

Strukturelle und funktionelle Analysen von Bakterienpopulationen mit Hilfe der PCR-SSCP in sechs unterschiedlichen Modellböden

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Rheinisch-
Westfälischen Technischen Hochschule Aachen zur Erlangung des akademischen
Grades einer Doktorin der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Biologin

Anja Seibold

aus Stade/Elbe

Berichter: Frau Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Ursula Priefer

Herr Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Klinner

Tag der mündlichen Prüfung: 30. Oktober 2002

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

1	Einleitung	1
1.1	Bodenbakterien.....	2
1.2	Molekulare Methoden zur Analyse bakterieller Gemeinschaften.....	3
1.3	Biologische Stickstofffixierung und funktionelle Markergene	10
1.4	Zielsetzung der Arbeit.....	13
2	Material und Methoden	15
2.1	Verwendete Chemikalien und Geräte	15
2.1.1	Chemikalien.....	15
2.1.2	Technische Geräte.....	16
2.1.3	Puffer und Lösungen.....	17
2.1.4	Medien.....	18
2.2	Bakterienstämme.....	19
2.3	Physikalische und chemische Bodenparameter.....	19
2.3.1	Bodenproben.....	19
2.3.2	Korngrößenanalyse.....	21
2.3.3	Wasser- und Lufthaushalt.....	23
2.3.3.1	Porenvolumen.....	23
2.3.3.2	Bodenwassergehalt und Trockengewicht	23
2.3.3.3	Feldkapazität.....	24
2.3.4	pH-Wert.....	24
2.3.5	Carbonatbestimmung.....	25
2.3.6	Humusgehalt.....	26
2.3.7	Bestimmung des anorganischen Stickstoffs als Ammonium und Nitrat....	27
2.3.7.1	Nitratbestimmung	28
2.3.7.2	Ammoniumbestimmung	28

2.4	Mikrobiologische Arbeitstechniken.....	29
2.4.1	Bakterienanzucht.....	29
2.4.2	Glycerinkulturen.....	30
2.5	Molekularbiologische Arbeitstechniken.....	30
2.5.1	Isolierung von Gesamt-DNA aus Gram-negativen Bakterien.....	30
2.5.2	Isolierung von Gesamt-DNA aus Gram-positiven Bakterien.....	31
2.5.3	Isolierung von Gesamt-DNA aus Boden.....	31
2.5.4	Gelelektrophorese	33
2.5.5	PCR.....	33
2.5.5.1	Amplifikationsansätze	34
2.5.5.2	Reinigung der PCR-Produkte.....	37
2.5.6	SSCP.....	38
2.5.6.1	Lambda-Exonuklease-Verdau	38
2.5.6.2	Reinigung der einzelsträngigen DNA-Proben	39
2.5.6.3	Polyacrylamid (PAA)-Gelelektrophorese.....	39
2.5.6.4	Silbernitratfärbung	41
2.5.7	Elution von DNA und Sequenzierung	42
3	Ergebnisse.....	44
3.1	Chemische und physikalische Bodenparameter.....	44
3.2	Etablierung und Optimierung der PCR-SSCP	48
3.2.1	Optimierung der PCR.....	48
3.2.2	Optimierung der SSCP.....	50
3.3	Untersuchung der sechs Modellböden mit PCR-SSCP	55
3.3.1	Isolierung genomischer DNA aus Boden.....	56
3.3.2	Strukturelle Analyse.....	57
3.3.3	Sequenzierung ausgewählter 16S rDNA Amplifikate	65
3.3.4	Funktionelle Analyse am Beispiel des <i>nifH</i> Gens.....	74
3.3.5	Ergebnisse der Sequenzierung des <i>nifH</i> -Gens	78

4	Diskussion	83
4.1	Methodendiskussion der SSCP	83
4.1.1	DNA-Isolierung.....	83
4.1.2	PCR.....	84
4.1.3	SSCP	86
4.1.3.1	Auflösungsvermögen	87
4.1.3.2	Parallelproben und Reproduzierbarkeit.....	89
4.1.3.3	Computerauswertung	90
4.1.4	Sequenzanalyse	91
4.1.5	Alternative Nitrogenasen.....	92
4.2	Strukturelle und funktionelle Diversitätsanalysen der Modellböden.....	96
4.2.1	Datenbankvergleiche	100
5	Zusammenfassung.....	103
6	Ausblick	105
7	Abkürzungen.....	107
8	Literaturverzeichnis	109
9	Anhang	121
10	Danksagung	124
11	Lebenslauf.....	125

1 Einleitung

Der Boden stellt als Grundlage für das terrestrische Leben auf der Erde ein wichtiges Teil-Ökosystem dar und bietet Lebensraum für Mikroorganismen, Pflanzen und Tiere. Er ist ein sehr heterogenes System, das aus drei verschiedenen Phasen besteht, der Bodenmatrix (feste Phase), Bodenlösung (flüssige Phase) und Bodenluft (gasförmige Phase). Deren Anteil und räumliche Verteilung prägen alle wichtigen Bodenprozesse und machen eine der grundlegendsten Eigenschaften des Bodens aus. Durch seine Funktion als Ort der Zersetzung und Mineralisierung organischer Stoffe sowie als Speicher für Nährstoffe und Wasser, spielt er eine entscheidende Rolle für die globalen Stoffkreisläufe und stellt den Bodenorganismen, dem Edaphon, ein nährstoffreiches und auf kleinstem Raum äußerst komplexes Substrat mit einer sehr großen spezifischen Oberfläche zur Verfügung. Das Edaphon gliedert sich in die Bodenflora und Bodenfauna, und seine Aktivität wird durch die physikalischen und chemischen Zustände und Prozesse im Boden gesteuert. Umgekehrt beteiligen sich die Organismen an wichtigen Prozessen der Bodenbildung. Seine Hauptaufgabe ist der Ab- und Umbau der organischen Substanz und die Rückführung der Stoffe in eine anorganische Form, in der sie von den Pflanzen wieder aufgenommen werden können (Gisi *et al.* 1997).

Obwohl Pflanzen nicht im engeren Sinn zu den Bodenorganismen zählen, befinden sich ihre Wurzeln in direktem Stoffaustausch mit dem Boden. Die unmittelbare Oberfläche der Pflanzenwurzel, die Rhizoplane, sowie die enge Zone von Boden, die von der Wurzel durch Abgabe chemischer Stoffe unmittelbar beeinflusst wird, die Rhizosphäre, stellen einen bedeutenden Lebensraum für Mikroorganismen dar. Diese werden durch die Wurzelexsudation wachsender Pflanzen gefördert, während umgekehrt Pflanzen durch die Tätigkeit der Rhizosphärenorganismen positiv oder negativ beeinflusst werden können. Das im Vergleich zu wurzelfreiem Boden häufigere Vorkommen von Mikroorganismen in Wurzelnähe wird als Rhizosphäreneffekt bezeichnet (Gisi *et al.* 1997).

1.1 Bodenbakterien

Bakterien stellen einen beachtlichen Teil der Bodenmikroflora dar. Sie treten mit einer Häufigkeit von bis zu 10^9 Zellen (Blaine Metting 1992) und einer hohen Diversität von minimal 4000-7000 unterschiedlichen Bakteriengenomen pro Gramm Boden auf (Torsvik *et al.* 1990). Bodenbakterien zeigen die unterschiedlichsten Stoffwechselaktivitäten und übernehmen Schlüsselfunktionen in den biochemischen Kreisläufen der Makro- und Mikronährelemente (Ranjard *et al.* 2000). Aufgrund ihrer begrenzten Kultivierbarkeit sind sie in ihrer Breite bisher nur sehr unvollständig untersucht. Schätzungsweise können nur 0,1 bis 10 % der gesamten Bakteriengemeinschaft kultiviert werden (Amann *et al.* 1995).

Die Bakteriengruppe der Aktinomyceten, die zu den Gram-positiven Eubakterien zählt (Ensign 1992), spielt eine wichtige Rolle im Boden (Gisi *et al.* 1997). Sie sind morphologisch und physiologisch sehr divers und leben obligat aerob saprophytisch, d.h. sie ernähren sich von totem organischen Material (Gisi *et al.* 1997). Sie sind zahlenmäßig im Boden sehr dominant (Ensign 1992) und besitzen einige einzigartige Eigenschaften, die wahrscheinlich mit ihrer Fähigkeit, im Boden zu überleben, korreliert sind. Sie produzieren viele extrazelluläre Enzyme, die komplexe Makromoleküle, wie Lignin, Chitin und Stärke, die speziell im Boden zu finden sind, zumindest teilweise abbauen können und spielen daher eine große Rolle bei der Mineralisation im Boden. Ihre Resistenz gegen Austrocknung durch die Sporenbildung von *Streptomyces* oder dem nicht-Sporenbildner *Arthrobacter*, der von einigen Autoren zu den Aktinomyceten (Ensign 1992), von anderen dagegen (Schlegel & Schmidt 1985, Madigan *et al.* 2000) den Corynebakterien zugeordnet wird, ist sehr wichtig für das Überleben in trockenen Böden.

