 17 µl TEMED in die gekühlten Trenngel-Ansätze gegeben und mit einem Gradientenmischer (Model 385 Gradient Former, BioRad, Kalifornien, USA) ein linearer denaturierender Gradient gegossen. Zusätzlich wurden zur Herstellung des Sammelgels 10 ml der Stammlösung 1 entnommen, mit 50 µl APS und 10 µl TEMED vermischt und über das noch flüssige Trenngel geschichtet. Bei Raumtemperatur ist das Gel nach 4 h auspolymerisiert und wurde im Anschluss über Nacht bei 4 °C gelagert.

Ammoniumpersulfat (APS):

Ammoniumpersulfat	1 g
Aqua dest.	ad 10 ml

Die Lösung wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert.

TEMED:

N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin wurde gebrauchsfertig von der Firma BioRad (Kalifornien, USA) bezogen und bei Raumtemperatur gelagert.

Die aus den Bakterienkulturen gewonnene genomische DNA, wurde unter Verwendung des Eubakterien-Primersets 27F – 1492R amplifiziert. In einer weiteren PCR wurde dann das gewünschte Primerpaar unter Verwendung einer GC-Klammer eingesetzt. Die Menge des eingesetzten PCR-Produktes konnte durch Bandenintensität bei der Überprüfung im Agarosegel (siehe 2.6.2) abgeschätzt werden. So wurde eine relativ homogene Bandenintensität im DGGE-Gel erreicht. Leere Geltaschen wurden mit Ladepuffer gefüllt, um eine gleichmäßige Verteilung der Ionenkonzentration über das gesamte Gel zu gewährleisten und dem so genannten „Smiley-Effekt“ vorzubeugen. Als Laufpuffer diente 1 x TAE-Puffer.

DGGE-Ladepuffer (1-fach konzentriert)

Bromphenolblau	0,05 g
Saccharose	40,00 g
EDTA (Titriplex III)	2,92 g
SDS	0,50 g
Aqua dest.	ad 100 ml

Der Ladepuffer wurde in Aliquots bei -20°C gelagert.

Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 110 V und einer konstanten Temperatur von 59 °C etwa 17 Stunden durchgeführt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel für 20 min in einem Ethidiumbromidbad gefärbt. Vor der Dokumentation mit UV-Licht (GelDoc 1000, Universal Hood II, BioRad, Kalifornien, USA) wurde das Gel kurz in destilliertem Wasser gewaschen. Ausgesuchte Banden wurden mit Hilfe von sterilen Pipettenspitzen aus dem Gel gestanzt und in 1,5 ml Reaktionsgefäße gefüllt mit 35 µl PCR-Wasser überführt. Bei 4 °C konnte die DNA durch Diffusion langsam (mehr als 2 Tage) ins Wasser eluieren. In einer PCR wurden dann die DNA-Fragmente reamplifiziert, so dass sie anschließend nach Reinigung der PCR-Produkte (siehe 2.6.4) durch die Firmen Sequlab und Eurofins sequenziert werden konnten.

2.7 Klonierung

2.7.1 Transformation und Kultivierung von *E. coli*

100 µl chemisch kompetente *Escherichia coli*-Zellen (DH5α, XL1-Blue) wurden 5 min auf Eis aufgetaut, mit 1-5 µl Ligationsansatz versetzt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden einem Hitzeschock ausgesetzt (42,0 °C, 45 sec), 2 Minuten auf Eis abgekühlt, in 0,5 ml SOC-Medium resuspendiert und für eineinhalb Stunden bei 200 Upm und 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf LB-Medium mit 1,5 % Agar (w/v) und Ampicillin (100 µg/ml) sowie den Zusätzen IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid, 12 mg/l) und X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid, 50 mg/l) ausplattiert. Die Inkubation erfolgte 37 °C über Nacht.

SOC-Medium

Hefeextrakt	0,5 % w/v
Fleischextrakt	2,0 % w/v
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
Glucose	20 mM

Alle Bestandteile wurden in dest. Wasser gelöst.

Kulturmedium für *E. coli*-Zellen (LB-Medium)

NaCl	10 g
Hefeextrakt	5 g
Trypton	10 g
dest. Wasser	ad 1000 ml

Das LB-Medium wurde 20 min bei 121°C autoklaviert.

Die Zellanzucht rekombinanter *E. coli*-Zellen zur Plasmidisolierung erfolgte in Reagenzgläsern, die mit etwa 10 ml LB-Medium gefüllt waren. Das Medium wurde unmittelbar vor der Kultivierung der Mikroorganismen mit Ampicillin (100 µg/ml) versetzt. Die Inkubation erfolgte aerob unter Schütteln (200 Upm) bei einer konstanten Temperatur von 37 °C.

2.7.2 Identifizierung rekombinanter Transformanden mittels Blau / Weiß-Screening

Der T7- und SP6-RNA-Polymerase-Promoter des pGEM[®]-T-Vektors (Promega, Madison, USA) begrenzt innerhalb der Kodierungsregion des α -Peptids der β -Galaktosidase eine multiple Klonierungsregion. Das durch das Insert inaktivierte α -Peptid des rekombinanten Klons ermöglicht ein direktes Farb-Screening. Transformanden mit Insertionen bilden weiße, Transformanden ohne Insertionen bilden blaue Kolonien. Die Überprüfung der Transformanden erfolgte nach Anzucht einzelner weißer Klone durch die Isolation der Plasmide, dem Verdau dieser mit geeigneten Restriktionsenzymen und der Auftrennung im Agarosegel.

2.7.3 Isolierung von Plasmiden

Die Isolierung von Plasmiden wurde mit Hilfe des High Speed Plasmid Mini Kit der Firma AveGene (Taipei Hsien221, Taiwan) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.8 Sequenzvergleiche und Stammbauberechnungen

2.8.1 Sequenzvergleiche (Alignment)

Die erhaltenen Sequenzdaten wurden, wenn nötig, mit Hilfe des Computerprogramms BioEdit nachbearbeitet. Die so erhaltene Sequenz wurde in der NCBI Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) eingeben und unter Verwendung des Programms BLAST mit allen in den Datenbanken vorhandenen prokaryotischen DNA-Sequenzen verglichen. Sequenzdatensätze wurden im Anschluss mit BioEdit und dem hier integrierten ClustalW aniliert (THOMPSON et al., 1994), einem Algorithmus bei dem homologe Sequenzen durch das Einführen von Lücken untereinander gestellt werden.

2.8.2 Stammbauberechnungen

Für die phylogenetische Darstellung wurden zwei Rechenverfahren angewendet.

Zum einen wurde die *Neighbor Joining*-Methode (NJ) verwendet (SAITOU und NEI, 1987). NJ ist der in der Phylogenetik am häufigsten benutzte Algorithmus, der nicht die Bedingung einer molekularen Uhr (Metapher zur Abschätzung der Evolutionsdauer) stellt. Er beruht auf einer Distanzmatrix aller einbezogenen Sequenzen. Es handelt sich hierbei um ein schnelles Verfahren, um einen „minimum evolution tree“ (Baum mit der kleinsten Summe an Astlängen) zu erhalten.

Die *Maximum Likelihood*-Methode (ML) basiert auf einer statistischen Berechnung. Es wird die Wahrscheinlichkeit für eine bestimmte Stammbaumtopologie ermittelt und die Topologie größter Wahrscheinlichkeit als Ergebnis ausgegeben. Parameter wie das Verhältnis von Transversion zu Transition, der Konservierungsgrad an bestimmten Positionen oder die Wahrscheinlichkeit für Konservierung im Gegensatz zur Mutation werden berücksichtigt. Es werden diskrete Merkmale untersucht und nicht wie bei der Distanzmethode ermittelte Matrizen.

Die Bäume wurden mit MEGA 5.05 (KUMAR et al., 2001) erstellt, dabei wurde das Bootstrap-Verfahren, eine Vervielfachung (1000-fach) der bestehenden Datensätze (FELSENSTEIN, 1985) angewendet.

2.9 Isolierung der Nitritoxidoreduktase (Nxr)

Zur Isolierung und anschließender Charakterisierung der Nxr von Bakterien der Gattung *Nitrospira*, wurden die Reinkulturen *Nitrospira moscoviensis* und *Nitrospira defluvii* verwendet.

2.9.1 Zellaufschluss

Der Zellaufschluss erfolgte je nach Kultur auf zwei verschiedene Arten.

- 1) Zellen von *N. moscoviensis* wurden durch eine Ultraschallbehandlung in TEMB-Puffer für 4 x 2 min bei 60 Hz und 50 % aufgeschlossen (Ultrasonic Processor UP200S, Fa. Dr. Hielscher GmbH, Teltow, Deutschland). Ein Zusatz von Lysozym, DNase oder EDTA war hierbei nicht nötig. Nach der Behandlung erfolgte eine Zentrifugation bei 10.000 g und 4 °C für 30 min. Der rotbraune Überstand wurde zur Isolierung der Nxr verwendet.

2) Für Zellen von *N. defluvii* reichte eine Behandlung mit Ultraschall aufgrund der starken Flockenbildung nicht aus, um die EPS und die darunter befindliche Zellmembran zu zerstören. Daher wurden die Zellen von *N. defluvii* in TEMB-Puffer resuspendiert und mit einer dreimaligen Behandlung mittels French-Press bei 20.000 bar aufgeschlossen (French Pressure Cell Press, Fa. American Instrument Company, Division of Travenol Laboratories, inc., Silver Spring, Maryland, USA). Der gewonnene Rohextrakt wurde durch Zentrifugation bei 10.000 g und 4 °C für 30 min von Zelltrümmern getrennt. Der hellbeige zellfreie Rohextrakt wurde zur Isolierung der Nxr verwendet.

TEMB-Puffer

Tris	1,21 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	2,03 g
NaHCO ₃	1,68 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

Der pH-Wert wurde mittels HCl auf 8,0 eingestellt.

2.9.2 Identifizierung der Nxr-Proteine

2.9.2.1 Trennung des Rohextraktes mittels FPLC

Fast Protein Liquid Chromatographie (FPLC) ist eine Form der Säulenchromatographie, die zumeist ihre Verwendung in der Auftrennung von Proteinen aus komplexen Substratgemischen findet. Es handelt sich hierbei um eine Größenausschluss-Chromatographie. Diese erfolgte an der Äkta FPLC-Anlage (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden). Der zellfreie Rohextrakt wurde zu 0,5 ml Probenvolumen auf die mit entgastem Gelfiltrationspuffer equilibrierte Säule (HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade, Säulenvolumen 120 ml) aufgetragen. Der Säulendurchlauf wurde bei einer angelegten Flussrate von 0,3 ml pro Minute in Fraktionen zu je 2 ml aufgefangen (insgesamt 90 Fraktionen). Die Messung der Absorption fand kontinuierlich bei 280 nm statt.

Die erhaltenen Fraktionen wurden über Vivaspin 4 Säulen (5.000 MWCO PES, Fa. Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Deutschland) aufkonzentriert und für weitere Charakterisierungen wie Proteingehalt, Nitritoxidaseaktivität und Proteinidentifizierung verwendet.

Gelfiltrationspuffer

Tris	2,42 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	4,06 g
NaNO ₂	4,41 g
NaHCO ₃	3,36 g
NaCl	17,53 g
Aqua bidest.	ad 2000 ml

Auf pH 8,0 einstellen und durch einen 0,2 µm Filter sterilfiltrieren.

2.9.2.2 Bestimmung des Proteingehaltes

In alkalischer Lösung bildet Protein mit Kupfer(II)-Ionen einen Komplex. Dieser Vorgang wird Biuret-Reaktion genannt. Die Kupferionen des Komplexes werden zu Kupfer(I)-Ionen reduziert, die mit Bicichoninsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex bilden (SMITH et al., 1985).

Der BCA-Test zur Bestimmung des Proteingehaltes wurde mit Hilfe des BCA Protein Assay Kits der Firma Novagen (Vertrieb durch Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) in Ansätzen im Mikromaßstab nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Ein UV-Vis-Gerät zum detektieren von Mikrotiterplatten stand mit einer Wellenlänge von 550 nm zur Verfügung. Als Referenzprotein diente Rinderserumalbumin in bekannter Konzentration.

2.9.2.3 Bestimmung der Nitritoxidaseaktivität

Zur Bestimmung der Fähigkeit von Zellextrakten und aufgereinigten Proteinlösungen, Nitrit zu reduzieren, wurde die Abnahme von Nitrit nasschemisch ermittelt. Hierzu wurde die von Garrett und Nason (1969) beschriebene Methode in abgeänderter Form verwendet.

Der Test wurde bei 30 °C in einem Heizblock (Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Die Ansätze wurden kurz vorgewärmt. Durch Zugabe der Probe zum Reaktionsansatz wurde die Reaktion gestartet.

Reaktionsansatz:

Natriumchlorat (0,5 M)	10 µl
Natriumnitrit (0,1 M)	15 µl
Probe in TEMB-Puffer (25 - 100 µl Probe)	200 µl

Je nach Bedarf (z. B. alle 0,5 min) wurden regelmäßig, 12,5 µl entnommen und die Reaktion in 237,5 µl Sulfanilsäure-Lösung abgestoppt. Eine Kontrolle ohne Enzym wurde ebenfalls parallel beprobt.

Zur Nitritbestimmung wurden 20 µl der abgestoppten Probe in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben und mit 500 µl bidest. Wasser, 500 µl NEDA-Lösung (N-Naphtylethyldiammoniumdihydrochlorid 0,12 %, w/v) und 480 µl Sulfanilsäure-Lösung versetzt. Nach 10 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei $\lambda = 546$ nm gemessen.

Sulfanilsäure-Lösung:

Sulfanilsäure	2,5 g
Aqua bidest.	200 ml
konz. HCl	50 ml

2.9.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (LAEMMLI, 1970) erfolgte die Auftrennung der Rohextrakte bzw. Fraktionen der FPLC unter denaturierenden Bedingungen. Die Proteine wurden in einem Polyacrylamid-Sammelgel (4 % Polyacrylamid) fokussiert und über ein Polyacrylamid-Trenngel (10 %, Tabelle 3) ihrer Größe nach aufgetrennt. Die Zugabe von Natriumdodecylsulfat (SDS) bewirkte eine Denaturierung der Proteine und versieht sie mit einer negativen Ladung, die proportional zu ihrer Masse ist. Proteinproben wurden mit vierfach Laemmli-Puffer versetzt und 5 Minuten bei 95 °C denaturiert. Die Gelelektrophorese erfolgte mit dem Mini-Preotean III System der Firma Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) in Tris-Glycin Puffer bei 15 und 30 mA bis zur gewünschten Auftrennung. Unterschiedliche Marker dienten als Größenstandards (zum Beispiel Unstained Protein Ladder, Fa. Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland).

Proteinbanden in Gelen wurden mittels kolloidalem Coomassie (Rothi®-Blue, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) gemäß den Herstellerangaben mindestens 12 Stunden gefärbt. Die Dokumentation der Gele erfolgte mittels eines Flachbettscanners und der Auswertung der resultierenden Bilder.

Tabelle 3: Material zum Gießen von zwei SDS-Gelen.

	Trenngel ~10 %	Sammelgel 4 %
Trenngelpuffer	4 ml	-
Sammelgelpuffer	-	0,6 ml
40 % Acrylamidlösung ¹	3,5 ml	0,6 ml
H ₂ O	3 ml	3,2 ml
APS (10 %)	80 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl

1) 40 % Acrylamidlösung 37,5:1 (Fa. AppliChem, Darmstadt, Deutschland)

Trenngelpuffer:

Tris	90,75 g
SDS	2 g

Der Puffer wurde mit 0,1 M HCl auf pH 8,9 eingestellt und mit dest. Wasser auf 500 ml aufgefüllt.

Sammelgelpuffer:

Tris	0,23 g
SDS	2 g

Der Puffer wurde mit 0,1 M HCl auf pH 6,8 eingestellt und mit dest. Wasser auf 500 ml aufgefüllt.

Tris-Glycin-Puffer:

Tris (2 M)	12 ml
Glycin (2 M)	92 ml
SDS (10 %, w/v)	9,6 ml

Der Puffer wurde mit 1 M HCl auf den pH 8,8 eingestellt und mit dest. Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.

Probenpuffer (4 x):

2-Mercaptoethanol	2,5 ml
Glycerin	7,5 ml
SDS	1,2 g
Bromphenolblau (2 %, w/v)	0,5 ml
Tris	0,4 g

Der Puffer wurde mit 0,1 M HCl auf pH 6,8 eingestellt und mit dest. Wasser auf 25 ml aufgefüllt.

2.9.2.5 Identifizierung der Gamma-Untereinheit der Nxr

Zur Identifizierung der Gamma-Untereinheit der Nxr aus *N. defluvi* wurden die entsprechenden Banden aus dem SDS-Gel steril und möglichst kreatinfrei ausgeschnitten und mittels Im-Gel-Verdau (mit Trypsin) und anschließender LC-ESI-Ionenfallen MS / MS und MASCOT-Datenbanksuche analysiert. Diese Untersuchung fand im Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf in der Abteilung für Massenspektrometrische Proteomanalytik statt.

2.10 Mikroskopische Untersuchungen

2.10.1 *In situ*-Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden

Mit Hilfe der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) ist es möglich mit domänen- und gattungsspezifischen Sonden Anreicherungskulturen und Umweltproben auf ihre Bakteriengemeinschaft hin zu analysieren. Die verwendeten 16S rRNA Sonden EUB-338I und Nsp-662 sind mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 markiert (Tabelle 4).

Tabelle 4: Sequenzen und Bezeichnung Sonden

Bezeichnung	Position ¹	Sequenz 5' - 3'	Ziel	Referenz
EUB-338I	338 - 355	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	Eubakterien	Amann et al., 1990
Nsp-662	662 - 679	GGAATTCCGCGCTCCTCT	<i>Nitrospira</i>	Daims et al., 2001

1) *Escherichia coli* Nummerierung (BROSIUS et al., 1981)

Zur Fixierung der Zellen erfolgte durch die Zugabe von Paraformaldehyd (PFA). Das durch mehrmalige Zentrifugation erhaltene Zellpellet wurde in einem Lösungsgemisch von PBS-Puffer (1-fach) / PFA-Lösung (4 %) im Verhältnis 1:3 aufgenommen und resuspendiert. Nach der Inkubationszeit von etwa 1,5 Stunden auf Eis konnten die fixierten Zellen bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren werden.

Phosphat buffered saline (PBS)

NaCl	8,01 g
KCl	0,20 g
Na ₂ HPO ₄	1,42 g
KH ₂ PO ₄	0,27 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

Der pH-Wert wurde mittels HCl auf 7,4 eingestellt und sterilfiltriert.

4 % Paraformaldehyd-Lösung

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

Das Paraformaldehyd wurde in den erwärmten PBS-Puffer gegeben, durch Zugabe von NaOH gelöst und der pH-Wert mit HCl auf 7,5 eingestellt. Die fertige Lösung konnte bei -20 °C gelagert werden.

Für die Hybridisierung wurden pro Feld eines Objektträgers je 3 µl der fixierten Probe aufgetragen und an der Luft trocknen gelassen. Anschließend wurde durch steigende Konzentrationen an Ethanol für je 3 min entwässert (50 %, 80 % und 96 %). Nach dem Trocknen der Proben wurden 8 µl Hybridisierungspuffer auf jedes Feld gegeben und darin je 1 µl der entsprechenden Gensonde suspendiert. Die Hybridisierung erfolgte in einem Hybridisierungsofen (OV2 Mini Hybridisation Oven, Biometra, Göttingen, Deutschland) mit dem Hybridisierungspuffer bei 46 °C für zwei Stunden. Als feuchte Kammer diente hierbei ein 50 ml Falconröhrchen mit Puffer getränktem Papier. Der nachfolgende Waschschritt wurde ebenfalls in einem Falconröhrchen durchgeführt. Dazu wurde das Gefäß mit 50 ml des bei 48 °C vorgewärmten Waschpuffers befüllt, der Objektträger hineingelegt und für 20 min bei 48 °C inkubiert. Im Anschluss wurde der Objektträger mit eisgekühltem Aqua bidest. abgespült und getrocknet.

Hybridisierungspuffer (35 % Formamid)

NaCl (5 M)	180 µl
Tris HCl (1 M, pH 7,2)	20 µl
Formamid	350 µl
SDS (10 %, w/v)	1 µl
Aqua dest.	ad 1 ml

Waschpuffer

NaCl (5 M)	700 µl
Tris HCl (1 M, pH 7,2)	1000 µl
EDTA (0,5 M)	500 µl
SDS (10 %, w/v)	50 µl
Aqua dest.	ad 50 ml

Zur Dokumentation der FISH-Proben wurde zusätzlich eine Markierung der DNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) durchgeführt. Durch Anregung mit ultraviolettem Licht fluoresziert DAPI im sichtbaren Bereich mit blauer Farbe. Das Absorptionsmaximum liegt in Verbindung mit der doppelsträngigen DNA bei einer Wellenlänge von 358 nm, das Emissionsmaximum bei 461 nm. Für die DAPI-Färbung wurden auf jedes Feld der beladenen Objektträger 10 µl einer 0,1 % (w/v) DAPI-Verdünnung gegeben und für 5 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde der Objektträger mit destilliertem Wasser abgespült und bei 4 °C im Dunkeln bis zur Mikroskopie aufbewahrt.

Die fluoreszenzmikroskopische Betrachtung und Auswertung wurde mit dem Epifluoreszenzmikroskop Axio Imager Z1 (Carl Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen, Deutschland) und der dazugehörigen Software (AxioVision© AxioVs40, Carl Zeiss Imaging Solutions GmbH, München, Deutschland) durchgeführt.

2.10.2 Elektronenmikroskopie

2.10.2.1 Transelectronenmikroskopie (TEM)

Durch die TEM können Schnitte durch Zellen sichtbar gemacht werden. Dadurch ist es möglich, Zellsegmente und Zellkompartimente zu erkennen. Die Einbettung, die Herstellung der Ultradünnschnitte sowie die Dokumentation fand unter der Anleitung von Frau Woelken in der Abteilung Zellbiologie der Pflanzen und Phykologie im Biozentrum Klein Flottbek der Universität Hamburg statt.

Probenvorbereitung

Für eine elektronenmikroskopische Untersuchung wurden die Zellen nach Spurr (1969) eingebettet. Hiefür wurde die gewünschte Kultur stark angereichert oder durch einen Zentrifugationsschritt bei 10.000 g für 30 min pelletiert (Zentrifuge: Kontron Hermle Centrikon H 401, Rotor KA 12.500). Die Kulturlösung (etwa 7 ml) bzw. das erhaltene Pellet wurde zunächst mit 2,0 % Glutaraldehyd in Cacodylatpuffer (Arsenatpuffer 75 mM, C₂H₆AsNaO₂) für 30 min bei Raumtemperatur und im Anschluss 90 min auf Eis fixiert.

Die Probe wurde mehrmals in Cacodylatpuffer gewaschen und danach das Pellet mit ca. 0,5 ml 2 % Agar-Noble in Cacodylatpuffer übergossen. Das Pellet wurde mit Hilfe einer Pipette mittig im Agar platziert. Der Agar wurde auf Eis bis zur Starre gekühlt. Mit einem Skalpell wurde das Pellet ausgeschnitten und erneut mit Agar überschichtet. Nach dem Erkalten wurde das Pellet in einem Würfel mit etwa 2 mm Kantenlänge ausgeschnitten und in Cacodylatpuffer zwischengelagert. Über Nacht wurde die Probe bei 4 °C in 1 % Osmiumtetroxid in Cacodylatpuffer kontrastiert. Anschließend wurde die Probe dreimal mit Cacodylatpuffer gewaschen. Im Folgenden wurde die Probe stufenweise mit steigender Acetonkonzentration (30 %, 50 %, 70 %, 90 %, 100 %) für je 10 min bei 4 °C und im Anschluss zweimal für 10 min mit 100 % Aceton bei Raumtemperatur entwässert.

Einbettung

Für die Einbettung wurden die Agarwürfel mit den Probenpellets auf einem Drehmischer bei langsamer Drehgeschwindigkeit in 2 ml Rollrandgläschen mit dem jeweiligen Spurr-Gemisch (Tabelle 5) überschichtet und bei Raumtemperatur inkubiert. Die Probe wurde danach in eine Silikonform eingebettet und erneut mit Spurr überschichtet. Die Polymerisation erfolgte für 24 Stunden bei 70 °C.

Spurr Einbettungsgemisch (LVG: Low Viscosity Gemisch)

VCD (E.R.L. 4221 D, 3,4-Epo xycyclohexylmethyl-3,4-epoxycyclohexylcarbo xylat)	5,0 g
D.E.R.736 (Diglycidether)	3,0 g
NSA (Nonenyl-Bersteinsäureanhydrid)	13,0 g
DMAE (S-1, Dimethylaminoethanol)	0,2 g

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

Tabelle 5: Einbettung nach Spurr (1969)

Spurr / Aceton 100 %	Inkubationszeit [Stunden]
1:3	1
1:1	1,5 - 2
3:1	4 – 6 (oder über Nacht)
100 % Spurr	über Nacht
100 % Spurr	bis zum Gießen

Herstellung der Ultradünnschnitte und Dokumentation

Zur Herstellung der Ultradünnschnitte wurden ein Ultramikrotom (OmU2, Fa. Reichert-Jung Optische Werke AG, Wien, Österreich) und ein Diamantmesser (Fa. Diatome AG, Biel, Schweiz) genutzt. Die 50 bis 70 nm dünnen Schnitte wurden mit Movital (Polyvinylformaldehyd in 0,25 % Chloroform) befilmten Kupfernetzchen (300 mesh) aufgetragen. Das Nachkontrastieren erfolgte mit 5% Uranylacetat in Methanol (WATSON, 1958) und Bleicitrat (REYNOLDS, 1963) für jeweils zehn Minuten. Die fertigen Proben konnten nun mittels Transmissions-Elektronenmikroskop (Model Leo 906E, Fa. Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland) untersucht werden.

2.10.2.2 Negativkontrastierung

Die Negativkontrastierung ist eine relative schnelle Methode kleine biologische Strukturen wie Bakterien, Viren und Phagen hochauflösend darzustellen. Die Bakterien werden dafür auf eine dünne Kohlefolie aufgebracht und mit einer Schwermetallsalzlösung (Uranylacetat, 2 %) inkubiert (60 – 90 sec). Nach dem Absaugen bleibt aufgrund von Kapillarkräften an Furchen, Rändern und Vertiefungen mehr Schwermetall zurück – das Objekt erscheint daher heller als die kontrastreiche unmittelbare Umgebung (= negativer Kontrast). Nach dem Trocknen der Präparate erfolgte die Untersuchung unter dem Transmissions-Elektronen-Mikroskop (Model Leo 906E, siehe oben).

2.10.3 Rasterelektronen-Mikroskopie (REM)

Mit der REM-Technik können ganze Zellen und ihre Oberflächen sichtbar gemacht werden (REYNOLDS, 1963). Die Fixierung der Zellen erfolgte in einer Lösung von 1 % Paraformaldehyd (w/v) und 0,25 % Glutaraldehyd (v/v) in PBS-Puffer (pH 7,4) für 20 min bei Raumtemperatur. Die folgende Entwässerung fand durch eine an Ethanol-Reihe mit ansteigender Konzentration (30 % – 100 %) ebenfalls bei Raumtemperatur statt. Unter Anleitung von Frau Dehn wurde im Anschluss die kritische Punkt Trocknung (Balzers CPD 030, Bal-Tec, Schalksmühle, Deutschland) zur Erhaltung der Oberflächenstruktur und die Goldbedampfung (SCD 050, Bal-Tec, Schalksmühle, Deutschland) in der Abteilung für Biodiversität, Evolution und Ökologie im Biozentrum Klein Flottbek der Universität Hamburg durchgeführt. Die REM-Aufnahmen wurden von Frau Walter mit einem Zeiss Modell SEM LEO 1525 (Zeiss, Jena, Deutschland) am zoologischen Institut der Universität Hamburg erstellt.

3 Publikationen

3.1 Temperature influences the population structure of nitrite-oxidizing bacteria in activated sludge

Environmental Microbiology Reports, 2009, 1(3): 184–190

Autoren: Mashal Alawi, Sandra Off, Meral Kaya und Eva Spieck

Ziel: Das Ziel dieser Studie war die Klärung des Einflusses der Temperatur auf die Zusammensetzung einer Nitrit-oxidierenden Bakteriengemeinschaft aus Belebtschlamm.

Zusammenfassung: Um die Populationsstruktur der NOB in Anreicherungskulturen zu untersuchen, wurden die Methoden der Elektronenmikroskopie, der DGGE und TGGE (Temperatur-Gradienten-Gelelektrophorese), der gattungsspezifischen PCR sowie der 16S rRNA Analyse eingesetzt. Anhand der Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass im Belebtschlamm drei verschiedene Gattungen an NOB vorkommen: *Nitrospira*, *Nitrobacter* und *Candidatus Nitrotoga*. Je nach Kultivierungstemperatur veränderte sich die Populationsstruktur. Bei 10 °C und 17 °C koexistierte der an Kälte angepasste Nitritoxidant *Candidatus Nitrotoga* mit *Nitrospira*. Bakterien der Gattung *Nitrospira* wurden in einem weiten Temperaturbereich von 10 °C bis 28 °C angereichert und *Nitrobacter* wuchs bei 17 °C und 28 °C. Damit konnte geklärt werden, dass sich die NOB-Struktur in Belebtschlamm langfristigen Temperaturwechseln und somit den Jahreszeiten anpasst.

Persönliche Beteiligung: Ich isolierte die DNA der verschiedenen Anreicherungen, fertigte die DGGE-Analysen an und führte die nachfolgenden Schritte für Sequenzanalysen durch. Die DGGE-Gele sind im Zusatzmaterial, Abbildung S2 von Alawi et al. 2009 im Anhang zu finden.

3.2 Enrichment and physiological characterization of a novel *Nitrospira*-like bacterium obtained from a marine sponge

Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(14): 4640–4646

Autoren: Sandra Off, Mashal Alawi und Eva Spieck

Ziele: In dieser Arbeit sollten die Kultivierungsbedingungen für eine effektive Anreicherung von NOB aus dem Mesohyl eines Mittelmeerschwammes optimiert werden. Ein weiteres Ziel war, die angereicherten Bakterien der Gattung *Nitrospira* zu charakterisieren sowie die physiologischen Eigenschaften mit anderen *Nitrospira*-ähnlichen Bakterien aus marinen und nicht-marinen Lebensräumen zu vergleichen.

Zusammenfassung: Ein neues *Nitrospira*-ähnliches Bakterium konnte aus dem Mesohyl des marinen Schwammes *Aplysina aerophoba* erfolgreich angereichert und physiologisch charakterisiert werden. Elektronenmikroskopische Aufnahmen lieferten erste Informationen über die Form und Ultrastruktur dieser Organismen. Die Bakterien der Gattung *Nitrospira* wurden physiologisch hinsichtlich optimaler Kultivierungsbedingungen, insbesondere der Temperatur und der Substratkonzentration, mit anderen *Nitrospira*-Kulturen verglichen. Bestes Wachstum wurde bei Temperaturen zwischen 28 °C und 30 °C in mineralischem Medium mit einem Seewasseranteil von 70 % und einer Substratkonzentration von 0,5 mM Nitrit unter mikroaerophilen Bedingungen erreicht. Substratkonzentrationen über 1,5 mM führten zu einer starken Hemmung des Wachstums. Phylogenetische Analysen des 16S rRNA Gens ergaben, dass das neue *Nitrospira*-ähnliche Bakterium (Aa01) dem Cluster IVa zugeordnet werden konnte. Zu der am nächsten beschriebenen Reinkultur *Nitrospira marina* besteht eine Sequenzähnlichkeit von 94,6 %.

Beteiligung der Co-Autoren: Mashal Alawi untersuchte die physiologischen Eigenschaften der beiden Anreicherungen S11 und F2 und erstellte anhand gegebener Sequenzen den phylogenetischen Baum. Eva Spieck stellte die bereits vor der Studie drei Jahre alten Anreicherungen aus den Gewebeproben von *Aplysina aerophoba* zur Verfügung, lieferte die Daten zur Erstellung der Tabelle über die physiologischen Eigenschaften beschriebener Vertreter von *Nitrospira* und war an der Konzeption des Manuskripts und an den anschließenden Arbeiten im Zuge der Publikation beteiligt.

3.3 Isolation and characterization of a novel thermophilic nitrite-oxidizing bacterium from a geothermal spring

FEMS Microbiology Ecology, 2011, 75: 195–204

Autoren: Elena V. Lebedeva, Sandra Off, Sabine Zumbrägel, Myriam Kruse, Ayvy Shagzhina, Sebastian Lücker, Frank Maixner, André Lipski, Holger Daims, Eva Spieck

Ziele: Ziel dieser Studie war die Anreicherung und Isolierung Nitrit-oxidierender Bakterien aus heißen Quellen. Es sollte untersucht werden, ob Bakterien der Gattung *Nitrospira* in der Lage sind, bei Temperaturen über 50 °C zu wachsen.

Zusammenfassung: Es konnte in dieser Arbeit die erste moderat thermophile Reinkultur Nitrit-oxidierender Bakterien der Gattung *Nitrospira* beschrieben werden. *Nitrospira calida* wurde aus einer Bakterienmatte der terrestrischen geothermalen Quelle Gorjachinsk (pH 8,6; Temperatur 48 °C) aus der Baikal-Riffzone (Russland) isoliert und charakterisiert. Eine hohe 16S rRNA Gensequenzähnlichkeit von 99,6 % besteht zu einer Anreicherung aus der Garga Quelle, die am besten bei 46 °C wächst, während drei weitere thermophile Anreicherungen von *Nitrospira* aus der Garga Quelle und von einer heißen Quelle auf der Kamchatka-Halbinsel (Russland) deutlich von *N. calida* unterschieden werden konnten (93,6 – 96,1 % 16S rRNA Gensequenzsimilarität). Als physiologische Eigenschaften zeigte *N. calida* die höchste Nitritumsatzrate bei 46 – 52 °C innerhalb einer Temperaturspanne von 37 – 58 °C und Wachstum in einem weiten pH-Bereich von pH 7,0 – 8,8. Eine Fähigkeit zu mixotrophem oder chemoorganotrophem Wachstum konnte nicht festgestellt werden. Die Hauptfettsäuren sind 16:0, 16:1 cis-7 und 16:0 11-methyl. Es wurde gezeigt, dass Bakterien der Gattung *Nitrospira* an der Oxidation von Nitrit in moderat thermophilen Habitaten beteiligt sind und in geothermalen heißen Quellen eine große Diversität von an Hitze angepassten Bakterien dieser Gattung vorkommen.

Persönliche Beteiligung: Ich isolierte die DNA der verschiedenen Anreicherungen, fertigte DGGEs zur Kontrolle des Reinheitsgrades an und führte die nachfolgenden Schritte für Sequenzanalysen durch. Des Weiteren klonierte ich die 16S rRNA Gene der Kultur Ga3a und ermittelte dessen vollständige Sequenz. Von *N. calida* bestimmte ich das pH-Optimum und analysierte die HPLC-Proben (siehe auch Zusatzmaterial zu Lebedeva et al., 2011 im Anhang).

4 Ergebnisse

4.1 Diversität von *Nitrospira*: Phylogenetische Zuordnung von NOB-Anreicherungen und neuen Reinkulturen

Die bisher zur Verfügung stehenden Daten von *Nitrospira*-ähnlichen Sequenzen stammten hauptsächlich aus Umweltproben und wurden durch kultivierungsunabhängige Methoden gefunden. Zu Beginn dieser Arbeit beschränkte sich die Anzahl der Reinkulturen der Gattung *Nitrospira* auf zwei: *N. marina* und *N. moscoviensis* (WATSON et al., 1986; EHRICH et al., 1995). Durch die Nutzung selektiver flüssiger Mineralmedien gelang es, weitere Bakterien der Gattung *Nitrospira* anzureichern und molekularbiologisch zu charakterisieren.

4.1.1 Screening von Anreicherungskulturen nach verschiedenen NOB

Für den Nachweis von *Nitrospira*-ähnlichen Bakterien in moderaten und extremen Lebensräumen wurden Anreicherungskulturen aus verschiedenen Habitaten mit spezifischen Primersets mittels PCR auf NOB der Gattungen *Nitrospira*, *Nitrobacter* und *Candidatus Nitrotoga* hin untersucht. Mit dieser Methode konnten Hinweise auf diejenigen Umweltfaktoren gefunden werden, die die Zusammensetzung der NOB in einem Habitat beeinflussen.