Weitere herausragende Eigenschaften der Aktinomyceten sind ihre Antibiotikaproduktion (Streptomycin, Chloramphenicol, Tetracycline), die Produktion von Geosmin, einem Terpendeivat, das den typischen Bodengeruch im Wald ausmacht (Gisi *et al.* 1997), sowie die Stickstofffixierung der Gattung *Frankia* in Wurzelknöllchen in einer Symbiose mit Angiospermen (Heuer *et al.* 1997).

1.2 Molekulare Methoden zur Analyse bakterieller Gemeinschaften

In den letzten Jahren wurden verstärkt Methoden zur Untersuchung von nicht-kultivierbaren Bakterienarten entwickelt. Dabei ist die molekulare mikrobielle Ökologie zu einer eigenen Disziplin geworden (Akkermans *et al.* 1995). Obwohl molekulare Methoden brauchbare Werkzeuge sind, die Diversität und Struktur bakterieller Gemeinschaften zu untersuchen, ersetzen sie allerdings nicht die Charakterisierung der physiologischen und biochemischen Eigenschaften, die nach wie vor die Kultivierung eines Organismus erfordert (Amann *et al.* 1994).

Um tiefere Einblicke in die Funktion und Vielfalt der mikrobiellen Zönosen des Bodens zu erlangen und die Auswirkung von menschlichen Eingriffen wie z.B. Bodenbearbeitung, Düngung und Pflanzenschutzmittel auf die Bakteriengemeinschaft im Boden zu gewinnen, ist die Untersuchung der bakteriellen Diversität im Boden erforderlich (Ranjard *et al.* 2000).

Die ökologische Diversität - darunter wird die Vielfalt und Häufigkeit der Spezies in unterschiedlichen Habitaten und Gemeinschaften verstanden - ist ein zentrales Thema der Ökologie. Allgemein wird sie für einen brauchbaren Indikator gehalten, ökologische Systeme zu bewerten. Über ihre Rolle in der Funktion von Ökosystemen wird allerdings noch kontrovers diskutiert (Chapin *et al.* 1997, Lawton 1994, Magurran 1988, McNaughton 1977, Naeem *et al.* 1994, Pimm 1984, Putman 1994, Rosenzweig 1995). Eine Schwierigkeit besteht darin, die Diversität exakt zu bestimmen (Franklin *et al.* 2001). Zur Zeit gibt es keine Methode, mit der mikrobielle Diversität gemessen werden kann. Dagegen stehen viele Methoden zur Verfügung, mit denen Änderungen der Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft erfaßt werden können (Franklin *et al.* 2001).

Die molekularen Untersuchungsmethoden der mikrobiellen Gemeinschaft teilen sich nach Ranjard *et al.* (2000) in zwei Kategorien. Erstens in die Untersuchung des vollständigen Genoms, bei der die ganze genetische Information der extrahierten DNA in die Untersuchung eingesetzt wird, und zweitens in die Analyse eines bestimmten Genom-Teiles, eines Gens oder eines Teils eines Gens, das mit der Polymerase Ketten Reaktion (PCR) amplifiziert und weiter untersucht wird (siehe Abbildung 1).

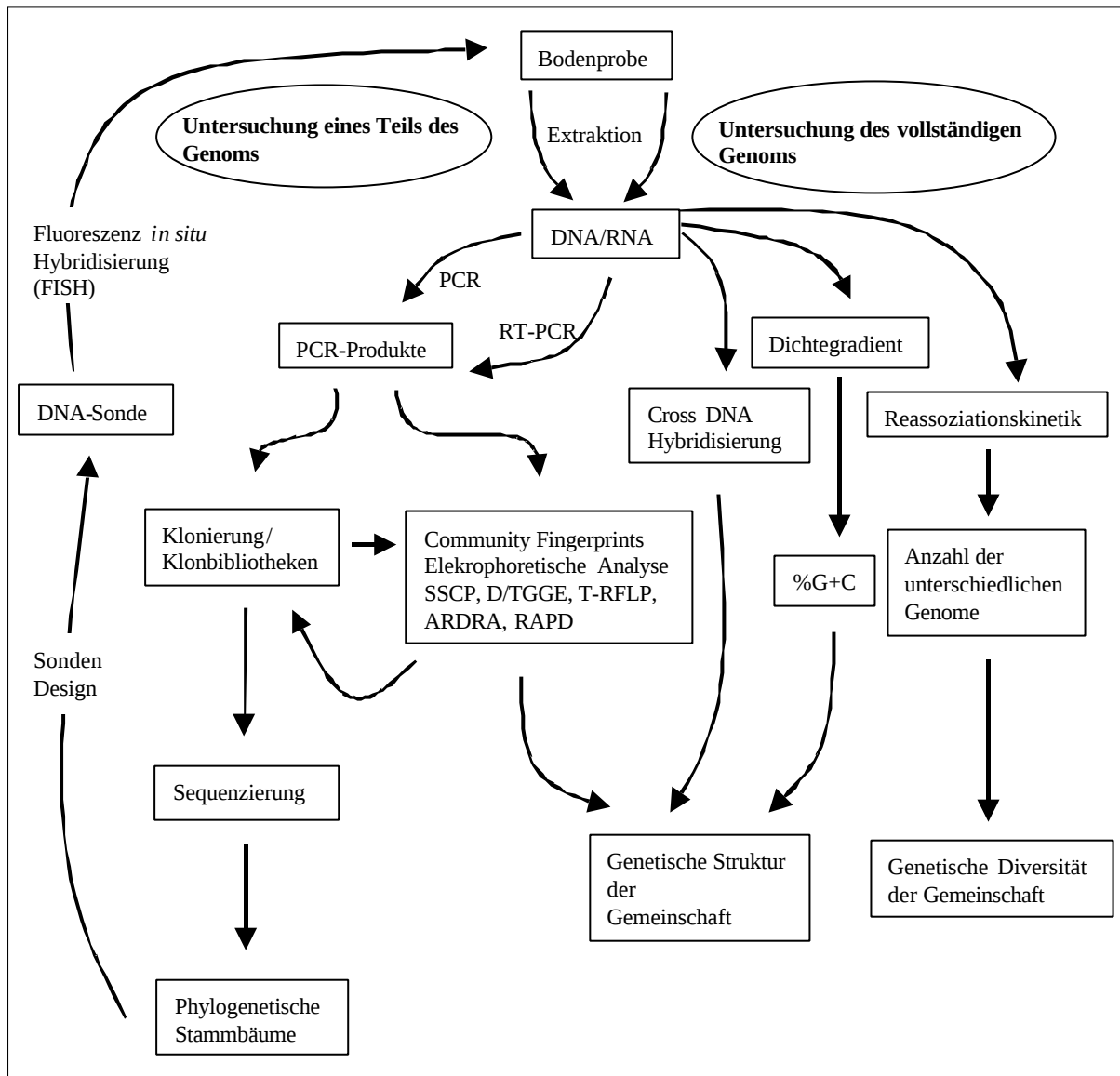


Abbildung 1: Strategien zur Charakterisierung mikrobieller Gemeinschaften im Boden ohne Kultivierung, abgeändert nach Pace (1996) und Ranjard *et al.* (2000)

Bei der Untersuchung des vollständigen Genoms kommen Methoden wie die Cross DNA Hybridisierung (Lee & Fuhrman 1990), Reassoziationskinetiken (Torsvik *et al.* 1990, 1996) und Dichtegradientuntersuchungen (Holben & Harris 1995) zum Einsatz. Diese ermöglichen die Untersuchung der genetischen Struktur und der Diversität der Bakteriengemeinschaft.

Bei der Beschränkung der Analyse auf ein bestimmtes Gen oder einen Teil eines Gens, werden bei Prokaryoten am häufigsten Sequenzen der 16S rDNA ausgewählt sowie der IGS (intergenic spacer) zwischen den 16S rRNA und 23S rRNA Genen.

Die 16S rRNA ist ein etwa 1520 bp langes Polynukleotid (Neefs *et al.* 1993), das einen funktionellen Teil der kleinen Untereinheit prokaryotischer Ribosomen darstellt. Aufgrund ihrer funktionellen Konstanz, der universellen Verbreitung und der guten Konservierung eignen sich rRNA Moleküle hervorragend als phylogenetische Marker (Madigan *et al.* 2000). Sie besitzen daher ein großes Potential für phylogenetische Rekonstruktionen der mikrobiellen Diversität (Olsen *et al.* 1986, Woese 1987). Die Sequenzen der 16S rRNA-Gene nahezu aller beschriebenen Prokaryoten sowie die Sammlung der 16S rDNA Klon Bibliotheken aus Umweltproben stellen einen der größten Datensätze für ein individuelles Gen zur Verfügung (Amann *et al.* 1994, Glöckner *et al.* 2000, Maidak *et al.* 2000), wodurch die Identifizierung neuer 16S rDNA Sequenzen erheblich erleichtert wird.

Durch Zusammenstellung von Sequenzdaten konnte gezeigt werden, daß die 16S rRNA Gene aller lebenden Organismen neun variable Regionen (V1 bis V9) im Molekül verteilt enthalten (Neefs *et al.* 1993). Stark konservierte Bereiche können dabei gut für Primer- oder Sondenbindungsstellen verwendet werden, während die variablen Bereiche sich zur Unterscheidung der Organismen eignen.