Bestehende Kulturen aus dem Biozentrum Klein Flottbek wurden im November 2006 überimpft und weiter angereichert. Ausnahmen von dieser Reihenfolge sind separat angegeben. In den Tabellen 6 bis 11 sind die Anreicherungen nach Umweltbedingungen der Habitate getrennt aufgelistet. Alle Kulturen wurden in Medium I für terrestrische bzw. Süßwasser-Habitate und Medium II für marine Standorte mit 0,3 mM Nitrit geführt. Verbrauchtes Nitrit wurde regelmäßig ersetzt. Ausnahmen hiervon sind ebenfalls dokumentiert. Die verschiedenen NOB wurden unter Verwendung der Primerpaare Nsp60-k-dgF/Nsp1158R bzw. Nsp60-k-dgF/Nsp662R, Ntoga122F/Ntoga1422R und Nb1000gF/DegR nachgewiesen. Zum Teil gelang es, die Sequenzen der PCR-Amplifikate zu erhalten.

Tabelle 6: Ergebnisse des gattungsspezifischen Screenings nach NOB in Anreicherungskulturen aus kalten Habitaten. Angegeben sind der jeweilige Anreicherungszeitraum sowie die Anzahl der Überimpfungen bis zur DNA-Isolierung und die Kultivierungstemperatur.

Kultur- Bezeichnung	Entnahmestelle der Probe	Anreicherung		<i>Nitrospira</i>	<i>Nitrotoga</i>	<i>Nitrobacter</i>
		Monate / Überimpfen	Temperatur [°C]			
MAK 106		30 / 0	17	nein	100 % <i>N. arctica</i>	nein
MAK 107	Mamontovy Klyk, Nordsibirien, „alter“	30 / 0	17	nein	nein	ja
MAK 109	Permafrost (20.000 – 40.000 Jahre)	30 / 0	10	nein	100 % <i>N. arctica</i>	nein
MAK 109	Polygon (2003)	30 / 0	17	ja	100 % <i>N. arctica</i>	nein
MAK 207.6		30 / 0	10	94 % <i>N. moscov.</i> ¹	100 % <i>N. arctica</i>	nein
3301 AT	Kliff der Insel Samoylov; „junger“	48 / 0	17	97 % <i>N. defluvii</i>	ja	nein
3304 AKT	Permafrost (2000 – 7000 Jahre), aktive	48 / 0	17	95 % <i>N. moscov.</i>	ja	nein
3305 AT	Layer (August 2004)	48 / 0	17	97 % <i>N. defluvii</i>	ja	nein
3309 AKT		48 / 0	17	97 % <i>N. defluvii</i>	nein	nein
LD 01 Wall		30 / 0	17	ja	nein	nein
LD 02 Wall		30 / 0	17	95 % <i>N. moscov.</i>	nein	nein
LD 03 Wall		30 / 0	17	95 % <i>N. moscov.</i>	nein	nein
LD 04 Hang	Insel Samoylov im Lena-Delta	30 / 0	17	ja	nein	nein
LD 05 Hang	Boden-Profil des Polygons P1 (2004)	30 / 0	17	ja	ja	nein
LD 06 Hang		30 / 0	17	95 % <i>N. moscov.</i>	ja	nein
LD 07 Zentrum		30 / 0	17	ja	ja	nein
LD 08 Zentrum		30 / 0	10	99 % <i>N. defluvii</i>	ja	ja
LD 09 Zentrum		30 / 0	17	ja	ja	nein
6678	Insel Samoylov im Lena-Delta	3 / 0	17	nein	100 % <i>N. arctica</i>	nein
6680	Boden-Profil (2001)	Erhalten ²	17	nein	100 % <i>N. arctica</i>	nein
S 11	Sedimente der Laptev-See (August 2003) beeinflusst	30 / 1	10 und 17	97 % <i>N. marina</i>	nein	nein
F 2, Q 2	vom Nordpolarmeer	30 / 2	28	99 % <i>N. marina</i>	nein	nein
Lena	Flusssedimente, Sibirien	30 / 1	17	ja	nein	ja

1) *Nitrospira moscoviensis*; 2) Kultur stand für physiologische Untersuchungen zur Verfügung

Bis auf die Anreicherungen 6678 und 6680, die speziell zur Anzucht von *Candidatus Nitrotoga* dienten, kamen in allen kalten Lebensräumen *Nitrospira*-ähnliche Bakterien der Cluster I und II und in den marinen Habitaten des Clusters IV vor. *Candidatus Nitrotoga* war ebenfalls in vielen Anreicherungen zu detektieren. Ausnahmen bildeten marine Lebensräume und die oberen Schichten von Polygonen. NOB der Gattung *Nitrobacter* konnten nur in den Anreicherungen MAK 107 und Lena nachgewiesen werden.

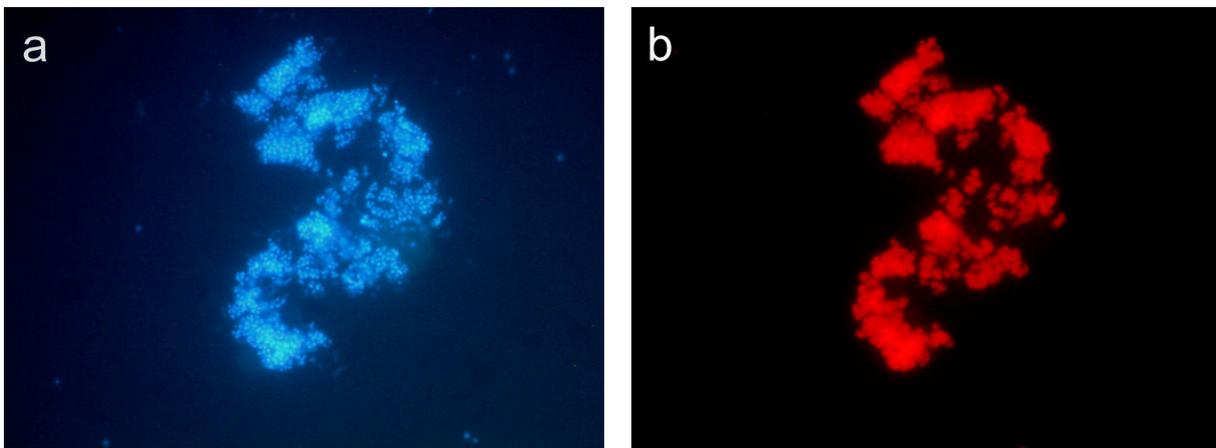
Tabelle 7: Ergebnisse des gattungsspezifischen Screenings nach NOB in Anreicherungskulturen aus moderat temperierten aquatischen Habitaten. Angegeben sind der jeweilige Anreicherungszeitraum sowie die Anzahl der Überimpfungen bis zur DNA-Isolierung und die Kultivierungstemperatur.

Kultur- Bezeichnung	Entnahmestelle der Probe	Anreicherung		<i>Nitrospira</i>	<i>Nitrotoga</i>	<i>Nitrobacter</i>
		Monate / Überimpfen	Temperatur [°C]			
Schwamm A	Schwammgewebe (Mesohyl), <i>Aplysina aerophoba</i> (April 2003)	Dez. 05 – Apr. 07 / 0	28	95 % <i>N. marina</i>	n. u. ¹	nein
Schwamm N		28 / 2	28	95 % <i>N. marina</i>	n. u.	n. u.
Schwamm Aa01		28 / 4	28	95 % <i>N. marina</i>	nein	nein
Poel 2b	Ostsee, Insel Poel, Sediment (Oktober 2005)	6 / 2	22	100 % <i>N. Stamm Ecom. 2.1</i>	nein	nein
Vilm	Ostsee, Insel Vilm, Ufersediment (April 2007)	45 / 1	22	99 % <i>N. marina</i>	nein	nein
AG 1	Meerwasseraquarium (Februar 2006)	Feb. 06 – Apr. 07 / 1	28	ja	nein	n. u.
AG 3		Feb. 06 – Apr. 07 / 1	28	ja	nein	n. u.
Aqua-Süß	Süßwasseraquarium, Tonzylinder aus Biofilter (Februar 2007)	Feb. 07 – Jun. 07 / 2	28	ja	nein	nein

1) n. u. = nicht untersucht

In allen untersuchten moderat temperierten aquatischen Lebensräumen kam *Nitrospira* vor. Nitrit-oxidierende Bakterien der Gattungen *Candidatus Nitrotoga* und *Nitrobacter* konnten dagegen nicht nachgewiesen werden. Am schwierigsten gestaltete sich die Anreicherung des Vertreters von *Nitrospira* aus dem Mesohyl des marinen Schwammes *Aplysina aerophoba* (OFF et al., 2010). Hier vergingen 10 Monate, bis zum ersten Mal 0,3 mM Nitrit verbraucht worden sind. Dennoch ist es im Weiteren gelungen, genügend Zellmaterial für phylogenetische und physiologische Experimente zu bekommen.

Die taxonomische Zuordnung der NOB aus einem Süßwasseraquarium (Aqua-Süß) wurde mittels Fluoreszenz markierten Oligonukleotid Sonden bestätigt: in der Anreicherung konnte die erfolgreiche Bindung der *Nitrospira*-spezifischen Sonde Nsp-662 nachgewiesen werden (Abbildungen 3a und b). In den Proben dominierten blumenkohlartige Mikrokolonien. Nur wenige einzelne Zellen waren zu beobachten.



Abbildungen 3a und b: Gattungsspezifische Färbung mit der Oligonukleotidsonde Nsp-662. Mikrokolonie von *Nitrospira*-ähnlichen Bakterien in der Anreicherungskultur aus einem Süßwasseraquarium. a: DAPI, b: Cy3 markierte Sonde.

Tabelle 8: Ergebnisse des gattungsspezifischen Screenings nach NOB in Anreicherungskulturen aus trockenen Habitaten. Angegeben sind der jeweilige Anreicherungszeitraum sowie die Anzahl der Überimpfungen bis zur DNA-Isolierung und die Kultivierungstemperatur.

Kultur- Bezeichnung	Entnahmestelle der Probe	Anreicherung		<i>Nitrospira</i>	<i>Nitrotoga</i>	<i>Nitrobacter</i>
		Monate / Überimpfen	Temperatur [°C]			
LUA 8 / c-3	Gesteinsproben, Prüfkörper	50 / 1	28	ja	nein	ja
LUA 16 / a-3		29 / 1	28	97 % <i>N. moscov.</i>	nein	nein
EL 9	Strontiumcarbonat haltiges Erz mit Barit von Erzhalde (Februar 2005)	Nov. 06 DNA isoliert	28	99 % <i>N. defluvii</i>	n. u.	n. u.
Namibia 74	Wüstenboden, ohne Biokruste	29 / 1	28	97 % <i>N. defluvii</i>	nein	nein
Namibia 80	Wüstenboden, nur Biokruste	29 / 1	28	95 % <i>N. defluvii</i>	nein	nein
Südafrika 83	Wüstenboden, mit Biokruste	50 / 1	28	97 % <i>N. moscov.</i>	nein	nein
Südafrika 85	Wüstenboden	50 / 1	28	ja	nein	nein

In den Anreicherungskulturen aus trockenen Habitaten konnte kein *Candidatus Nitrotoga* nachgewiesen werden. Dagegen kommen *Nitrospira*-ähnliche Bakterien der Cluster I und II in allen Proben vor. Nur in der Kultur Lua 8 konnte zusätzlich *Nitrobacter* detektiert werden.

Tabelle 9: Ergebnisse des gattungsspezifischen Screenings nach NOB in Anreicherungskulturen aus Biofiltern bzw. Belebtschlamm. Angegeben sind der jeweilige Anreicherungszeitraum sowie die Anzahl der Überimpfungen bis zur DNA-Isolierung und die Kultivierungstemperatur.

Kultur- Bezeichnung	Entnahmestelle der Probe	Anreicherung		<i>Nitrospira</i>	<i>Nitrotoga</i>	<i>Nitrobacter</i>
		Monate / Überimpfen	Temperatur [°C]			
Ns Shelly	Saurer Bioreaktor, pH 3,5 (Juni 2004)	9 / 0	28	98 % <i>N. defluvii</i>	nein	ja
Ns Shelly 6D von Festmedium in acides Medium		8 / 4	28	nein	nein	ja
Ns Shelly acides Medium		Jul. 08 – Sep. 10 / 1	28	nein	nein	ja
BS 10 alt ¹	Belebtschlamm, Hamburger Klärwerk, Dradenau (Januar und Mai 2006)	Jan. 06 – Jan. 07 / 4	10	ja	<i>N. sp.</i> Ham-1	nein
BS 10		Mai 06 – Jan. 07 / 2	10	<i>N. defluvii</i>	<i>N. sp.</i> Ham-1	nein
BS 17		Mai 06 – Jan. 07 / 2	17	<i>N. defluvii</i>	nein	<i>N. sp.</i> Drad-1
BS 28		Mai 06 – Jan. 07 / 2	28	<i>N. defluvii</i>	nein	<i>N. sp.</i> Drad-1
Aquakultur HW	Süßwasser- Aquakultur- Anlage, alter Biofilter (Oktober 2010)	direkt DNA isoliert	---	ja	~100 % <i>N. sp.</i> Ham-1	ja
Aquakultur HW		18 / 4	10 und 17	Cluster I	nein	99 % <i>N. hamburg.</i>
Aquakultur HW acides Medium		18 / 4	10 und 17	Cluster I	nein	n. u.

1) Anreicherung aus Belebtschlamm etwa ein Jahr alt

Bis auf die Anreicherung mit einer Kultivierungstemperatur von 10 °C aus Belebtschlamm der biologischen Reinigung des Hamburger Klärwerks Dradenau konnte aus diesem Habitat in jeder Kultur *Nitrobacter* nachgewiesen werden (*N. sp.* Drad-1; Accession-Nr. FJ263062). NOB der Gattung *Nitrospira* kamen in jedem biologischen Reinigungssystem vor. Allerdings war es nicht möglich, *Nitrospira* in den Anreicherungen Ns Shelly aus dem sehr sauren Bioreaktor bei Verwendung von acidem Medium anzureichern. Dabei war es unabhängig davon, ob die Anreicherung im Anschluss an ein Picken von Kolonien (auf mineralischem Festmedium mit Nitrit) geschah oder direkt aus der Originalprobe in acides Medium überimpft wurde. Bakterien der Gattung *Candidatus Nitrotoga* waren nur in Anreicherungen bei einer Kultivierungstemperatur von 10 °C aus Belebtschlamm (*N. sp.* Ham-1; FJ263061) und in Direktproben der Süßwasser-Aquakultur HW aus dem alten Biofilter detektierbar.

Tabelle 10: Ergebnisse des gattungsspezifischen Screenings nach NOB in Anreicherungskulturen aus geothermalen Quellen. Angegeben sind der jeweilige Anreicherungszeitraum sowie die Anzahl der Überimpfungen bis zur DNA-Isolierung und die Kultivierungstemperatur.

Kultur- Bezeichnung	Entnahmestelle der Probe	Anreicherung		<i>Nitrospira</i>	<i>Nitrotoga</i>	<i>Nitrobacter</i>
		Monate / Überimpfen	Temperatur [°C]			
Ga 3a		34 / 0	42	96 % <i>N. calida</i>	n. u.	n. u.
Ga 3b	Geothermale Quelle des Garga-Flusses am Baikalsee (2001)	34 / 0	42	ja	n. u.	n. u.
Ga 4a		34 / 0	42	ja	n. u.	n. u.
Ga II		34 / 0	46	99 % <i>N. calida</i>	n. u.	n. u.
Beryl Spring	Heiße Quelle Yellowstone Nationalpark (2001)	36 / 1	55	ja	n. u.	n. u.
Yellowstone	Heiße Quelle Yellowstone Nationalpark (2001)	36 / 1	42	97 % <i>N. moscov.</i>	n. u.	n. u.

Bakterien der Gattung *Nitrospira* sind in allen untersuchten geothermalen Quellen vorhanden. Auf den Nachweis von NOB der Gattung *Candidatus Nitrotoga* wurde verzichtet, da nach den vorherigen Ergebnissen ein Vorkommen dieser Gattung bei erhöhter Temperatur äußerst unwahrscheinlich ist. *Nitrobacter* war in den Kulturen aus der Quelle des Garga-Flusses nicht nachzuweisen (LEBEDEVA et al., 2005).

Tabelle 11: Ergebnisse des gattungsspezifischen Screenings nach NOB in Anreicherungskulturen aus der Movile-Höhle. Angegeben sind der jeweilige Anreicherungszeitraum sowie die Anzahl der Überimpfungen bis zur DNA-Isolierung und die Kultivierungstemperatur.

Kultur- Bezeichnung	Entnahmestelle der Probe	Anreicherung		<i>Nitrospira</i>	<i>Nitrotoga</i>	<i>Nitrobacter</i>
		Monate / Überimpfen	Temperatur [°C]			
Mov 3		Jun. 03 – Jan. 06	22	99 % <i>N. defluvii</i>	n. u.	n. u.
Mov 6	Luftraum der Movile-Höhle in Rumänien (2002)	29 / 1	22	98 % <i>N. moscov.</i>	nein	n. u.
Mov 6 Flasche		17 / 0	22	98 % <i>N. moscov.</i>	n. u.	n. u.
Mov II 9		29 / 1	22	99 % <i>N. defluvii</i>	nein	nein
Mov II 9 Flasche	II. Luftglocke der Movile-Höhle in Rumänien (2002)	20 / 0	22	99 % <i>N. defluvii</i>	n. u.	n. u.
Mov II 10		29 / 1	22	99 % <i>N. defluvii</i>	nein	n. u.
Mov II 10 Flasche		20 / 0	22	99 % <i>N. defluvii</i>	n. u.	n. u.

Vertreter der Gattung *Nitrospira* sind in dem alten Höhlensystem, welches tausende von Jahren von der Umwelt abgeschnittenen war, weit verbreitet, Andere Nitrit-oxidierende Bakterien der Gattungen *Candidatus Nitrotoga* und *Nitrobacter* waren in den Anreicherungen aus der zweiten Luftglocke mit dem verminderten Sauerstoffgehalt von ca. 10 % (SARBU et al., 1996) nicht nachweisbar.

4.1.2 DGGE-Technik

Für die Untersuchung der Diversität wurde neben dem Screening mittels PCR die DGGE-Technik (Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese) eingesetzt. Mit diesem DNA-Fingerprinting-Verfahren konnten *Nitrospira*-ähnliche Bakterien aus verschiedenen Habitaten differenziert werden.

Für eine Übersicht der Bakteriengemeinschaft in einer Anreicherungskultur wurde ein Eubakterien Primerset (Eub341F+GC/Eub907R) gewählt, um partielle 16S rDNA Amplifikate zu erhalten. Diese konnten dann mittels DGGE nach ihrem sequenzspezifischen Schmelzverhalten aufgetrennt werden. Die Laufweite der Banden im Gel wurde mit Referenzen Nitrit-oxidierender Bakterien verglichen. Dabei ergaben sich zum Teil Hinweise auf das Vorhandensein unterschiedlicher NOB in einer Kultur (zum Beispiel in einer bei 10 °C kultivierten Anreicherung von Belebtschlamm, BS 10, Abbildung 4). Eine Zuordnung der Banden allein über ihre Laufweite ist bei *Nitrospira*-ähnlichen Bakterien schwierig, da die Gattung durch ihre große Heterogenität einen weiten Bereich im DGGE-Profil einnimmt. Deshalb wurden ausgesuchte Banden reamplifiziert und sequenziert.

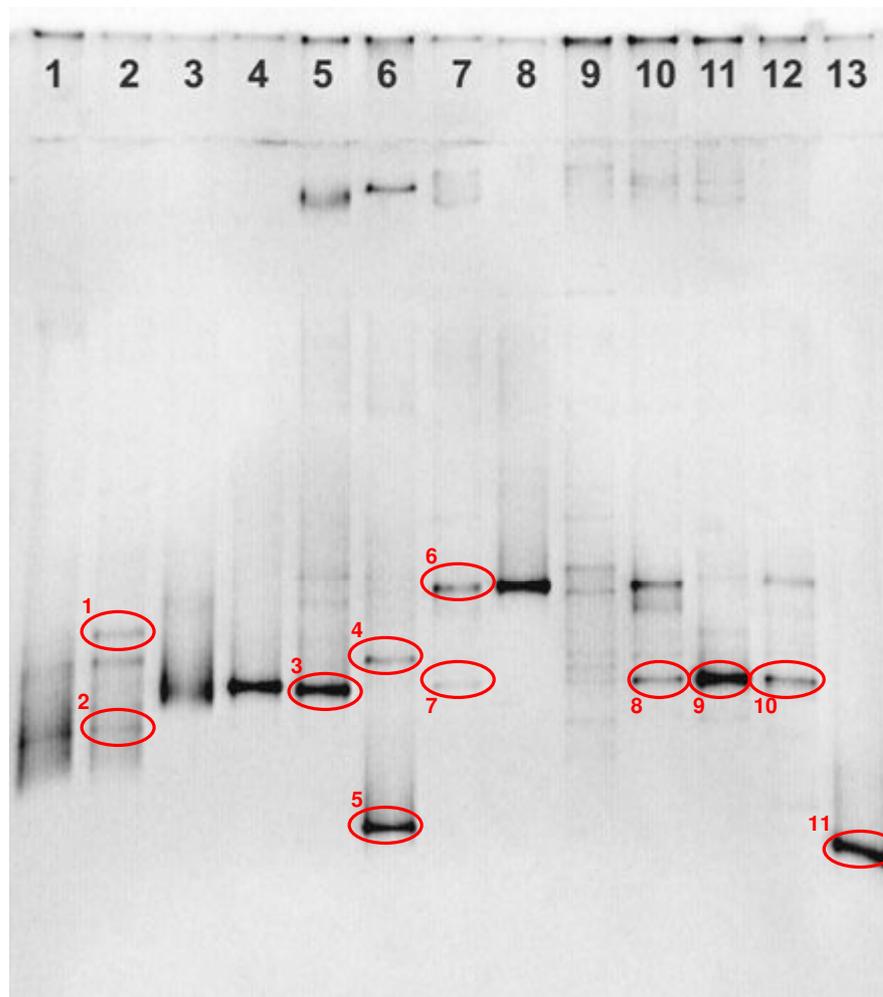


Abbildung 4. DGGE-Profil von Nitrit-oxidierenden Anreicherungskulturen aus unterschiedlichen Habitaten. Die Teilamplifikation des 16S rRNA Gens wurde mit dem Eubakterien Primerset Eub341F+GC/Eub907R durchgeführt. Spur 1: Schwamm N; Spur 2: Schwamm ex; Spur 3: *Nitrospira marina*; Spur 4: *N. moscoviensis*; Spur 5: Ns Shelly; Spur 6: EL 9; Spur 7: BS 10 alt (etwa 1 Jahr alte Belebtschlamm-Anreicherung bei 10 °C); Spur 8: *Nitrobacter hamburgensis*; Spur 9: Belebtschlamm-Naturprobe; Spur 10: BS 10 (ca. 4 Monate alte Belebtschlamm-Anreicherung bei 10 °C); Spur 11: BS 17 (4 Monate alt); Spur 12: BS 28 (4 Monate alt); Spur 13: Ns 10. Die rot markierten Banden wurden erfolgreich extrahiert, reamplifiziert und sequenziert.

In Abbildung 4 ist ein Beispiel für ein DGGE-Screening von Anreicherungskulturen nach NOB und deren Begleitorganismen aufgezeigt, bei dem ein Denaturierungsgradient von 40 % bis 70 % verwendet wurde. Durch den Einsatz von Reinkulturen als Referenzen und Anreicherungen aus dem Belebtschlamm des Hamburger Klärwerks Dradenau konnte gezeigt werden, wie die Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft durch unterschiedliche Inkubationstemperaturen variiert (Spur 9 - 12). Während in der Naturprobe in Spur 9 über acht unterschiedliche Banden zu erkennen sind, reduziert sich deren Anzahl im Lauf der selektiven Kultivierung. In Spur 7 sind nur noch zwei Banden zu sehen. Im Vergleich der Intensitäten lässt sich eindeutig feststellen, dass die Bande auf Höhe der Laufweite von *Candidatus Nitrotoga* sp. in der Anreicherung bei 10 °C am stärksten ist, die Bande auf Höhe von *Nitrospira defluvii* dagegen bei 17 °C. Die *Nitrospira*-ähnlichen Bakterien der Anreicherung BS 10 alt konnten nicht eindeutig identifiziert werden, da sich mindestens zwei 16S Gensequenzen überlagerten. Die Kulturen wurden von Meral Kaya (Diplomandin der Universität Hamburg) im Mai und November 2006 aus frischen Proben von Belebtschlamm angeimpft.

In der Anreicherungskultur aus dem Mesohyl eines Mittelmeerschwammes wurde neben der Bande des *Nitrospira*-ähnlichen Bakteriums auch ein Begleitorganismus identifiziert. Dieser hat eine große Ähnlichkeit zu dem Meersalzbakterium *Labrenzia marina* und einem Umweltklon aus einem marinen Schwamm der Gattung *Haliclona* (Tabelle 12). Der Vergleich der Bandenintensitäten innerhalb der Anreicherung Ns Shelly (Spur 5) aus einem sauren Bioreaktor deutet auf ein dominierendes Vorkommen von Bakterien der Gattung *Nitrospira* hin. Die Anreicherung EL9 von einer Erzhalde für Strontiumcarbonat stammend enthält neben dem *Nitrospira*-ähnlichen Organismus auch ein Actinobakterium, welches eine Bande im DGGE auf Höhe der Anreicherung Ns 10 bildet. Bei der Anreicherung Ns 10 konnte es sich bereits aufgrund fehlender Banden von Begleitorganismen um eine Reinkultur handeln. Dieses musste noch in weiteren Untersuchungen bestätigt werden (siehe auch LEBEDEVA et al., 2011). Auffällig ist die sehr ähnliche Laufweite von Bakterien der Gattung *Nitrospira* aus Cluster I und II, während sich die Bande von Ns 10 weit darunter befindet. Die Bande der Kultur *Nitrobacter hamburgensis* (Spur 8) liegt dagegen oberhalb der Laufweite von *Nitrospira* (Cluster I und II) und somit auf gleicher Höhe wie Bakterien der Gattung *Candidatus Nitrotoga*. Im oberen Bereich des DGGE-Geles sind in Spur 5 und 6 Banden erkennbar. Diese wurden nicht weiter untersucht, da frühere Ergebnisse von Alawi zeigten, dass zumeist heterotrophe Bakterien bei Verwendung des eubakteriellen Primersets und des Denaturierungsgradienten (40 % - 70 %) in dieser Laufhöhe Banden bilden (ALAWI, 2007).

Tabelle 12: Taxonomische Zuordnung von 16S rRNA Gensequenzen aus DGGE-Gelen von Anreicherungskulturen aus verschiedenen Habitaten (Eubakterien-Primereset, Eub341F+GC/Eub907R). Untergruppen (Cluster) von *Nitrospira*-ähnlichen Bakterien sind in römischen Ziffern angegeben.

DNA-Bande	Kultur	Höchste Übereinstimmung bei Sequenzvergleichen	Sequenz-ähnlichkeit
1	Schwamm Aa01	Meersalatbakterium (<i>Labrenzia marina</i>), FN811315 Schwamm Bakterium, EU346531	99 % 99 %
2	Schwamm Aa01	<i>N. marina</i> (IV)	95 %
3	Ns Shelly	<i>N. defluvii</i> (I)	97 %
4	EL 9	<i>N. defluvii</i> (I)	99 %
5	EL 9	Actinobakterium (<i>Rhodococcus ruber</i>), JN613330	99 %
6	BS 10 alt ¹	<i>Candidatus Nitrotoga</i> sp. (FJ263061)	99 %
7	BS 10 alt ¹	<i>Nitrospira</i>	---
8	BS 10 ²	<i>N. defluvii</i> (I)	100 %
9	BS 17 ²	<i>N. defluvii</i> (I)	100 %
10	BS 28 ²	<i>N. defluvii</i> (I)	100 %
11	Ns 10	<i>N. calida</i> (VI)	100 %

1) Anreicherung aus Belebtschlamm etwa ein Jahr alt; 2) Anreicherung aus Belebtschlamm ca. 4 Monate alt

Mit einer zusätzlichen DGGE konnten die Anreicherungen aus dem Belebtschlamm näher untersucht werden. Dazu wurde wiederum ein Eubakterien-Primereset (Eub341F+GC/Eub907R) verwendet. Als Referenzen dienten eine Anreicherung von *N. defluvii* (Inkubationstemperatur: 28 °C), *Nitrobacter hamburgensis* (28 °C) sowie eine Anreicherung von *Candidatus Nitrotoga arctica* (10 °C). Das DGGE-Profil ist in ALAWI et al. (2009) veröffentlicht (Zusatzmaterial: Abbildung S2; siehe Anhang). Es zeigte sich, dass die Temperatur einen erheblichen Einfluss auf die Konkurrenz der Nitrit-oxidierenden Bakterien hat. Während NOB der Gattung *Nitrospira* in allen drei untersuchten Inkubationstemperaturen vertreten waren, fand bei 17 °C ein Wechsel zwischen zwei weiteren Gattungen statt. Bei Temperaturen von 10 °C und 17 °C konnte *Candidatus Nitrotoga* angereichert werden, während *Nitrobacter* nur bei 17 °C und 28 °C wuchs.

Eine weitere DGGE unter Verwendung des oben genannten Eubakterien-Primersets klärte die starke Veränderung in der Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft der Anreicherungen Ns Shelly aus einem sauren Bioreaktor (Abbildung 5). Die ursprüngliche Probe wurde in einem mineralischen Medium bei neutralem pH-Wert kultiviert. Eine parallel geführte Kultur wurde auf Festmedium wachsen gelassen, die entstandenen Kolonien gepickt und in Reagenzgläsern mit „neutralem“ Medium angezogen. Angewachsene Kulturen wurden in Kolben mit acidem Medium (pH-Wert ca. 5,5) überführt. Nach dreimaligem Überimpfen in frisches acidem Medium wurde die DNA isoliert (Ns Shelly 6D). Diese wurde zusammen mit der DNA aus der ursprünglich „neutral“ geführten Anreicherung im DGGE eingesetzt.

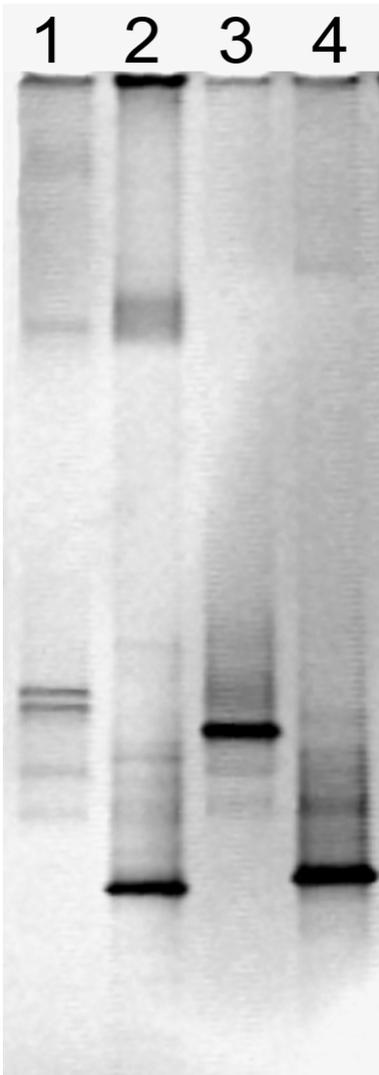


Abbildung 5. DGGE-Profil von Nitrit-oxidierenden Anreicherungskulturen aus einem sauren Bioreaktor mit verschiedener Anzucht und Referenzen. Die Teilamplifikation des 16S rRNA Gens wurde mit dem Eubakterien-Primerset Eub341F+GC/Eub907R durchgeführt. Spur 1: Ns Shelly 6D (Festmedium und acidem Medium); Spur 2: Ns Shelly (neutrales Medium); Spur 3: *Nitrobacter hamburgensis*; Spur 4: *Nitrospira moscoviensis*.

Für das DGGE wurden die beiden Anreicherungen Ns Shelly 6D (acides Medium, Spur 1) und Ns Shelly (neutrales Medium, Spur 2) eingesetzt. Als Referenzen dienten *Nitrobacter hamburgensis* (Spur 3) und *Nitrospira moscoviensis* (Spur 4). Sowohl die Banden in Spur 1 und 3 als auch die in Spur 2 und 4 liegen in etwa auf einer Höhe. Es ist daher anzunehmen, dass es sich bei der Anreicherung Ns Shelly 6D eher um Nitritoxidanten der Gattung *Nitrobacter* als um *Nitrospira* handelt. Diese Vermutung wurde durch gattungsspezifische PCRs bestätigt. Ausschlaggebend für die Verdrängung war wahrscheinlich die Kultivierung im aciden Medium. Zur Bestätigung wurde mit der Originalprobe acides Medium angeimpft und über zwei Jahre lang inkubiert. Nach diesem Zeitraum konnten ausschließlich NOB der Gattung *Nitrobacter* nachgewiesen werden. Inwiefern die Anzucht auf Festmedium diesen Effekt verstärkt hat, konnte nicht eindeutig geklärt werden.

Zusätzlich zu den DGGE unter Verwendung eubakterieller Primerpaare sollte durch den Einsatz von *Nitrospira*-spezifischen Primersets überprüft werden, ob es sich bei den zuvor im PCR-Screening detektierten *Nitrospira*-ähnlichen Sequenzen um ein oder mehrere Vertreter dieser NOB pro Kultur handelt. Für das DGGE mit dieser Fragestellung wurde das semispezifische Primerpaar Eub341F+GC/Nsp1158R verwendet. Es konnten die Anreicherungen Poel 2b aus der Ostsee, Südafrika 83 und LD 01 bis LD 09 von den Bodenprofilen eines Polygons anhand des DGGE untersucht werden (Abbildung 6). Dabei wurde ein Denaturierungsgradient von 40 % bis 70 % eingesetzt.

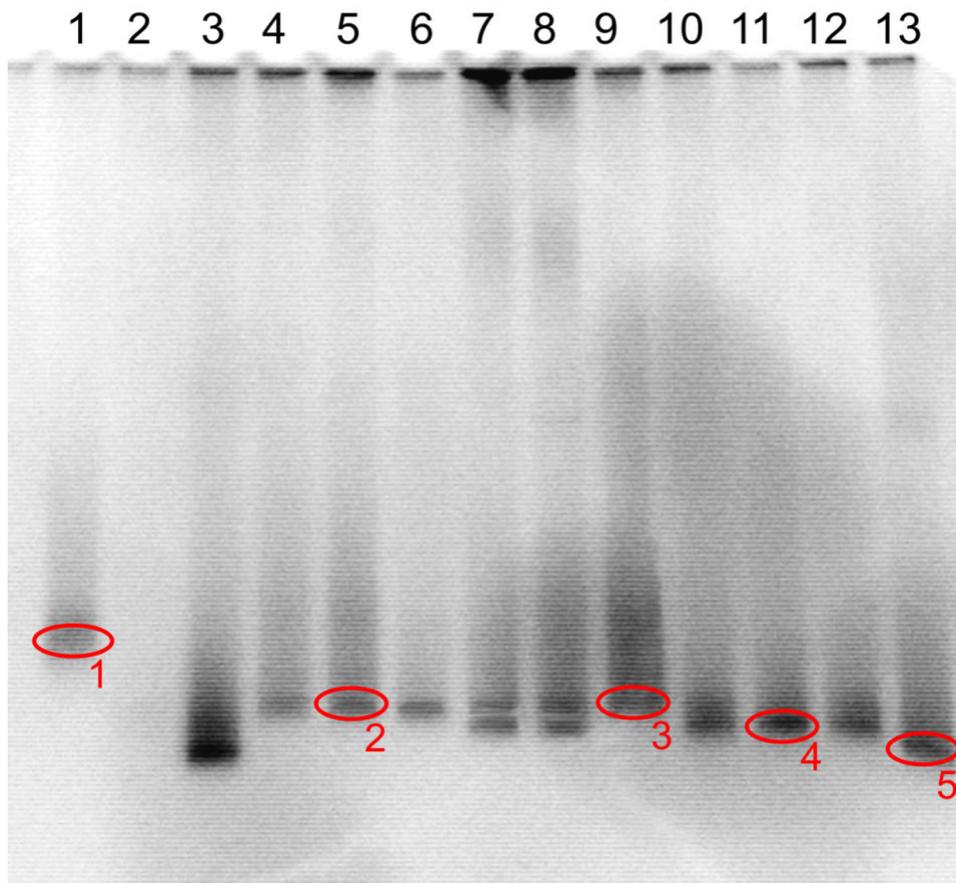


Abbildung 6. DGGE-Profil von Nitrit-oxidierenden Anreicherungskulturen aus unterschiedlichen Habitaten. Die Teilamplifikation des 16S rRNA Gens wurde mit dem semispezifischen Primerset Eub341F+GC/Nsp1158R durchgeführt. Spur 1: Poel 2b; Spur 2: frei; Spur 3: *Nitrospira moscoviensis*; Spur 4: LD01; Spur 5: LD 02; Spur 6: LD 03; Spur 7: LD 04; Spur 8: LD 05; Spur 9: LD 06; Spur 10: LD 07; Spur 11: LD 08; Spur 12: LD 09; Spur 13: Südafrika 83. Die rot markierten Banden wurden extrahiert, reamplifiziert und sequenziert.

Die Bande der marinen Anreicherungskultur Poel 2b liegt deutlich oberhalb der anderen Banden mit etwa gleicher Laufweite, die aus nicht marinen Habitaten stammen. Spur 3 mit der Reinkultur *N. moscoviensis* ist überladen. In den Spuren 7 und 8 sind zwei Banden zu erkennen, was auf die Koexistenz von mehreren *Nitrospira*-ähnlichen Bakterien hindeutet. Vergleicht man die Laufweite von der Reinkultur *N. moscoviensis* mit der Lage der Banden der Anreicherungen, so wird deutlich, dass es bei der gewählten Primerkombination keine Übereinstimmung von Sequenzähnlichkeit und Laufweite im DGGE-Gel gibt. Daher sollte das semispezifische Primerpaar nicht zur Übersicht von Verwandtschaftsverhältnissen innerhalb der Gattung *Nitrospira* verwendet werden. In Tabelle 13 ist die taxonomische Zuordnung der 16S rRNA Gensequenzen der Banden aufgelistet.

Tabelle 13: Taxonomische Zuordnung von 16S rRNA Gensequenzen. Anreicherungskulturen aus verschiedenen Habitaten (semispezifisches Primerset, Eub341F+GC/Nsp1158R). Cluster von *Nitrospira*-ähnlichen Bakterien sind in römischen Ziffern angegeben.

DNA-Bande	Kultur	Höchste Übereinstimmung bei Sequenzvergleichen	Sequenz-ähnlichkeit
1	Poel 2b	<i>N. marina</i> (IV)	99 %
2	LD 02	<i>N. moscoviensis</i> (II)	95 %
3	LD 06	<i>N. moscoviensis</i> (II)	95 %
4	LD 08	<i>N. defluvii</i> (I)	99 %
5	Südafrika 83	<i>N. moscoviensis</i> (II)	97 %

In den Anreicherungskulturen LD 01 bis LD 06, die aus dem Wall und dem Hang eines Polygons stammen, waren *Nitrospira*-ähnliche Bakterien aus dem Cluster II vertreten. Sie weisen eine Sequenzähnlichkeit von 95 % zu *N. moscoviensis* auf. Die Kulturen LD 04, 05, 07, 08 und 09 wurden mit Proben aus dem Hang sowie dem Polygonzentrum angeimpft. In den resultierenden Anreicherungen kamen NOB der Gattung *Nitrospira* aus Cluster I mit einer Sequenzähnlichkeit von 99 % zu *N. defluvii* vor. In der Anreicherung Südafrika 83 konnte ein *Nitrospira* mit einer Sequenzähnlichkeit von 97 % zu *N. moscoviensis* detektiert werden.

Es hat sich gezeigt, dass die *Nitrospira*-spezifische Primerkombination von Nsp60-k-dgF+GC und Nsp662R im DGGE für eine Überprüfung der Vielfältigkeit an *Nitrospira*-ähnlichen Bakterien in einer Probe nicht eingesetzt werden kann. Bei der Amplifikation der DNA-Fragmente kommt es wahrscheinlich zur Bildung von Sekundärstrukturen, die ein unterschiedliches Denaturierungsmuster zeigen. Nach der Auftrennung im DGGE traten pro *Nitrospira*-ähnlichen Organismus bis zu drei Banden auf, deren Sequenzen identisch waren (nicht dargestellt). Mit dem Einsatz des semispezifischen Primersets Eub341F+GC/Nsp662R hingegen erzielte Alawi eine gute Auftrennung von Vertretern der Gattung *Nitrospira* (ALAWI, 2007).

4.1.3 Phylogenetische Untersuchungen auf Grundlage von 16S rRNA Gensequenzen

Aus den meisten der bereits genannten Anreicherungskulturen von *Nitrospira* konnten im Anschluss an die Untersuchungen mittels PCR und DGGE neue bzw. längere 16S rRNA basierte Sequenzen gewonnen und phylogenetisch eingeordnet werden. Es handelte sich um Kulturen aus Permafrostgebieten in Nordost-Sibirien sowie moderat thermophile Stämme aus heißen Quellen am Baikalsee und im Yellowstone Nationalpark. Weitere Anreicherungen stammen aus der Movile-Höhle in Rumänien, aus der Wüste Namibias und Südafrikas, aus Gesteinsproben des Landesuntersuchungsamtes Nordrheinwestfalen (Lua), einem Süßwasseraquarium, einer Norddeutschen Süßwasser-Aquakultur, aus Ostseesedimenten, aus einem sauren Bioreaktor in Israel (Shelly) und aus dem Mesohyl des marinen Schwammes *Aplysina aerophoba* (siehe auch 4.1.1).

Für die Analyse wurde ein semispezifisches Oligonukleotidpaar gewählt, das ein DNA-Fragment von 1131 bp lieferte (Eub27F/Nsp1158R, MAIXNER, 2009). Allerdings konnte festgestellt werden, dass diese Primerkombination sowie das eigentlich spezifische Primerset Nsp60-k-dgF/Nsp1158R, auch 16S rRNA Fragmente der Gattungen *Acidobacterium* und *Polaromonas* durch 2 bzw. 4 Fehlpaarungen mit dem Nsp1158R-Primer bei 56 °C Annealingtemperatur erkennt. Daher wurden zusätzlich die 16S rRNA Gene ausgewählter Kulturen in *E. coli* kloniert und sequenziert. Einige der moderat thermophilen *Nitrospira*-Kulturen wurden an der Universität Wien sequenziert (LEBEDEVA et al., 2011). Zusätzlich wurden die Sequenzen der beschriebenen Anreicherungen S11 und F2 aus Sedimenten der Laptev-See von Mashal Alawi zur Verfügung gestellt (OFF et al., 2010). Der so entstandene umfangreiche Stammbaum aller in dieser Arbeit kultivierten *Nitrospira*-ähnlichen Organismen ist in Abbildung 7 dargestellt.

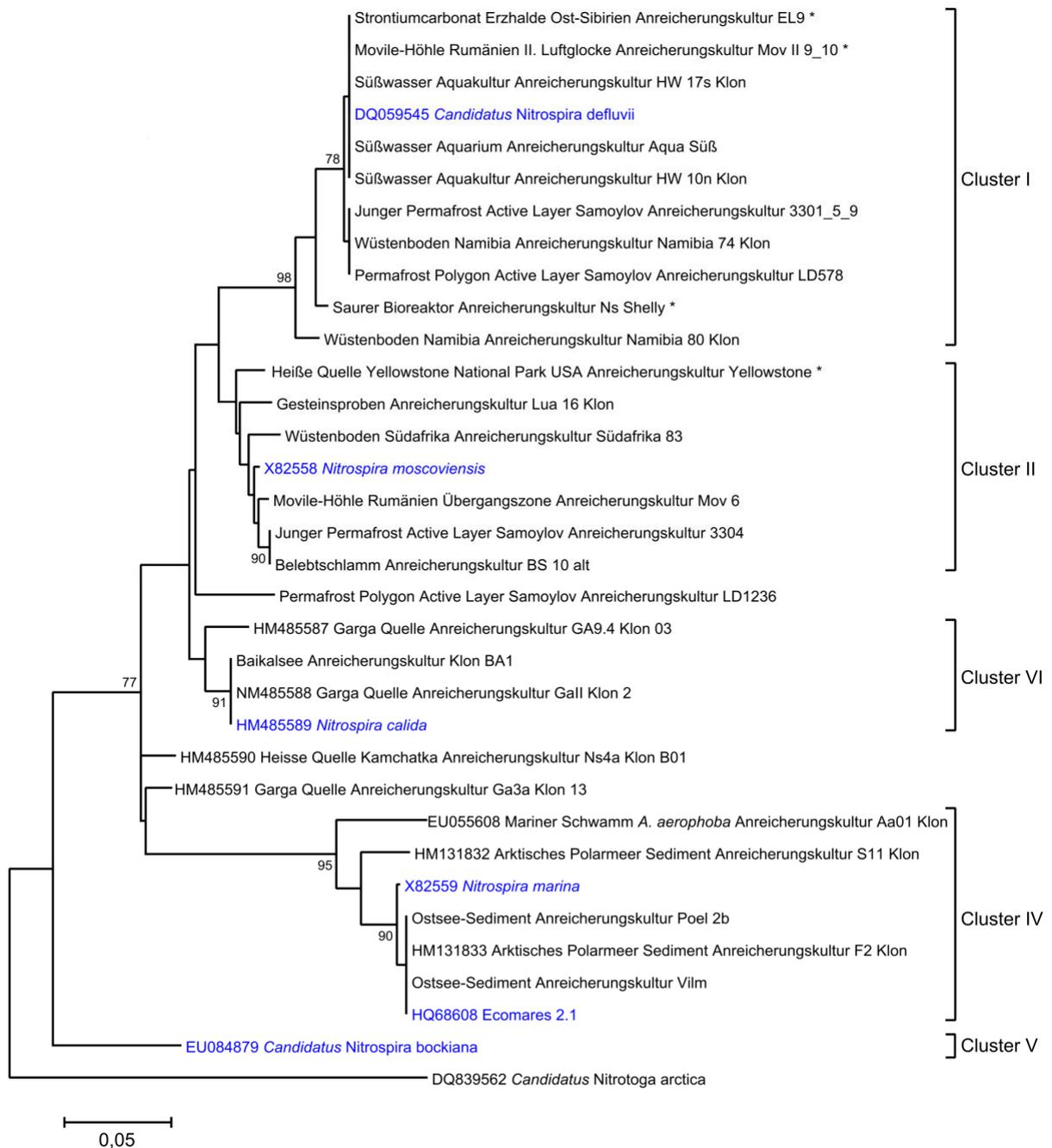


Abbildung 7. Phylogenetischer Stammbaum basierend auf *Maximum Likelihood*-Analysen der 16S rRNA Gensequenzen der Gattung *Nitrospira*. Sequenzen ≤ 800 bp sind mit * gekennzeichnet. Die Reinkulturen sind in blau markiert. Als Wurzel wurde ein Vertreter der Gattung *Candidatus Nitrotoga* gewählt, der zu den Betaproteobacterien gehört. Die Einteilung der Cluster (Untergruppen) wurde nach Lebedeva et al. (2011) vorgenommen. Bootstrap-Werte sind ab 75 % angegeben. Der Skalierungsbalken entspricht einem Sequenzunterschied von 5 %.

Anhand des oben gezeigten Stammbaumes der Anreicherungskulturen der Gattung *Nitrospira* konnte die Frage, ob es eine Übereinstimmung hinsichtlich der Habitate innerhalb eines Clusters gibt, für die Untergruppen I und II eindeutig verneint werden. In diesen kommen Bakterien sowohl aus moderaten als auch kalten Standorten vor. So sind neben *Nitrospira defluvii* in Cluster I Anreicherungskulturen folgender Lebensräume eingegliedert: kalte (LD578 und 3301_5_9 aus Permafrostböden), trockene (EL9 von einer Strontiumcarbonat Erzhalde, Namibia 74 und 80 aus Wüstenboden), sauerstoffarme (Mov_II_9_10 aus der zweiten Luftglocke der Movable-Höhle) und Abwasserreinigung (HW_10n und HW-17s aus der Süßwasser-Aquakultur HW, Aqua-Süß aus einem Süßwasseraquarium und Ns Shelly aus einem sauren Bioreaktor).

In Cluster II, in dem noch vielseitigere Habitate vertreten sind, unterscheiden sich die Kulturen physiologisch hinsichtlich ihres Temperaturspektrums erheblich. Die Anreicherung 3304 aus dem Permafrost eines Kliffs wächst bei 4 °C, während die beschriebene Art *Nitrospira moscoviensis* mit einem Temperaturoptimum von 39 °C bei so niedriger Temperatur kein messbares Wachstum zeigt (EHRICH et al., 1995). Weitere Anreicherungen aus folgenden Habitaten sind dem Cluster II zugeordnet worden: trocken (Lua 16 aus Gesteinsproben und Südafrika 83 aus Wüstenboden), heiß (Yellowstone aus einer heißen Quelle) und Abwasserreinigung (BS 10, eine bei 10 °C kultivierte Anreicherung aus Belebtschlamm). Demnach ist auch die Substratmenge kein Kriterium für die Zugehörigkeit zu einem Cluster, da Lua 16 und BS 10 beide dem Cluster II angehören.

Für die Cluster IV und VI kann die Vermutung nach einem einheitlichen Habitat bestätigt werden. Bis auf wenige Ausnahmen (zum Beispiel KIM und CROWLEY, 2007) sind bis jetzt alle in Cluster IV vorkommenden Bakterien der Gattung *Nitrospira* marinen Ursprungs. Die Anreicherungskulturen Aa01 aus dem Mesohyl eines Mittelmeerschwammes, S11 und F2 aus den Sedimenten arktischen Polarmeers sowie Poel 2b und Vilm aus Ostseesedimenten wurden in Cluster IV gruppiert. Cluster VI kann ebenfalls als habitatspezifisch angesehen werden. Hier sind neben *Nitrospira calida* und der identischen Anreicherung aus dem Baikalsee die Anreicherungen Ga9.4 und GaII aus moderat thermophilen Lebensräumen vertreten. Diese *Nitrospira*-ähnlichen Bakterien aus den warmen Lebensräumen bis 55 °C wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Lebedeva von der Universität Moskau beschrieben (LEBEDEVA et al., 2011).

Candidatus Nitrospira bockiana bildet die separate Entwicklungslinie Cluster V. Damit konnte bestätigt werden, dass verschiedene Arten im selben Lebensraum koexistieren (MAIXNER et al., 2006), denn *Cand. N. bockiana* (LEBEDEVA et al., 2008) stammt wie *N. moscoviensis* aus dem Moskauer Heizungssystem, wo er in korrodierten Ablagerungen vorkommt. Des Weiteren gehören drei Anreicherungen aus einem Habitat (Garga Quelle) ebenfalls zu zwei unterschiedlichen 16S rRNA Clustern (LEBEDEVA et al., 2005). Die Kultur Ga3a konnte bisher keinem der sechs Cluster eindeutig zugeordnet werden. Die zwei anderen Kulturen GaII und Ga9.4 scheinen nach dem in Abbildung 8 verwendeten Rechenverfahren in Cluster VI zu fallen, doch ist die Zuordnung der Kultur Ga9.4 nicht stabil (LEBEDEVA et al., 2011). Im Gegensatz zu koexistierenden Vertretern der Gattung *Nitrospira* in einem Habitat steht das Vorkommen von drei Stämmen der neuen Art *Nitrospira calida*. Diese stammen aus geographisch weit voneinander getrennten heißen Quellen : Gorjachinsk und Garga (beide am Baikalsee in Russland) und eine im Yellowstone Park in den USA (LEBEDEVA et al., 2011).

4.1.4 Gen der Beta-Untereinheit der Nxr (NxrB) als phylogenetischer Marker

Zur phylogenetischen Verwandtschaftsanalyse von *Nitrospira*-ähnlichen Bakterien wurden neben den DNA-Fragmenten der 16S rRNA auch Amplifikate des *NxrB*-Gens herangezogen. Die NxrB ist die Beta-Untereinheit des Nitrit-oxidierenden Systems (Nxr) und liegt in einigen NOB in mehreren Kopien vor (z.B. in *N. defluvii* zweimal, MAIXNER, 2009). Diese Kopien unterscheiden sich jedoch nicht signifikant voneinander. In *N. defluvii* ist lediglich eine Base ohne Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz ausgetauscht. Zusätzlich besitzt die NxrB innerhalb der Gattung *Nitrospira* mit 46 kDa ein einheitliches Molgewicht. Dadurch war es möglich ein Primerset zu entwickeln, das die *NxrB* Gene aller *Nitrospira*-ähnlichen Bakterien erkennt (MAIXNER, 2009). Amplifikate dieses Primersets (NxrB169F/NxrB638R) besitzen eine Fragmentlänge von ca. 460 bp. Anhand von phylogenetischen Untersuchungen auf Basis der Aminosäuresequenz konnte festgestellt werden, dass der Enzymkomplex zur Energiegewinnung der Gattung *Nitrospira* sich schneller verändert als die hoch konservierte 16S rRNA. Die Clustereinteilung des resultierenden Baumes entspricht nicht vollständig der Topologie einer mit 16S rRNA Gensequenzen errechneten (Abbildung 7).

NOB der Gattung *Nitrospira* aus Cluster I und II, in denen diverse Habitats vertreten sind, sind im 16S rRNA-Baum und im NxrB-Baum abweichend angeordnet. Betrachtet man jedoch die habitatspezifischen Cluster IV (marin) und VI (thermophil), so entsprechen sich die Verwandtschaftsverhältnisse auf Grundlage der 16S rRNA und der NxrB. Auf Basis der NxrB Aminosäuresequenz wurden dem Cluster IV die marinen Anreicherungskulturen Schwamm Aa01, F2 und Poel 2b zugeordnet. Im Cluster VI wurden die Kulturen Beryl Spring, GaII und *N. calida* eingruppiert. Allerdings deuten die niedrigen Bootstrap-Werte an den Ästen auf eine nicht stark gefestigte Gliederung des Baumes hin. Künftig sollten daher längere DNA-Fragmente der NxrB zur Verwandtschaftsanalyse herangezogen werden.

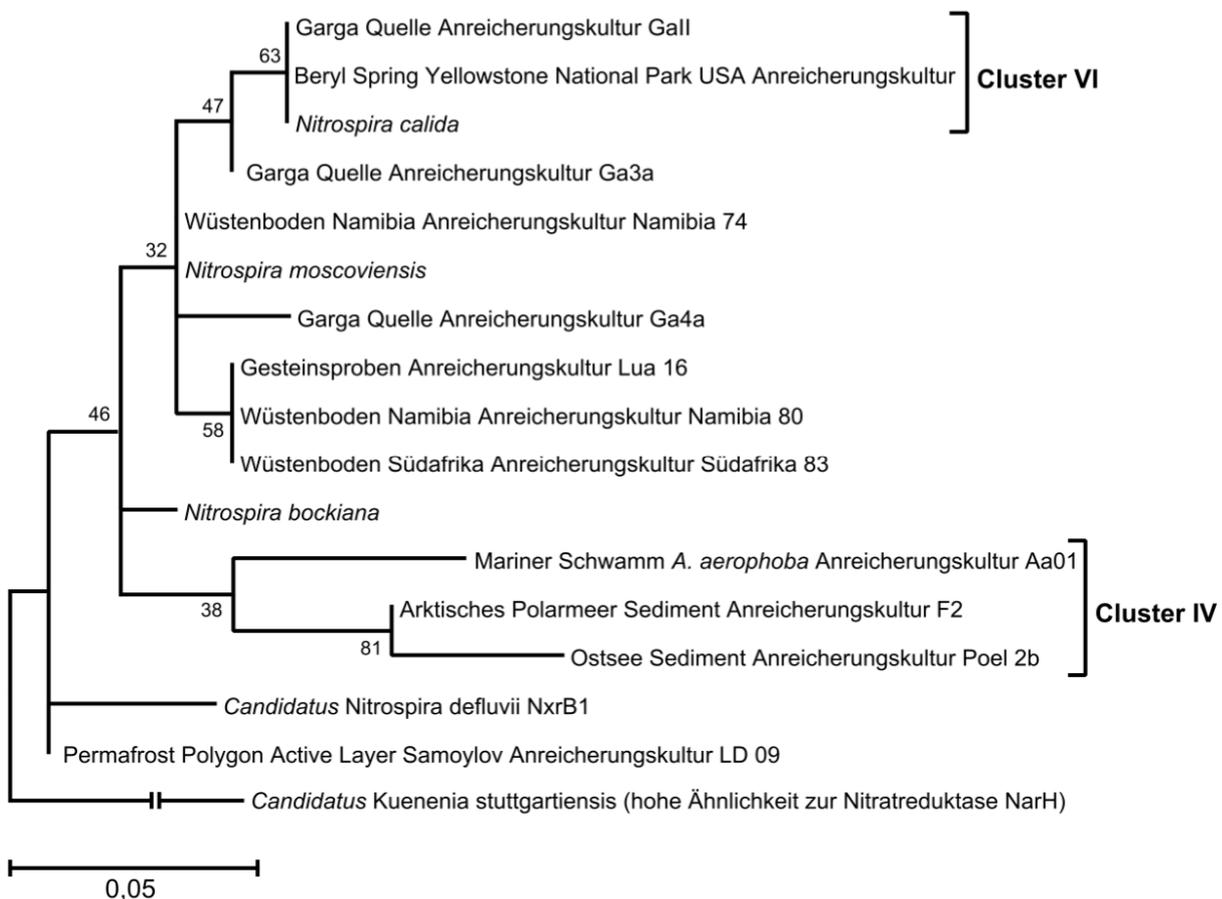


Abbildung 8. Phylogenetischer Stammbaum basierend auf *Maximum Likelihood*-Analysen der Aminosäuresequenz der Beta-Untereinheit der Nxr. Als Wurzel wurde eine Aminosäuresequenz von *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* gewählt, die eine sehr große Ähnlichkeit zu einer Nitratreduktase (NarH) aufweist. Die Einteilung der Cluster wurde in Anlehnung an den 16S rRNA basierten Stammbaum vorgenommen. Bootstrap-Werte sind ab 30 % angegeben. Der Skalierungsbalken entspricht einem Sequenzunterschied von 5 %.

Anscheinend üben die abiotischen Umweltbedingungen, die in den verschiedenen Habitaten vorherrschen, einen Einfluss auf die Evolution der NxrB aus. So könnte eine stark eingeschränkte Wasserverfügbarkeit zu der ähnlichen NxrB und somit zu einer Clusterbildung von Lua 16 (Gesteinsprobe), Namibia 80 (Wüstenbodenoberfläche mit Biokruste) und Südafrika 83 (Biokruste auf Wüstenboden) geführt haben. Temperaturen um die 50 °C zusammen mit einer ausreichenden Wasserverfügbarkeit könnte ebenfalls zu einer konvergenten Evolution der mit Cluster VI bezeichneten *Nitrospira*-ähnlichen Vertreter geführt haben. Der Einfluss der Salinität konnte nur zur Erklärung der Abgrenzung der drei marinen Kulturen dienen, da für die anderen Proben zum Beispiel Wüstenboden oder Heizungssystem keine Angaben zum Salzgehalt vorlagen.

4.2 Die Isolierung von *Nitrospira defluvii*: Zusammenspiel von klassischer Mikrobiologie und molekularen Methoden

Zu Beginn des Projektes war *Candidatus N. defluvii* aus dem Hamburger Klärwerk (Dradenau) zu 86 % in der Kultur angereichert. Diese Kultur reichte aus, um Teile des Genoms zu sequenzieren (MAIXNER et al., 2008). Zur experimentellen Untersuchung der Physiologie war es nötig, eine Reinkultur von *N. defluvii* zu erhalten. Zu diesem Zweck wurden mehrere Methoden der klassischen Mikrobiologie durchgeführt und schließlich aus molekularen Untersuchungen eine entscheidende Erkenntnis gewonnen, auf die im Weiteren näher eingegangen wird. Im Fließschema der Abbildung 9 ist die Isolierung von *N. defluvii* dargestellt.

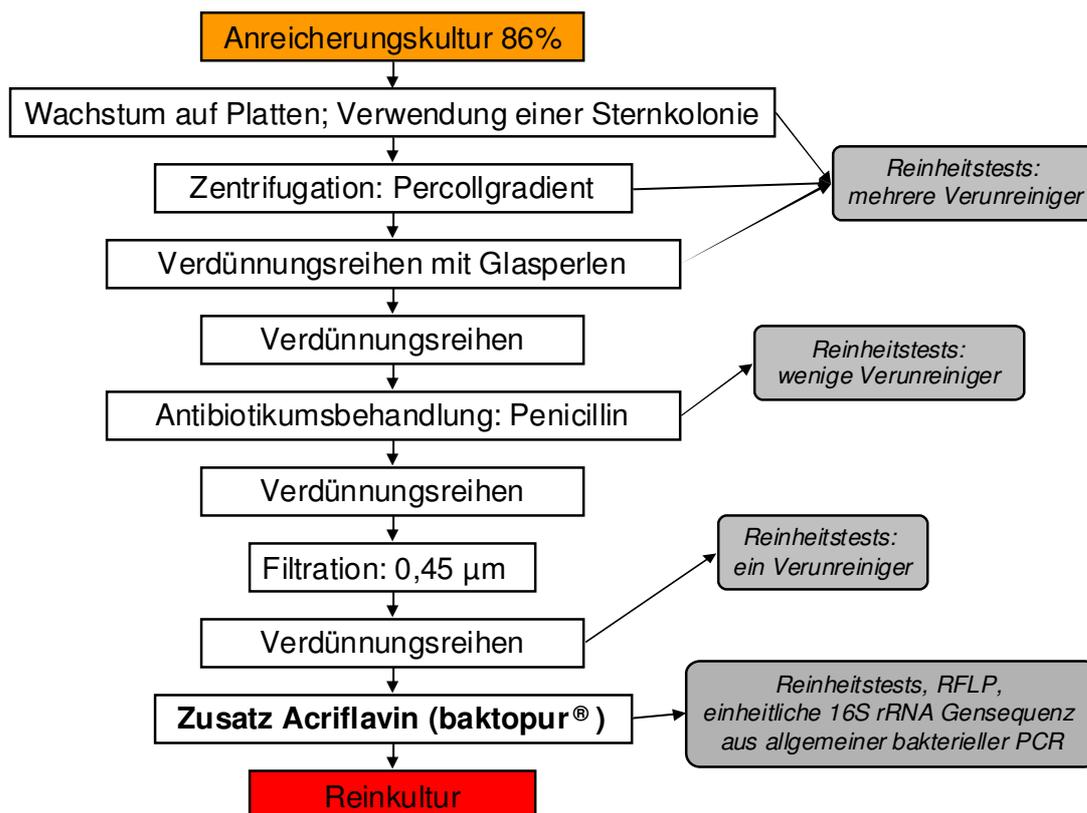


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Ablaufes der Isolierung von *Nitrospira defluvii*. Insgesamt nahm die gezeigte Anreicherung und schließlich Isolierung einen Zeitrahmen von etwa vier Jahren ein.

Es war möglich, die hoch angereicherte Kultur (86 %) von *Candidatus N. defluvii* auf festem Medium mit einem geringen Anteil an Organik und unter Verwendung von Agarose statt Agar zu vermehren. Die sternenförmigen Kolonien von *N. defluvii* waren aber stets mit heterotrophen Begleitorganismen vermischt (Abbildung 10).

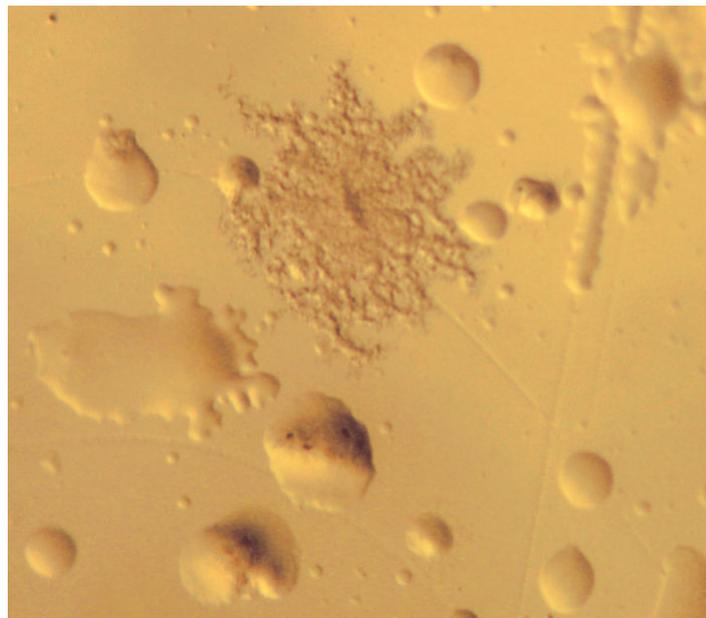


Abbildung 10: Festmedium mit Kolonien von *N. defluvii*. Die Platten sind etwa zwei Monate bei 28° C inkubiert worden. Neben den sternförmigen Kolonien von *N. defluvii* sind noch Kolonien weiterer Organismen zu sehen.

Durch Verdünnungsreihen in Mikrotiterplatten konnte *N. defluvii* noch weiter angereichert werden. Mittels eines Percollgradienten wurden die braun gefärbten Nitritoxidanten optisch von den helleren Begleitorganismen separiert. Im Anschluss wurden weitere zahlreiche Verdünnungsschritte unter Einsatz von Glasperlen durchgeführt, um die Mikrokolonien zu zerschlagen. Da die einzelnen Bakterien von *N. defluvii* eine längliche Form besitzen (0,2 – 0,4 µm x 0,7 – 1,7 µm; SPIECK et al., 2006), wurden die Nitrit-oxidierenden Kulturen mit der höchsten Verdünnungsstufe mittels einem 0,45 µm Filter von größeren Mikroorganismen getrennt. Nach immer wiederkehrenden Behandlungen mit Penicillin-Derivaten zur Hemmung der heterotrophen Bakterien war nur noch ein Begleitorganismus nachzuweisen. Dieser war genau wie *Candidatus N. defluvii* resistent gegen Antibiotika auf Penicillin-Basis und ließ sich nur in einem niedrig dosierten Reinheitstest-Medium nachweisen.

Der Durchbruch gelang, als im vollständigen Genom eine Resistenz gegen Acriflavin gefunden wurde (LÜCKER et al., 2010). Dieses Antiseptikum wird bei bakteriellem Befall in der Süßwasser-Aquaristik eingesetzt. Acriflavin-Derivate interkalieren in Nukleinsäuren und hemmen dadurch die Vermehrung von Mikroorganismen (LERMAN, 1964). Die Kulturführung unter Verwendung von steril filtriertem Sera baktipur® (Sera GmbH, Heinsberg, Deutschland) erfolgte in kleinen Volumina unter anfangs reduziertem Sauerstoffpartialdruck. Die optimale Dosierung wurde in mehreren Versuchsschritten getestet. Die kommerziell bezogene Acriflavin-Lösung baktipur® (210 mg / 100 ml) wurde in einer Endkonzentration von 10 µl je 100 ml Kultur eingesetzt. Höhere Konzentrationen hemmten das Wachstum der Nitritoxidanten erheblich.

Die Reinheit wurde anhand mehrerer Methoden überprüft. Die Beimpfung verschiedener flüssiger und fester Reinheitsmedien verlief schließlich negativ. Eine Restriktionsanalyse (RFLP) der 16S rDNA mit HapII ergab zwei Bandenmuster (zum Beispiel Abbildung 11). Die 16S rRNA Gene der beiden Mustertypen wurden zur Kontrolle sequenziert und ergaben ausschließlich die Sequenz von *N. defluvii*. Die DNA der Kultur enthielt nach einer PCR mit allgemeinen bakteriellen Primern nur die 16S rRNA Sequenz von *N. defluvii*. Mittels der FISH-Sonde Nsp-662 wurden alle mit DAPI gefärbten Bakterien markiert. Demnach handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit nun um eine Reinkultur.

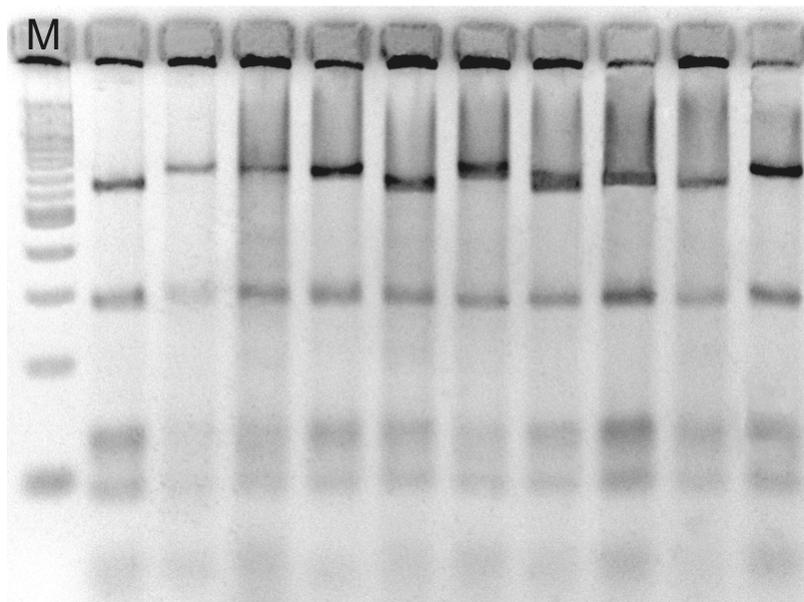


Abbildung 11: RFLP von *N. defluvii*. Nach der Amplifikation des Inserts (Primerpaar T7/SP6) von Klonen wurde das Amplifikat mit dem Restriktionsenzym HapII geschnitten und in einem Agarosegel aufgetrennt. M: 100 bp DNA-Leiter.

4.2.1 Einfluss von organischen Substanzen auf das Wachstum von *Nitrospira defluvii*

Durch die Erstellung von Wachstumskurven konnte der Frage nachgegangen werden, ob *N. defluvii* wie *Nitrospira marina* (WATSON et al., 1986) ausgewählte organische Bestandteile nutzen kann. Im Genom von *N. defluvii* wurden Gene detektiert, die für Proteine zum Einbau einfacher organischer Substanzen codieren (LÜCKER, 2010). Zur Klärung eines möglicherweise positiven Einflusses auf die Wachstumsgeschwindigkeit und damit einem mixotrophen Wachstum wurden deshalb die Zusätze Fumarat und Succinat als grundlegende Bausteine des reversen Tricarbonsäurezyklus gewählt. Des Weiteren wurden einfache Kohlenstoffverbindungen wie Formiat und Acetat sowie Pyruvat einzeln dem Medium in einer Konzentration von 0,5 mM hinzugefügt.

Die Kultur *N. defluvii* wächst marginal besser, wenn dem Medium Acetat oder Pyruvat zugegeben wurde. Der Nitritverbrauch von drei parallelen Ansätzen pro Zusatz mit einer Anfangskonzentration an Nitrit von 620 μM wurde mittels HPLC analysiert. Die Steigungen der Mittelwerte zwischen Tag 2 und 3 sind in der Abbildung 12 dargestellt. Im Vergleich zur Kontrolle mit 280 $\mu\text{M}/\text{Tag}$ lagen die höchsten Umsatzraten mit Pyruvat bei 320 $\mu\text{M}/\text{Tag}$ und mit Acetat bei 290 $\mu\text{M}/\text{Tag}$ nur minimal höher. Formiat, Succinat oder Fumarat dagegen hatten einen leicht hemmenden Einfluss auf das Wachstum. Succinat und Fumarat konnten nicht mittels HPLC analysiert werden. Ihr Einfluss auf das Wachstum wurde anhand des so genannten Tüpfeltest grob bestimmt.