Obwohl die Analyse der 16S rRNA Sequenzen ein idealer Weg ist, phylogenetische Zusammenhänge zu klären, kann dieser Ansatz nicht dazu verwendet werden, Rückschlüsse auf physiologische Eigenschaften der Bakterien zu ziehen (Crocker *et al.* 2000). Zur Untersuchung einer Bakteriengemeinschaft mit einer bestimmten Eigenschaft ist die Analyse des entsprechenden funktionellen Gens besser geeignet. Solche funktionellen Analysen wurden z.B. für denitrifizierende (Braker *et al.* 2000), Ammonium oxidierende (Rotthauwe *et al.* 1997), methanotrophe (Henckel *et al.* 2001), Sulfat reduzierende (Wawer & Muyzer 1995), photosynthetische (Pichard *et al.* 1997) und stickstofffixierende Bakterien (Young 1992, Widmer *et al.* 1999) durchgeführt.

Nach der Vervielfältigung des ausgewählten Fragments über PCR, können die Amplifikationsprodukte anschließend kloniert, sequenziert und weiter durch Restriktion analysiert werden. Es kann ebenfalls mit Hilfe eines genetischen Fingerabdrucks („Fingerprinting“) ein globales Bild der genetischen Struktur einer bakteriellen Gemeinschaft erstellt werden. Der Einsatz der RT(**R**everse **T**ranskriptase)-PCR ermöglicht die Untersuchung aktiver Bakterienpopulationen. Dabei wird in der PCR

eine reverse Transkriptase eingesetzt, die einzelsträngige RNA als Matrize verwendet, um eine doppelsträngige DNA-Kopie herzustellen (Ibelgaufs 1993).

Die Sequenzierung der 16S rDNA wird inzwischen verstärkt dazu genutzt, die verwandtschaftlichen Beziehungen der Bakterien untereinander durch die Erstellung phylogenetischer Stammbäume zu bestimmen (Dobrovol'skaya *et al.* 2001). Sequenzdaten können auch zur Entwicklung von Sonden genutzt werden, die dann z.B. bei der **F**luoreszenz *in situ* **H**ybridisierung (FISH) eingesetzt werden können (Amann *et al.* 1995). Diese Methode ermöglicht die direkte Detektion metabolisch aktiver und dominanter mikrobieller Populationen im Boden (Dobrovol'skaya *et al.* 2001).

16S rDNA-Klone können ebenfalls vor oder statt einer Sequenzierung mit unterschiedlichen Fingerprint-Techniken, wie REP (**R**epetitive **E**xtragenic **P**alindromic), RAPD (**R**andom **A**mplified **P**olymorphic **D**NA), ERIC (**E**nterobacterial **R**epetitive **I**ntergeneric **C**onsensus) oder ARDRA (**A**mplified **R**ibosomal **D**N **A**nalysis) klassifiziert werden.

Im Gegensatz zur zeitaufwendigen Klonierung und Sequenzierung, mit der auch die weniger häufigen Bakterienpopulationen erfaßt werden können, bieten Fingerprint-techniken einen Überblick über die genetische Struktur der ganzen bakteriellen Gemeinschaft, sowie die Möglichkeit einer schnellen vereinfachten Abschätzung der mikrobiellen Diversität.

Die genetischen Fingerprints ergeben komplexe Bandenprofile, die eine repräsentative genetische Struktur der Gemeinschaft, definiert durch die Wahl bestimmter Primer, zeigen. Diese Bandenmuster sind aber bezüglich ihres Reichtums und ihrer Regelmäßigkeit nicht direkt interpretierbar, da sowohl die gleiche Bande von unterschiedlichen Bakterien stammen als auch eine Spezies mehrere Banden verursachen kann. Daher ist dieser Ansatz eher zum Vergleich bakterieller Gemeinschaften geeignet und wurde vor allem dazu genutzt, die genetische Diversität zwischen Böden unterschiedlicher Regionen, verschiedenen agrarkulturellen Praktiken und physikalisch-chemischen Gegebenheiten zu untersuchen (Ranjard *et al.* 2000).

Methoden wie **D**ichtegradient **G**elelektrophorese (DGGE), die **T**emperaturgradient **G**elelektrophorese (TGGE) und „**S**ingle **S**trand **C**onformation **P**olymorphism“ (SSCP) wurden ursprünglich in der Medizin zur Mutationsanalyse entwickelt (Myers *et al.*

1987, Orita *et al.* 1989). Erst später wurde ihr Potential für die Untersuchung von bakteriellen Gemeinschaften entdeckt (Muyzer *et al.* 1995, Schwieger & Tebbe 1998).

Die Methoden der DGGE und TGGE basieren auf der sequenzspezifischen Trennung doppelsträngiger DNA-Fragmente der gleichen Länge durch einen denaturierenden Gradienten (chemisch oder durch Temperatur) (Muyzer & Smalla 1998). Dazu wird in der PCR eine GC-Klammer, d.h. ein Bereich von 30 bis 40 Basen Cytosin und Guanin, an die PCR-Produkte synthetisiert. Während des Schmelzprozesses im Gradientengel, hält diese GC-Klammer die aufgeschmolzenen Einzelstränge terminal zusammen und fixiert dieses Molekül an der entsprechenden Position. Die Trennung der unterschiedlichen Moleküle erfolgt aufgrund des Schmelzverhaltens, das von der Sequenz abhängt. Folglich werden nur Unterschiede detektiert, die Sequenz selbst bleibt unbekannt.

Da sowohl DGGE als auch TGGE früher als die SSCP entwickelt wurden, liegen entsprechend mehr Untersuchungen mikrobieller Gemeinschaften mit diesen Methoden vor.

Die SSCP unterscheidet sich von der DGGE und TGGE dadurch, daß die Doppelstrangmoleküle nach der PCR durch die Behandlung mit dem Enzym Lambda-Exonuklease spezifisch in Einzelstrangmoleküle überführt werden. Angriffspunkt für dieses Enzym ist der Phosphatrest am 5'-Ende des PCR-Produkts, der durch den Reverseprimer eingeführt wurde (siehe Abbildung 2). Anschließend werden die Sekundärstrukturen der einzelsträngigen DNA-Moleküle sequenzspezifisch auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Dies bietet den entscheidenden Vorteil, daß die hohe Reannealing-Rate der Einzelstränge und damit die Heteroduplexmolekülbildung ausgeschlossen werden kann (Schwieger & Tebbe 1998, Lee *et al.* 1996). Unter Heteroduplexmolekülen versteht man hier doppelsträngige Moleküle, deren Einzelstränge von unterschiedlichen Organismen stammen. Solche Moleküle können während der PCR entstehen und bei DGGE und TGGE Artefakte bilden. Weiterhin wird während der Amplifikation durch die fehlende GC-Klammer am Primer die Bildung von Artefakten verhindert (Lee *et al.* 1996).