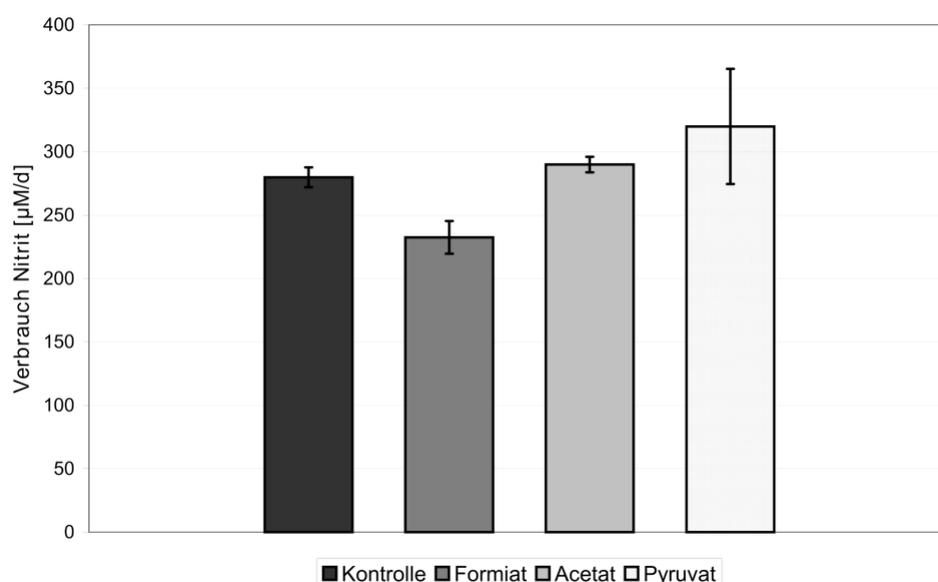


Abbildung 12: Nitritverbrauch einer Reinkultur von *N. defluvii* unter Zusatz von organischen Kohlenstoffverbindungen. Angegeben ist der Mittelwert aus drei Parallelen.

4.3 Physiologie von *Nitrospira*: Anpassung an moderate und extreme Lebensräume

4.3.1 Bildung von extrapolymere Substanzen unter Stress

Anhand von Untersuchungen mit dem Rasterelektronenmikroskop (REM) sollte die Bildung von extrapolymere Substanzen (EPS) unter verschiedenen Einflüssen detektiert werden. Dafür wurden Reinkulturen von *N. defluvii* unterschiedlich angezogen. Neben der Anzucht mit nur etwa 3 mM Nitrit wurde zum einen eine sehr hohe Nitritkonzentration von 30 mM gewählt, zum anderen ein Zusatz an baktipur[®], welcher das antiseptisch wirkende Acriflavin enthält. Alle Kulturen wurden bei 28 °C im Dunkeln unter Rühren inkubiert.

Die Aufnahmen des REM zeigen deutlich, dass es bei Stress durch hohe Nitritkonzentrationen oder durch das Antiseptikum zur Ausbildung sehr starker, fädiger EPS kommt (Abbildungen 13 bis 15).

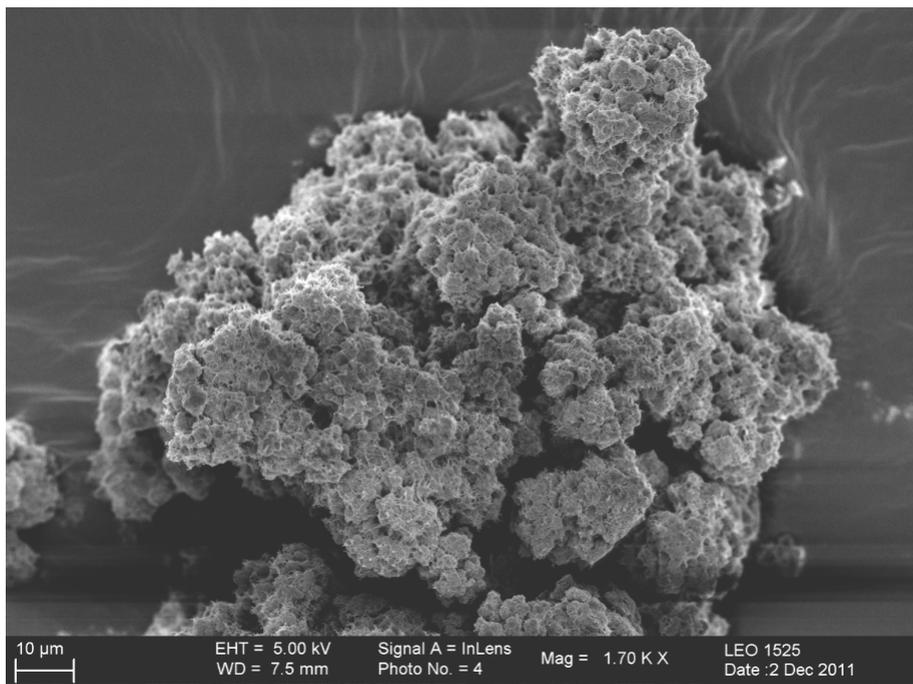


Abbildung 13: Mikroskopische Rasterelektronenaufnahme einer Reinkultur von *Nitrospira defluvii*. Die Kultivierung erfolgte mit 30 mM Nitrit. Flocke als Übersicht.

Auffällig ist bei in Abbildung 13 das blumenkohlartige Aussehen der Flocke. Sie ist nicht kompakt, sondern weist Poren und Löcher auf. Einzelne Zellen sind wie bei der FISH-Aufnahme 3 in Kapitel 4.1.1 nicht erkennbar.

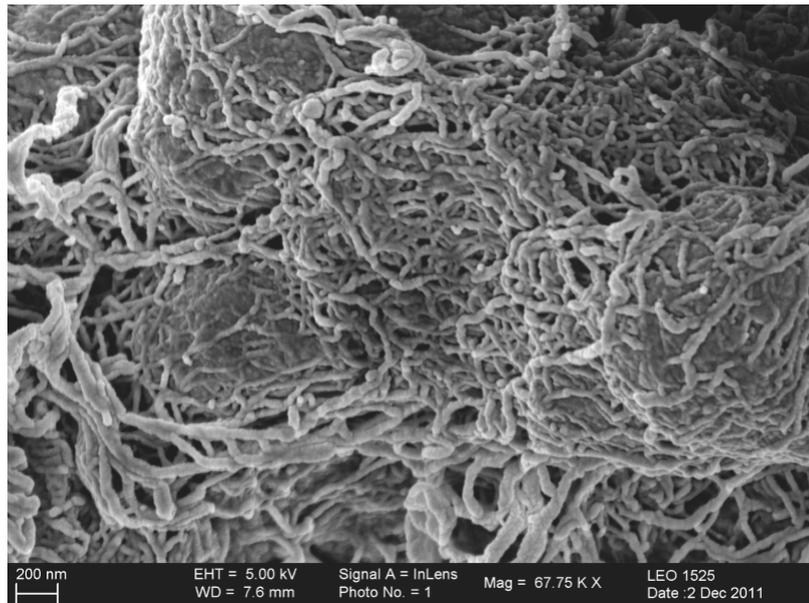


Abbildung 14: Mikroskopische Rasterelektronenaufnahme einer Reinkultur von *N. defluvii*. Die Kultivierung erfolgte mit 30 mM Nitrit. Nahaufnahme der fädigen EPS.

Die Fäden, die in Abbildung 14 im Detail zu sehen sind, überziehen die Bakterien wie ein Netz. Sie sind bis zu 100 nm dick. Wird *N. defluvii* mit Zusatz des Antiseptikums Acriflavin kultiviert, umschließt das enge Netz aus EPS die Bakterien fast vollständig (Abbildung 15). Die Flocken weisen eine fast lückenlose Struktur auf (Zusatzmaterial 15a, siehe Anhang).

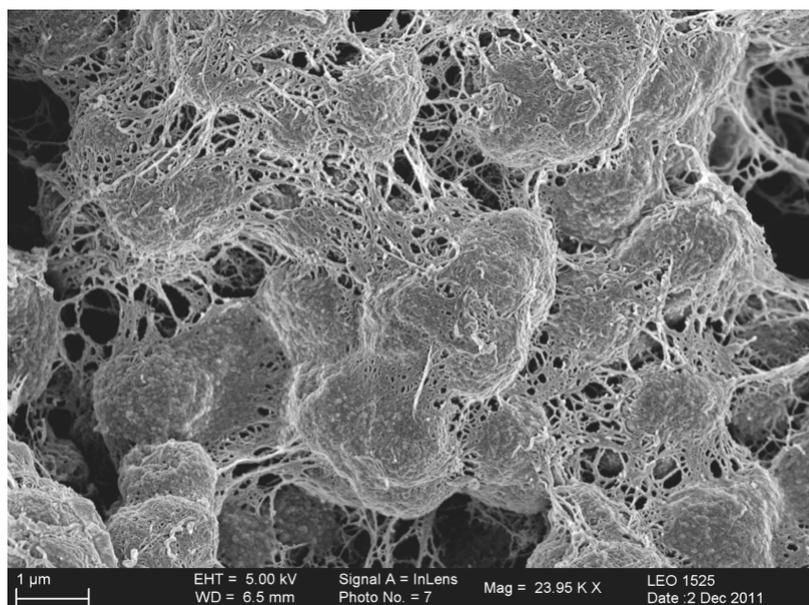


Abbildung 15: Mikroskopische Rasterelektronenaufnahme einer Reinkultur von *N. defluvii*. Die Kultivierung erfolgte mit Zusatz des Wirkstoffes Acriflavin. Nahaufnahme der EPS umhüllten Bakterien.

Wächst *N. defluvii* im Gegensatz zu den vorher genannten Kulturen mit einer Substratkonzentration von 3 mM und ohne den Zusatz Acriflavin ist die Bildung der EPS wesentlich geringer ausgeprägt (Abbildung 16). Die Beschaffenheit der Flocken ist im Vergleich zu denen unter Stresseinwirkung aufgelockerter mit größeren Hohlräumen (Zusatzmaterial 16a, siehe Anhang).

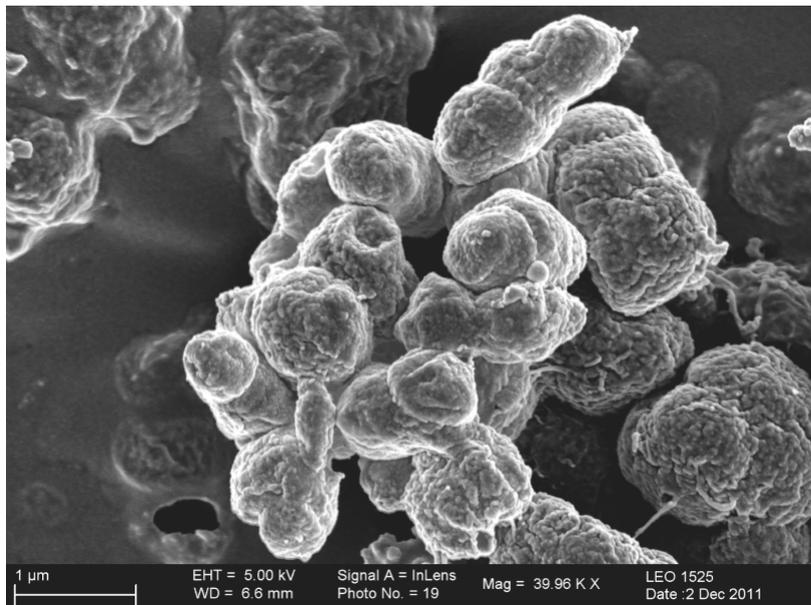


Abbildung 16: Mikroskopische Rasterelektronenaufnahme einer Reinkultur von *N. defluvii*. Kultur unter optimierten Bedingungen gewachsen. Gut sichtbar ist die gedrehte Form der Bakterien.

Auf den Zellen einiger REM-Aufnahmen sind mehrere ca. 100 nm große Partikel zu erkennen (Abbildung 17). Es wird vermutet, dass es sich bei den Partikeln um Vesikel handelt, die wie die Fäden aus EPS oder Zellinhaltsstoffen bestehen könnten.

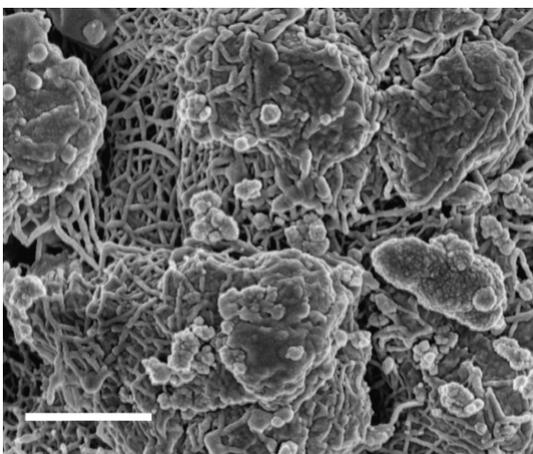


Abbildung 17: Mikroskopische Rasterelektronenaufnahme einer unter Acriflavin-Zusatz gewachsenen Reinkultur von *N. defluvii*. Auf dem Geflecht sind ca. 100 nm große Partikel sichtbar. Größenmarker 1 µm.

Mittels einer sanften Präparation durch Absaugen der Flocken zur Erstellung von Ultradünnschnitten für die Elektronenmikroskopie konnte neben den durch EPS zusammengehaltenen Zellverbänden ein Vorkommen an Vesikeln beobachtet werden (Abbildung 18). Diese könnten beim Stofftransport innerhalb des Biofilms eine Rolle spielen (REMIS et al., 2010).

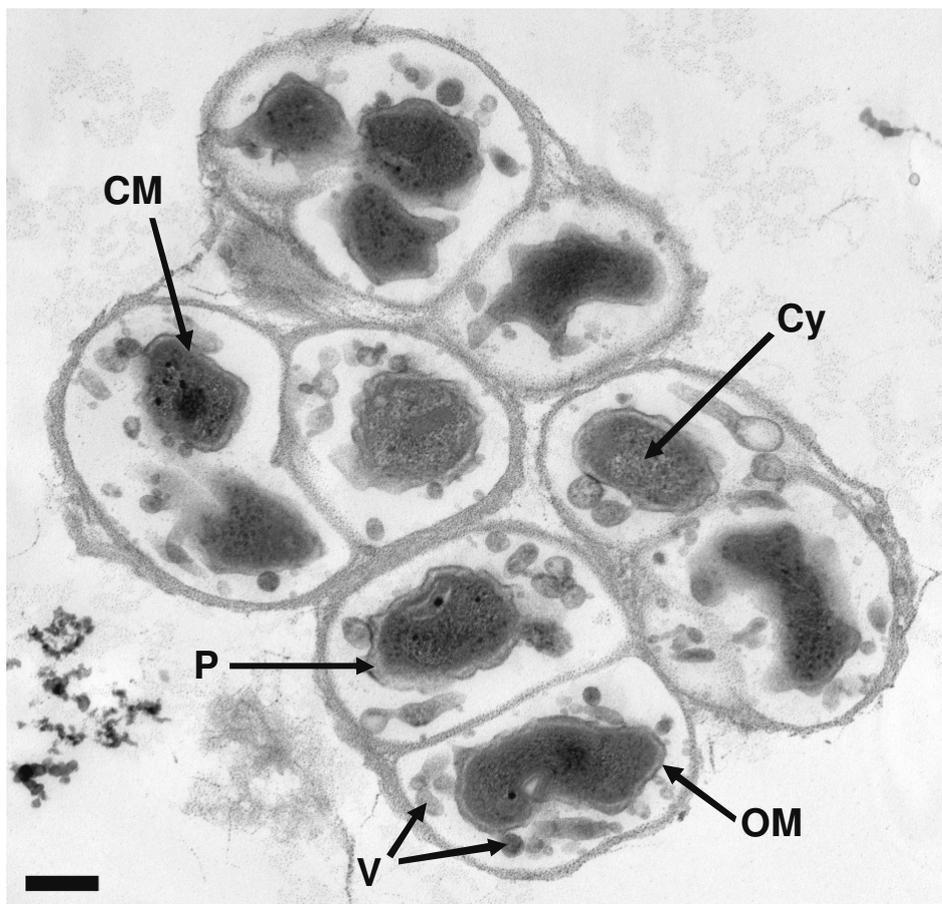


Abbildung 18: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *Nitrospira defluvii*. Typische Mikrokolonie junger Zellen (etwa drei Monate alt) der Reinkultur *N. defluvii* nach Acriflavin-Behandlung. Die Zellen wurden im Gegensatz zu früheren Präparationen nicht zentrifugiert. Gut sichtbar sind zahlreiche Vesikel. CM: Cytoplasmamembran; Cy: Cytoplasma; P: Periplasma; OM: outer membrane; V: Vesikel. Der Größenbalken entspricht 200 nm.

4.3.2 Hungertest: Überdauern ohne Substrat-/Energiezufuhr

So genannte „Hungertests“ sollten die Überlebensdauer ohne Zufuhr des Substrates Nitrit von Rein- bzw. Anreicherungskulturen der Gattungen *Nitrospira* und *Nitrobacter* aufzeigen. Dafür wurden zwei Versuche durchgeführt.

Im ersten Ansatz wurden je zwei Vertreter der Gattung *Nitrobacter* (*N. hamburgensis* und *N. winogradskyi*) und *Nitrospira* (*N. moscoviensis* und *Candidatus N. defluvii*, Anreicherung) gewählt. Diese Kulturen waren aufgrund ihres recht ähnlichen Temperaturspektrums in der Lage, bei 28 °C gut zu wachsen. Die Ergebnisse des ersten Hungertests sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

Tabelle 14: Ergebnisse des ersten Hungertests. Angabe von Tagen der Anwachsphase bis zum ersten Nitritverbrauch (0,3 mM, 6 Parallelen) nach Animpfen mit substratfrei gelagerten Kulturen. Bei unterschiedlich schnellem Anwachsen ist die Spannweite der Phase in Klammern angegeben.

Kulturen	Dauer der Lagerung ohne Substrat ¹			
	0 Monate	3 Monate	6 Monate	9 Monate
<i>N. hamburgensis</i>	9	9	10 (7 – 10)	22 (9 – 57)
<i>N. winogradsky</i>	5	7	6	25 (9 – 51)
<i>N. moscoviensis</i>	4	5	13	21 (20 – 24)
<i>Candidatus N. defluvii</i>	7	7	6 (6 – 8)	21

1) Ermittelt aus zwei Ansätzen pro Kultur mit je drei Parallelen.

Beide Gattungen überdauern Hungerphasen von neun Monaten mit einer ca. 2 – 3-mal längeren Lag-Phase beim erneuten Anwachsen in Medium mit Substrat. Bei einer Dauer der Hungerphase von drei und sechs Monaten ist die Anwachsphase der Kulturen mit etwa ein bis zwei Wochen annähernd gleich lang wie die der Kontrolle (0 Monate). Werden die NOB allerdings 9 Monate ohne Substrat gelagert, findet ein Sprung in der Dauer bis zum ersten Nitritverbrauch statt. Sie beträgt im Mittel bei allen Kulturen in etwa drei Wochen.

Der zweite Ansatz vom Hungertest wurde mit Kulturen durchgeführt, die unterschiedliche Temperaturbedingungen zum Wachsen brauchen. Hierfür wurden die Nitritoxidanten *Nitrobacter alcalicus*, *Nitrobacter vulgaris* und *Nitrospira moscoviensis* sowie die hoch angereicherten Kulturen *Candidatus Nitrospira bockiana* und Ns 10 (später *Nitrospira calida*) genommen. Die Temperatur der Anzucht und der Lagerung ohne Substrat wurde an die jeweilige Kultur angepasst. Die Zeit bis zu ersten Anwachsen ohne Hungerphase betrug bei allen Ansätzen etwa 11 Tage. Nach einem Langzeittest von über 13 Monaten Lagerung ohne Substrat bei unterschiedlichen Temperaturen haben alle sechs Parallelen pro Spezies nach etwa 19 Tagen das Substrat (0,3 mM Nitrit) verbraucht. Es bestand dabei kein relevanter Unterschied zwischen den Gattungen *Nitrospira* und *Nitrobacter*. Beide Nitritoxidanten konnten mehr als ein Jahr ohne das Substrat zur Energiegewinnung überdauern. Lediglich die Phase bis zum ersten Nitritverbrauch verdoppelte sich bei einem erneuten Anwachsen nach der Hungerzeit. Diese Überlebensstrategie war unabhängig von der jeweiligen optimalen Temperatur (28 °C, 37 °C, 40 °C und 45 °C).

4.3.3 Substratoptimum und -toleranz

Das Substratoptimum von *N. defluvii* wurde durch einen Versuch mit zwei Parallelen in Erlenmeyerkolben bei einer Temperatur von 28 °C und einer Inkubation ohne Rühren ermittelt. Der maximale Nitritverbrauch eines Ansatzes wurde anhand der größten Steigung berechnet. Die maximale Umsatzrate einer Reinkultur von *N. defluvii* wurde bei einer Konzentration von 12 mM Nitrit gemessen: 430 µM pro Tag (Abbildung 19). Es konnte festgestellt werden, dass die Lag-Phase bei steigender Nitritkonzentration länger wird. Sie beträgt bei 2 mM Nitrit etwa 4 Tage und bei 12 mM fast 12 Tage. Die Versuchsdauer von 19 Tagen reichte jedoch nicht, um einen Nitritverbrauch bei einer Konzentration von 30 mM messen zu können.

Ergebnisse

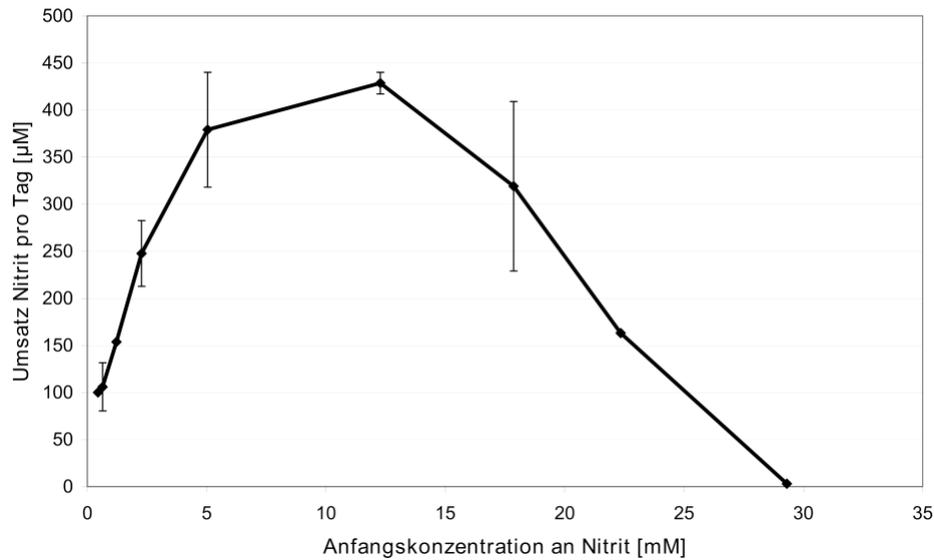


Abbildung 19: Substratoptimum einer Reinkultur von *N. defluvii*. Angegeben ist der Mittelwert aus zwei Parallelen.

Die Toleranz gegenüber der toxischen Wirkung von Nitrit bei erhöhter Konzentration als Hauptsubstrat für die Energiegewinnung wurde von zwei physiologisch sehr verschiedenen Kulturen untersucht. Aa01 ist eine Anreicherungskultur *Nitrospira*-ähnlicher Bakterien aus dem marinen Mittelmeerschwamm *Aplysina aerophoba*. Sie reagiert sehr empfindlich auf Nitritkonzentrationen größer als 1,5 mM. Oberhalb dieser Toleranzgrenze ist kein Wachstum der NOB mehr nachweisbar (OFF et al., 2010). Das Substratoptimum des mit dem marinen Schwamm assoziierten Vertreters der Gattung *Nitrospira* liegt bei etwa 0,8 mM.

Die Reinkultur *N. defluvii* kann dagegen unter normalem Sauerstoffpartialdruck 30 mM Nitrit umsetzen. Bemessen an dem recht langen Zeitraum von sechs Monaten im Vergleich zu 19 Tagen bei 5 mM Nitrit übte die hohe Konzentration an Substrat einen deutlich hemmenden Effekt auf das Wachstum aus. Wurde *N. defluvii* unter einem verminderten Gasaustausch zusammen mit einem dadurch bedingtem geringeren Sauerstoffgehalt (Anzucht in Schraubdeckelflaschen) inkubiert, so ist die Kultur in der Lage, nur bis zu 15 mM Nitrit in 10 Monaten umzusetzen.

4.3.4 pH-Optimum

Der optimale pH-Bereich zum Wachstum der Reinkultur *N. defluvii* wurde in unterschiedlichen Medien getestet. Dabei stellte sich heraus, dass ein mineralisches, steril filtriertes Medium ohne zusätzlichen Puffer zur Anzucht von autotrophen NOB in einem pH-Bereich von etwa 6,1 bis 7,5 benutzt werden kann. Unter- und oberhalb dieser Werte verändert sich der pH-Wert nach Zugabe vom gewünschten Inokulum (1 % - 6 %) signifikant. Außerdem oxidiert Nitrit in nahezu ungepufferten Medien mit pH-Werten unter 6,0 autokatalytisch zu Nitrat, ohne die Beteiligung von Mikroorganismen. Bei Verwendung von Kalziumkarbonat (0,05 M) als Puffer in einem pH-Bereich von 8,0 bis 9,0 sank der pH-Wert der Ansätze nach Zugabe des Inokulums auf pH 8,1 bis 8,3, wonach diese Methode nur eingeschränkt verwendbar war (LEBEDEVA et al., 2011). Es war daher nicht möglich eine durchgängige Kurve bei der Messung des pH-Optimums von *N. calida* zu erhalten.

Die Kurven des Nitritverbrauchs aus dem Versuch mit Medium ohne zusätzlichen Puffer werden in Abbildung 20 gezeigt (Mittelwerte aus zwei Parallelen).

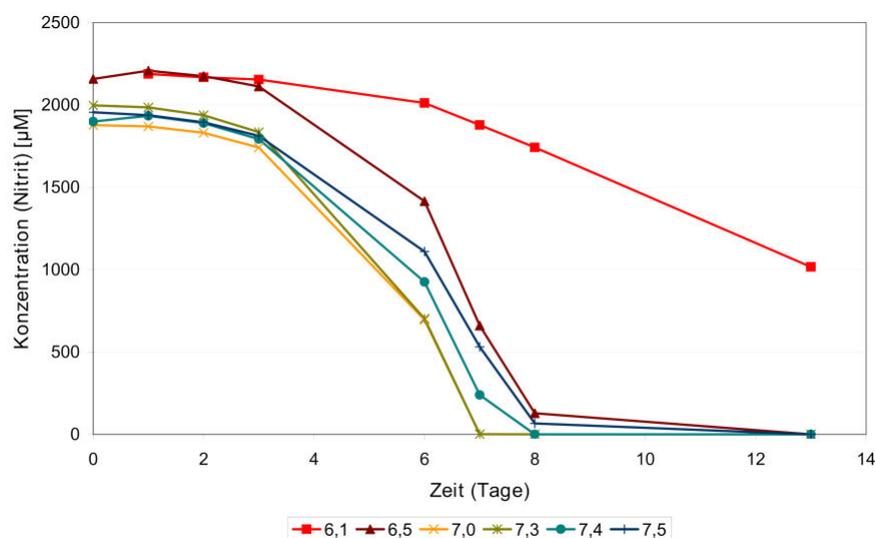


Abbildung 20: Kurven des Nitritverbrauchs einer Reinkultur von *N. defluvii* bei verschiedenen pH-Werten unter Verwendung von Medium I ohne zusätzlichen Puffer. Mittelwerte aus zwei Parallelen.

Die Anfangskonzentration von 2 mM Nitrit wurde stöchiometrisch innerhalb von sieben Tagen bei pH-Werten von 7,0 und 7,3 zu Nitrat (Nitratkurven nicht dargestellt) oxidiert, während bei pH 6,1 nach 13 Tagen noch 50 % vorhanden waren. Zur Berechnung des pH-Optimums wurde die Differenz der Nitritkonzentrationen zwischen Tag 3 und Tag 7 durch die Anzahl der Tage geteilt. Die resultierende Kurve ist in Abbildung 21 dargestellt.

Ergebnisse

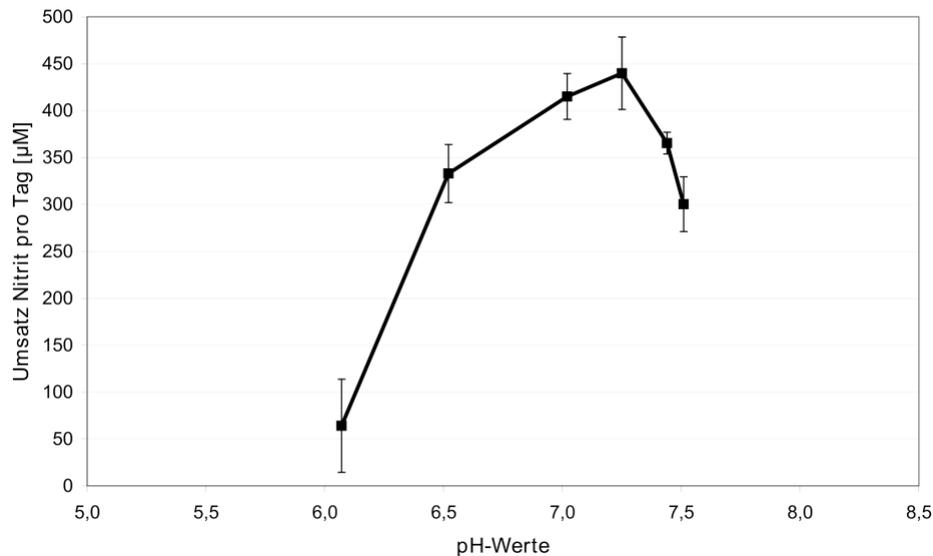


Abbildung 21: pH-Optimum einer Reinkultur von *N. defluvii* ermittelt unter Verwendung von Medium I ohne zusätzlichen Puffer.

N. defluvii zeigte in einem Medium ohne zusätzlichen Puffer die größte Umsatzrate an Nitrit bei einem pH-Wert von 7,3 mit etwa 440 µM pro Tag. Das so bestimmte pH-Optimum verschob sich allerdings durch die Verwendung von gepuffertem Medium gering. Einem phosphatfreien Medium I wurden dafür 0,02 M Phosphatpuffer zugesetzt. Die Kurven der Nitritabnahme (Anfangskonzentration 1,2 mM, Mittelwerte aus zwei Parallelen) bei verschiedenen pH-Werten sind in Abbildung 22 dargestellt.

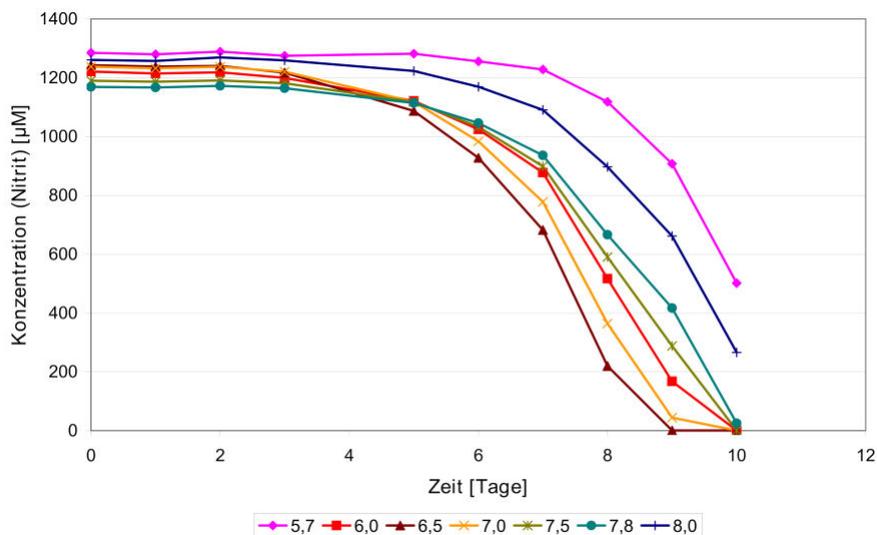


Abbildung 22: Kurven des Nitritverbrauchs einer Reinkultur von *N. defluvii* bei verschiedenen pH-Werten unter Verwendung von Medium I mit einem 0,02 M Anteil an Phosphatpuffer. Mittelwerte aus zwei Parallelen.

Nach neun Tagen war bei einem pH-Wert von 6,5 kein Nitrit mehr nachweisbar, wobei der Unterschied zu pH 7,0 sehr gering ist. Die Kurven liegen bis auf pH 5,7 und 8,0 dicht beisammen. Alle Ansätze von pH 6,0 bis pH 7,8 hatten nach 10 Tagen 1,2 mM Nitrit verbraucht. Aus den Differenzen der Nitritkonzentrationen zwischen den Tagen 5 und 9 wurde das pH-Optimum unter Verwendung von gepuffertem Medium berechnet. Die resultierende Kurve ist in Abbildung 23 dargestellt.

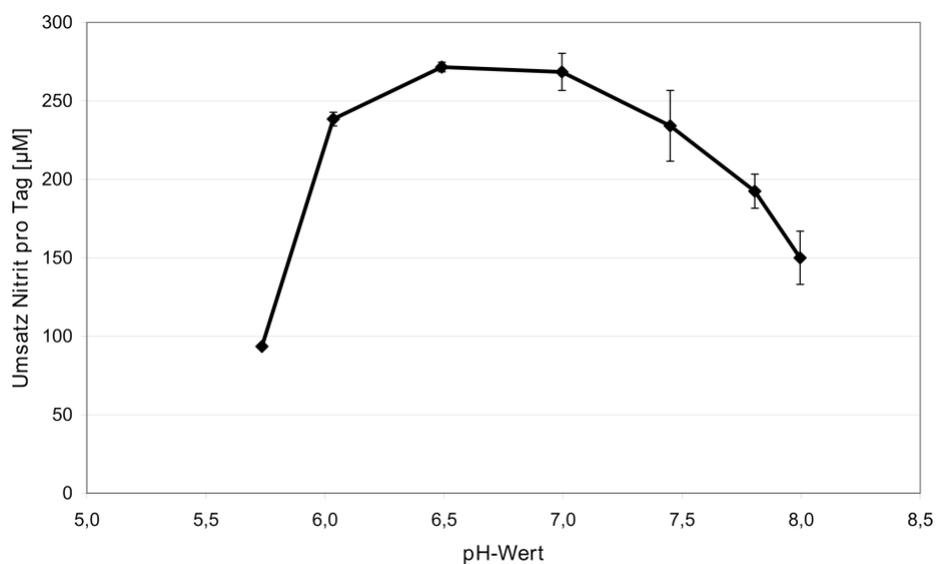


Abbildung 23: pH-Optimum einer Reinkultur von *N. defluvii* ermittelt unter Verwendung von phosphatfreiem Medium I mit einem 0,02 M Anteil an Phosphatpuffer.

Das pH-Optimum von *Nitrospira defluvii* in einem phosphatfreien Medium mit einem 0,02 M Anteil an Phosphatpuffer lag in einem pH-Bereich von 6,5 – 7,0 mit einer Umsatzrate von etwa 270 μM Nitrit pro Tag.

4.4 *Nitrospira* in Konkurrenz zu anderen NOB in Süßwasser-Aquakulturanlagen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Populationsstruktur Nitrit-oxidierender Bakterien in der Süßwasser-Aquakulturanlage HW untersucht. Das Besondere an dieser mit Brunnenwasser gespeisten Kaltwasserkreislaufanlage sind folgende Parameter: I. die niedrige Temperatur von durchschnittlich 13 °C, II. der mit Schwefelsäure künstlich eingestellte pH-Wert von 6,8 und III. der im Vergleich zum Medium I 25-fach höhere Mangengehalt im Frischwasserzulauf. Diese Parameter könnten die ökologische Nischenbildung von NOB beeinflussen. In der Anlage sind zwei unterschiedliche Biofilter installiert. Ein schwimmender Moving-Bed-Filter (belüfteter Biofilter mit frei beweglichem Filtermaterial zur Anheftung von Mikroorganismen) mit Füllkörpern aus neuem und recyceltem Material wurde Ende 2008 in die Anlage eingebaut, dessen Leistung jedoch nicht ausreichte. Daher wurde im November 2010 ein Verbund aus zwei großen Moving-Bed-Filtern in Betrieb genommen, die mit zwei Typen von Füllkörpern bestehend aus recyceltem Material befüllt worden sind.

Zur Untersuchung der Zusammensetzung an NOB in der beschriebenen Anlage wurde regelmäßig die DNA aus dem Biofilm der Füllkörper beider Biofilter isoliert. Durch spezifische PCR mit den Primersets Nsp60-k-dgF/Nsp1158R, Ntoga122F/Ntoga1422R bzw. Nb1000gF/DegR konnten Bakterien der Gattungen *Nitrospira*, *Candidatus Nitrotoga* und *Nitrobacter* nachgewiesen werden. Die Änderungen in der Population an NOB über die Zeit von Juli 2010 bis Juli 2011 sind in Tabelle 15 aufgelistet.

Nitrospira-ähnliche Bakterien kamen zu allen Zeitpunkten der Probennahme in beiden Biofiltern in der untersuchten Süßwasser-Aquakultur vor. Während im alten schwimmenden Moving-Bed-Filter zusätzlich *Candidatus Nitrotoga* vertreten war, konnten im neuen Filterverbund ab dem Frühjahr 2011, etwa ein halbes Jahr nach Inbetriebnahme, keine Bakterien der Gattung *Candidatus Nitrotoga* mit dem verwendeten Primerset (Ntoga122F/Ntoga1422R) mehr nachgewiesen werden. Im Juli 2011 wurde dafür erstmals *Nitrobacter* detektiert. Mögliche Ursachen für diese Veränderung in der Zusammensetzung an NOB könnten folgende Anlagenparameter sein: die Änderung der Fischpopulation (ab April 2011 zusätzlich zweite Fischart), die über dem Durchschnitt liegende Temperatur im Juni 2011 (14,5 °C) und der häufige Wechsel der Futtermenge.

Tabelle 15: Ergebnisse des spezifischen PCR-Screenings von Proben aus der Süßwasser-Aquakulturanlage HW.

Zeitpunkt der Probennahme	Biofilter	<i>Nitrospira</i>	<i>Nitrotoga</i> ¹	<i>Nitrobacter</i>
Juli 2010	älterer schwimmender Moving-Bed-Filter	ja	ja	nein
Oktober 2010		ja	ja	nein
November 2010	neuer Moving-Bed-Filter-Verbund	ja	ja	nein
Dezember 2010		ja	ja	nein
März 2011		ja	ja	nein
Juni 2011		ja	nein	nein
Juli 2011		ja	nein	ja
Oktober 2011	älterer schwimmender Moving-Bed-Filter	ja	ja	ja

1) erst Amplifikation bakterieller 16S rRNA Gene mit Eub27F/Eub1492R, dann Einsatz des spezifischen Primersets Ntoga122F/Ntoga1422R

Die Koexistenz von *Nitrospira* und *Candidatus Nitrotoga* wurde durch elektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigt (Abbildung 24). Die Auswertung je zweier unterschiedlicher Schnittreihen auf unterschiedlichen Kupfernetzen hat ergeben, dass im alten Biofilter im Juli 2010 etwa die Hälfte aller NOB zur Gattung *Candidatus Nitrotoga* gehörten. Erkennbar sind diese Bakterien an dem im Vergleich zu Kolonien von *Nitrospira* an einem länglichen Cytoplasma umgeben von einem außerordentlich breiten Periplasma und dem relativ lockeren Kolonieverbund (Abbildung 24). Allerdings verringerte sich das Vorkommen von *Candidatus Nitrotoga* im alten Biofilter erheblich nach dem Einführen der neuen Filteranlage. Im Oktober 2011 machte *Candidatus Nitrotoga* nur noch einen geringen Anteil der NOB aus. Der nächste Verwandte ist *Candidatus Nitrotoga* sp. HAM-1 (FJ263061) aus dem Belebtschlamm des Hamburger Klärwerks Dradenau. Die Sequenzsimilarität beträgt 99,6 %.

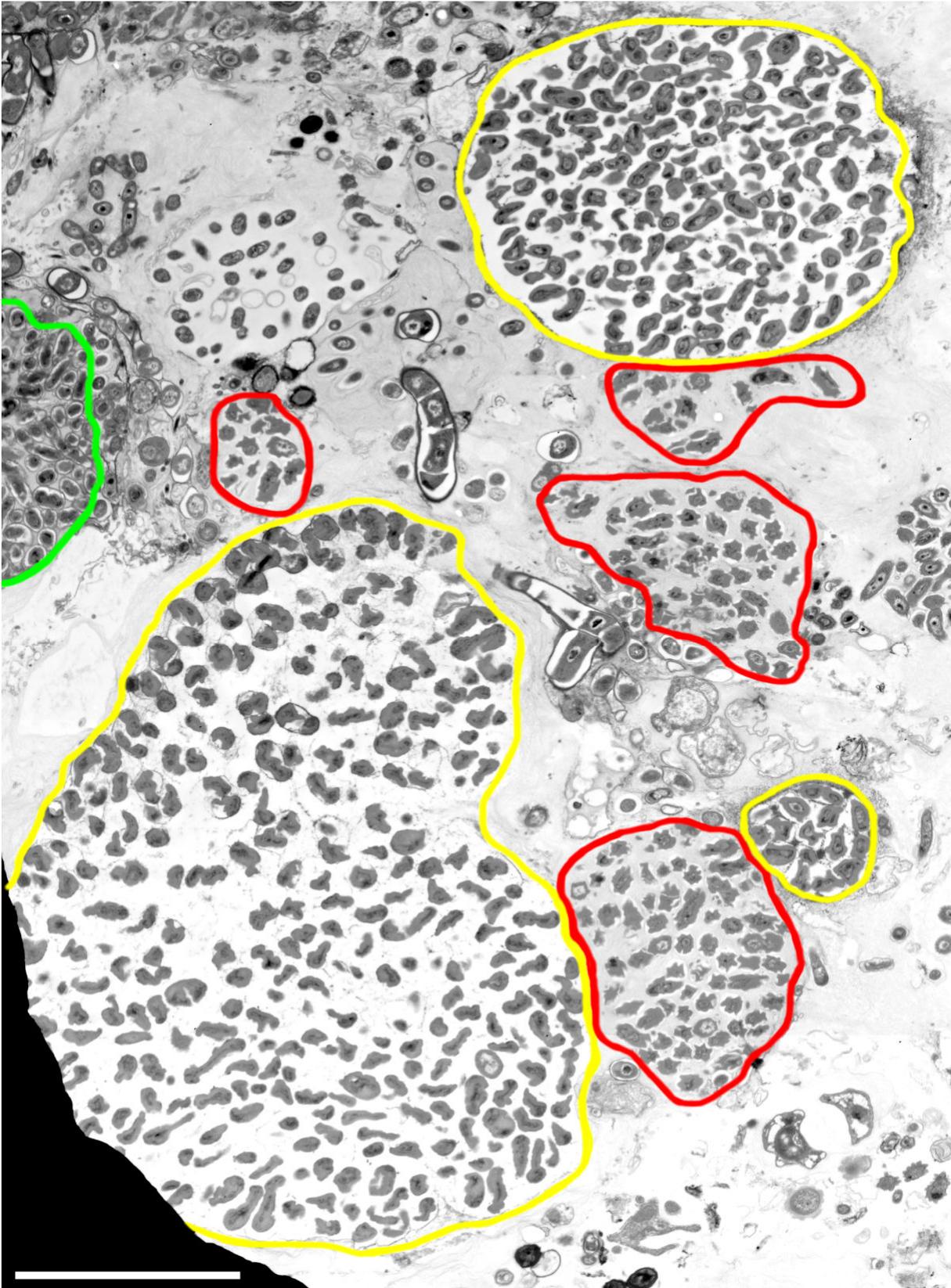


Abbildung 24: Elektronenmikroskopische Aufnahme vom Biofilm eines Biofilters der Süßwasser-Aquakulturanlage HW. Typische Kolonien verschiedener Nitrifikanten sind zu erkennen. AOB der Gattung *Nitrosomonas* sind gelb umrandet - *Nitrospira* grün und *Nitrotoga* rot. Der Größenbalken entspricht 5 µm.

Mittels der elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnte die Gattung *Nitrosomonas* als dominierende Ammoniak-oxidierende Bakterien identifiziert werden. Bakterien der Gattung *Nitrosomonas* besitzen mehrere in der Zellperipherie angeordnete intercytoplasmatische Membranen (ICM) und sind dadurch leicht zu erkennen (Abbildung 25).

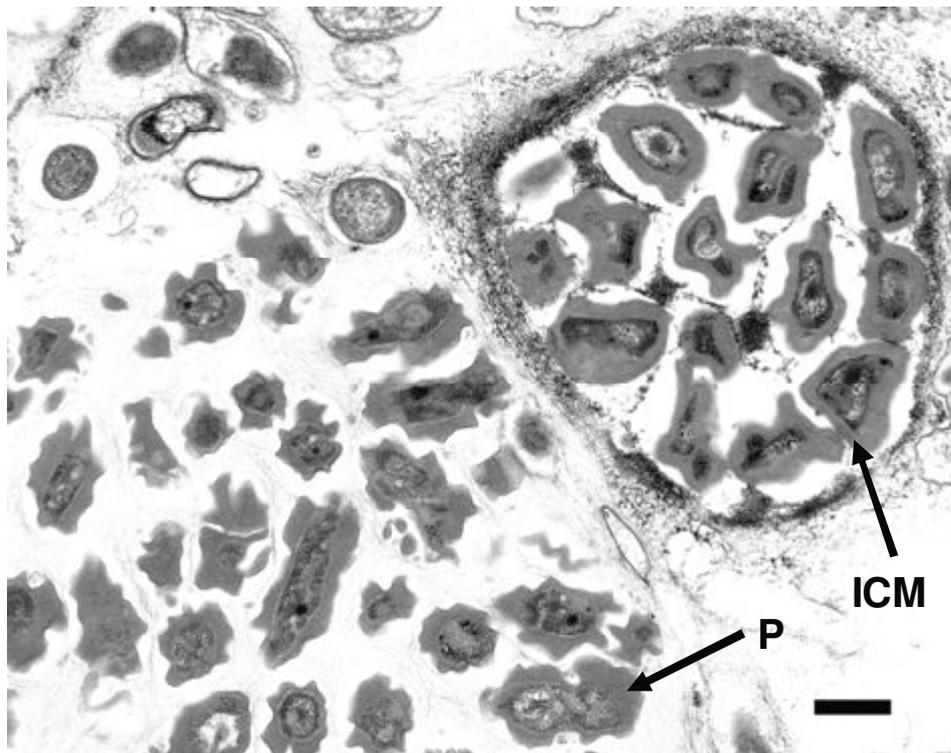


Abbildung 25: Ausschnitt einer elektronenmikroskopischen Aufnahme vom Biofilm eines Biofilters der Süßwasser-Aquakulturanlage HW. Detailaufnahme einer Kolonie von Ammoniak-oxidierenden Bakterien der Gattung *Nitrosomonas* (rechts im Bild) in enger Nachbarschaft zu locker assoziierten Zellen von *Candidatus Nitrotoga* (links im Bild). P = Periplasma, ICM = intracytoplasmatische Membranen.

Bakterien der Gattung *Nitrosomonas* sind im Biofilm der Aquakulturanlage zumeist in kompakten kugligen Zellpaketen angeordnet. Dieser feste Zusammenhalt durch EPS kommt auch bei NOB der Gattung *Nitrospira* vor. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen in den Abbildungen 26a, b und c zeigen eine kompakte Kolonie von *Nitrospira*. Zur Detektion *Nitrospira*-ähnlicher Bakterien wurde die Sonde Nsp-662 verwendet.

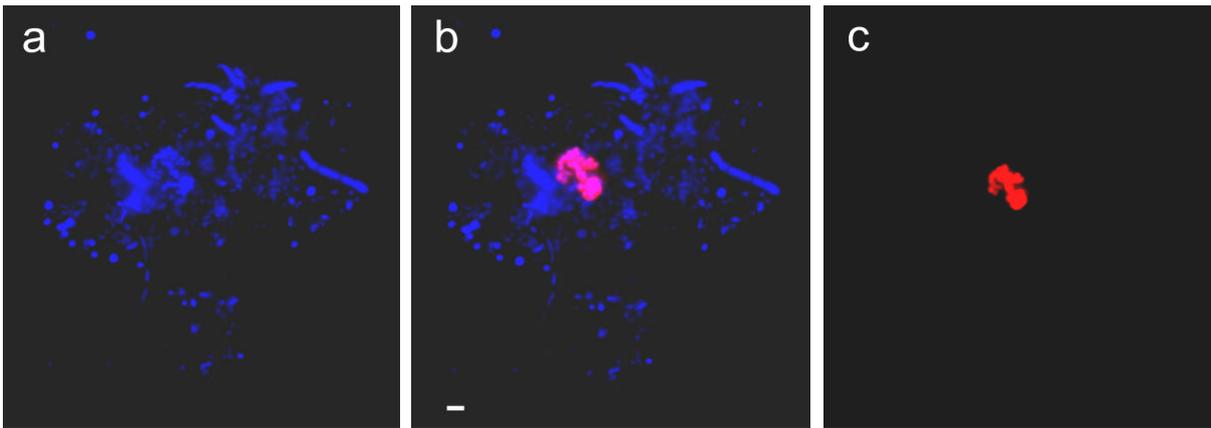


Abbildung 26 a, b und c: Gattungsspezifische Färbung mit der Oligonukleotidsonde Nsp-662. Mikrokolonie von *Nitrospira*-ähnlichen Bakterien und heterotrophe Begleitorganismen einer Probe aus der Süßwasser-Aquakulturanlage HW. a: DAPI, b: DAPI+Cy3 markierte Sonde, c: Cy3 markierte Sonde. Größenmarker 1 μm .

4.4.1 Einfluss des erniedrigten pH-Wertes

Neben der niedrigen Temperatur von durchschnittlich 13 °C, die erwartungsgemäß das Vorkommen der Gattung *Candidatus Nitrotoga* begünstigt, sollte auch der Einfluss des künstlich erniedrigten pH-Wertes von 6,8 auf Vertreter dieser Gattung untersucht werden. Dafür wurde die Wirkung des pH-Wertes auf die Wachstumsgeschwindigkeit einer Anreicherung von *Candidatus Nitrotoga* aus Permafrost-beeinflussten Böden Sibiriens (6680) in ungepuffertem NOB-Medium bestimmt. Zur Berechnung des pH-Optimums wurden die Mittelwerte aus zwei Parallelen herangezogen (bei pH 5,9 und 6,5 war nur ein Ansatz auswertbar). Die Anfangskonzentration an Nitrit betrug 0,3 mM. Die Kurven des Nitritverbrauchs sind in Abbildung 27 dargestellt.

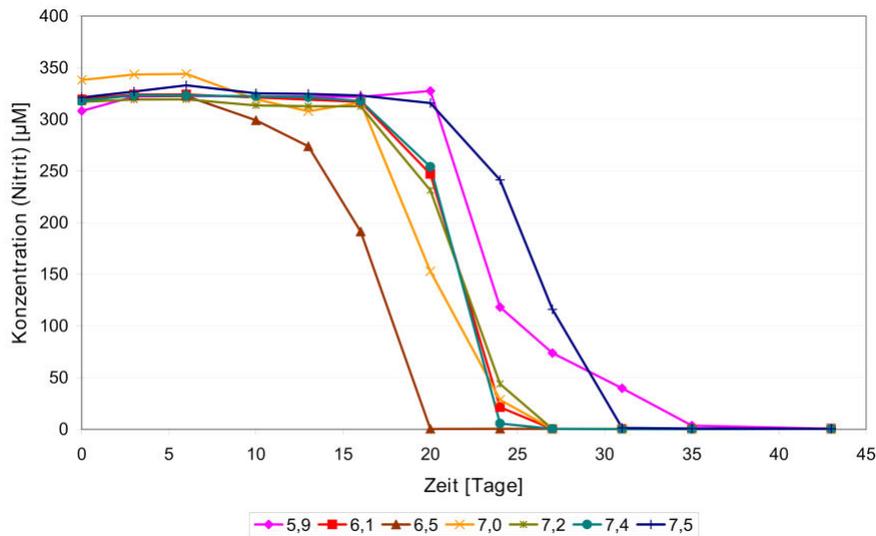


Abbildung 27: pH-Optimum einer Anreicherung von *Candidatus Nitrotoga arctica* (6680) ermittelt unter Verwendung von Medium I ohne Puffer. Mittelwerte aus zwei Parallelen (Ausnahmen pH 5,9 und 6,5).

Nach 20 Tagen konnte erstmals in dem Ansatz mit pH 6,5 kein Nitrit mehr nachgewiesen werden. Während die Kurven der Ansätze der pH-Werte 6,1 bis 7,4 nahezu identisch sind, weist derjenige bei pH 6,5 ein deutlich schnelleres Wachstum auf. Bei pH-Werten von 5,9 bzw. 7,5 ist das Wachstum verzögert. Die resultierende Kurve des pH-Optimums ist in Abbildung 28 dargestellt. Als Berechnungsgrundlage diente die Differenz zwischen Tag 16 und 24 bzw. für pH 6,5 zwischen Tag 16 und 20 geteilt durch die Anzahl der entsprechenden Tage.

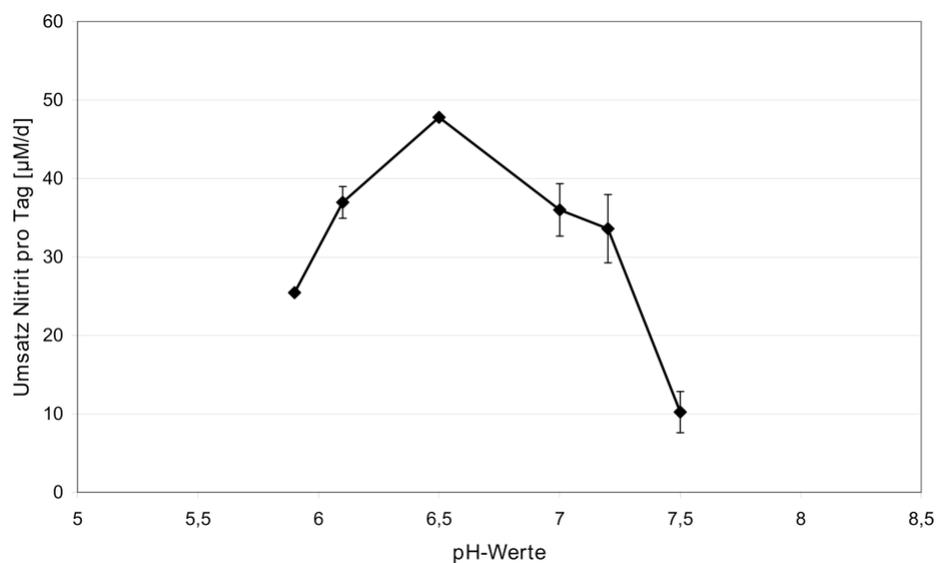


Abbildung 28: pH-Optimum einer Anreicherung von *Candidatus Nitrotoga arctica* (6680) bei 10 °C ermittelt unter Verwendung von Medium I ohne zusätzlichen Puffer.

Das pH-Optimum der Anreicherungskultur von *Candidatus Nitrotoga arctica* (6680) lag bei pH 6,5 mit 48 μM pro Tag. Oberhalb eines pH-Wertes von 7,1 wurde das Wachstum dieser Kultur gehemmt. Dieses Ergebnis zeigt, dass sich der künstlich erniedrigte pH-Wert von 6,8 in der Süßwasser-Aquakultur HW wahrscheinlich positiv auf das Vorkommen von Bakterien der Gattung *Candidatus Nitrotoga* auswirkt.

Zur Bestimmung inwieweit sich Bakterien der Gattung *Nitrospira* an den erniedrigten pH-Wert der Süßwasser-Aquakulturanlage HW angepasst haben, wurden je zwei NOB-Anreicherungen (10 °C, Medium I und IV; 17 °C, Medium I und IV) mit einem Inokulum einer gut wachsenden NOB-Kultur dieser Anlage beimpft. In einer statistischen Auswertung von etwa 40 Klonen pro Ansatz konnte gezeigt werden, dass zwei unterschiedliche Vertreter von *Nitrospira* aus Cluster I in der Anlage vorkommen. Ein Vertreter (HW_10n) mit einer Sequenzähnlichkeit zu *N. defluvii* von 99,1 % ließ sich eher im neutralen Medium bei 10 °C nachweisen (zu ca. 10 %), während der andere jedoch (HW_17s, 99,7 % Sequenzsimilarität zu *N. defluvii*) in sehr viel höherer Anzahl von etwa 20 % im acidem Medium mit pH 6 bei 17 °C wuchs. In den beiden anderen Ansätzen konnten im Vergleich wesentlich weniger Klone der Gattung *Nitrospira* zugeordnet werden.

4.4.2 Einfluss des erhöhten Mangangehaltes

Um zu klären, ob der erhöhte Mangangehalt im Wasser der Aquakulturanlage HW sich positiv auf das Wachstum von *Nitrospira* und *Candidatus Nitrotoga* auswirkt, wurden folgende Konzentrationen an Mangan an der Reinkultur *N. defluvii* und der Anreicherung 6680 (*Candidatus Nitrotoga arctica*) getestet: 0,2 μM (wie im Medium I), 4,9 μM (wie in der Aquakulturanlage) und 49 μM (als zehnfache Konzentration). Der Nitritverbrauch wurde in drei Parallelen analysiert. Für die Kultur 6680 sind die Kurven des Umsatzes an Nitrit und der stöchiometrischen Bildung von Nitrat von dem jeweils schnellsten Ansatz in Abbildung 29 dargestellt. Die Mittelwerte der Parallelen wiesen die gleiche Tendenz auf, zeigten aber einen geringeren Unterschied.

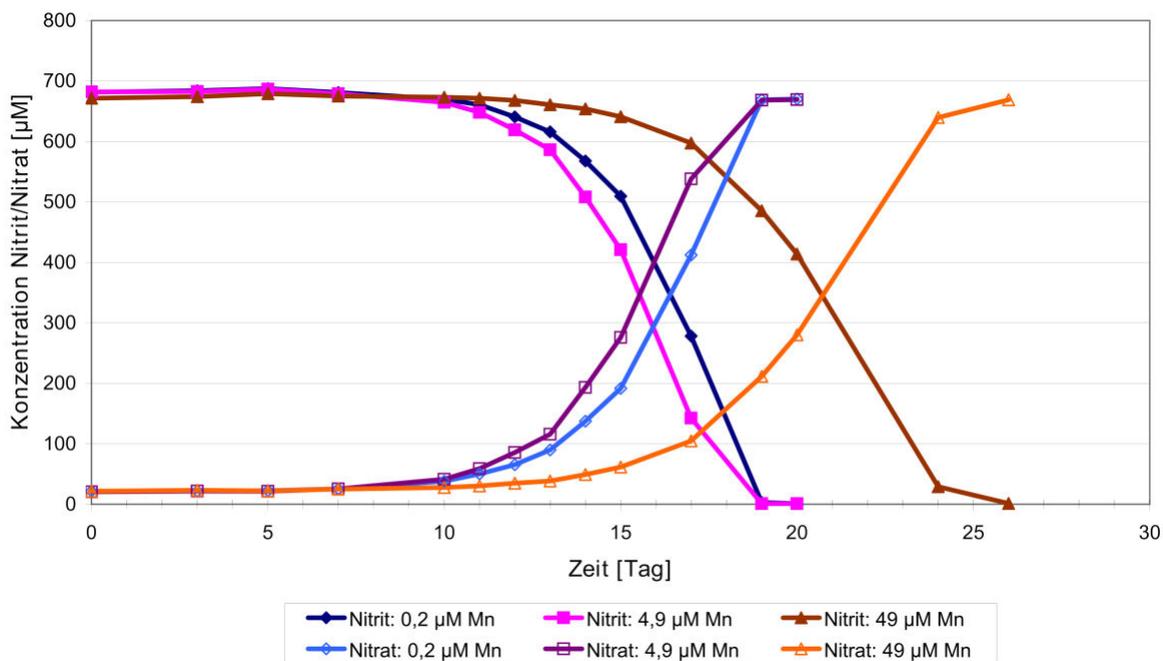


Abbildung 29: Kurven des Nitritverbrauchs und der Nitratbildung einer Anreicherungskultur von *Candidatus Nitrotoga arctica* (6680) bei verschiedenen Mangankonzentrationen. Dargestellt ist jeweils der schnellste Ansatz von drei Parallelen.

Berechnungen der Steigungen zwischen Tag 15 und 17 ergaben, dass bei einer Konzentration von 0,2 µM Mangan die Anreicherung von *Candidatus Nitrotoga* (6680) 116 µM Nitrit pro Tag oxidierte, bei 4,9 µM waren es 139 µM Nitrit pro Tag. Eine Konzentration von 49 µM Mangan hemmte das Wachstum der Kultur 6680 erheblich. Bei diesem Mangangehalt setzte die Anreicherung von *Candidatus Nitrotoga arctica* im genannten Zeitraum nur 22 µM Nitrit pro Tag um. Demnach wirkt sich anscheinend eine leicht erhöhte Konzentration an Mangan positiv auf das Wachstum von *Candidatus Nitrotoga* aus. Dieser fördernde Einfluss ist jedoch nicht unbegrenzt zu steigern, da eine im Vergleich zum Brunnenwasser der Aquakulturanlage zehnfache Konzentration an Mangan die Wachstumsgeschwindigkeit stark hemmt.

Für *N. defluvii* konnte keine Änderung der Wachstumsgeschwindigkeit bei der leicht erhöhten Mangankonzentration von 0,49 µM festgestellt werden (Kurven sind nicht gezeigt). Eine zehnfach erhöhte Mangankonzentration im Vergleich zum Brunnenwasser der Aquakultur HW zeigte wie bei der Anreicherung von *Candidatus Nitrotoga* einen stark hemmenden Effekt.

4.5 Die Nitritoxidoreduktase: Untersuchungen zum Schlüsselenzym von *Nitrospira*

4.5.1 Isolierung der Nitritoxidoreduktase (Nxr)

Aus aerob autotroph angezogenen Zellen von *Nitrospira moscoviensis* und *Nitrospira defluvii* wurde das Schlüsselenzym der Nitritoxidation isoliert. Der Zellaufschluss erfolgte für *N. moscoviensis* durch eine Ultraschall-Behandlung (4 x 2 Minuten bei 60 Hz und 50 % Intensität). Diese Methode reichte für *N. defluvii* aufgrund der starken Flockenbildung nicht aus, um die EPS und die darunter befindliche Zellmembran zu zerstören. Daher wurden die Zellen von *N. defluvii* mit einer dreimaligen Behandlung mittels French-Press bei 20.000 bar aufgeschlossen. Der gewonnene Rohextrakt wurde durch Zentrifugation von Zelltrümmern getrennt. Auf einen Zusatz von Detergenzien oder eine Hitzebehandlung wurde verzichtet, da die membranassoziierte Nxr möglichst schonend behandelt werden sollte. Die gewählten Methoden des Zellaufschlusses bewirkten eine ausreichende Ablösung der Nxr von der Cytoplasmamembran. Nach einer Aufkonzentrierung über Filtrationssäulen mit einem Ausschlussvolumen von 5 kDa konnte der zellfreie Extrakt nun mit der FPLC (fast protein liquid chromatography) über 10 Stunden aufgetrennt werden. Die Fraktionen zeigten deutliche Peaks und wurden getrennt aufgefangen. Vor jedem Durchlauf der FPLC mit Pufferwechsel wurde mit einem Standardproteingemisch kalibriert. Die UV-Absorptionsprofile eines FPLC-Durchlaufes von *N. moscoviensis* und *N. defluvii* sind in den Abbildungen 30 und 31 dargestellt.

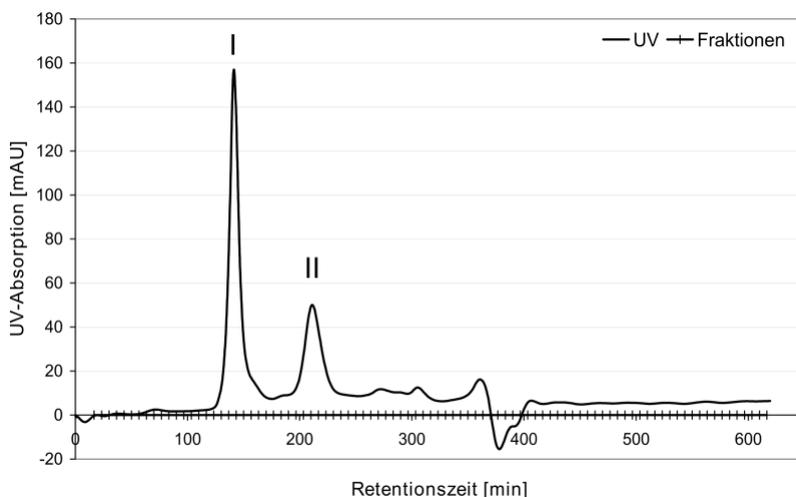


Abbildung 30: UV-Absorptionsprofil eines FPLC-Durchlaufes zur Trennung der Proteine im zellfreien Rohextrakt von *N. moscoviensis*. Peakbezeichnung in römischen Ziffern. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen.

Das UV-Absorptionsprofil des Rohextraktes von *N. moscoviensis* zeigt zwei große Hauptpeaks. Die Retentionszeiten und die Proteingrößen sind in Tabelle 16 aufgeführt. Als Berechnung dienten die Daten aus drei Durchläufen. Die ermittelte Formel aus dem Standarddurchlauf lautet: $y = 8 \cdot 10^7 \cdot e^{(-0,0291 \cdot RT)}$, wobei y die Angabe des ungefähren Molgewichtes in Dalton (Da) ist. Das Bestimmtheitsmaß der Gleichung betrug 0,991. Die Fraktionen des zweiten Peaks waren braun gefärbt. Es wurden jeweils die Fraktionen eines Peaks vereinigt und über eine Filtrationssäule (Ausschlussgröße: 5 kDa) aufkonzentriert. Im Weiteren werden diese gepoolten Fraktionen mit den jeweiligen Peaknummern bezeichnet (z. B. Fraktionen des zweiten Peaks → Fraktion II).

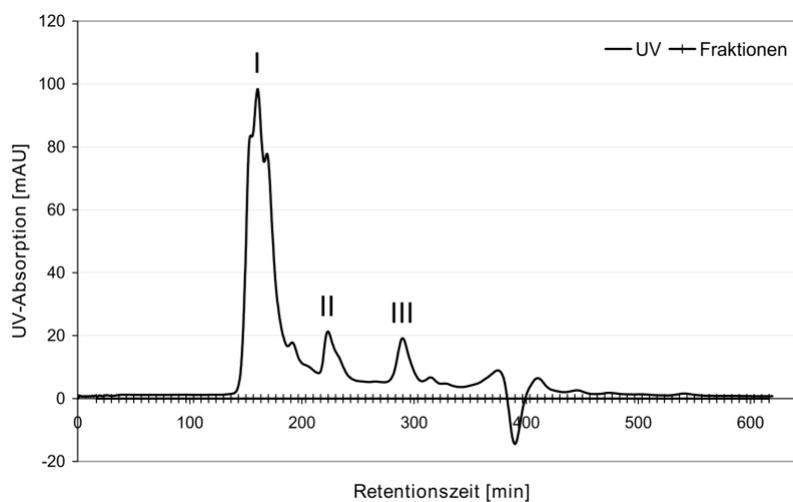


Abbildung 31: UV-Absorptionsprofil eines FPLC-Durchlaufes zur Trennung der Proteine im zellfreien Rohextrakt von *N. defluvii*. Peakbezeichnung in römischen Ziffern. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen.

Die Absorptionsmaxima des Rohextraktes von *N. defluvii* sind ebenfalls in Tabelle 16 aufgeführt. Zur Berechnung der Proteingrößen wurden vier Durchläufe herangezogen. Die zur Grunde liegende Formel aus dem Standarddurchlauf lautet: $y = 9 \cdot 10^7 \cdot e^{(-0,0284 \cdot RT)}$, Bestimmtheitsmaß: 0,988. Bei *N. defluvii* besitzt der erste Peak, detektierbar durch eine geringere Proteinkonzentration, drei Maxima. Diese liegen so eng beieinander, dass nur eine ungefähre Trennung der Peaks erfolgen konnte. Zwei weitere Peaks konnten deutlich voneinander separiert werden. Auch bei *N. defluvii* waren die Fraktionen des zweiten Hauptpeaks bräunlich gefärbt.

Tabelle 16: Berechnung der Proteingrößen von Peaks der Absorptionsspektren von *N. moscoviensis* und *N. defluvii*.

Peak	<i>N. moscoviensis</i>		<i>N. defluvii</i>	
	Retentionszeit [min]	Proteingröße [kDa]	Retentionszeit [min]	Proteingröße [kDa]
Iaa			152,3	1200
Ia	142,2	1279	160,5	948
Ib			168,7	747
II	214,2	158	222,6	165
III	307,6	10	291,8	23
IV	361,3	2	374,1	2

Die Proteingrößen der Fraktionen der zwei untersuchten Reinkulturen von *Nitrospira* ähneln sich zwar, sind aber nicht identisch.

Die ersten Fraktionen von *N. moscoviensis* und *N. defluvii* sind mit einem errechneten Molgewicht von rund 1.279 kDa und 1.200 kDa außerordentlich groß. Auch bei den folgenden Fraktionen kann es sich bei den durch die FPLC-Daten ermittelten Molgewichten nur um einen Zusammenschluss mehrerer Proteine handeln. Auffällig ist bei beiden Reinkulturen das Gewicht der zweiten Fraktion (II) von 158 bzw. 165 kDa. Es konnte durch zusätzliche Untersuchungen nachgewiesen werden, dass es sich hierbei um die gemeinsame Elution der Alpha- und Beta-Untereinheit sowie weiterer kleinerer Proteine handelt.

Zur genaueren Untersuchung der Proteingrößen wurden die Fraktionen beider Reinkulturen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt (zum Beispiel SDS-Gel von *N. defluvii*, Abbildung 32).

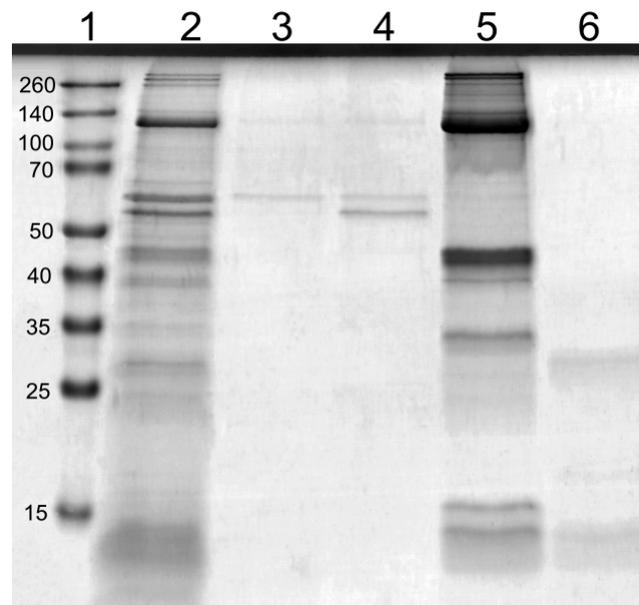


Abbildung 32: Darstellung eines SDS-Polyacrylamidgels nach der Auftrennung des Rohextraktes und der aus der FPLC erhaltenen Fraktionen. Spur 1: Marker (die Größenstandards sind in kDa angegeben), Spur 2: zellfreier Rohextrakt, Spur 3: Fraktion Ia, Spur 4: Fraktion Ib, Spur 5: Fraktion II, Spur 6: Fraktion III.

Zuvor ermittelte Molgewichte aus dem Rohextrakt und der Membranfraktion geben für *N. moscoviensis* folgende Größen an: 130, 85, 66, 62, 58, 46, 34, und 29 kDa für den Rohextrakt und 130, 62, 46, und 29 kDa für die Membranfraktion (SPIECK et al., 1998). Es wurden in dieser Arbeit drei weitere Parallelen (3 SDS-Gele) von *N. moscoviensis* und sechs von *N. defluvii* für die Berechnung der Proteingrößen verwendet. Die Ergebnisse wurden gemittelt und sind in Tabelle 17 gegenübergestellt.

Eine bedeutende Abweichung von den damals erhaltenen Daten stellt das Protein mit einem ungefähren Molgewicht von 62 kDa dar. Dieses Protein war in der aktiven Membranfraktion von Spieck und ihren Kollegen vorhanden, kommt jedoch bei einer Auftrennung mittels FPLC nur in den ersten Fraktionen von *N. defluvii* vor. Des Weiteren kann man davon ausgehen, dass es sich bei den etwas größeren Proteinen in Fraktion Ia und Ib mit etwa 134 kDa nicht um die Alpha-Untereinheit der Nxr handelt. Weder bei *N. moscoviensis* noch bei *N. defluvii* weisen die ersten farblosen Fraktionen (Fraktion I bzw. Ia und Ib) eine Nitritoxidase-Aktivität auf. Dagegen war die bräunlich gefärbte Fraktion II in der Lage, mit dem künstlichen Elektronenakzeptor Chlorat Nitrit zu oxidieren.