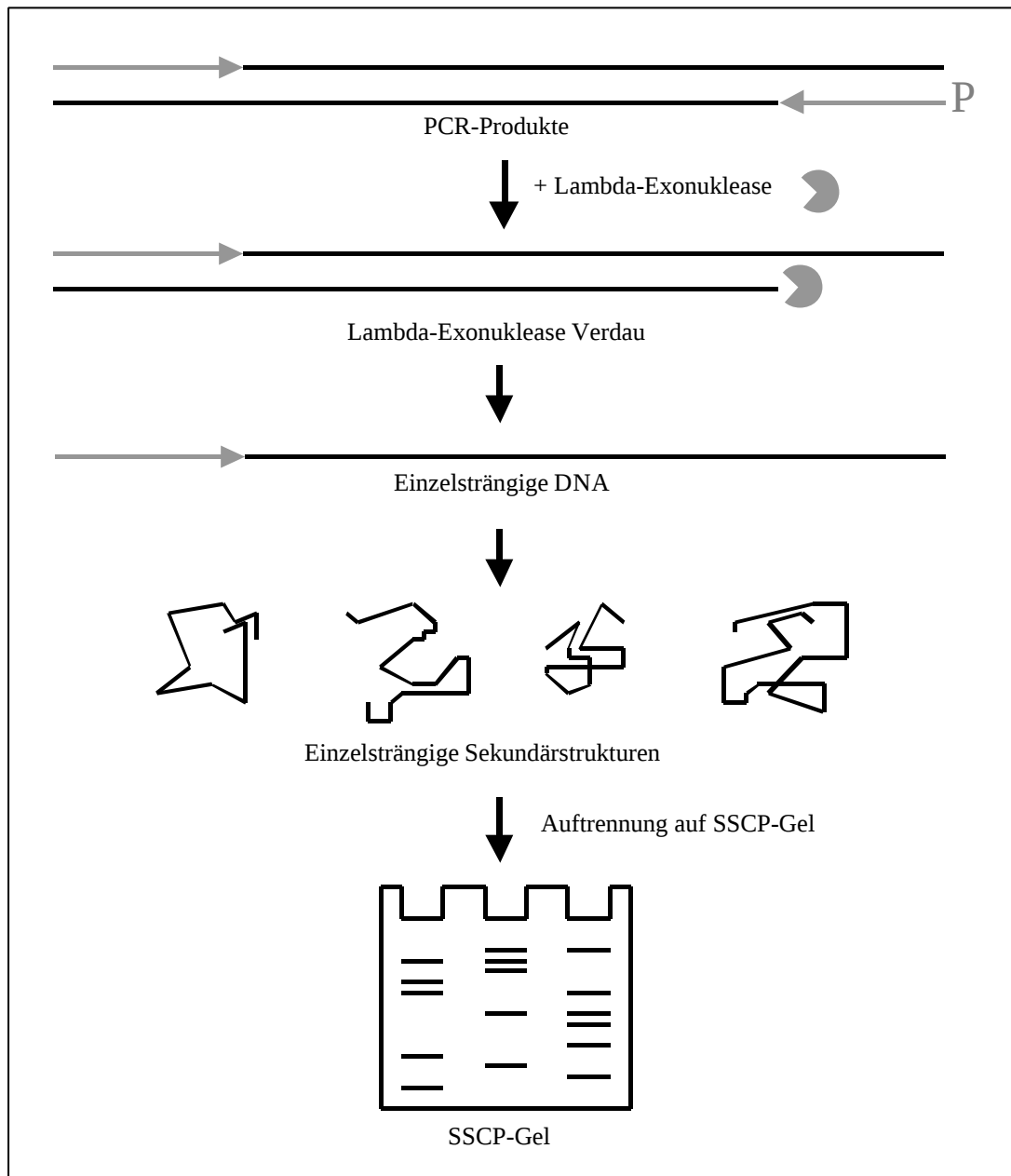


Abbildung 2: Schema des Single Strand Conformation Polymorphismus

Bisher wurde die SSCP zur Untersuchung bakterieller Diversitäten in folgenden Bereichen angewendet: Vergleich oligotropher See/eutropher Teich (Lee *et al.* 1996), Analyse mikrobieller Rhizosphärengemeinschaften (Schwieger & Tebbe 1998, 2000), Sukzession einer bakteriellen Gemeinschaft während des Kompostierungsprozesses (Peters *et al.* 2000) sowie zur Untersuchung der Dynamik einer mikrobiellen Gemeinschaft in einem anaeroben Bioreaktor (Zumstein *et al.* 2000). Weiterhin diente

sie dazu, die genetische Variabilität innerhalb einzelner Bakterienstämme zu untersuchen (Bennasar *et al.* 1998, Daffonchio *et al.* 1998).

Dabei konnte gezeigt werden, daß die Sensitivität dieser Methode hoch genug ist, um Bakterienpopulationen zu detektieren, die nur 1,5 % der bakteriellen Gemeinschaft ausmachen (Lee *et al.* 1996). Außerdem können minimale Sequenzunterschiede in PCR amplifizierter DNA detektiert werden (Sheffield *et al.* 1993). Dabei sinkt die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Mobilitätsänderungen mit steigender Fragmentgröße und nimmt ab einer Fragmentgröße von 400-500 bp ab (Sheffield *et al.* 1993, Hayashi 1992, Schmalenberger *et al.* 2001). Die Mobilität der einzelsträngigen DNA im Gel ist sowohl von der Länge als auch von der Sekundärstruktur, die durch die Sequenz bestimmt wird, abhängig (Orita *et al.* 1989).

Ursprünglich wurde die PCR-SSCP mit doppelsträngigen DNA-Molekülen durchgeführt, die vor der Elektrophorese denaturiert wurden (Lowell & Klein 2001, Nakao & Popovic 1998, Lee *et al.* 1996, Widjojoatmodjo *et al.* 1994). Daraus resultieren mindestens drei Banden pro Organismus, da auf dem SSCP-Gel jeweils beide Einzelstränge sowie der Doppelstrang eine Bande ausbilden. Dies ist bei der Analyse einer Mutation nicht weiter störend, bei der Untersuchung von bakteriellen Gemeinschaften wird dadurch allerdings die Komplexität des Bandenmusters unnötig stark erhöht.

Die Verwendung von biotinylierten Primern (Scheinert *et al.* 1996, Lee *et al.* 2000) oder ein Lambda-Exonukleaseverdau (Schwieger & Tebbe 1998) ermöglicht die Überführung der doppelsträngigen DNA in einzelsträngige Moleküle und vereinfacht dadurch das Bandenmuster.

1.3 Biologische Stickstofffixierung und funktionelle Markergene

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die erstmalige Etablierung einer funktionellen Analyse von Bakteriengemeinschaften im Boden mit Hilfe der PCR-SSCP am Beispiel des *nifH*-Gens der stickstofffixierenden Bakterien im Boden.

Die Fähigkeit Luftstickstoff zu fixieren ist in fast allen großen Gruppen der Eubakterien verbreitet (Eady 1992), wie z.B. bei den Cyanobakterien, Proteobakterien und Gram-positiven Bakterien (Young 1992) und wurde sogar bei methanogenen Archaeobakterien nachgewiesen (Murray & Zinder 1984). Durch die Stickstofffixierung wird molekularer Stickstoff in Ammonium überführt. Global werden $2 \text{ bis } 2,5 \times 10^8 \text{ t x ha}^{-1} \text{ x a}^{-1}$ Stickstoff fixiert, davon stammen 60 % aus biologischer Stickstofffixierung (Eady 1992).

Die biologische Stickstofffixierung wurde schon lange als wichtige Quelle für gebundenen Stickstoff in vielen Ökosysteme erkannt (Fogg & Stewart 1968, Horne 1971, Capone 1988, Dobereiner 1997, Moriarty & O'Donohue 1993). Im Boden liegt anorganischer Stickstoff in verfügbarer Form entweder als Nitrat oder als Ammonium vor. Er wird durch die Ammonifikation aus totem organischen Material mineralisiert und anschließend weiter durch die Nitrifikation in Nitrat umgewandelt, das von den Pflanzen aufgenommen werden kann. Da Nitrat leicht ausgewaschen wird oder unter anaeroben Bedingungen durch die Denitrifikation in molekularen Stickstoff umgewandelt werden kann, stellt Stickstoff im Boden einen limitierenden Faktor für das Pflanzenwachstum dar (Gisi *et al.* 1997). Dieses Defizit wird zum Teil durch die Stickstofffixierung ausgeglichen (Eady 1992).

Obwohl die meisten stickstofffixierenden Bakterien freilebend sind (Eady 1992), ist ihr Beitrag zur Gesamtfixierung im Vergleich zur symbiontischen Stickstofffixierung gering. Letztere wurde z.B. bei Rhizobien mit Leguminosen, dem Cyanobakterium *Anabaena azollae* mit dem Farn *Azolla* und dem Aktinomyceten *Frankia* mit Angiospermen beschrieben (Eady 1992). Einige Stickstofffixierer leben auch mit Pflanzenwurzeln assoziiert (Klucas 1991).

Die Reaktion der Stickstofffixierung wird durch das Enzym Nitrogenase katalysiert, das sich aus zwei funktionellen Komponenten, der Dinitrogenase und der Nitrogenase-

Reduktase zusammensetzt. Die Dinitrogenase katalysiert die Reduktion von N_2 zu Ammonium, während die Nitrogenase-Reduktase die dafür benötigten Reduktionsäquivalente unter ATP-Hydrolyse bereitstellt. Die Untereinheiten der Nitrogenase werden durch die sehr konservierten Gene *nifHDK* kodiert. Durch die Wechselwirkungen der beiden Komponenten der Nitrogenase wird ein Elektronentransport katalysiert, der die Reduktion des Stickstoffs ermöglicht. Diese Reaktion ist energetisch sehr ungünstig, da 16 ATP pro reduziertem Stickstoffmolekül verbraucht werden (Eady 1992). Der hohe Energiebedarf kann von einer Reihe von Stoffwechseltypen gedeckt werden, wie die Heterogenität der stickstofffixierenden Bakterien zeigt. Da die Nitrogenase sehr sauerstoffempfindlich ist, haben aerobe Stickstofffixierer spezielle Mechanismen und Strukturen entwickelt, um die interne Konzentration an freiem Sauerstoff zu reduzieren, z.B. die Heterocysten bei Cyanobakterien (Haselkorn 1978), Vesikel bei der Gattung *Frankia* (Tjepkema *et al.* 1980), Bakterioide bei den Rhizobien und eine verzweigte Atmungskette bei der Gattung *Azotobacter* (Eady 1992).

Die Nitrogenasesysteme der bisher beschriebenen stickstofffixierenden Bakterien sind sich sehr ähnlich. Eine Ausnahme bildet das Bakterium *Streptomyces thermoautotrophicus* (Ribbe *et al.* 1997). Es besitzt ein Enzymsystem, das deutlich weniger Energie verbraucht und sich maßgeblich von den bisher untersuchten Nitrogenasesystemen unterscheidet (Ribbe *et al.* 1997).

Aufgrund der Heterogenität der stickstofffixierenden Prokaryoten ist ihre Untersuchung nur anhand eines funktionellen Gens möglich. Das *nifH* Gen wurde als molekulares Markergen für die Stickstofffixierung beschrieben (Young 1992) und bereits mehrfach für die Untersuchung stickstofffixierender Bakterien eingesetzt. So wurden *nifH* Genpools bereits in aquatischen (Zani *et al.* 2000, Kirshtein *et al.* 1991, Zehr *et al.* 1998, Zehr *et al.* 1995, Olson *et al.* 1999, Tibbles & Rawlings 1994, Piceno *et al.* 1999, Olson *et al.* 1998) und terrestrischen Ökosystemen (Poly *et al.* 2001, Mergel *et al.* 2001, Shaffer *et al.* 2000, Kloos *et al.* 1998, Widmer *et al.* 1999) sowie im Darm von Termiten (Ohkuma *et al.* 1996 und 1999) untersucht. Dabei muß davon ausgegangen werden, daß mit dem *nifH* Genmarker *Streptomyces thermoautotrophicus* nicht erfaßt werden kann.

In den Untersuchungen des *nifH* Gens konnte gezeigt werden, daß seine Phylogenie grob mit der des 16S rRNA Gens übereinstimmt (Widmer *et al.* 1999, Steppe *et al.* 1996, Ueda *et al.* 1995). Young (1992) stellte in Frage, ob ein Gen, wie z.B. die 16S rDNA, die Beziehungen der Bakteriengenome insgesamt reflektieren kann. Er kommt zu dem Ergebnis, daß wenn die Phylogenie anderer Gene mit der der 16S rDNA übereinstimmt, dies die evolutionären Beziehungen der Bakterien untereinander widerspiegeln müßte. Dabei sind Abweichungen durch horizontalen Gentransfer zu erklären (Young 1992).

Der Nachweis von *nifH* Genen bedeutet allerdings nicht, daß aktive Stickstofffixierung stattfindet. Da die Nitrogenase sowohl prä- als auch posttranslational reguliert wird (Dean & Jacobson 1992), wäre auch der Nachweis der entsprechenden mRNA kein Beweis für die tatsächlich vorliegende Stickstofffixierungsaktivität. Piceno *et al.* (1999) zeigten bei der Untersuchung von *nifH* Genen in der Rhizosphäre einer Salzmarschvegetation mit der DGGE, daß die kleinen Unterschiede in den Acetylen-Reduktionsraten nicht das Ergebnis der Unterschiede in der Zusammensetzung der Ansammlung der stickstofffixierenden Bakterien ist.

Die Diversität anderer funktioneller Markergene ist ebenfalls mit DGGE untersucht worden (Muyzer & Smalla 1998), wie z.B. das [NiFe]-Hydrogenasegen der Sulfat reduzierenden Bakterien der Gattung *Desulfovibrio* (Wawer & Muyzer 1995), Methan oxidierende Bakterien anhand der Methanmonooxygenase (*pmoA*) und der Methanoldehydrogenase (*mxoF*) (Henckel *et al.* 1999) und Stickstoff fixierende Bakterien anhand des *nifH* Gens (Dinitrogenasereduktase) (Rosado *et al.* 1998, Piceno *et al.* 1999). Da sie jeweils nur einen Teil der bakteriellen Gemeinschaft repräsentieren, zeigen sie einfachere Bandenmuster als die der strukturellen Analyse (Muyzer & Smalla 1998).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Methode der PCR-SSCP nach Schwieger & Tebbe (1998) nicht nur zur strukturellen sondern erstmals auch zur funktionellen Analyse bakterieller Gemeinschaften im Boden etabliert werden. Dabei wurde die Fragestellung, ob mit dieser Methode auch funktionelle Analysen möglich sind, am Beispiel des *nifH*-Gens, das für die Nitrogenase-Reduktase, einem Schlüsselenzym für die Stickstofffixierung, kodiert, untersucht. Um die häufig als Minderheit vorkommenden stickstofffixierenden Bakterien (Chandler *et al.* 1997) im Boden erfassen zu können, wurde der verschachtelte PCR-Ansatz von Widmer *et al.* (1999) übernommen. Vergleichend zu diesem funktionellen Ansatz sollte in einem strukturellen Ansatz die Diversität der Eubakterien und Aktinomyceten analysiert werden.

Die Anwendbarkeit der strukturellen und funktionellen SSCP sollte nach der Optimierung der Methode an sechs sehr unterschiedlichen Modellböden unterschiedlicher Herkunft getestet werden. Dazu wurde Buchenwaldboden des Aachener Stadtwaldes, Gartenboden aus dem westlichen Stadtgebiet von Aachen, Rekultivierungsboden des Rheinischen Braunkohlereviers im dritten Jahr der Rekultivierung und Boden aus drei unterschiedlichen Regionen nahe des Aralsees ausgewählt. Da Untersuchungen des *nifH* Gens im Boden gezeigt haben, daß in den obersten Bodenschichten die meisten stickstofffixierenden Mikroorganismen vorkommen (Kloos *et al.* 1998, Widmer *et al.* 1999), beschränkte sich die Probenahme auf die oberste Bodenschicht.

Die Böden wurden deswegen ausgewählt, da sie sich in wichtigen Parametern grundlegend unterscheiden. Bei dem Buchenwaldboden handelt es sich um einen natürlich gewachsenen, humosen, sauren Boden während dem Gartenboden durch regelmäßige Bearbeitung Nährstoffe und Humus zugeführt wurden. Der Rekultivierungsboden ist ein nährstoff- und humusarmer Boden. Er zeichnet sich durch eine fehlende Abfolge der Bodenhorizonte aus, die durch den Braunkohleabbau zerstört wurden (Dumbeck 1992). Die Bodenqualität soll während der landwirtschaftlichen Rekultivierung durch dreijährigen Daueranbau von Luzerne als Pionierpflanze verbessert werden. Die tiefwurzelnde Luzerne lockert auch die tiefen Bodenregionen auf und gewährleistet durch die Speicherung von Luftstickstoff im Wurzelbereich,

durch die Symbiose mit Rhizobien die Anreicherung von pflanzenverfügbaren Stickstoff (Sihorsch 1992).

Der Boden in der Region des Aralsees ist sandig, salzig und einem aridem Klima ausgesetzt. Der Aralsee liegt in Mittelasien und war 1960 mit 69 000 qkm das viertgrößte Binnengewässer der Welt. Da in den letzten 50 Jahren aus seinen Zuflüssen große Wassermengen für die umliegende Landwirtschaft entnommen wurde, schrumpfte der See inzwischen auf ein Fünftel seiner damaligen Größe. In Folge der Austrocknung des schwachsalzigen (1,08 %) Sees, sowie durch Sand- und Salzverwehungen, versalzte der See und damit der umliegende Boden zunehmend. Durch den Einsatz von Pestiziden in der Landwirtschaft ist der Boden zusätzlich stark belastet (Jensen *et al.* 1997).

Im Anschluß an die Diversitätsanalysen der einzelnen Böden sollten zusätzlich einzelne Bakterien durch Sequenzierung ausgewählter PCR-Amplifikate taxonomisch charakterisiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Chemikalien und Geräte

2.1.1 Chemikalien

Chemikalien:

Soweit nicht anders vermerkt, stammten alle verwendeten Chemikalien in Analysequalität von den Firmen Merck, Life Technologies, Pharmacia Biotech, Serva, Roth, Fluka, Sigma, Biozym und Riedel-de Haën.

Nährstoffe:

Agar (Fa. ICN Biomedicals Inc.)

Hefe-Extrakt (Fa. Gibco BRL)

Trypton (Fa. Oxoid)

Verbrauchsmaterial:

Filter: Zellulose Nitrat Filter, 0,45 µm Porengröße (Fa. Sartorius)

Faltenfilter: Typ 593 ½ Ø 185 mm (Fa. Schleicher & Schuell)

Reaktionsgefäße: 1,5 ml (Fa. Sarstedt)

Reaktionsgefäße: 2 ml (Fa. Biozym)

Reaktionsgefäße für PCR: 0,2 ml 8-er Strips (Fa. Greiner)

Zinnkartuschen (3,5 x 5 mm) (Fa. HEKAtech)

Enzyme und Reaktionskits:

Proteinase K (Fa. MN)

Pronase E (Fa. Serva)

Ribonuklease A (Fa. Serva)

Lambda-Exonuklease (Fa. New England Biolabs)

FastDNA SPIN Kit (for soil) (Fa. Bio 101)

NuclioSpin® Extract (Fa. Macherey & Nagel)

Größenstandard:

100 bp DNA Ladder Plus, GeneRuler™ (Fa. MBI Fermentas)

2.1.2 Technische Geräte

Elektrophorese-Dokumentation: Compact imaging system (Fa. Imago)

Elementar-Analyser Modell 1106 (Fa. Carlo Erba Strumentazione)

Geldokumentationssystem Imago compact imaging system, B & L Systems

Kühlzentrifuge: Universal 30 RF (Fa. Hettich)

Rotor: Universal 30 F (Fa. Hettich)

Tischzentrifuge: Biofuge 13 (Fa. Heraeus); Rotor Heraeus Sepatech

Kugelmühle Typ MM2 (Fa. Retsch)

pH-Meter: HI 931300 Microprocessor Logging pH Meter (Fa. Hanna Instruments)