Tabelle 17: Übersicht der durch SDS-PAGE ermittelten Proteingrößen. Referenzen aus der Membranfraktion von Spieck und Kollegen (1998) sind mit * markiert. RE: zellfreier Rohextrakt; I – III: FPLC-Fractionen.

Fraktion	<i>N. defluvii</i>		<i>N. moscoviensis</i>	
	Proteingröße [kDa]	Proteingrößen [kDa]	Proteingrößen [kDa]	Proteingrößen [kDa] ^{1,2}
RE	121	124	130 *	
		84	85	
		68	66	
	62	62	62 *	
	56	56	58	
	46	46	46 *	
	38			
	32	32	34	
	28	28	29 *	
	27	27		
		25		
		16	16	
		14		
Ia	134			
	61			
Ib	134	56		
	61			
	56			
II	122	118		
	46	46		
	38			
	32	32		
		25		
	16	16		
III	14			
	28			
	14			

1) Ehrich et al., 1995; 2) Spieck et al, 1998;

Die spezifische Aktivität der Rohextrakte, der zellfreien Extrakte und der zweiten Fraktion ist in Tabelle 18 dargestellt. Zur Ermittlung der Aktivitäten wurden je drei Parallelen herangezogen. Für *N. moscoviensis* gelang eine Anreicherung der spezifischen Nitritoxidase-Aktivität um den Faktor 9, für *N. defluvii* um den Faktor 23.

Tabelle 18: Nitritoxidase-Aktivität des Rohextraktes und der Fraktion II von *N. moscoviensis* und *N. defluvii*. Als künstlicher Elektronenakzeptor diente Chlorat.

<i>Nitrospira</i>	Fraktion	Konzentration an Protein [mg/ml]	Nitritoxidase-Aktivität [units] ¹	Spezifische Nitritoxidase-Aktivität [units/mg]	Anreicherung
<i>moscoviensis</i>	Rohextrakt	4,50	13,70	3,04	-
	zellfreier Extrakt	1,31	23,73	18,04	6
	Fraktion II	0,86	23,02	26,80	9
<i>defluvii</i>	Rohextrakt	1,11	0,73	0,73	-
	zellfreier Extrakt	0,46	0,67	1,66	2
	Fraktion II	0,36	5,56	15,98	23

1) units: $\mu\text{mol} \cdot (\text{ml} \cdot \text{min})^{-1}$

4.5.2 Identifizierung der Gamma-Untereinheit der Nxr

Zur Identifizierung der Gamma-Untereinheit der Nxr aus *N. defluvii* wurden die zwei nächst größeren Banden unterhalb der Beta-Untereinheit ausgeschnitten (etwa 38 kDa und 32 kDa) und mittels Im-Gel-Verdau (mit Trypsin) und anschließender LC-ESI-Ionenfallen MS/MS und MASCOT-Datenbanksuche analysiert. In der Fraktion II von *N. defluvii* sind fünf Proteine, die nach Sebastian Lücker zum Nitrit-Metabolismus gehören (LÜCKER, 2010) identifiziert worden (Tabelle 19).

Tabelle 19: Gene aus dem Genom von *N. defluvii*, die im Nitrit-Metabolismus involviert sind (nach LÜCKER, 2010). In Fraktion II nachgewiesene Proteine sind **fett** hervorgehoben.

Bezeichnung	NCBI - Eintrag	Aminosäuren-Anzahl	Enzymklasse	NIDE ¹
Nxr, putative Membran-Untereinheit	CBK40668	275		0904
nirA Ferredoxin-Nitritreduktase	CBK41117	531	1.7.7.1	1367
nirK Kupferhaltige-Nitritreduktase (NO-Bildung)	CBK42243	323	1.7.2.1	2534
NxrB1 Nxr Beta-Untereinheit	CBK42927	429	1.7.99.4	3236
NxrA1 Nxr Alpha-Untereinheit	CBK42928	1146	1.7.99.4	3237
NxrA2 Nxr Alpha-Untereinheit	CBK42946	1147	1.7.99.4	3255
NxrB2 Nxr Beta-Untereinheit	CBK42947	429	1.7.99.4	3256
Nxr, putative Membran-Untereinheit	CBK42961	280		3271
Nxr, putative Membran-Untereinheit	CBK42968	317		3278
Putatives Chaperon Protein	CBK42969	325		3279
Nxr, putative Membran-Untereinheit, Cytochrom c	CBK42982	594		3293
nirK Kupferhaltige-Nitritreduktase (NO-Bildung)	CBK43917	321	1.7.2.1	4252

1) NIDE: *Nitrospira defluvii*, Nummerierung der Gene

Die nachgewiesene putative Gamma-Untereinheit hat eine Aminosäureanzahl von 317 und eine theoretische Molekülmasse von 34.340 Da. Praktisch wurde dieses Protein in der zweiten Bande unterhalb der Beta-Untereinheit der Nxr mit bei etwa 32 kDa gefunden. Nicht nachweisbar waren sowohl die anderen drei putativen Gamma-Untereinheiten der Nxr (CBK40668, CBK42961 und CBK42982) als auch die weiteren in Tabelle 19 aufgeführten Proteine, die im Nitrit-Metabolismus involviert sein sollen. Allerdings konnten durch die hohe Sensitivität der gewählten Methode folgende weitere Proteine in den ausgeschnittenen Banden von *N. defluvii* eindeutig identifiziert werden:

Bande bei ca. 38 kDa:

Score	Masse [Da]	emPAI		
539	41021	1,17	Serin-Glyoxylat-Transaminase	gil302038733
280	40082	0,61	Choris mat-Synthase	gil302036778
238	44208	0,54	Cystein-Desulfurase	gil302039296
205	41408	0,47	Acetyl-Coa Acetyltransferase	gil302038413
160	40930	0,36	Fructose-1,6-bisphosphatase, Klasse V	gil302037354
142	38060	0,28	N-Acetyl- γ -Glutamyl-Phosphat-Reduktase	gil302038064
108	42351	0,16	UDP-N-Acetylglucosamin-2-Epimerase	gil302038297
107	63701	0,11	30S ribosomales Protein S1	gil302035807

Bande bei ca. 32 kDa:

Score	Masse [Da]	emPAI		
345	69367	0,38	Chaperon Protein DnaK	gil302037063
189	37134	0,41	putative Serin-Protease	gil302036781
144	31013	0,11	Dihydrodipicolinat-Synthase	gil302035868
140	35166	0,31	Hypothetisches Protein NIDE0192	gil302035580
133	16091	0,47	Cyanat-Hydratase	gil302036719.

Mit angegeben ist neben der theoretischen Masse der Score als Wahrscheinlichkeit nach dem MASCOT-Algorithmus und der emPAI. Beim so genannten PAI (Protein Abundance Index) wird kalkuliert, wie viele einzigartige Peptide pro Protein theoretisch gemessen werden können, unter Ausschluss von Peptiden mit überlesenen Schnittstellen. Die tatsächliche Zahl an gemessenen Peptiden wird dann durch die theoretische Anzahl dividiert und ergibt den besagten PAI. In der Praxis wird heutzutage der exponentiell modifizierte Index emPAI verwendet (ISHIHAMA et al., 2005).

Die identifizierte Fructose-1,6-bisphosphatase, Klasse V in der Bande bei ca. 38 kDa gehört zu einer Gruppe an Fructose-1,6-bisphosphatasen, die in thermophilen Archaeen und im hyperthermophilen Bakterium *Aquifex aeolicus* nachgewiesen worden ist (RASHID et al., 2002). Die Cyanat-Hydratase, die in der Bande bei 32 kDa detektiert wurde, vermittelt eine Resistenz gegenüber Cyanat. Sie könnte zur Erschließung einer alternativen Stickstoffquelle dienen, indem sie Cyanat zusammen mit Bikarbonat zu Ammonium und Kohlenstoffdioxid umsetzt.

5 Diskussion

5.1 Die Diversität der Gattung *Nitrospira*

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Diversität von *Nitrospira* und ihr Potenzial zur Anpassung an ungünstige Umweltbedingungen anhand von Laborkulturen untersucht werden. Die bisher zur Verfügung stehenden Daten von *Nitrospira*-ähnlichen Sequenzen stammten hauptsächlich aus Umweltproben, die durch kultivierungsunabhängige Methoden gefunden worden sind. Zu Beginn dieser Arbeit beschränkte sich die Anzahl an Reinkulturen der Gattung *Nitrospira* auf zwei: *N. marina* aus dem Nordwest-Atlantik und *N. moscoviensis* aus einem Moskauer Heizungsrohr (WATSON et al., 1986; EHRICH et al., 1995). Lebedeva und Kollegen gelang es, zwei neue Reinkulturen zu erhalten: *Candidatus N. bockiana* ebenfalls aus einem Moskauer Heizungsrohr und *N. calida* aus einer geothermalen Quelle in Südost-Russland (LEBEDEVA et al., 2008; LEBEDEVA et al., 2011). Erst kürzlich konnte ein zweiter mariner Vertreter isoliert werden: *Ecomares 2.1* aus dem Biofilter einer Aquakulturanlage für Meeresfische (KEUTER et al., 2011). Ein Ziel dieser Arbeit war es, die zur Verfügung stehenden Kulturen von *Nitrospira* noch weiter anzureichern, um möglichst weitere Reinkulturen zu erhalten. So gelang es, *N. defluvii* erfolgreich von seinen Begleitorganismen zu trennen und physiologisch zu charakterisieren (siehe Abschnitt 5.2).

In dieser Arbeit standen über 50 Kulturen mit Nitrit-oxidierenden Bakterien zur Verfügung. Durch die Nutzung selektiver flüssiger Mineralmedien konnten sie weiter angereichert und molekularbiologisch untersucht werden. Somit wurde der bisher nahezu ausschließlich über klonierte 16S rRNA Gensequenzen definierte Stammbaum von *Nitrospira* mit phänotypischen Daten belegt. Dabei stellte sich heraus, dass Vertreter der Gattung *Nitrospira* weit verbreitet sind und sowohl in moderaten als auch extremen Lebensräumen vorkommen. Es wurde in dieser Arbeit *Nitrospira* in Kulturen aus Permafrost beeinflussten Böden der Insel Samoylov genauso wie aus heißen Quellen der Baikalsee-Riffzone und des Yellowstone Nationalparks nachgewiesen. Bakterien der Gattung *Nitrospira* besiedeln sowohl trockene Gesteine (Steinplättchen) und Wüstenböden in Namibia und Südafrika als auch marine und Süßwasser-Habitats.

In Kulturen, die aus der Movile-Höhle in Rumänien gewonnen worden sind, konnten Bakterien der Gattung *Nitrospira* erfolgreich angereichert werden. Dort sind unter dem niedrigen Sauerstoffgehalt *Nitrospira*-ähnliche Bakterien neben möglichen Vertretern von *Candidatus Nitrotoga* verantwortlich für den zweiten Schritt der Nitrifikation (CHEN et al., 2009). In Assoziation zu marinen Schwämmen gilt *Nitrospira* sowohl in Anreicherungen als auch *in situ* als dominierende NOB (WEBSTER et al., 2009; KAMKE et al., 2010; RADAX et al., 2012). Somit ist *Nitrospira* auch in vielen moderaten und extremen Lebensräumen der Schlüsselorganismus der Nitritoxidation (JURETSCHKO et al., 1998; BARTOSCH et al., 2002; SPIECK und BOCK, 2005; DAIMS et al., 2006; GIESEKE et al., 2006; LEBEDEVA et al., 2011; SWANNER und TEMPLETON, 2011).

5.1.1 Phylogenetische Untersuchungen auf Grundlage von 16S rRNA Gensequenzen

Zur Untersuchung der Diversität an Nitrit-oxidierenden Bakterien von Kulturen ist die DGGE-Technik unter Verwendung des Eubakterien-Primersets EUB341F+GC/EUB907R mit entsprechenden Referenzen für eine Übersicht nützlich. Mit DGGE-Analysen, die spezifisch für die Gattung *Nitrospira* sind, kann im Weiteren die Anzahl an unterschiedlichen Vertretern in derselben Kultur dieser Gattung abgeschätzt werden. Dafür eignen sich die semispezifischen Primersets Eub341F+GC/Nsp1158R und Eub341F+GC/Nsp662R. Das zuletzt genannte Primerpaar wurde schon zur Analyse von *Nitrospira*-ähnlichen Bakterien aus moderat thermophilen Habitaten erfolgreich eingesetzt (ALAWI, 2003). Durch die Kombination eines spezifischen Primers mit einem eubakteriellen ist es wahrscheinlicher, auch unbekannte Vertreter mit abweichenden Sequenzen auf den konservierten Bindungsstellen der Primer zu erfassen (ALAWI, 2007). Es hat sich jedoch gezeigt, dass der Unterschied im Schmelzverhalten der DNA von Bakterien der Gattung *Nitrospira* aus Cluster I und II sehr ähnlich ist. Um nah verwandte *Nitrospira*-ähnliche Bakterien genauer zu untersuchen, ist demnach die DGGE-Technik nur bedingt verwendbar. Der Einsatz des Primers Nsp60-k-dgF+GC ist für eine Untersuchung mittels DGGE nicht sinnvoll, da sich pro Vertreter von *Nitrospira* bis zu drei Banden bilden.

Für die Nachweise von *Nitrospira*, *Candidatus Nitrotoga* und *Nitrobacter* in Laborkulturen haben spezifische PCRs mit den drei Primerpaaren Nsp60-k-dgF/Nsp1158R, Ntoga122F/Ntoga1422R und Nb1000gF/DegR gute Ergebnisse geliefert. Für eine Untersuchung von Biofilmen und Naturproben sind allerdings andere Primersets besser

geeignet (siehe Abschnitt 5.4). Im Anschluss an eine spezifische PCR ist häufig eine direkte Sequenzierung der aufgereinigten Amplifikate von *Nitrospira* und *Candidatus Nitrotoxa* mit relativ langen 16S rRNA Genfragmenten möglich. Für phylogenetische Analysen wurden dennoch Vollsequenzen relevanter *Nitrospira*-Stämme durch Klonierung gewonnen.

Erst kürzlich wurde die These aufgestellt, dass die Zuordnung der 16S rRNA Gensequenzen von *Nitrospira*-ähnlichen Bakterien habitatspezifisch wäre (DAIMS et al., 2011). Ein solcher Zusammenhang konnte in dieser Arbeit widerlegt werden. Die Zusammensetzung der Untergruppen steht in keiner direkten Korrelation mit den Umweltbedingungen der jeweiligen Habitate. Ausnahmen bilden einzig die Cluster IV und VI. In Cluster IV stammen bis jetzt alle *Nitrospira*-ähnlichen Bakterien aus marinen Lebensräumen. Ein umgekehrter Rückschluss, dass nur in Cluster IV marine Organismen vorkommen, kann jedoch nicht aufgestellt werden. Erst kürzlich wurden Sequenzen von Mitgliedern der Gattung *Nitrospira* in der Klonbibliothek des marinen Kaltwasserschwammes *Tentorium semisuberites* mit einer Sequenzsimilarität von 94,2 % zu *Nitrospira moscoviensis* dem Cluster II zugeordnet (RADAX et al., 2012). In Cluster VI fallen bislang nur moderat thermophile Stämme von *Nitrospira*. Auch die Aussage über diese Zuordnung lässt sich nicht umkehren. Die 16S rRNA Gensequenzen moderat thermophiler Vertreter der Gattung *Nitrospira* zählen zu unterschiedlichen Clustern. Die Anreicherung Ga3a aus der Garga-Quelle konnte bislang in keine Untergruppe von *Nitrospira* eingeordnet werden, während die Anreicherung GaII aus demselben Habitat eindeutig zu Cluster VI zählt (LEBEDEVA et al., 2011). Auch die beiden Klone aus der heißen Quelle Bor Khlueng in Thailand PK287 und PK350 weisen nur eine Sequenzähnlichkeit von 94 % zu *N. calida* auf und sind zurzeit noch keinem Cluster zuzuordnen (KANOKRATANA et al., 2004).

Zur feineren verwandtschaftlichen Abgrenzung *Nitrospira*-ähnlicher Bakterien wurde vorgeschlagen, das Cluster II in zwei Bereiche zu unterteilen (FREITAG et al., 2005). Interessant ist, dass die *Nitrospira*-Anreicherung LD1236, die in dieser Arbeit keiner Untergruppe zugeordnet werden konnte, eine hohe Sequenzähnlichkeit von fast 99 % zu der im phylogenetischen Baum von Freitag erwähnten Sequenz AF293010 aufweist und damit in die zweite postulierte Untergruppe des Clusters fällt. Es sind demnach noch weitere Untersuchungen notwendig, um die Taxonomie der bisher bekannten Cluster zu bestätigen oder zusätzliche Unterteilungen mit genügend Sequenzdaten zu belegen.

5.1.2 NxrB als phylogenetischer Marker

Die Analyse der 16S rRNA Gene zählt jeher zu den erfolgreichsten Methoden um die mikrobielle Diversität in Umweltproben zu erfassen (FOX et al., 1980). Jedoch lassen diese phylogenetischen Verhältnisse der Mikroorganismen nur bedingt Rückschlüsse auf ihre Physiologie zu. Funktionelle Markergene, die für wichtige biochemische Prozesse verantwortlich sind, ermöglichen eine gezielte Untersuchung von Mikroorganismen mit speziellen physiologischen Eigenschaften. So beruht das Verständnis der verwandtschaftlichen Verhältnisse innerhalb der Gruppe der AOB auf vergleichende Sequenzanalysen des 16S rRNA Gens und des *amoA* Gens (zum Beispiel AVRAHAMI und CONRAD, 2003). Das Letztgenannte codiert für die Alpha-Untereinheit des funktionellen Schlüsselenzyms der Ammoniak-Monooxygenase (Amo) (ROTTTHAUWE et al., 1997). Bei den Nitrit-oxidierenden Bakterien bietet sich das Gen der Beta-Untereinheit der Nxr (*nxB*) an. Zwar kommt das Gen der NxrB zum Teil ähnlich wie bei der AmoA in mehreren Kopien innerhalb einer Art vor (zum Beispiel bei *N. defluvii*), doch sind die Sequenzunterschiede nach heutigem Kenntnisstand zu vernachlässigen (LÜCKER et al., 2010). Immunologische Experimente mit den monoklonalen Antikörpern Hyb 153-3 bestätigen diese Annahme, da die NxrB durch diese Antikörper sogar gattungsübergreifend detektiert werden kann (BARTOSCH et al., 1999). Außerdem ist es bei der Gattung *Nitrobacter* möglich, phylogenetische Bäume auf Grundlage der Beta-Untereinheit der Nxr zu erstellen, wobei sie die 16S rRNA basierte Phylogenese der nah miteinander verwandten Vertreter der Gattung widerspiegeln (VANPARYS et al., 2007). Auf Grundlage der NxrA ist es allerdings nicht möglich, die heterogene Gruppe an NOB mit einem Primerset zu erfassen (POLY et al., 2008).

In dieser Studie wurde der Wert des *nxB* Gens als phylogenetischer Marker für *Nitrospira* untersucht. Hierfür wurde die Wechselbeziehung der 16S rRNA und der *nxB* Phylogenese anhand von Kulturen von *Nitrospira* analysiert. Gensequenzen der NxrB in öffentlichen Datenbanken sind noch nicht ausreichend vorhanden. Es wurde daher eine verwandtschaftliche Untersuchung von 16 bekannten und neu beschriebenen Kulturen durchgeführt, um einen vertieften Einblick in die Diversität der Gattung *Nitrospira* zu gewinnen. Im Anschluss wurde der resultierende Stammbaum mit den Umweltbedingungen verglichen, aus denen die Kulturen stammen, um mehr über die mögliche Korrelation zwischen den klimatischen Standortfaktoren und der Taxonomie von *Nitrospira*-ähnlichen Bakterien zu lernen.

Die Gattung *Nitrospira* ist abstammungsgeschichtlich eine sehr alte Gruppe, deren Phylum tief im Stammbaum der Bakterien verwurzelt ist (EHRICH et al., 1995). Es ist daher nicht überraschend, dass die Verwandtschaftsverhältnisse basierend auf der 16S rRNA und jene, die Sequenzen der NxrB zur Grundlage haben, zum Teil heterogen sind und sich unterscheiden. Vergleichbar ist diese Diskrepanz mit der phylogenetischen Zuordnung auf Basis des *amoA* Gens, welches zu der 16S rRNA eine alternative aber nicht identische Analyse der Verwandtschaftsverhältnisse der AOB erlaubt (PURKHOLD et al., 2000). Maixner hat zwar eine hohe Übereinstimmung zwischen der Zuordnung auf Basis der 16S rRNA Gene und der Gensequenz der NxrB aufgezeigt (2009), doch wurden in jener Arbeit pro Cluster nur jeweils ein Habitat betrachtet: in Cluster I sind nur Sequenzen aus Belebtschlämmen dokumentiert (Ausnahme: Teich mit Buntbarsch-Besatz), in Cluster II nur Bodenproben. Die Feststellung der Homologie zwischen den beiden phylogenetischen Bäumen wird daher eingeschränkt. Zusammen aber werden künftig die 16S rRNA und das Markergen *nxrB* einen robusten phylogenetischen Rahmen für eine molekulare Klassifizierung darstellen.

Aus ökologischer Sicht stellte sich die Frage, ob sich mit Hilfe der verwandtschaftlichen Analyse des Gens der NxrB Rückschlüsse auf die physiologischen Eigenschaften ableiten lassen. Phylogenetische Stammbäume der Aminosäuresequenz der Beta-Untereinheit der Nxr von Mitgliedern der Gattung *Nitrospira* unter Verwendung des Primersets NxrB169F/NxrB638R geben Hinweise auf markante physiologische Eigenschaften, wie die Anpassung an Trockenheit. Bakterien von *Nitrospira*, die aus den extrem trockenen Habitaten einer Gesteinsprobe (Lua 16), der Wüstenbodenoberfläche mit Biokruste (Namibia 80) und der Biokruste auf Wüstenboden (Südafrika 83) stammen, bildeten im NxrB basierten Baum eine distinkte Untergruppe.

5.2 Isolierung von *Nitrospira defluvii*

Zu Beginn dieser Arbeit war *Candidatus Nitrospira defluvii* aus dem Hamburger Klärwerk (Dradenau) zu 86 % in der Kultur angereichert. Diese Kultur wie auch eine frühere 40 %-ige Anreicherung reichten aus, Teile des Genoms zu sequenzieren (MAIXNER et al., 2008). Durch eine Kombination aus klassischer Mikrobiologie und dem Wissen aus molekularen Analysen konnten die letzten Begleitorganismen eliminiert werden. Das dafür eingesetzte Acriflavin in der Endkonzentration von 21 µg je 100 ml Kultur bewirkte die effektive Hemmung anderer Bakterien in der bereits sehr hoch angereicherten Kultur von *N. defluvii*.

Künftig wird die Erkenntnis, dass mit Hilfe des Antiseptikums Acriflavin Begleitorganismen von Nitrit-oxidierenden Bakterien im Wachstum gehemmt werden, dazu beitragen, diese NOB schneller isolieren zu können. Wachstumsversuche zeigen, dass auch Vertreter der Gattung *Nitrobacter* in Gegenwart von Acriflavin kultiviert werden können (persönliche Mitteilung von Boris Nowka, Doktorand der Universität Hamburg). Ob allerdings die vermutete Resistenz gegen Acriflavin tatsächlich auf der Wirkung eines aktiven Transportsystems beruht, der Antibiotika, organische Lösungsmittel bzw. Farbstoffe effektiv ausschleust (LÜCKER et al., 2010) oder die Hemmung des Wachstums nur Folge der sehr geringen Wachstumsgeschwindigkeit der NOB im Vergleich zu den Begleitorganismen ist, bleibt zu erforschen.

Anhand der nun zur Verfügung stehenden Reinkultur von *Nitrospira defluvii* wurden weitere Versuche wie die Erstellung von Wachstumskurven ermöglicht. So konnte der Frage nachgegangen werden, ob *N. defluvii* wie *Nitrobacter* ausgewählte organische Bestandteile nutzen kann. Eine Mixotrophie konnte zwar für keine der moderat thermophilen Arten nachgewiesen werden (LEBEDEVA et al., 2008, LEBEDEVA et al., 2010), für *N. marina* und *N. sp.* Ecomares 2.1 jedoch wurde ein besseres Wachstum unter Verwendung mixotropher Medien beschrieben (WATSON et al., 1986; KEUTER et al., 2011). Die Reinkultur *N. defluvii* kann durch Zugabe von Pyruvat schneller wachsen. Ein alleiniger Zusatz von anderen einfachen Kohlenstoffverbindungen fördert das Wachstum nicht, obwohl das Genom von *N. defluvii* für eine lösliche Formiat-Dehydrogenase (S-FDH) codiert (LÜCKER et al., 2010). Die S-FDH katalysiert die Oxidation von Formiat zu CO₂ mit NAD⁺ als Elektronenakzeptor. Daher wurde vermutet, dass *N. defluvii* Formiat als Substrat zur Energiegewinnung nutzen kann. Es sind demnach weitere umfangreiche Arbeiten notwendig, um die Wissenslücke zu *Nitrobacter* (STARKENBURG et al., 2010) schließen zu können. Ein heterotrophes Wachstum kann noch nicht ausgeschlossen werden, da Versuche zum gemeinsamen Einsatz von zusätzlichen Kohlenstoff- und Stickstoffquellen fehlen.

5.3 Physiologie von *Nitrospira*

Zur Untersuchung der Anpassung an den jeweiligen Lebensraum mit zum Teil extremen Standortfaktoren, wie Trockenheit, hohe Temperatur oder saurer pH-Wert, wurden Kulturen von *Nitrospira* physiologisch charakterisiert, um einen möglichen Selektionsvorteil gegenüber anderen Nitritoxidanten zu erkennen.

5.3.1 Bildung von extrapolymeren Substanzen unter Stresseinwirkung

Nitrospira-ähnliche Bakterien besitzen eine hohe Tendenz zur Bildung von Mikrokolonien, die als Flocken sichtbar sind (SPIECK und LIPSKI, 2011). Extrapolymeren Substanzen (EPS) bieten den NOB die Möglichkeit zur Bildung von stabilen Mikrokolonien. Zudem besitzt die EPS-Matrix sorptive Eigenschaften und kann deshalb auch gelöste und partikuläre Nährstoffe akkumulieren (FLEMMING und WINGENDER, 2010). Gerade in einer oligotrophen Umgebung liegt darin ein entscheidender Vorteil für das Leben in einem engen Zusammenhalt. Inwieweit die EPS selbst eine Nährstoffreserve darstellen, ist umstritten. Die EPS kann aufgrund ihrer Komplexität nur bedingt biologisch abgebaut werden, so dass sie in Mangelsituationen nur in einem geringen Umfang als Nährstoff dienen kann. Zumindest liegt auf Grundlage der Ergebnisse der Hungertests die Vermutung nahe, dass die EPS als Speicher für Stoffwechselprodukte dient, und somit zum Überleben langer Hungerphasen von über einem Jahr beiträgt. Da Zellen von *Nitrobacter* nicht so ausgeprägt zur Bildung von EPS neigen, müssen zusätzlich andere Mechanismen für das Überstehen von substratfreier Lagerung verantwortlich sein. Wahrscheinlich dient die Akkumulation von Speicherstoffen, wie zum Beispiel Glycogen, sowohl in *Nitrobacter* als auch in *Nitrospira* als Nahrungsreserve (BOCK, 1976; LÜCKER et al., 2010).

Wurden Bakterien von *Nitrospira defluvii* hohen Nitritkonzentrationen oder dem Antiseptikum Acriflavin ausgesetzt, so konnte eine vermehrte Bildung von EPS beobachtet werden. Dieses Phänomen tritt vermutlich aufgrund der Schutzwirkung der EPS gegenüber schädlichen anorganischen und organischen Substanzen im Allgemeinen auf (FLEMMING und WINGENDER, 2010). Für Nitrit-oxidierende Bakterien der Gattung *Nitrospira* wurde die außergewöhnliche Schutzwirkung der EPS-Matrix unter extremen physikalischen und chemischen Einflüssen beschrieben (LARSEN et al., 2008). Dieser umfassende Schutz durch die EPS könnte auch ein Grund sein, warum es möglich war, bei hohen Salzkonzentrationen von bis zu 20 g/l an NaCl in einem Versuchs-Bioreaktor *Nitrospira*-ähnliche Bakterien zu kultivieren (BASSIN et al., 2012). Der dort beschriebene Vertreter (B21) ist nah verwandt mit *N. moscoviensis* und kann daher nicht dem marinen Cluster IV zugeordnet werden.

Die Flocken von *Nitrospira defluvii*, die durch EPS zusammengehalten werden, sind mit Poren und Löchern durchsetzt. Diese aufgelockerte Struktur ermöglicht wahrscheinlich eine ausreichende Sauerstoff- und Substratversorgung bis in tiefere Schichten der Konsortien (DAIMS et al., 2001). Als Erweiterung der bisher erzielten Ergebnisse wäre die Untersuchung

der Beschaffenheit der EPS nach Hungerphasen, bei Austrocknung oder bei erhöhten Salzkonzentrationen interessant.

Das Vorkommen von Bakterien der Gattung *Nitrospira* in extrem trockenen Habitaten, wie Gesteinen und Wüstenböden, gibt Hinweise zur Fähigkeit der Wasserspeicherung. Zur Anpassung an Lebensräume mit eingeschränkter Wasserverfügbarkeit könnte ebenfalls die Bildung von EPS dienen, da diese zumeist stark hydratisiert sind und Wasser zurückhalten (FLEMMING et al., 2007). Vertreter der Gattung *Candidatus Nitrotoga* besitzen eine im Vergleich zu *Nitrospira* weitaus weniger starke EPS-Matrix und ihr Kolonieverbund ist nur locker assoziiert. Es ist daher anzunehmen, dass dies die Ursache für ein Fehlen von *Candidatus Nitrotoga* in den oberen Schichten der Permafrostböden von Polygonen ist, da im Wall von Polygonen in geringer Tiefe Wassermangel herrscht (KOBABE, 2005). In Polygonzentren dagegen kommt erwartungsgemäß *Candidatus Nitrotoga* vor, da die Wasserverfügbarkeit hier ausreichend ist (KOBABE, 2005).

Ein anderer schützender Mechanismus ist die Produktion oder die Ansammlung von kompatiblen Soluten (zum Beispiel Trehalose, Glycinbetain oder Saccharose). Im Zusammenhang mit Salzstress und Trockenheit wurde eine zunehmende Menge an kompatiblen Soluten in Zellen von *Nitrobacter* gefunden (LIN, 1994). Inwieweit solche Stoffe in Bakterien der Gattung *Nitrospira* vorkommen und damit die Anpassung an salzreiche bzw. trockene Habitate beeinflussen, ist noch ungeklärt.

5.3.2 Anpassung an geringe Sauerstoff- und Substratverhältnisse

In der Umwelt konkurrieren NOB nicht nur mit anderen Organismen des Stickstoffkreislaufs um Nitrit wie zum Beispiel Denitrifizierer und Anammox-Bakterien (VLAEMINCK et al., 2010), sondern auch um Sauerstoff mit heterotrophen Bakterien und AOB (LIU et al., 2008). Zu den überraschenden Ergebnissen dieser Arbeit zählt, dass einige Kulturen von *Nitrospira* im Vergleich zu *Nitrobacter* bei niedrigen Sauerstoffpartialdrücken gut wachsen. Das mikroaerophile Verhalten von *Nitrospira*-ähnlichen Bakterien steht im Einklang mit früheren Beobachtungen, bei denen *Nitrospira* ein maximales Auftreten in der mikroaerophilen Zone von Biofilmen zeigte (OKABE et al., 1999; SCHRAMM et al., 2000). Obgleich die Nitrifikation ein aerober Prozess ist, wurden auch Bakterien der Gattung *Nitrospira* gefunden, die unter anoxischen Bedingungen bestehen können (ALTMANN et al., 2004). Andere

Nitrospira-ähnliche Bakterien kommen zusammen mit Planctomyceten, die eine anaerobe Ammoniakoxidation betreiben, entlang eines Sauerstoffgradienten in einem Reaktorsystem vor (THIRD et al., 2001). Selbst im Gastrointestinaltrakt von Karpfen wurden *Nitrospira*-ähnliche Sequenzen detektiert (VAN KESSEL et al., 2011). Des Weiteren konnte durch die Genomannotation von *N. defluvii* nachgewiesen werden, dass *Nitrospira* Kohlenstoffdioxid nicht wie die anderen nitrifizierenden Bakterien über den Calvinzyklus fixiert, sondern über den reversen Tricarbonsäurezyklus (LÜCKER et al., 2010). Dieser Weg ist typisch für anaerobe bzw. mikroaerophile Bakterien. Diese Fakten erklären, warum es möglich ist, Kulturen von *Nitrospira* auch in geschlossenen Schraubdeckelflaschen mit einem Sauerstoffgehalt von ca. 4 mg/l zu kultivieren wie auch die Kultivierung von *Nitrospira* auf Festmedien unter mikroaerophilen Verhältnissen. Zellen von *Nitrobacter* lysierten unter diesen Bedingungen (SPIECK, unveröffentlichte Ergebnisse). Das Fehlen von Sauerstoffschutzenzymen im Genom von *N. defluvii* gibt zusätzlich Hinweise zur Mikroaerophilie der Gattung *Nitrospira* (LÜCKER, 2010). Anscheinend ist das biochemische System zur CO₂-Fixierung von *Nitrospira* somit effizienter als das anderer Nitrit-oxidierender Bakterien. Es könnte sich daher um eine physiologische Eigenschaft handeln, die die Schlüsselrolle von *Nitrospira* in der Natur erklärt. Die Menge an gelöstem Sauerstoff kann jedoch nicht unbegrenzt erniedrigt werden. Nach den Ergebnissen einer Studie zur Inhibierung des zweiten Schritts der Nitrifikation in einer Abwasserreinigungsanlage tritt eine effektive Hemmung aller NOB bei einem Sauerstoffgehalt von 1,5 mg/l ein (JIANLONG und NING, 2004).

Ähnlich dem Sauerstoffgehalt wird durch ein niedriges Substratangebot das Wachstum von *Nitrospira*-ähnlichen Organismen in den meisten Fällen eher gefördert. Unterstützt wird diese Annahme durch die Untersuchungen zur Kinetik bzw. der Substrataffinität von *Nitrospira* im Vergleich zu *Nitrobacter* (SCHRAMM et al., 1999). Des Weiteren konnte durch Untersuchungen von landwirtschaftlich genutzten Böden die These bestätigt werden, dass *Nitrospira* (K-Strategie) besser mit einer niedrigen Stickstofflast auskommt als *Nitrobacter* (r-Strategie) (ATTARD et al., 2010).

In Bezug auf hohe Substratkonzentrationen sind die marinen Vertreter der Untergruppe IV sehr sensibel (OFF et al., 2010). Ausnahme bildet alleine *Nitrospira sp.* Ecomares 2.1 (KEUTER et al., 2011), der genauso wie *N. defluvii* (Cluster I) auch mit hohen Nitritkonzentrationen bis zu 30 mM wächst. Ein Nitritgehalt über die Toleranzgrenze hinaus hat jedoch zur Folge, dass sich die Lag-Phase extrem ausdehnt (zum Beispiel bei *N. defluvii*

bis zu einem halben Jahr bei 30 mM Nitrit). Es kann demnach davon ausgegangen werden, dass zunächst eine Entgiftung stattfindet, bis die Toleranzgrenze für Nitrit unterschritten wurde.

Diese Punkte erklären die erfolgreiche Verbreitung und Diversität innerhalb der Gattung *Nitrospira* in Umweltgebieten, in denen die Substrat- und Sauerstoffkonzentration zu niedrig für proteobakterielle NOB ist.