Photometer: Ultrospec® 1000 UV/Visible Spectrophotometer (Fa. Pharmacia Biotech)

Schüttler: Horizontalschüttler: Typ 3015 (Fa. GFL)

Überkopfschüttler GFL 3040

SSCP: 2010 Macrophor Electrophoresis Unit (Fa. LKB Bromma)

2103 Powersupply (Fa. LKB Biochrom)

Thermomixer comfort (Fa. Eppendorf)

Thermocycler: TRIO-Thermoblock™ (Fa. Biometra)

Computerprogramme:

Scanner: Agfa Arcus II; Programm: Agfa FotoLook 3.5

Chromas 1.51

Clustal X 1.81

Treeview, Version 1.6.1

Gelcompar II, Applied Maths, Kortrijk, Belgium

2.1.3 Puffer und Lösungen

1 x TBE-Puffer (2,5 mM EDTA, 90 mM Borsäure, 90 mM Tris-HCl)

1 x TE-Puffer (1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5)

10 x PCR-Puffer für Hot Gold Star Polymerase (150 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 0,1 % Tween 20)

Ladepuffer für Agarosegele: 60 % Glycerin, 50 mM EDTA, 100 mM Tris, 2 mg/ml Bromphenolblau, pH 8,0

Ladepuffer für SSCP-Gele: 95 % Formamid, 10 mM NaOH, Bromphenolblau

Elutionspuffer (0,5 x Ammoniumacetat, 10 mM Magnesiumacetat, 1 mM EDTA, 0,1 % SDS, pH 8)

Lösungen für DNA-Isolierung:

CTAB/NaCl-Lösung: 10 % CTAB (bei 65 °C lösen), 0,7 M NaCl

Lysozym/RNase-Lösung: 50 mg Lysozym, 1 ml RNase-Lösung (100 mg/ml), 9 ml A. dest. (vor Gebrauch frisch ansetzen)

Sarkosyl/Proteinase K-Lösung: 1 ml 10 % Sarkosyl-Lösung, 1 ml TE-Puffer, 10 mg Pronase (vor Gebrauch frisch ansetzen)

Lösungen für die Silberfärbung:

Fixierungslösung: 10 % Essigsäure

Färbelösung: 0,5 g AgNO₃, 0,03 % Formaldehyd

Entwickler: Na₂CO₃, Formaldehyd, Natriumthiosulfat

Alle Lösungen wurden mit Ausnahme des Entwicklers kurz vor Gebrauch hergestellt. Bei der Herstellung des Entwicklers wurde zunächst das Natriumcarbonat vorgelöst, die

Lösung bei 4 °C gekühlt und die restlichen Reagenzien erst kurz vor Gebrauch zugegeben.

Alle Lösungen wurden mit *A. dest.* angesetzt.

Lösungen für Ammoniumbestimmung:

Nitroprussidsalicylat-Lösung: 0,12 g Nitroprussidnatrium und 17 g Natriumsalicylat werden mit destilliertem Wasser zu 100 ml aufgefüllt

Mischlösung: gleiche Volumenanteile 0,3 M Natronlauge, Nitroprussidsalicylatlösung und destilliertes Wasser werden gemischt

Herstellung der verkupferten Zinkgranalien:

250 g Zink (gekornt) werden mit 150 ml destilliertem Wasser und 15 ml Schwefelsäure (1:10 verdünnt) versetzt und so lange umgerührt, bis die Oberfläche des Zinks völlig blank ist. Die Lösung wird abgegossen und die Zinkgranalien mehrmals mit destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend werden 150 ml destillierten Wassers zugegeben und unter Rühren 25 ml einer 2,5 %-igen (w/v) Kupfersulfatlösung eingetropt, bis die Zinkgranalien mit einer schwarzen Schicht aus Kupfer bedeckt sind. Die überstehende Flüssigkeit wird abgegossen, die Zinkgranalien sorgfältig mit destilliertem Wasser gewaschen und an der Luft getrocknet (Kremer 1999).

2.1.4 Medien

Alle Mengenangaben beziehen sich auf 1000 ml deionisiertes Wasser. Um Festmedien herzustellen, werden zu den Nährmedien 12 g Agar/l zugegeben und zusammen autoklaviert. Medienzusätze werden erst nach dem Autoklavieren bei einer Temperatur von ca. 60 °C zugegeben.

Nährmedien für *Azomonas*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*:

½ TY-Medium:

2,5 g Trypton

1,5 g Hefeextrakt

0,35 g CaCl₂

pH 7,5

Nährmedien für *Nocardia* und *Streptomyces*:

Standard I Medium:

25 g Standard I Nährbouillon

2.2 Bakterienstämme

Tabelle 1: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme und deren Herkunft

Bakterienstämme	Herkunft/Referenz
<i>Azomonas macrocytogenes</i> DSM 721	DSMZ, Braunschweig
<i>Azotobacter chroococcum</i> DSM 328	DSMZ, Braunschweig
<i>Nocardia calcaria</i>	Stammsammlung, Biologie IV, RWTH-Aachen
<i>Nocardia rubra</i>	Stammsammlung, Biologie IV, RWTH-Aachen
<i>Pseudomonas stutzeri</i> DSM 4166	DSMZ, Braunschweig
<i>Rhizobium leguminosarum</i> VF39	Stammsammlung, Biologie I, Ökologie des Bodens, RWTH-Aachen
<i>Streptomyces albus</i>	Stammsammlung, Biologie IV, RWTH-Aachen
<i>Sinorhizobium meliloti</i> MVII	Stammsammlung Bodenökologie

2.3 Physikalische und chemische Bodenparameter

2.3.1 Bodenproben

In dieser Arbeit wurden sechs unterschiedliche Böden untersucht, die in Tabelle 2 aufgeführt sind: Gartenerde aus dem westlichen Stadtgebiet von Aachen, Buchenwaldboden des Aachener Stadtwaldes, Rekultivierungsboden des Rheinischen Braunkohlereviere im dritten Jahr der Rekultivierung sowie Bodenproben aus drei unterschiedlichen Regionen nahe des Aralsees. Bei allen Böden wurde auf eine statistische Probenahme verzichtet, da der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Methodik liegt.

Die Probenahmestellen des Gartenbodens lagen in unterschiedlichen Blumenbeeten eines Gartens. Im Buchenwald wurden ungefähr 10 m voneinander entfernt Proben entnommen. Der Rekultivierungsboden des Rheinischen Braunkohlereviere (Inden-West) ist durch das Fehlen von typisch gewachsenen Bodenstrukturen und Boden-

horizonten gekennzeichnet. Nach der Aufschüttung und Planierung des Bodens nach dem Braunkohleabbau wird Luzerne (*Medicago sativa*) eingesät, die in der Regel nach 3 Jahren untergepflügt wird. Die Probenahme erfolgte bei diesen drei Böden im Februar 2001. Es wurde die obere Bodenschicht (ohne Streuauflage und Q-Horizont) bis zu einer Tiefe von ungefähr 15 cm entnommen.

Tabelle 2: Übersicht der untersuchten Bodenproben (A_p = Pflügehorizont, A_h = humoser Horizont, A_i = Initial-Horizont)

Probenbezeichnung	Standort	Horizont
Garten 1	Aachen (West) Garten	A_p -Horizont
Garten 2	Aachen (West) Garten	A_p -Horizont
Garten 3	Aachen (West) Garten	A_p -Horizont
Wald 1	Aachen (West) Stadtwald	A_h -Horizont
Wald 2	Aachen (West) Stadtwald	A_h -Horizont
Wald 3	Aachen (West) Stadtwald	A_h -Horizont
Rekultivierung 1	Eschweiler, Rekultivierungsfeld	A_i -Horizont
Rekultivierung 2	Eschweiler, Rekultivierungsfeld	A_i -Horizont
Rekultivierung 3	Eschweiler, Rekultivierungsfeld	A_i -Horizont
Rekultivierung 4	Eschweiler, Rekultivierungsfeld	A_i -Horizont
Rekultivierung 5	Eschweiler, Rekultivierungsfeld	A_i -Horizont
Rekultivierung 6	Eschweiler, Rekultivierungsfeld	A_i -Horizont
Aralsee 1	Aralsee, Region 1	Bodenoberfläche
Aralsee 2	Aralsee, Region 2	Bodenoberfläche
Aralsee 3	Aralsee, Region 2	Bodenoberfläche
Aralsee 4	Aralsee, Region 2	Bodenoberfläche
Aralsee 5	Aralsee, Region 3	Bodenoberfläche
Aralsee 6	Aralsee, Region 3	Bodenoberfläche
Aralsee 7	Aralsee, Region 3	Bodenoberfläche
Aralsee 8	Aralsee, Region 3	Bodenoberfläche
Aralsee 9	Aralsee, Region 3	Bodenoberfläche

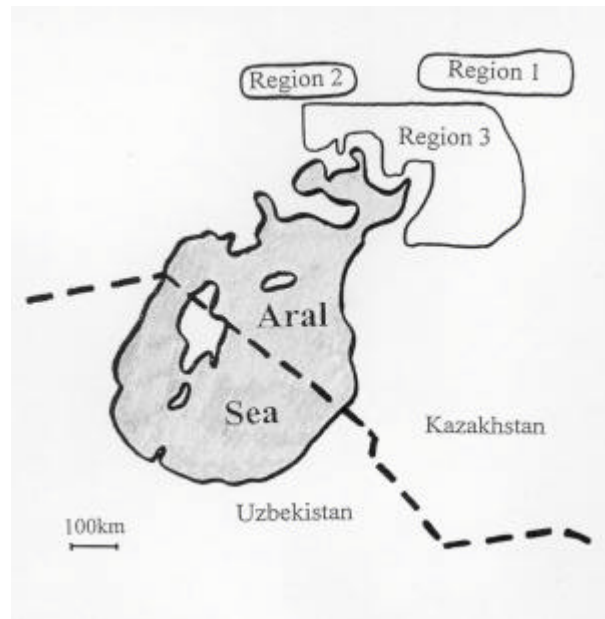


Abbildung 3: Lage der Regionen der Probenahmestellen am Aralsee

Am Aralsee erfolgte die Probenentnahme in unterschiedlichen Regionen, wie in Abbildung 3 dargestellt ist. Region 1 liegt an den Mugadgari Bergen, einem Ausläufer der Uralberge, die 300 km nördlichen vom Aralsee entfernt sind. Die dort lokal vertretene Luzerneart ist *Medicago trautvetteri*. Region 2 liegt 100 km von dem nordwestlichen Rand des Aralsees entfernt. Die vorherrschende Pflanzenart dieser Region ist die Leguminose *Halimodendron halodendron*, der Salzstrauch, der an sehr salzhaltigen Standorten wachsen kann, ein sich horizontal ausbreitendes Wurzelsystem besitzt und in Symbiose mit Rhizobien viel Stickstoff fixiert. Region 3 ist 100 km nordöstlich vom Aralsee entfernt. In dieser Region wächst hauptsächlich die Leguminose *Glycyrrhiza glabra*, das Süßholz, das gut an salzige Standorte angepaßt ist, ein kriechendes Wurzelsystem besitzt und ebenfalls eine Symbiose mit Rhizobien ausbildet.

2.3.2 Korngrößenanalyse

Die Bodenart wird durch die relativen Anteile der Fraktionen Sand, Schluff und Ton beschrieben (Gisi *et al.* 1997), die hier mit Hilfe der trockenen und der nassen Siebung sowie der Fingerprobe bestimmt wurden.

Die Fingerprobe dient einer groben Bestimmung der Bodenart und wurde als Ergänzung zu der trockenen und nassen Siebung durchgeführt. Durch Zerreiben der durch-

feuchteten Bodenprobe mit den Fingern erfolgte die Bewertung der Merkmale des Bodens und der Bodenart nach Tabelle 3.

Tabelle 3: Bewertung der Merkmale der Fingerprobe, entnommen aus Blume *et al.* (2000)

Bodenart	Merkmale bei der Fingerprobe
Sand S	Nicht bindig
Lehmiger Sand LS	Bindig, läßt sich aber nicht schnell zu bleistiftdicker Wurst ausrollen
Sandiger Lehm SL	Ist zu bleistiftdicker Wurst ausrollbar, Sandgehalt gut spürbar, starkes Knirschen zu vernehmen
Milder Lehm L	Sandgehalt nur mäßig spürbar, beim Ausquetschen zwischen Daumen und Zeigefinger entsteht stumpfe Gleitfläche, in Ohrnähe schwaches Knirschen zu vernehmen
Schwerer Lehm TL	Beim Ausquetschen zwischen Daumen und Zeigefinger erscheint Gleitfläche glänzend, Knirschen ist nur zwischen den Zähnen spürbar
Tonböden T	Gleitfläche zeigt Hochglanz, Boden fühlt sich zwischen den Zähnen butterartig an, kein Knirschen

Durch die trockene Siebung erfolgt die Trennung der zum Bodenskelett gehörigen Steine und Kies ($\varnothing > 2 \text{ mm}$) von der Feinerde ($\varnothing < 2 \text{ mm}$). Dazu wurde ca. 100 g lufttrockene Bodenprobe auf ein 2 mm Sieb mit untergesetztem Auffanggefäß gegeben und die Erde mit einem Gummistopfen auf dem Sieb zerrieben.

Die nasse Siebung diente zur weiteren Auftrennung der Feinerde in die Sand- ($\varnothing = 50\text{--}2000 \text{ }\mu\text{m}$) und die Schluff-Tonfraktion ($\varnothing = 0\text{--}50 \text{ }\mu\text{m}$). Auf die weitere Trennung der Schluff- und Tonfraktion ($\varnothing < 2 \text{ }\mu\text{m}$) wurde verzichtet. Bei Böden mit einem Humusgehalt von mehr als 5 % muß eine Vorbehandlung mit einem Dispergierungsmittel erfolgen, um die Zerteilung in die Einzelkornstruktur zu gewährleisten. Dazu wurde die gesiebte Feinerde mehrmals mit 35 %-igem H_2O_2 versetzt und mit Hilfe eines Sandbades auf 60 °C so lange erhitzt, bis bei erneuter Zugabe von H_2O_2 nur noch leichte Schaumbildung zu beobachten war.

Zur Fraktionierung der Feinerde wurde eine Bodensuspension aus 50 g Feinerde und Wasser hergestellt, auf ein Sieb (50 μm) mit einem Auffanggefäß gegeben und mit einer Spritzflasche durchgespült. Nach der Trocknung der Rückstände des Siebes und der Auffangschale bei 105 °C, erfolgte die Trockengewichtsbestimmung.

2.3.3 Wasser- und Lufthaushalt

2.3.3.1 Porenvolumen

Das Porenvolumen ist definiert als die mit Wasser oder Luft erfüllten Hohlräume in 100 ml Boden. Es wird nach der folgenden Gleichung berechnet.

$$V_p = 100 - V_t \times 100/s$$

Dabei stellt V_p das Porenvolumen, V_t das Volumen des trockenen Bodens und s das spezifische Gewicht dar.

Das Volumen des trockenen Bodens wird durch folgende Gleichung bestimmt:

$$V_t = \text{Trockengewicht des gewachsenen Bodens} / \text{Volumen des gewachsenen Bodens}$$

Die Bestimmung des Trockengewichts des gewachsenen Bodens wurde durch das Eindringen eines Stechzylinders bekannten Volumens in den möglichst steinfreien Boden bestimmt. Danach wurde der Zylinder vorsichtig ausgegraben und an der Ober- und Unterkante glatt abgeschnitten. Nach der Trocknung bei 105 °C erfolgte die Ermittlung des Bodentrockengewichts durch Wägung.

Das spezifische Gewicht ist definiert durch:

$$s = \text{Gewicht des trockenen Bodens [g]} / \text{Volumen des trockenen Bodens [ml]}$$

Zur Bestimmung des spezifischen Gewichts wurden 20 g trockener Boden in einen 50 ml fassenden Meßkolben gegeben und von 50 ml Methanol die Hälfte direkt zugegeben. Das restliche Methanol wurde in eine Bürette gegeben und der Meßkolben bis zur Marke mit Methanol aufgefüllt. Um eingeschlossene Luft, die zwischen den trockenen Bodenteilchen sitzen kann, zu eliminieren, wurde der Kolben mehrmals geschüttelt. Das in der Bürette zurückgebliebene Methanol entspricht dem Volumen von 20 g Boden.

2.3.3.2 Bodenwassergehalt und Trockengewicht

Das Trockengewicht dient als Bezugswert für den Nitrat- und Ammoniakgehalt und ermöglicht den Vergleich dieser Daten.

10 g naturfeuchter Boden wurde in eine Porzellanschale eingewogen, ü. N. bei 105 °C getrocknet und anschließend das Trockengewicht bestimmt.

Das Trockengewicht wird ermittelt und als Prozentsatz Trockensubstanz (% TS) der frischen Probe angegeben (Schinner *et al.* 1993). Der Wassergehalt (W) berechnet sich aus der Differenz von Feuchtgewicht (FW) und Trockengewicht (TG) und ist als prozentualer Wassergehalt (%W) angegeben.

2.3.3.3 Feldkapazität

Unter Feldkapazität wird der Wasserzustand eines normal durchlässigen Bodens verstanden, der sich etwa 3 Tagen nach vollständiger Sättigung, d.h. der gesamte Porenraum ist mit Wasser gefüllt, einstellt (Schachtschabel *et al.* 1989). Die Messung erfolgte durch die Wässerung eines Stechzylinders mit gewachsenem Boden, indem dieser auf ein Filterpapier in eine Schale mit Wasser gestellt und mindestens 1 Stunde im Wasser stehengelassen wurde, bis sich der Boden vollgesogen hat. Nach dem Abtropfen der Probe für mindestens 2 Stunden auf saugfähigem Papier wurde das Gewicht des Zylinders mit Erde und Filterpapier festgestellt. Die Bestimmung des Trockengewichts des Bodens erfolgte nach der Trocknung bei 105 °C und die Berechnung der Wasserkapazität erfolgte nach folgender Formel:

$$FK \text{ (\% des Bodenvolumens)} = (G - Z - T) / V_{Fr} \times 100$$

G ist das Gewicht des wassergesättigten Bodens, Z ist das Gewicht des Zylinders und des Filterpapiers, T ist das Trockengewicht des Bodens und V_{Fr} ist das Volumen der gewachsenen Bodenprobe in Gramm.