5.3.3 Anpassung an ungünstige pH- und Temperaturbedingungen

Ein Vertreter der Gattung *Nitrospira* aus einem sauren Versuchsreaktor in Israel, der eng mit *N. defluvii* verwandt ist, konnte in einer Mischkultur mit *Nitrobacter* unter Verwendung von acidem Medium nicht angereichert werden. Bei pH-Werten unter 6 setzte sich langfristig *Nitrobacter* durch. Das vermehrte Auftreten von *Nitrospira*-ähnlichen Bakterien in dem oben genannten künstlichen Bioreaktor bei pH 4,3 ist daher nicht nachvollziehbar. Der besondere Aufbau der Versuchsanlage verhindert jedoch die Bildung von salpetriger Säure (TARRE und GREEN, 2004). Da der pH-Wert eine direkte Wirkung auf das Gleichgewicht der freien salpetrigen Säure ausübt, erhöht eine kleine Abnahme des pH-Wertes das Niveau der freien salpetrigen Säure erheblich (ANTHONISEN et al., 1976). Es wird vermutet, dass *Nitrospira* empfindlicher auf salpetrige Säure reagiert als *Nitrobacter* (KIM und SEO, 2006). In einer Studie von Blackburne und Kollegen konnte bestätigt werden, dass die Hemmkonzentration freier salpetriger Säure für *Nitrospira* um das Zehnfache niedriger ist als für *Nitrobacter* (BLACKBURNE et al., 2007). Mit diesen Ergebnissen könnte auch erklärt werden, warum das pH-Optimum für *N. defluvii* in einem Phosphat-gepufferten Medium niedriger ist als in einem ungepufferten System. Der Puffer fängt die freie salpetrige Säure ab und verhinderte somit ihre Hemmung gegenüber den NOB. Ob daher die Bildung von Nitrat in sauren, heißen Quellen im Anschluss an eine Ammoniakoxidation durch AOA wirklich auf der Aktivität von NOB beruht (REIGSTAD et al., 2008) und nicht die Folge der spontanen, chemischen Autooxidation des Nitrits in saurer Lösung ist (CAI et al., 2001), konnte bislang nicht experimentell bewiesen werden.

Hinsichtlich der Temperatur besteht für Nitrit-oxidierende Bakterien eine vergleichbare Konkurrenz. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Kultivierungstemperatur selektiv auf die Anzucht der beteiligten Nitritoxidanten eines Habitats auswirkt. Die Inkubation von NOB aus

Permafrost beeinflussten Böden zwischen 4 °C und 17 °C resultierte in der Entdeckung der Gattung *Candidatus Nitrotoga* (ALAWI et al., 2007). Es handelte sich hierbei um den ersten Nitritoxidanten, der zu den Betaproteobakterien gehört. Später erfolgte die Beobachtung, dass diese an Kälte angepassten Vertreter der Gattung *Candidatus Nitrotoga* auch in Wasseraufbereitungsanlagen gemäßiger Klimaregionen vorkommen und dort mit *Nitrobacter* und *Nitrospira* konkurrieren (ALAWI et al., 2009). So existiert im Belebtschlamm des Hamburger Klärwerks Dradenau eine komplexe Lebensgemeinschaft an Nitrit-oxidierenden Bakterien. Je nach Jahreszeit und damit abhängig von der Temperatur variiert die Gewichtung der NOB-Gemeinschaft. Während in den Wintermonaten ein relevantes Auftreten der Gattung *Candidatus Nitrotoga* nachzuweisen ist, überwiegen in den Sommermonaten die Gattungen *Nitrospira* und *Nitrobacter*. Die Gemeinschaft an NOB im Belebtschlamm zeigt ein breites Temperaturoptimum von 22 °C bis 32 °C. Es kann damit eine sehr flexible Anpassung an die verschiedenen Jahreszeiten stattfinden (ALAWI et al., 2009). Erst kürzlich wurde dieser temperaturabhängige Populationswechsel zwischen den NOB in einem Bioreaktor bestätigt. Bei einer Temperatur von 5 °C sind als Hauptnitritoxidanten Bakterien der Gattung *Candidatus Nitrotoga* detektiert worden, während bei 10 °C *Nitrospira* dominierte (KARKMAN et al., 2011).

Nicht nur der breite Aktivitätsbereich einzelner Stämme mit bis zu 30 °C Temperaturunterschied (WATSON et al. , 1986; EHRICH et al. , 1995; ALAWI , 2007; OFF et al. , 2010), sondern auch die große Diversität an unterschiedlichen Habitaten hinsichtlich derer Temperaturen ist typisch für die Gattung *Nitrospira*. Der Wachstumsbereich von *Nitrospira* reicht von -2 °C von Anreicherungen aus Sedimenten des arktischen Polarmeers bis zu 58 °C von Kulturen aus geothermalen Quellen. Dementsprechend wurden Temperaturen bis zu 60 °C für die Anzucht von *Nitrospira* aus Cluster VI benötigt (LEBEDEVA et al., 2011). Anhand der vielen kultivierten, moderat thermophilen Bakterien der Gattung *Nitrospira* (LEBEDEVA et al., 2005 und 2011) sowie den zahlreich nachgewiesenen Sequenzen (zum Beispiel HIRAYAMA et al., 2005) ist deutlich geworden, dass *Nitrospira* den dominierenden Nitritoxidanten bei erhöhter Temperatur darstellt. Ob dies auch für Temperaturen über 60 °C gilt, muss künftig untersucht werden.

Hohe Temperaturen bzw. ein defekter Inkubationsraum beendete jedoch das Wachstum von mehreren Anreicherungskulturen irreversibel. Bei den Kulturen handelte es sich um *N. defluvii* verwandte *Nitrospira*, die eine Temperatur um die 55 °C nicht überlebten (Dauer der Exposition zwei Tage). Dagegen überlebten die Kulturen unterhalb des optimalen

Temperaturbereichs bis 0 °C, denn regelmäßig werden Anreicherungs- und Reinkulturen von *Nitrospira* bei 4 °C gelagert, ohne dass sie merklichen Schaden nehmen. Nach der Überführung in ihr Temperaturoptimum wachsen sie ähnlich dem Wachstum vor der Kühlperiode weiter. In einem Gefrierschutzpuffer (zum Beispiel Hatefi) konnte die Reinkultur *N. defluvii* kurzzeitig bei -70 °C gefrieren und nach dem Auftauen auf Eis ohne relevante Unterschiede in der Dauer der Phase bis zum ersten vollständigen Verbrauch des Nitrits (11 Tage) im Vergleich zu einer nicht gefrorenen Kultur (9 Tage) wieder anwachsen.

Die hohe Anpassung von Bakterien der Gattung *Nitrospira* an die gegebenen Umweltbedingungen des jeweiligen Habitats macht deutlich, dass diese Nitritoxidanten unter möglichst naturnahen Bedingungen kultiviert werden müssen.

5.4 *Nitrospira* in Konkurrenz zu anderen NOB in Süßwasser-Aquakulturanlagen

Bei Ammoniak-oxidierenden Archaeen und Bakterien besteht in vielen Habitaten eine Koexistenz mehrerer Gattungen, auch wenn die Gewichtung der Zusammensetzung zum Teil stark bei einer Gattung liegt (zum Beispiel STEPHEN et al., 1996; AVRAHAMI et al., 2011). AOA bzw. AOB besetzen sogenannte Mikronischen innerhalb eines begrenzten Lebensraums (MARTENS-HABBENA et al., 2009). In der mit Brunnenwasser gespeisten Süßwasser-Aquakulturanlage HW besteht eine Konkurrenz unter den drei Gattungen Nitrit-oxidierender Bakterien *Nitrospira*, *Candidatus Nitrotoga* und *Nitrobacter*. Vertreter von *Nitrospira* dominieren erwartungsgemäß in den beiden untersuchten Biofiltern. Die Durchschnittstemperatur von 13 °C begründet zwar neben *Nitrospira* das Vorkommen von *Candidatus Nitrotoga* (ALAWI et al., 2007), doch wurde bei dieser niedrigen Temperatur auch *Nitrobacter* nachgewiesen. Dessen Anwesenheit könnte im Zusammenhang mit der großen Futtermenge, einem damit hohen Substratangebot und viel Organik stehen.

Neben der Temperatur beeinflussen der künstlich erniedrigte pH-Wert von 6,8 und der im Vergleich zum mineralischen Medium 25-fach höhere Mangangehalt der Süßwasser-Aquakultur HW die Zusammensetzung Nitrit-oxidierender Bakterien. So könnte der erhöhte Mangangehalt einen leichten Selektionsvorteil auf *Candidatus Nitrotoga* gegenüber *Nitrospira* ausüben. Möglicherweise ist *Candidatus Nitrotoga* in der Lage, das Mangan im Wasser der Anlage effektiv zu nutzen. So können Betaproteobakterien der Gattung

Burkholderia Mn^{2+} zu MnO_4 oxidieren (CAHYANI et al., 2009). Ferner dient Mangan in vielen Enzymen als Synonym für Magnesium (JAKUBOVICS und JENKINSON, 2001).

Der leicht saure pH-Wert im Wasserkreislauf wirkt sich ebenfalls positiv auf das Wachstum von *Candidatus Nitrotoga* aus. Allerdings wurde im Verlauf der Beobachtungen der Aquakulturanlage HW mit Inbetriebnahme zweier neuer Biofilter ein Rückgang an *Candidatus Nitrotoga* festgestellt. Es wird vermutet, dass die Bakterien dieser Gattung durch fabrikneue Füllkörper aus recyceltem Material gehemmt werden (KEUTER, 2011) oder sie sensibel auf einen neuen Fischbesatz bzw. die damit verbundenen unterschiedlichen Futtermengen reagieren.

Für die Analyse der Bakterienpopulation an NOB in Biofilmen der Aquakulturanlage konnten die besten Ergebnisse mit spezifischen PCRs (siehe Ergebnisse 4.4) unter Verwendung von so genannten nested PCRs (geschachtelte PCR) erzielt werden. Eine weitere Möglichkeit ist die Amplifikation von kurzen DNA-Fragmenten, wie zum Beispiel mit den spezifischen Primersets Nsp60-k-dgF/Nsp662R oder Ntg200F/Ntg840R, die zu weniger falsch positiven bzw. negativen Aussagen führt (ALAWI, 2007).

5.5 Das Schlüsselenzym der Nitritoxidation

Über den Nitrit-oxidierenden Enzymkomplex (Nxr) von Bakterien der Gattung *Nitrospira* ist hinsichtlich seiner biochemischen Eigenschaften wenig bekannt. Dagegen wurde die Nxr aus *Nitrobacter hamburgensis* (MEYER, 1987; SUNDERMEYER-KLINGER et al., 1984) und aus *Nitrobacter winogradskyi* (TANAKA et al., 1983) isoliert und vollständig charakterisiert. Die Cytochromausstattung und die Zusammensetzung der Untereinheiten hingen dabei von der Wahl der Isolierungsmethode ab. Während sich unter Verwendung des Detergenzes Natriumdesoxycholat (SUNDERMEYER-KLINGER et al., 1984) die Untereinheiten 115 kDa, 65 kDa und 32 kDa sowie Cytochrom c isolieren ließen, waren es mit Triton X-100 (TANAKA et al., 1983) die Untereinheiten 100 kDa, 55 kDa, 29 kDa und 19 kDa sowie Cytochrom a_1 und Cytochrom c_1 . Wurde die Nxr durch Hitzebehandlung aus der Membran gelöst (MEYER, 1987) wurden lediglich die Untereinheiten 115 kDa und 65 kDa und keine Cytochrome erhalten. Ein weiterer Nachteil der Hitzebehandlung war es, dass nur 25 % der Membranproteine freigesetzt wurden, wobei 10 % dabei auf die Nxr entfielen (MEINCKE, 1990). Dieser Anteil an solubilisierten Enzym, zusammengesetzt aus Alpha- und Beta-

Untereinheit, wies eine wesentlich geringere spezifische Aktivität von nur 41 % im Vergleich zu den Membranen vor der Hitzebehandlung auf. Dass die fehlende Gamma-Untereinheit ein Grund für die geringere Aktivität sein könnte, scheint unwahrscheinlich. Trotz mehrerer kleinerer Untereinheiten traten noch größere Verluste der spezifischen Aktivität auf, wenn Nitrit-oxidierenden Enzyme mittels Detergenzien aus dem Membranverband freigesetzt wurden. Das isolierte Enzym aus *Nitrobacter hamburgensis* (SUNDERMEYER-KLINGER et al., 1984) besaß lediglich 14 % und das Enzym aus *Nitrobacter winogradskyi* (TANAKA et al., 1983) etwa 10 % der spezifischen Aktivität von Membranen. Eine mögliche Erklärung für diese erheblichen Verluste an spezifischer Aktivität könnte die geringere Konzentration an Molybdän in der Enzymfraktion sein (MEINCKE et al., 1992). Im Gegensatz zu *Nitrobacter* führte eine Hitzebehandlung zur Solubilisierung der membranassoziierten Nxr von *Nitrospira moscoviensis* (SPIECK et al., 1998) zu keinem Aktivitätsverlust. Eine schonende Isolierung unter Beibehaltung größerer Aggregate scheint daher wichtig für den Erhalt einer aktiven Nxr zu sein. In den Zellen von *Nitrospira* liegt der Enzymverband auch in 2D geordnet vor (SPIECK et al., 1998).

Im Gegensatz zu vorherigen Versuchen zur Isolierung der Nitritoxidoreduktase wurde zum Ausschluss möglicher Verfahren oder Zusätze, die die Aktivität der Nxr negativ beeinflussen können, auf die Verwendung von Hitzebehandlung, Lysozym und EDTA verzichtet. EDTA ist in der Lage Molybdän-Ionen zu binden (PECSOK und SAWYER, 1956) und könnte dadurch zu einer Konformationsänderung der Nxr führen. Der rein mechanische Zellaufschluss mit Ultraschall bzw. French-Press erlaubte den Erhalt von kleinsten Membranbruchstücken (SPIECK, 1993). Diese beinhalteten eine intakte und aktive Nxr, die mittels Zentrifugation und anschließender FPLC von größeren Membranfragmenten und anderen Proteinen getrennt werden konnte. Anhand der zur Verfügung stehenden katalytisch aktiven FPLC-Fraktion war es nun möglich, die genaue Zusammensetzung der Nxr zweier Vertreter von *Nitrospira* zu bestimmen. Herausragend war dabei die Anreicherung der spezifischen Aktivität der Nxr-Fraktionen bis zu 23-fach im Vergleich zu den Rohextrakten. In Tabelle 20 ist der Stand des Wissens über die Nxr der Gattungen *Nitrospira* und *Nitrobacter* aufgelistet.

Tabelle 20: Vergleich der Nitritoxidoreduktasen von *Nitrospira* und *Nitrobacter* (in Anlehnung an KIRSTEIN, 1993)

	<i>Nitrospira</i>	<i>Nitrobacter</i>
Molekulargewicht	ca. 160 kDa und Mehrfaches, Aggregatbildung *	360 kDa und Mehrfaches, Aggregatbildung, konzentrationsabhängig ¹
Untereinheiten	$\alpha = 121 \text{ kDa}^{4,*}$ $\beta = 46 \text{ kDa}^4$ $\gamma = 34 \text{ kDa}^*$	$\alpha = 115 \text{ kDa}^{2,3}$ $\beta = 65 \text{ kDa}^{2,3}$ $\gamma = 32 \text{ kDa}^2$
Lokalisierung	membrangebunden zum Periplasma weisend ⁴	membrangebunden zum Cytoplasma weisend ^{2,15}
Molybdän-Kofaktor	vorhanden ¹² Molybdopterin ¹²	vorhanden ⁵ Bactopterin ^{1,6}
Fe-S-Zentren	vorhanden ¹² 3 [4Fe-4S] + 1 [2Fe-2S] ¹²	vorhanden ^{1,6} 2 [4Fe-4S] + 1 [2Fe-2S] ¹ 3 [4Fe-4S] + 1 [2Fe-2S] ¹¹
Cytochrom	Cyt b ^{14,17} Cyt c ^{14,17}	Cyt a ₁ ^{3,13} Cyt c ₁ ^{2,13}
Nitritoxidation	ja ¹⁶	ja ²
Nitratreduktion	evt. bei <i>N. moscoviensis</i> ¹⁷	ja ⁷
Enzyminduktion	aerob durch Nitrit ^{16,17} anaerob mit Wasserstoff und Nitrat ¹⁷	aerob durch Nitrit oder Nitrat ^{8,9} anaerob mit und ohne Nitrat ^{9,10}
O ₂ -sensibel	(ja ^{*,14})	nein ⁷

* diese Arbeit; 1) Meincke, 1990; 2) Sundermeyer-Klinger et al., 1984; 3) Meyer, 1987; 4) Spieck et al., 1998; 5) Ingledew und Halling, 1976; 6) Meincke et al., 1992; 7) Freitag und Bock, 1990; 8) Bock, 1976; 9) Sand und Bock, 1982; 10) Schütze, 1984; 11) Kirstein, 1993; 12) Maixner, 2009; 13) Tanaka et al, 1983; 14) Lückner, 2010; 15) Spieck et al., 1996; 16) Watson et al., 1986; 17) Ehrich et al., 1995.

Zusätzlich zu den bekannten Alpha- und Beta-Untereinheiten der Nitritoxidoreduktase von *Nitrospira defluvii* wurde eine Dritte identifiziert. Die Gamma-Untereinheit besitzt ein relatives Molekulargewicht von 34 kDa und wurde bereits als putative Gamma-Untereinheit beschrieben (LÜCKER, 2010). Sie codiert für eine transmembrane Domäne, die als Membrananker der Nxr dienen könnte.

Neben den verschiedenen Untereinheiten der Nxr wurden in ausgeschnittenen und per Massenspektrometrie analysierten SDS-Gelbanden noch weitere Proteine nachgewiesen. Interessant ist hier die Fructose-1,6-bisphosphatase Klasse V zu nennen. Dieser Typ des Enzyms zur Gluconeogenese wurde in thermophilen Archaeen entdeckt (RASHID et al., 2002; NISHIMASU et al., 2004). Die Bestätigung des Vorkommens dieses Enzyms in Bakterien der Gattung *Nitrospira* ist hinweisend auf deren Ursprünglichkeit (DU et al., 2011). Zusammen mit dieser Erkenntnis unterstreicht das Vorkommen von *Nitrospira* in sehr vielen moderaten und extremen Lebensräumen das hohe Alter der Gattung.

6 Literaturverzeichnis

Alawi, M. 2003. Beispiele für die Anwendung der Denaturierenden Gradienten Gelelektrophorese (DGGE) bei der Identifizierung Nitrit oxidierender Bakterien. Diplomarbeit, Universität Hamburg, Deutschland.

Alawi, M. 2007. Diversität Nitrit oxidierender Bakterien in Böden des nordsibirischen Permafrostes und Sedimenten der Laptev-See. Dissertation, Universität Hamburg, Deutschland.

Alawi, M., A. Lipski, T. Sanders, E.-M. Pfeiffer & E. Spieck. 2007. Cultivation of a novel cold-adapted nitrite oxidizing betaproteobacterium from the Siberian Arctic. *ISME J.* **1**: 256-264.

Alawi, M., S. Off, M. Kaya & E. Spieck. 2009. Temperature influences the population structure of nitrite-oxidizing bacteria in activated sludge. *Environ. Microbiol. Reports* **1**: 184-190.

Aleem, M. I. H. & M. Alexander. 1960. Nutrition and Physiology of *Nitrobacter agilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **8**: 80-84.

Alef, K. 1991. Methodenhandbuch Bodenmikrobiologie: Aktivitäten, Biomasse, Differenzierung. Landsberg/Lech, Deutschland. Ecomed pp. 44-49.

Altmann, D., P. Stief, R. Amann & D. de Beer. 2004. Distribution and activity of nitrifying bacteria in natural stream sediment versus laboratory sediment microcosms. *Aquat. Microb. Ecol.* **36**: 73-81.

Amann, R. I., B. J. Binder, R. J. Olson, S. W. Chisholm, R. Devereux & D. A. Stahl. 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1919-1925.

Anitori, R. P., C. Trott, D. J. Saul, P. L. Bergquist & M. R. Walter. 2002. A culture independent survey of the bacterial community in a radon hot spring. *Astrobiology* **2**: 255-269.

Anthonisen, A. C., R. C. Loehr, T. B. S. Prakasam & E. G. Srinath. 1976. Inhibition of nitrification by ammonia and nitric acid. *J. Water Pollut. Control Fed.* **48**: 835-852.

Avrahami, S. & R. Conrad. 2003. Patterns of community change among ammonia oxidizers in meadow soils upon long-term incubation at different temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 6152-6164.

Avrahami, S., Z. Jia, J. D. Neufeld, J. C. Murrell, R. Conrad & K. Küsel. 2011. Active autotrophic ammonia-oxidizing bacteria in biofilm enrichments from simulated creek ecosystems at two ammonium concentrations respond to temperature manipulation. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**: 7329-7338.

- Bartosch, S., I. Wolgast, E. Spieck & E. Bock.** 1999. Identification of nitrite-oxidizing bacteria with monoclonal antibodies recognizing the nitrite oxidoreductase. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 4126-4133.
- Bartosch, S., C. Hartwig, E. Spieck & E. Bock.** 2002. Immunological detection of *Nitrospira*-like bacteria in various soils. *Microbiol. Ecol.* **43**: 26-33.
- Bassin, J. P., R. Kleerebezem, G. Muyzer, A. S. Rosado, M. C. M. van Loosdrecht & M. Dezotti.** 2012. Effect of different salt adaptation strategies on the microbial diversity, activity, and settling of nitrifying sludge in sequencing batch reactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **93**: 1281-1294.
- Blackburne, R., V. M. Vadivelu, Z. Yuan & J. Keller.** 2007. Kinetic characterisation of an enriched *Nitrospira* culture with comparison to *Nitrobacter*. *Water Res.* **41**: 3033-3042.
- Bock, E., H. Sundermeyer-Klinger & E. Stackebrandt.** 1983. New facultative lithoautotrophic nitrite-oxidizing bacteria. *Arch. Microbiol.* **136**: 281-284.
- Bock, E., P. A. Wilderer & A. Freitag.** 1988. Growth of *Nitrobacter* in the absence of dissolved oxygen. *Water Res.* **22**: 245-250.
- Bock, E., H.-P. Koops, U. C. Möller & M. Rudert.** 1990. A new facultatively nitrite oxidizing bacterium, *Nitrobacter vulgaris* sp. nov. *Arch. Microbiol.* **153**: 105-110.
- Bock, E. & M. Wagner.** 2006. Oxidation of Inorganic Nitrogen Compounds as an Energy Source. In Dworkin M., S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer & E. Stackebrandt (Ed.), *The Prokaryotes*, vol. 2: Ecophysiology and Biochemistry. Springer New York, pp. 457-495.
- Bock, E.** 1976. Growth of *Nitrobacter* in the presence of organic matter. II. Chemooorganotrophic growth of *Nitrobacter agilis*. *Arch. Microbiol.* **108**: 305-312.
- Bömeke, H.** 1954. Über das Verhältnis des oxydierten Stickstoffs zum reduzierten Kohlenstoff beim Nitratbildner. *Arch. Microbiol.* **20**: 176-182.
- Brochier-Armanet, C., B. Boussau, S. Gribaldo & P. Forterre.** 2008. Mesophilic *Crenarchaeota*: proposal for a third archaeal phylum, the *Thaumarchaeota*. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**: 245-252.
- Brosius, J., T. J. Dull, D. D. Sleeter & H. F. Noller.** 1981. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *J. Molec. Biol.* **148**: 107-127.
- Burrell, P. C., J. Keller & L. L. Blackall.** 1998. Microbiology of a nitrite-oxidizing bioreactor. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 1878-1883.
- Cahyani, V. R., J. Murase, E. Ishibashi, S. Asakawa & M. Kimura.** 2009. Phylogenetic positions of Mn²⁺-oxidizing bacteria and fungi isolated from Mn nodules in rice field subsoils. *Biol. Fertil. Soils* **45**: 337-346.

Cai, Q., W. Zhang & Z. Yang. 2001. Stability of nitrite in wastewater and its determination by ion chromatography. *Anal. Sci.* **17**: 917-920.

Camargo, J. A. & Á. Alonso. 2006. Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. *Environ. Internat.* **32**: 831-849.

Camargo, J. A., Á. Alonso & A. Salamanca. 2005. Nitrate toxicity to aquatic animals: a review with new data for freshwater invertebrates. *Chemosphere* **58**: 1255-1267.

Chen, Y., L. Wu, R. Boden, A. Hillebrand, D. Kumaresan, H. Moussard, M. Baciu, Y. Lu & J. C. Murrell. 2009. Life without light: Microbial diversity and evidence of sulfur- and ammonium-based chemolithotrophy in Movile Cave. *ISME J.* **3**: 1093-1104.

Colt, J. & G. Tchobanoglous. 1976. Evaluation of short term toxicity of nitrogenous compounds in the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture* **8**: 209-224.

Daims, H. 2012. Ecophysiology and evolution of nitrite-oxidizing bacteria: news on the 'big unknown' of the nitrogen cycle. Society for General Microbiology Spring Conference, Dublin. Abstract.

Daims, H., S. Lücker, D. Le Paslier & M. Wagner. 2011. Diversity, environmental genomics and ecophysiology of nitrite-oxidizing bacteria. *In* Nitrification. Ward, B. B., D. J. Arp & M. G. Klotz (Ed.), American Society for Microbiology, Washington, DC. pp. 295-322.

Daims, H., F. Maixner, S. Lücker, K. Stoecker, K. Hace & M. Wagner. 2006. Ecophysiology and niche differentiation of *Nitrospira*-like bacteria, the key nitrite oxidizers in wastewater treatment plants. *Water Sci. Technol.* **54**: 21-27.

Daims, H., J. L. Nielson, P. H. Nielsen, K. H. Schleifer & M. Wagner. 2001. In situ characterization of *Nitrospira*-like nitrite-oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 5273-5284.

Degrange, V. & R. Bardin. 1995. Detection and counting of *Nitrobacter* populations in soil by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2093-2098.

Diaz, R. J. & R. Rosenberg. 2008. Spreading Dead Zones and Consequences for Marine Ecosystems. *Science* **321**: 926-929.

Du, J., R. F. Say, W. Lü, G. Fuchs & O. Einsle. 2011. Active-site remodelling in the bifunctional fructose-1,6-bisphosphate aldolase/phosphatase. *Nature* **478**: 534-537.

Ehrich, S., D. Behrens, E. Lebedeva, W. Ludwig & E. Bock. 1995. A new obligately chemolithoautotrophic, nitrite oxidizing bacterium, *Nitrospira moscoviensis* sp. nov and its phylogenetic relationship. *Arch. Microbiol.* **164**: 16-23.

Fan, A. M. & V. E. Steinberg. 1996. Health implications of nitrate and nitrite in drinking water: an update on methemoglobinemia occurrence and reproductive and developmental toxicity. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **23**: 35-43.

- Felsenstein, J.** 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783-791.
- Flemming, H.-C., T. R. Neu & D. J. Wozniak.** 2007. The EPS matrix: the “house of biofilm cells.” *J. Bacteriol.* **189**: 7945-7947.
- Flemming, H.-C. & J. Wingender.** 2010. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**: 623-633.
- Foesel, B. U., A. Gieseke, C. Schwermer, P. Stief, L. Koch, E. Cytryn, J. R. de la Torr , J. van Rijn, D. Minz, H. L. Drake & A. Schramm.** 2008. *Nitrosomonas* Nml43-like ammonia oxidizers and *Nitrospira marina*-like nitrite oxidizers dominate the nitrifier community in a marine aquaculture biofilm. *FEMS Microbiol. Ecol.* **63**: 192-204.
- Fox, G. E., E. Stackebrandt, R. B. Hespell, J. Gibson, J. Maniloff, T. A. Dyer, R. S. Wolfe, W. E. Balch, R. S. Tanner, L. J. Magrum, L. B. Zablen, R. Blakemore, R. Gupta, L. Bonen, B. J. Lewis, D. A. Stahl, K. R. Luehrsen, K. N. Chen & C. R. Woese.** 1980. The phylogeny of prokaryotes. *Science* **209**: 457-463.
- Freitag, A. & E. Bock.** 1990. Energy conservation in *Nitrobacter*. *FEMS Microbiol. Lett.* **66**: 157-162.
- Freitag, A., M. Rudert & E. Bock.** 1987. Growth of *Nitrobacter* by dissimilatoric nitrate reduction. *FEMS Microbiol. Lett.* **48**: 105-109.
- Freitag, T. E., L. Chang, C. D. Clegg & J. I. Prosser.** 2005. Influence of inorganic nitrogen management regime on the diversity of nitrite-oxidizing bacteria in agricultural grassland soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 8323-8334.
- Galloway, J. N. & E. B. Cowling.** 2002. Reactive nitrogen and the world: 200 years of change. *AMBIO: A Journal of the Human Environment* **31**: 64-71.
- Garrett, R. H. & A. Nason.** 1969. Further purification and properties of *Neurospora* nitrate reductase. *J. Biol. Chem.* **244**: 2870-2882.
- Gieseke, A., S. Tarre, M. Green & D. de Beer.** 2006. Nitrification in a biofilm at low pH values: role of in situ microenvironments and acid tolerance. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 4283-4292.
- Hamburg Wasser.** 2011. <http://www.hamburgwasser.de/abwasserbehandlung.html>
- Hankinson, T. R. & E. L. Schmidt.** 1988. An acidophilic and a neutrophilic *Nitrobacter* strain isolated from the numerically predominant nitrite-oxidizing population of an acid forest soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 1536-1540.
- Hentschel, U., J. Hopke, M. Horn, A. B. Friedrich, M. Wagner, J. Hacker & B. S. Moore.** 2002. Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 4431-4440.

- Hirayama, H., K. Takai, F. Inagaki, Y. Yamato, M. Suzuki, K. H. Nealson & K. Horikoshi.** 2005. Bacterial community shift along a subsurface geothermal water stream in a Japanese gold mine. *Extremophiles* **9**: 169-184.
- Hollocher, T. C., M. E. Tate & D. J. D. Nicholas.** 1981. Oxidation of ammonia by *Nitrosomonas europaea*: definitive ¹⁸O-tracer evidence that hydroxylamine formation involves a monooxygenase. *J. Biol. Chem.* **256**: 10834-10836.
- Holmes, A. J., N. A. Tujula, M. Holley, A. Contos, J. M. James, P. Rogers & M. R. Gillings.** 2001. Phylogenetic structure of unusual aquatic microbial formations in Nullarbor caves, Australia. *Environ. Microbiol.* **3**: 256-264.
- Hovanec, T. A. & E. F. DeLong.** 1996. Comparative analysis of nitrifying bacteria associated with freshwater and marine aquaria. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2888-2896.
- Hovanec, T. A., L. T. Taylor, A. Blakis & E. DeLong.** 1998. *Nitrospira*-like bacteria associated with nitrite oxidation in freshwater aquaria. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 258-264.
- Ingledeew, W. J. & P. J. Halling.** 1976. Paramagnetic centers of the nitrite oxidizing bacterium *Nitrobacter*. *FEBS Lett.* **67**: 90-93.
- Ishihama, Y., Y. Oda, T. Tabata, T. Sato, T. Nagasu, J. Rappsilber & M. Mann.** 2005. Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *Mol. Cell. Proteomics* **4**: 1265-72.
- Jakubovics, N. S. & H. F. Jenkinson.** 2001. Out of the iron age: new insights into the critical role of manganese homeostasis in bacteria. *Microbiology* **147**: 1709-1718.
- Jianlong, W. & Y. Ning.** 2004. Partial nitrification under limited dissolved oxygen conditions. *Proc. Biochem.* **39**: 1223-1229.
- Juretschko, S., G. Timmermann, M. Schmid, K.-H. Schleifer, A. Pommerening-Röser, H.-P. Koops & M. Wagner.** 1998. Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 3042-3051.
- Juretschko, S., A. Loy, A. Lehner & M. Wagner.** 2002. The microbial community composition of a nitrifying-denitrifying activated sludge from an industrial sewage treatment plant analyzed by the full-cycle rRNA approach. *Syst. Appl. Microbiol.* **25**: 84-99.
- Kamke, J., M. W. Taylor & S. Schmitt.** 2010. Activity profiles for marine sponge-associated bacteria obtained by 16S rRNA vs 16S rRNA gene comparisons. *ISME J.* **4**: 498-508.
- Kanokratana, P., S. Chanapan, K. Pootanakit & L. Eurwilaichitr.** 2004. Diversity and abundance of *Bacteria* and *Archaea* in the Bor Khlueng Hot Spring in Thailand. *J. Basic Microbiol.* **44**: 430-444.

- Karkman, A., K. Mattila, M. Tamminen & M. Virta.** 2011. Cold temperature decreases bacterial species richness in nitrogen-removing bioreactors treating inorganic mine waters. *Biotechnol. Bioeng.* **108**: 2876-2883.
- Keuter, S.** 2011. Characterization of nitrifying bacteria in marine recirculation aquaculture systems with regard to process optimization. Dissertation, Universität Hamburg, Deutschland.
- Keuter, S., M. Kruse, A. Lipski & E. Spieck.** 2011. Relevance of *Nitrospira* for nitrite oxidation in a marine recirculation aquaculture system and physiological features of a *Nitrospira marina*-like isolate. *Environ. Microbiol.* **13**: 2536-2547.
- Kim, J.-S. & D. E. Crowley.** 2007. Microbial diversity in natural asphalts of the Rancho La Brea tar pits. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 4579-4591.
- Kim, D. J. & D. W. Seo.** 2006. Selective enrichment and granulation of ammonia oxidizers in a sequencing batch airlift reactor. *Proc. Biochem.* **41**: 1055-1062.
- Kirstein, K.** 1993. Molekularbiologische Untersuchungen zur Nitritoxidoreduktase aus *Nitrobacter hamburgensis* X14. Dissertation, Universität Hamburg, Deutschland.
- Kirstein, K. & E. Bock.** 1993. Close genetic relationship between *Nitrobacter hamburgensis* nitrite oxidoreductase and *Escherichia coli* nitrate reductases. *Arch. Microbiol.* **160**: 447-453.
- Kisker, C., H. Schindelin, D. Baas, J. Retey, R. U. Meckenstock & P. M. Kroneck.** 1998. A structural comparison of molybdenum cofactor-containing enzymes. *FEMS Microbiol. Rev.* **22**: 503-521.
- Klotz, M. G. & L. Y. Stein.** 2008. Nitrifier genomics and evolution of the nitrogen cycle. *FEMS Microbiol. Lett.* **278**: 146-156.
- Kobabe, S.** 2005. Charakterisierung der mikrobiellen Lebensgemeinschaft eines sibirischen Permafrostbodens. Dissertation, Universität Potsdam, Deutschland.
- Könneke, M., A. E. Bernhard, J. R. de la Torre, C. B. Walker, J. B. Waterbury & D. A. Stahl.** 2005. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* **437**: 543-546.
- Kumar, S., K. Tamura, I. B. Jakobsen & M. Nei.** 2001. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* **17**: 1244-1245.
- Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lane, D. J.** 1991. 16S/23S rRNA sequencing, *In* E. Stackebrandt & M. Goodfellow (Ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Wiley, London, United Kingdom. pp. 115-175.
- Larsen, P., J. L. Nielsen, T. C. Svendsen & P. H. Nielsen.** 2008. Adhesion characteristics of nitrifying bacteria in activated sludge. *Water Res.* **42**: 2814-2826.

- Lebedeva, E. V., M. Alawi, C. Fiencke, B. Namsaraev, E. Bock & E. Spieck.** 2005. Moderately thermophilic nitrifying bacteria from a hot spring of the Baikal rift zone. *FEMS Microbiol. Ecol.* **54**: 297-306.
- Lebedeva, E. V., M. Alawi, F. Maixner, P. G. Jozsa, H. Daims & E. Spieck.** 2008. Physiological and phylogenetical characterization of a new lithoautotrophic nitrite-oxidizing bacterium '*Candidatus Nitrospira bockiana*' sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**: 242-250.
- Lebedeva, E. V., S. Off, S. Zumbärgel, M. Kruse, A. Shagzhina, S. Lücker, F. Maixner, A. Lipski, H. Daims & E. Spieck.** 2011. Isolation and characterization of a moderately thermophilic nitrite-oxidizing bacterium from a geothermal spring. *FEMS Microbiol. Ecol.* **75**: 195-204.
- Lerman, L. S. J.** 1964. Acridine mutagens and DNA structure. *Cell. Comp. Physiol.* **64**: 1-18.
- Li, L., C. Kato & K. Horikoshi.** 1999. Bacterial diversity in deep-sea sediments from different depths. *Biodiv. Conserv.* **8**: 659-677.
- Lin, L.** 1994. Kompatible Solute in nitrifizierenden Bakterien. Dissertation, Universität Hamburg, Deutschland.
- Lipski, A., E. Spieck, A. Makolla & K. Altendorf.** 2001. Fatty acid profiles of nitrite-oxidizing bacteria reflect their phylogenetic heterogeneity. *System Appl Microbiol* **24**: 377-384.
- Liu, S., X. Yang, Y. Xue, Z. Gong, H. Chen, T. Wang & Z. Su.** 2008. Evaluation of oxygen adaptation and identification of functional bacteria composition for anammox consortium in non-woven biological rotating contactor. *Bioresource Technology* **99**: 8273-8279.
- Lücker, S.** 2010. Exploring the ecology and genomics of globally important nitrite-oxidizing bacteria. Dissertation, Universität Wien, Österreich.
- Lücker S., M. Wagner, F. Maixner, E. Pelletier, H. Koch, B. Vacherie, T. Rattei, J. S. Sinninghe Damsté, E. Spieck, D. Le Paslier & H. Daims.** 2010. A *Nitrospira* metagenome illuminates the physiology and evolution of globally important nitrite-oxidizing bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**: 13479-13484.
- Maixner, F.** 2009. The ecophysiology of nitrite-oxidizing bacteria in the genus *Nitrospira*: novel aspects and unique features. Dissertation, Universität Wien, Österreich.
- Maixner, F., D. Noguera, B. Amneser, K. Stoecker, G. Wegl, M. Wagner & H. Daims.** 2006. Nitrite concentration influences the population structure of *Nitrospira*-like bacteria. *Environ. Microbiol.* **8**: 1487-1495.
- Maixner, F., M. Wagner, S. Lücker, E. Pelletier, S. Schmitz-Esser, K. Hace, E. Spieck, R. Konrat, D. Le Paslier & H. Daims.** 2008. Environmental genomics reveals a functional chlorite dismutase in the nitrite-oxidizing bacterium '*Candidatus Nitrospira defluvii*'. *Environ. Microbiol.* **10**: 3043-3056.

- Martens-Habbena, W., P. M. Berube, H. Urakawa, J. R. de la Torre & D. A. Stahl.** 2009. Ammonia oxidation kinetics determine niche separation of nitrifying Archaea and Bacteria. *Nature* **461**: 976-979.
- McDevitt, C. A., P. Hugenholtz, G. R. Hanson & A. G. McEwan.** 2002. Molecular analysis of dimethyl sulphide dehydrogenase from *Rhodovulum sulfidophilum*: Its place in the dimethyl sulphoxide reductase family of microbial molybdopterin-containing enzymes. *Mol. Microbiol.* **44**: 1575-1587.
- McKhann, G. M. & D. B. Tower.** 1961. Ammonia toxicity and cerebral oxidative metabolism. *Am. J. Physiol.* **200**: 420-424.
- Meincke, M.** 1990. Untersuchungen zur Struktur und Funktion von Redoxzentren im Enzym Nitrit-Oxidoreduktase. Dissertation, Universität Hamburg, Deutschland.
- Meincke, M., E. Bock, D. Kastrau & P. M. H. Kroneck.** 1992. Nitrite oxidoreductase from *Nitrobacter hamburgensis*: redox centers and their catalytic role. *Arch. Microbiol.* **158**: 127-131.
- Meinelt, T., K. Schreckenbach, A. Stüber & C. Steinberg.** 1997. Fischtoxizität von Nitrit. *Fischer & Teichwirt* **10**: 421-426.
- Meyer, W.** 1987. Struktur und Funktion der Nitritoxidoreduktase aus Zellen von *Nitrobacter hamburgensis* X14. Dissertation, Universität Hamburg, Deutschland.
- Mobarry, B. K., M. Wagner, V. Urbain, B. E. Rittmann & D. A. Stahl.** 1996. Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2156-2162.
- Muyzer, G., T. Brinkhoff, U. Nübel, C. Santegoeds, H. Schäfer & C. Wawer.** 1998. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. *Mol. Microbial Ecol. Manual* **3.4.4**: 1-27.
- Nishimasu, H., S. Fushinobu, H. Shoun & T. Wakagi.** 2004. The first crystal structure of the novel class of fructose-1,6-bisphosphatase present in thermophilic Archaea. *Structure* **12**: 949-959.
- Off, S., M. Alawi & E. Spieck.** 2010. Enrichment and physiological characterization of a novel *Nitrospira*-like bacterium obtained from a marine sponge. *Appl. Environ. Microb.* **76**: 4640-4646.
- Okabe, S., H. Satoh & Y. Watanabe.** 1999. In situ analysis of nitrifying biofilms as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 3182-3191.
- Pecsok, R. L. & D. T. Sawyer.** 1956. Molybdenum(V) and molybdenum(VI) complexes with ethylenediaminetetraacetic acid. *J. Am. Chem. Soc.* **78**: 5496-5500.

- Poly, F., S. Wertz, E. Brothier & V. Degrange.** 2008. First exploration of *Nitrobacter* diversity in soils by a PCR cloning-sequencing approach targeting functional gene *nxrA*. FEMS Microbiol. Ecol. **63**: 132-140.
- Purkhold, U., A. Pommerening-Röser, S. Juretschko, M. C. Schmid, H. P. Koops & M. Wagner.** 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.
- Purkhold, U., M. Wagner, G. Timmermann, A. Pommerening-Röser & H. P. Koops.** 2003. 16S rRNA and *amoA*-based phylogeny of 12 novel betaproteobacterial ammonia-oxidizing isolates: extension of the dataset and proposal of a new lineage within the nitrosomonads. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **53**: 1485-1494.
- Radax, R., F. Hoffmann, H. T. Rapp, S. Leininger & C. Schleper.** 2012. Ammonia-oxidizing archaea as main drivers of nitrification in cold-water sponges. Environ. Microbiol. **14**: 909-923.
- Randall, D. J. & T. K. N. Tsui.** 2002. Ammonia toxicity in fish. Mar. Pollut. Bull. **45**: 17-23.
- Rashid N., H. Imanaka, T. Kanai, T. Fukui, H. Atomi & T. Imanaka.** 2002. A novel candidate for the true fructose-1,6-bisphosphatase in *archaea*. J. Biol. Chem. **277**: 30649-55.
- Reigstad, L. J., A. Richter, H. Daims, T. Urich, L. Schwark & C. Schleper.** 2008. Nitrification in terrestrial hot springs of Iceland and Kamchatka. FEMS Microbiol. Ecol. **64**: 167-174.
- Remis, J. P., J. W. Costerton & M. Auer.** 2010. Biofilms: structures that may facilitate cell-cell interactions. ISME J. **4**: 1085-1087.
- Reynolds, E. S.** 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. J. Cell Bio. **17**: 208-212.
- Rothery, R. A., G. J. Workun & J. H. Weiner.** 2008. The prokaryotic complex iron-sulfur molybdoenzyme family. Biochim. Biophys. Acta **1778**: 1897-1929.
- Rotthauwe, J. H., K. P. Witzel & W. Liesack.** 1997. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker — molecular finescale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. Appl. Environ. Microbiol. **63**: 4704-4712.
- Saitou, N. & M. Nei.** 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Bio. Evol. **4**: 406-425.
- Sand, W. & E. Bock.** 1982. Der Einfluß von C- und N-Quellen auf die Induktion des Nitritoxidierenden Systems und auf den PHB-Gehalt von *Nitrobacter agilis*. Mitt. Inst. Bot. Hamburg **18**: 61-70.

- Santelli, C. M., B. N. Orcutt, E. Banning, W. Bach, C. L. Moyer, M. L. Sogin, H. Staudigel & K. J. Edwards.** 2008. Abundance and diversity of microbial life in ocean crust. *Nature* **453**: 653-656.
- Sarbu, S. M., B. K. Kinkle, L. Vlasceanu & T. C. Kane.** 1994. Microbiological characterization of a sulfide-rich groundwater ecosystem. *Geomicrobiol. J.* **12**: 175-182.
- Schmidt, E. L. & L. W. Belser.** 1994. Autotrophic nitrifying bacteria. In Weaver, R. W., J. S. Angle & P. S. Bottomley (Ed.), *Methods of soil analysis, part 2. Microbiological and biochemical properties*. SSSA Book series no. 5. Soil Science Society of America, Madison, Wis. pp. 159-177.
- Schramm, A., D. De Beer, A. Gieseke & R. Amann.** 2000. Microenvironments and distribution of nitrifying bacteria in a membrane-bound biofilm. *Environ. Microbiol.* **2**: 680-686.
- Schramm, A., D. de Beer, J. C. van den Heuvel, S. Ottengraf & R. Amann.** 1999. Microscale distribution of populations and activities of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. along a macroscale gradient in a nitrifying bioreactor: quantification by in situ hybridization and the use of microsensors. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 3690-3696.
- Schramm, A., D. De Beer, M. Wagner & R. Amann.** 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.
- Schütze, E.** 1984. Vergleichende Untersuchungen über den regulatorischen Einfluß von Nitrat und Sauerstoff auf das Nitritoxidierende System aus Zellen von *Nitrobacter*. Diplomarbeit, Universität Hamburg, Deutschland.
- Singer, B. & Grunberger, D.** 1983. *Molecular biology of mutagens and carcinogens*. Plenum Press, New York.
- Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson & D. C. Klenk.** 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**: 76-85.
- Sorokin, D. Y., G. Muyzer, T. Brinkhoff, J. G. Kuenen & M. S. Jetten.** 1998. Isolation and characterization of a novel facultatively alkaliphilic *Nitrobacter* species, *N. alkalicus* sp. nov. *Arch. Microbiol.* **170**: 345-352.
- Spang, A., R. Hatzenpichler, C. Brochier-Armanet, T. Rattei, P. Tischler, E. Spieck, W. Streit, D. A. Stahl, M. Wagner & C. Schleper.** 2010. Distinct gene set in two different lineages of ammonia-oxidizing archaea supports the phylum *Thaumarchaeota*. *Trends Microbiol.* **18**: 331-340.
- Spieck, E.** 1993. Zweidimensionale Struktur der membrangebundenen Nitrit-Oxidoreduktase von *Nitrobacter hamburgensis* X14. Dissertation, Universität Hamburg, Deutschland.

- Spieck, E., J. Aamand, S. Bartosch & E. Bock.** 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. & E. Bock.** 2005. The lithoautotrophic nitrite-oxidizing bacteria. *In* Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2. Stanley, J. T., D. R. Boone, D. J. Brenner et al. (Ed.). New York, Springer Science+Business Media, pp. 149-153.
- Spieck, E., S. Ehrich, J. Aamand & E. Bock.** 1998. Isolation and immunocytochemical location of the nitrite-oxidizing system in *Nitrospira moscoviensis*. *Arch. Microbiol.* **169**: 225-230.
- Spieck E., C. Hartwig, I. McCormack, F. Maixner, M. Wagner, A. Lipski & H. Daims.** 2006. Selective enrichment and molecular characterization of a previously uncultured *Nitrospira*-like bacterium from activated sludge. *Environ Microbiol* **8**: 405-415.
- Spieck, E. & A. Lipski.** 2011. Cultivation, growth physiology and chemotaxonomy of nitrite-oxidizing bacteria. *In* Methods in Enzymology, Vol. 486, part A: Microbial Nitrification and Related Processes. Klotz, M. G. (Ed.). Oxford: Academic Press/Elsevier, pp. 109-130.
- Spurr, A. R.** 1969. A low viscosity epoxy resin embedding medium of electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.* **26**: 31-43.
- Stackebrandt, E., R. G. E. Murray & H. G. Truper.** 1988. *Proteobacteria* classis nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the "purple bacteria and their relatives". *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**: 321-325.
- Starkenburger, S. R., P. S. Chain, L. A. Sayavedra-Soto, L. Hauser, M. L. Land, F. W. Larimer, S. A. Malfatti, M. G. Klotz, P. J. Bottomley, D. J. Arp & W. J. Hickey.** 2006. Genome sequence of the chemolithoautotrophic nitrite-oxidizing bacterium *Nitrobacter winogradskyi* Nb-255. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 2050-2063.
- Starkenburger, S. R., E. Spieck & P. J. Bottomley.** 2010. Metabolism and genomics of nitrite oxidizing bacteria: Emphasis on pure culture studies and *Nitrobacter* species. *In* Nitrification. Ward, B., D. J. Arp & M. G. Klotz (Ed.) ASM Press, Washington, DC. pp. 267-293.
- Stein, L. Y., M. T. La Duc, T. J. Grundl & K. H. Nealson.** 2001. Bacterial and archaeal populations associated with freshwater ferromanganous micronodules and sediments. *Environ. Microbiol.* **3**: 10-18.
- Stephen, J. R., A. E. McCaig, Z. Smith, J. I. Prosser & T. M. Embley.** 1996. Molecular diversity of soil and marine 16S rDNA sequences related to β -subgroup ammonia-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 4147-4154.
- Sugita, H., H. Nakamura & T. Shimada.** 2005. Microbial communities associated with filter materials in recirculating aquaculture systems of freshwater fish. *Aquaculture* **243**: 403-409.

- Sundermeyer-Klinger, H., W. Meyer, B. Warninghoff & E. Bock.** 1984. Membrane-bound nitrite oxidoreductase of *Nitrobacter*: Evidence for a nitrate reductase system. Arch. Microbiol. **140**: 153-158.
- Swanner, E. D. & A. S. Templeton.** 2011. Potential for Nitrogen Fixation and Nitrification in the Granite-Hosted Subsurface at Henderson Mine, CO. Front. Microbiol. Online Veröffentlichung, Band 2: Artikel 254.
- Tanaka, Y., Y. Fukumori & T. Yamanaka.** 1983. Purification of cytochrome a_1c_1 from *Nitrobacter agilis* and characterization of nitrite oxidation system of the bacterium. Arch. Microbiol. **135**: 265-271.
- Tarre, S. & M. Green.** 2004. High-rate nitrification at low pH in suspended- and attached-biomass reactors. Appl. Environ. Microbiol. **70**: 6481-6487.
- Taylor, M. W., R. Radax, D. Steger & M. Wagner.** 2007. Sponge-associated microorganisms: evolution, ecology, and biotechnological potential. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **71**: 295-347.
- Teske, A., E. Alm, J. M. Regan, T. S., B. E. Rittmann & D. A. Stahl.** 1994. Evolutionary relationships among ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria. J. Bacteriol. **176**: 6623-6630.
- Third, K. A., A. O. Sliemers, J. G. Kuenen & M. S. M. Jetten.** 2001. The CANON system (completely autotrophic nitrogen-removal over nitrite) under ammonium limitation: interaction and competition between three groups of bacteria. System. Appl. Microbiol. **24**: 588-596.
- Thorell, H. D., K. Stenklo, J. Karlsson & T. Nilsson.** 2003. A gene cluster for chlorate metabolism in *Ideonella dechloratans*. Appl. Environ. Microbiol. **69**: 5585-5592.
- Todorov, J. R., A. Y. Chistoserdov & J. Y. Aller.** 2000. Molecular analysis of microbial communities in mobile deltaic muds of Southeastern Papua New Guinea. FEMS Microbiol. Ecol. **33**: 147-155.
- Thompson J. D., D. G. Higgins & T. J. Gibson.** 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. **22**: 4673-4680.
- Treusch, A. H., S. Leininger, A. Kletzin, S. C. Schuster, H. P. Klenk & C. Schleper.** 2005. Novel genes for nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. Environ. Microbiol. **7**: 1985-1995.
- van Kessel, M. A. H. J., B. E. Dutilh, K. Neveling, M. P. Kwint, J. A. Veltman, G. Flik, M. S.M. Jetten, P. H. M. Klaren & H. J. M. Op den Camp.** 2011. Pyrosequencing of 16S rRNA gene amplicons to study the microbiota in the gastrointestinal tract of carp (*Cyprinus carpio* L.). AMB Express. Online Veröffentlichung, Band 1: Artikel 41.

Vanparys, B., E. Spieck, K. Heylen, L. Wittebolle, J. Geets, N. Boon & P. De Vos. 2007. The phylogeny of the genus *Nitrobacter* base on comparative rep-PCR, 16S rRNA and nitrate oxidoreductase gene sequence analysis. *Syst. Appl. Microbiol.* **30**: 297-308.

Vlaeminck, S. E., A. Terada, B. F. Smets, H. De Clippeleir, T. Schaubroeck, S. Bolca, L. Demeestere, J. Mast, N. Boon, M. Carballa & W. Verstraete. 2010. Aggregate size and architecture determine microbial activity balance for one-stage partial nitrification and Anammox. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**: 900-909.

Ward, M. H., T. M. de Kok, P. Levallois, J. Brender, G. Gulis, B. T. Nolan & J. Van Derslice. 2005. Workgroup report: drinking-water nitrate and health – recent findings and research needs. *Environ. Health Perspect.* **113**: 1607-1614.

Watson, M. L. 1958. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **4**: 475-478.

Watson, S. W., E. Bock, F. W. Valois, J. B. Waterbury & U. Schlosser. 1986. *Nitrospira marina* gen. nov. sp. nov: a chemolithotrophic nitrite-oxidizing bacterium. *Arch. Microbiol.* **144**: 1-7.

Watson, S. W., E. Bock, H. Harms, H. P. Koops & A. B. Hooper. 1989. Nitrifying bacteria. In Stanley, J.T. (Ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 3. Williams and Wilkins, Baltimore, MD, pp. 1808-1834.

Watson, S. W. & J. B. Waterbury. 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.

Webster, N. S., M. W. Taylor, F. Behnam, S. Lücker, T. Rattei, S. Whalan, M. Horn & M. Wagner. 2009. Deep sequencing reveals exceptional diversity and modes of transmission for bacterial sponge symbionts. *Environ. Microbiol.* **12**: 2070-2082.

Weidler G. W., M. Dornmayer-Pfaffenhüemer, F. W. Gerbl, W. Heinen & H. Stan-Lotter. 2007. Communities of *Archaea* and *Bacteria* in a subsurface radioactive thermal spring in the Austrian Central Alps, and evidence of ammonia-oxidizing *Crenarchaeota*. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 259-270.

Winogradsky, S. 1890. Recherches sur les organismes de la nitrification. *Ann. Inst. Pasteur* **4**: 213-331.

Winogradsky, S. 1892. Contributions a la morphologie des organismes de la nitrification. *Arch. Sci. Biol.* **1**: 88-137.

Winslow, C. E., J. Broadhurst, R. E. Buchanan, C. Krumwiede, L. A. Rogers & G. H. Smith. 1917. The families and genera of the bacteria: preliminary report of the committee of the Society of American Bacteriologists on characterization and classification of bacterial Types. *J. Bacteriol.* **2**: 505-566.

7 Anhang

Im Anhang sind die zusätzlichen beiden Aufnahmen der Rasterelektronenmikroskopie sowie das Zusatzmaterial der unter 3.1 bis 3.3 erwähnten Publikationen.

Zusatzmaterial zu den REM-Aufnahmen

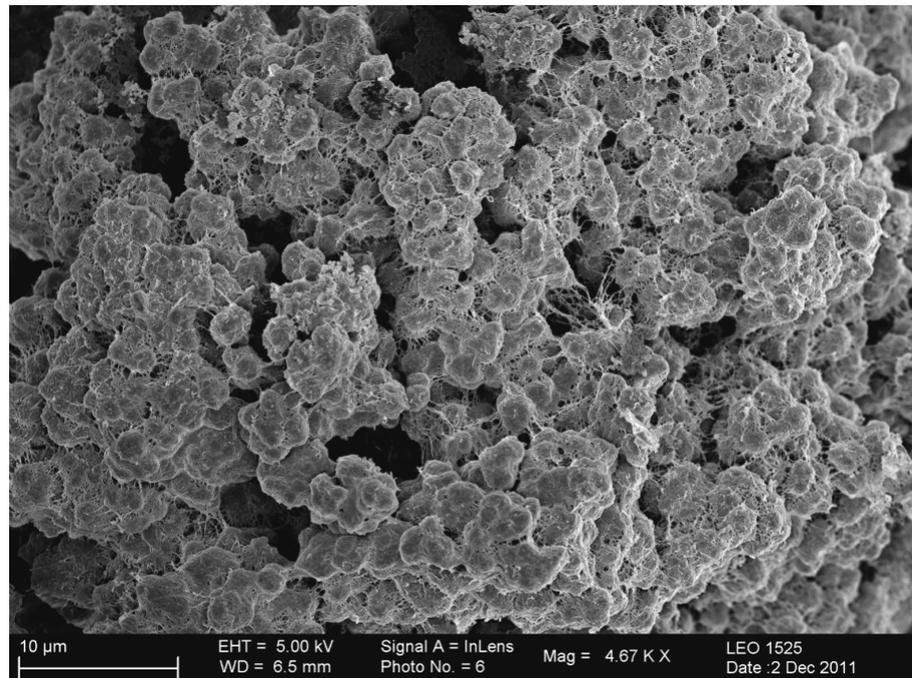


Abbildung 15a: Rasterelektronenaufnahme einer Reinkultur von *N. defluvii*. Die Kultivierung erfolgte mit Antiseptikum mit dem Wirkstoff Acriflavin. Die Bakterien sind von einem dichten Netz aus EPS überzogen.

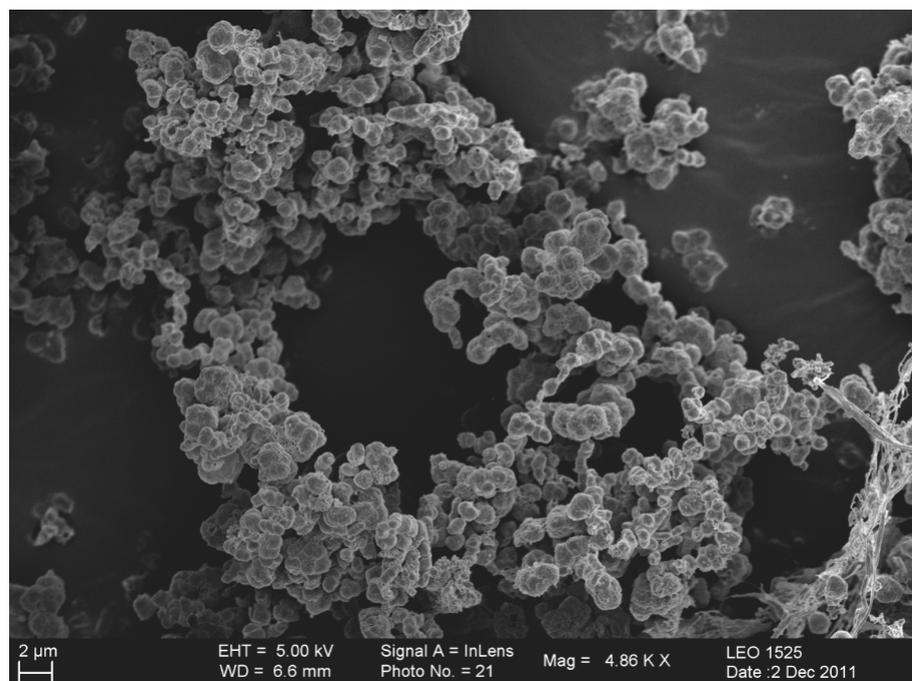


Abbildung 16a: Rasterelektronenaufnahme einer Reinkultur von *N. defluvii*. Die Kultivierung erfolgte mit 3mM Nitrit und ohne den Zusatz Acriflavin. Gut sichtbar ist die gedrehte Form der Bakterien.

Zusatzmaterial zu Alawi et al., 2009

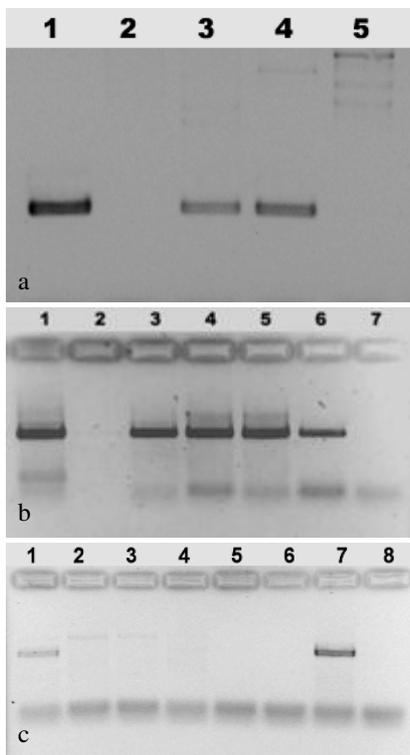


Fig. S1. Agarose gels of PCR products obtained with genus-specific primer pairs (Table 2). A. *Nitrobacter*-specific PCR. Lane 1: *Nitrobacter hamburgensis* X14; lane 2: NOB enriched at 10 °C; lane 3: NOB grown at 17 °C, lane 4: NOB culture incubated at 28 °C; lane 5: pure sludge. B. *Nitrospira*-specific PCR. Lane 1: *Nitrospira moscoviensis* M1; lane 3: NOB grown at 10 °C; lane 4: NOB culture incubated at 17 °C; lane 5: enrichment culture of NOB grown at 28 °C; lane 6: activated sludge; lane 7: *Nitrobacter hamburgensis* X14. C. *Nitrotoga*-specific PCR. Lane 1: NOB enrichment grown at 10 °C, lane 2: NOB culture incubated at 17 °C; lane 3: NOB enriched at 28 °C; lane 4: pure sludge; lane 7: '*Candidatus Nitrotoga arctica*' 6675; lane 8: *Nitrobacter hamburgensis* X14.

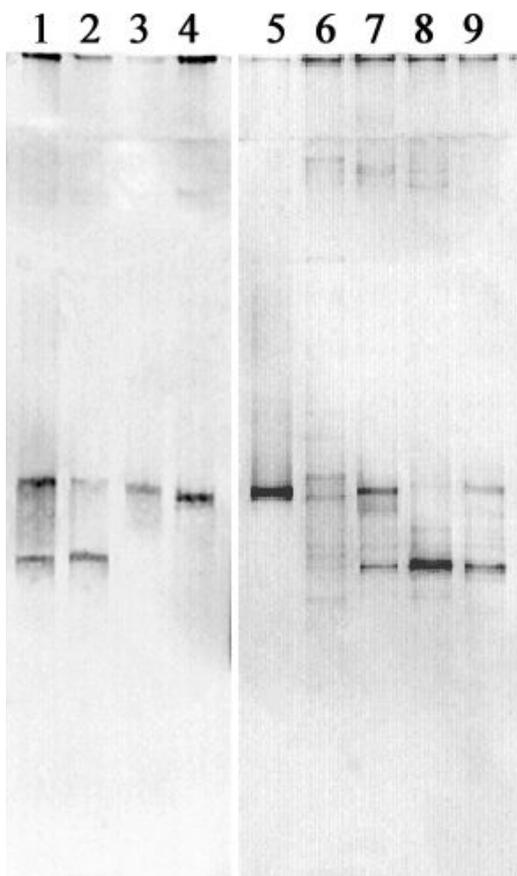


Fig. S2. DGGE profile of NOB enriched from activated sludge at three temperatures in comparison to reference organisms (16S rDNA, 640 bp). Lanes 1 and 9: NOB grown at 28 °C; lane 2: '*Candidatus Nitrospira defluvii*'; lane 3: '*Candidatus Nitrotoga arctica*' 6678; lanes 4 and 5: *Nitrobacter hamburgensis* X14; lane 6: activated sludge; lane 7: NOB grown at 10 °C; lane 8: NOB enrichment at 17 °C.

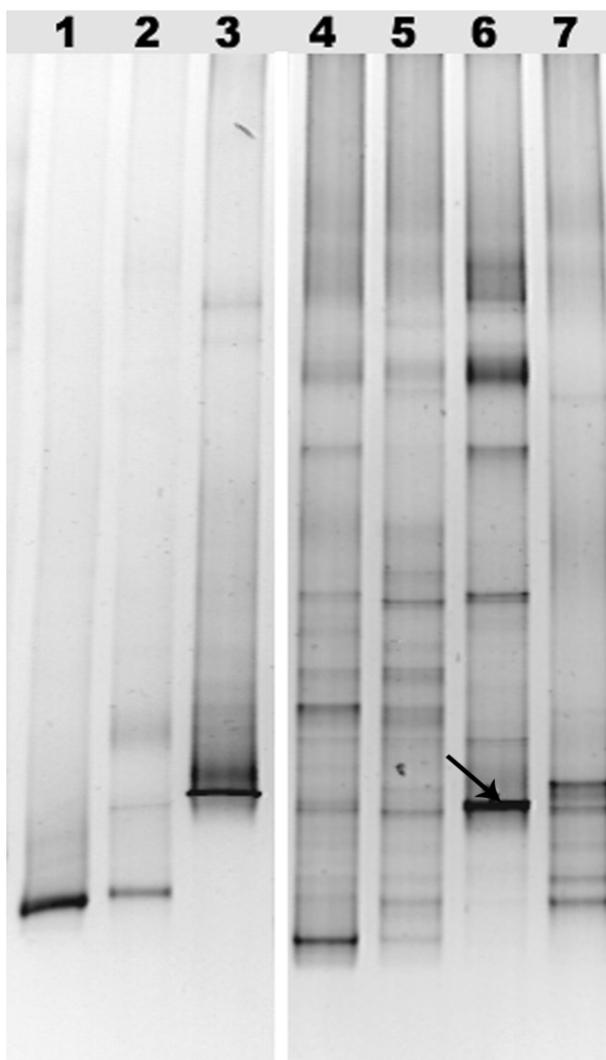


Fig. S3. TGGE profile of NOB enrichment cultures originating from the WWTP Dradenau, Hamburg, different genera of NOB from the culture collection and pure sludge (16S rDNA, 640 bp). Lane 1: *Nitrospira moscoviensis* M1; lane 2: '*Candidatus Nitrospira defluvii*'; lane 3: *Nitrobacter hamburgensis* X14; lane 4: activated sludge sampled at 11.05.2006 (17 °C), lane 5: activated sludge taken at 28.08.2006 (19 °C); lane 6: NOB grown at 10 °C; lane 7: enrichment culture of NOB incubated at 28 °C. The arrow labels 16S rDNA of the novel *Nitrotoga*-like bacterium.

Zusatzmaterial zu Lebedeva et al., 2011

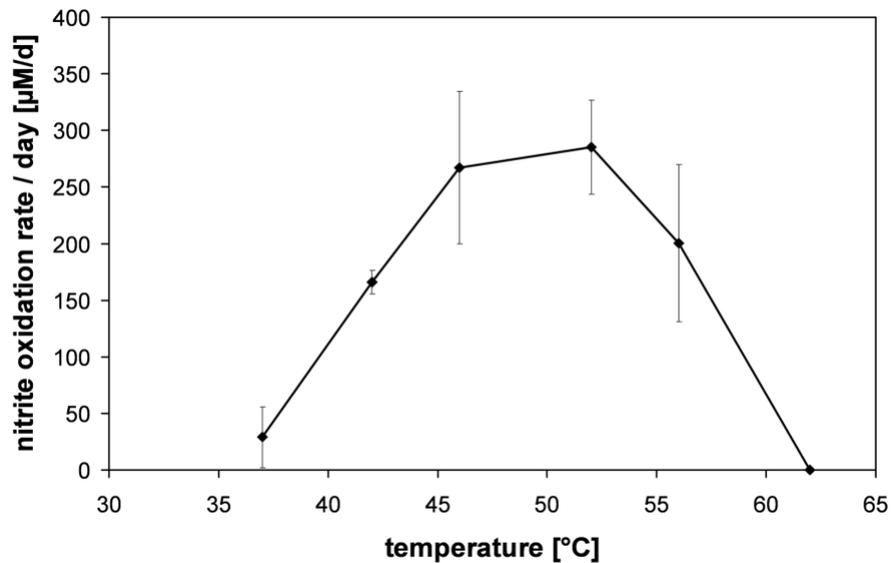


Fig. 1. Temperature dependence of nitrite consumption by *N. calida* strain Ns10. The inoculum was taken from a pre-culture grown at 46 °C. 1.0 mM sodium nitrite was used as substrate concentration and the pH of incubation was 7.7. The temperature optimum was determined on the basis of the maximal nitrite consumption rate, which was detected between day two and three. The results were reproduced in two independent experiments.

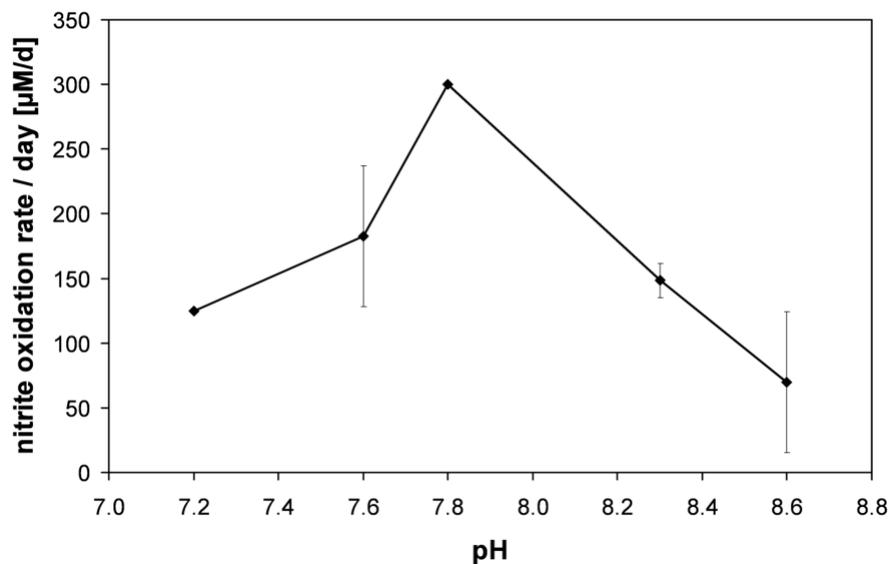


Fig. 2. Influence of pH on the nitrite consumption of *N. calida* strain Ns10. The inoculum was taken from a pre-culture grown at pH 8.4 and the temperature of incubation was 46 °C. Effect of pH on nitrite oxidation was measured between day four and five.

Danksagung

Als Erstes möchte ich mich bei Frau PD Dr. Eva Spieck für die Themenstellung, ihre Betreuung, Diskussionsbereitschaft und insbesondere für die Unterstützung in jeder familiären Situation bedanken. Sie vermittelte mir die Geheimnisse im Umgang mit den faszinierenden und manchmal sehr eigenwilligen Nitritoxidanten.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Streit danke ich für die Begutachtung meiner Arbeit und der Möglichkeit, in der Arbeitsgruppe für Mikrobiologie und Biotechnologie meine Doktorarbeit anfertigen zu dürfen.

Besonders danke ich Herrn Dr. Mashal Alawi, der mich in der ersten Zeit meiner Arbeit begleitete und mir mit Rat und Tat zur Seite stand. Seine konstruktive Kritik und das Korrekturlesen dieser Arbeit haben mir sehr geholfen.

Frau Dr. Elena Lebedeva danke ich für Bereitstellung zahlreicher Anreicherungskulturen sowie für die freundliche und sehr effektive Zusammenarbeit zeitweise auch über tausenden von Kilometern hinweg.

Den Kooperationspartnern Herrn Prof. Dr. André Lipski und Frau Dr. Myriam Kruse sei für die anfänglich enge Zusammenarbeit gedankt.

Bei Frau Sabine Zumbrägel möchte ich mich für die Vertretung während der Schwangerschaft und die erfolgreiche Weiterführung meiner Kulturen bedanken.

Frau Dr. Sabine Keuter und Frau Katja Wendt danke ich für die stete Hilfe beim Lösen von Problemen, für die vielen Ratschläge und das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Meinen Promotionskollegen und -kolleginnen aus Raum 3.008 danke ich ganz besonders für eine so herzliche Atmosphäre.

Weiterhin danke ich allen anderen Mitarbeitern des Arbeitsbereiches Mikrobiologie und Biotechnologie sowie der Lebensmikrobiologie der Universität Hamburg für ein kollegiales und gutes Zusammenarbeiten.

Frau Elke Woelken danke ich für die mit vielen interessanten und unterhaltsamen Gesprächen verbundene Unterstützung bei der Vorbereitung und Analyse zahlreicher elektronenmikroskopischer Proben.

Die vorliegende Arbeit wurde zum Teil von der Deutschen Forschungsgesellschaft (DFG) mit dem Projekt DFG SP 667/3-1 unterstützt. Für die bereitgestellten Mittel möchte ich mich hiermit bedanken.

Ein ganz herzliches Dankeschön geht an meine Eltern, Marlies und Holger sowie meiner Schwester Anneke für das Vertrauen und die unzähligen Ermutigungen.

Meiner Freundin Svenja danke ich für ihre absolut verlässliche Unterstützung und die vielen aufbauenden Worte.

Mein größter Dank geht an meine kleine Familie. Nur mit ihrem Verständnis und ihrer Geduld konnte ich diese Herausforderung schaffen.

Holger und Milena, Ich liebe euch!