2.3.4 pH-Wert

Der pH-Wert wurde durch die Ausschüttelung mit einer $CaCl_2$ -Lösung bestimmt. Dadurch erfolgt ein Austausch der an die Ton- und Humusteilchen adsorbierten Protonen mit den zweiwertigen Calcium-Kationen. Der so gemessene pH-Wert wird auch als Austauschazidität bezeichnet.

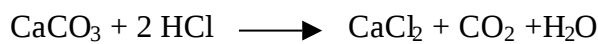
Zur pH-Wert Bestimmung wurden 10 g getrocknete Feinerde im Verhältnis 1:2,5 (m/v) mit 0,01 M $CaCl_2$ -Lösung versetzt, 10 min geschüttelt (Horizontalschüttler) und mit

einer pH-Elektrode gemessen. Pro Boden erfolgte die Untersuchung von jeweils 3 parallelen Proben.

Die Bestimmung des pH-Wertes des Aralseebodens erfolgte nur durch Zugabe von Wasser. Dazu wurden 5 g Bodenprobe mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1:5 verdünnt und anschließend der pH-Wert mit einer pH-Elektrode gemessen.

2.3.5 Carbonatbestimmung

In carbonatgepufferten Böden liegt gebundenes Carbonat vorwiegend als Calciumcarbonat vor und kann durch Säureeinwirkung nach folgender Reaktionsgleichung in gasförmiges CO₂ umgewandelt und anschließend volumetrisch bestimmt werden:



Die Carbonatbestimmung wurde nach Passon (Steubing & Fangmeier 1992) durchgeführt. Mit Hilfe einer Vorprobe erfolgt die Bestimmung des ungefähren Carbonatgehaltes. Dazu wurde ein kleiner Teil des Bodens in eine Porzellanschale gegeben und mit einigen Tropfen 10 %-iger Salzsäure versetzt. Die Bewertung der Intensität der Gasentwicklung erfolgte nach Tabelle 4.

Tabelle 4: Bewertung des Kalkgehalts nach Gasentwicklung der Bodenprobe nach Zugabe von 10 %-iger HCl

Aufbrausen	Kalkgehalt
Kein	< 1 %
Schwach	1-3 %
Deutlich, aber kurz	3-5 %
Anhaltend	> 5 %

Anstelle des Passon'schen Kalkmessers wurde ein Entwicklungsgefäß, das an eine kalibrierte Bürette (ml), die am unteren Ende mit einem Niveaugefäß verbunden war, benutzt. In das Entwicklungsgefäß wurde die Bodenprobe sowie ein kleines Glas, gefüllt mit Salzsäure, 1:3 (v/v) verdünnt, gegeben. Die Platzierung der Bürette und des Niveaugefäßes gefüllt mit konzentrierter NaCl-Lösung, die das Lösen von Luftsauerstoff verhindert, erfolgte so, daß der Lösungspegel in der Bürette an der Position 0 lag. Durch Kippen des Entwicklungsgefäßes wurde das Gläschen mit der Salzsäure umgestoßen, so daß die Säure mit der Bodenprobe in Berührung kam und das

sich entwickelnde Gas die Kochsalzlösung in der Bürette verdrängte, so daß das Gasvolumen in Milliliter abgelesen werden konnte.

2.3.6 Humusgehalt

Der Anteil des Humus kann mit Hilfe der Elementaranalyse durch trockene Verbrennung mit O_2 gaschromatographisch quantitativ gemessen werden, indem die Elemente C und N im organischen Probenmaterial bestimmt werden. Die Analysen erfolgten mit einem Elementar Analyzer Modell 1106.

105 °C getrocknete Feinerde wurde im Mörser zur besseren Homogenisierung zerrieben, erneut bei 105 °C getrocknet und bis zur Wägung in Exsikkator über Kieselgel aufbewahrt. Bei carbonathaltigen Böden (Gartenerde und Rekultivierungsboden) erfolgte eine Vorbehandlung der Feinerde mit 2 ml 2 M Salzsäure pro Gramm Boden, um den Carbonatkohlenstoff in der Analyse nicht zu erfassen (Giovanni *et al.* 1975). Zur Analyse wurden 3-5 mg der Probe in eine Zinnkartusche eingewogen, diese zugekniffen, mit einer Pinzette kugelig gerollt und in den Probenhalter des Probenwechslers plaziert. Pro Bodenprobe erfolgte die Erstellung von 3 Parallelen. Zusätzlich wurden 3 Blindwerte (leere, gerollte Zinnkartuschen), 3 Eichproben mit ca. 1 mg Cyclohexanon-2,4-Dinitrophenylhydrazon ($C_{12}H_{14}O_4N_4$, Fa. SATO Analytik) und 3 Proben mit 5-10 mg Bodenstandard Nr.4 (C = 2,417 %; N = 0,048 %, Fa. HEKAtech) hergestellt. Die Platzierung der Proben im Probenwechsler erfolgte so, daß nach jedem Leerwert ein Eichwert, ein Standardboden und anschließend 3 Bodenproben gemessen wurden. Im Elementar Analyzer werden die Proben mit Sauerstoff bei 1027 °C verbrannt und das bei der Verbrennung entstehende Gasgemisch zuerst in einer Oxidationssäule vollständig zu Stickstoff (N_2), Kohlendioxid (CO_2), Wasser (H_2O) und Stickoxiden (N_xO_y) oxidiert. Die entstandenen Stickoxide werden dann an auf 650 °C aufgeheiztem elementarem Reinstkupfer, das den überschüssigen Sauerstoff zurückhält, zu Stickstoff (N_2) reduziert. An einer Chromatographiesäule erfolgt die Auftrennung des Gasgemisches in die einzelnen Gase (N_2 und CO_2) und der Nachweis mit einem Hitzedrahtdetektor durch thermische Leitfähigkeitsänderung. Ein Wasserfilter mit Magnesiumperchlorat fängt das gasförmige Wasser ab.

Der Integrator gibt die Retentionszeit, die Peakfläche und den prozentualen Anteil am Gasgemisch an. Über die Retentionszeit können die Peaks den Elementen zugeordnet werden und zwar entspricht der erste Peak dem Stickstoff- und der zweite dem Kohlenstoffgehalt. Mit Hilfe der folgenden Formeln können die prozentualen Stickstoff- und Kohlenstoffgehalte über die Peakflächen berechnet werden:

$$K_N = 20,14 \% \times EW / \text{Area}$$

Dabei bezeichnet K_N den K-Faktor, EW die Einwaage und Area die Peakfläche der Eichsubstanz für Stickstoff. 20,14 % ist der theoretische Stickstoffgehalt der Eichsubstanz. K_C wurde nach der gleichen Formel berechnet, allerdings mit dem theoretischen Kohlenstoffgehalt der Eichsubstanz von 51,79 %. Die K-Faktoren der drei Eichmessungen wurden gemittelt und in die folgenden Formeln eingesetzt.

Der prozentuale Anteil des jeweiligen Elements berechnet sich wie folgt:

$$\%_N = K_N \times \text{Area} / EW$$

Es wurde so vorgegangen, daß zunächst die Werte des Bodenstandards berechnet und mit der Prozentangabe des Herstellers verglichen wurden. Anschließend erfolgte die Berechnung der prozentualen Gehalte der einzelnen Bodenproben und die Bildung deren Mittelwerte (Kremer 1999).

2.3.7 Bestimmung des anorganischen Stickstoffs als Ammonium und Nitrat

Das Nitrat-Anion wird durch Wasser gut gelöst, während das positiv geladene Ammonium-Kation zum Teil an bzw. zwischen Schichten negativ geladener Tonminerale gebunden ist. Aus diesem Grund führt man eine Extraktion mit hochmolekularen Salzlösungen durch.

Zur Extraktion wurden 20 g frische naturfeuchte Erde mit 100 ml 2 M KCl versetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur überkopf geschüttelt (Überkopfschüttler GFL 3040). Anschließend erfolgte eine Filtration über Faltenfilter (Typ 593 ½ Ø 185 mm), um ungelöste Rückstände zu entfernen. An diesen Filtraten erfolgte am gleichen Tag die Nitrat- und die Ammoniumbestimmung.

2.3.7.1 Nitratbestimmung

Die Nitratbestimmung erfolgte mit der Methode von Navone (1964), modifiziert für Böden nach Scharpf & Wehrmann (1976).

Das Nitrat wird durch UV-Absorption bei 210 nm spektralphotometrisch bestimmt. Dabei wird die Absorption von Störionen durch die Herstellung einer Leerprobe ausgeschlossen. In der Leerprobe wird das Nitrat mit verkupferten Zinkgranalien in schwefelsaurer Lösung reduziert. Mit einem detektierbaren Konzentrationsbereich von 0,5 - 10 mg/l ist die Methode nicht sehr sensitiv, dafür jedoch im Vergleich zu empfindlicheren Methoden z.B. mit Phenoldisulfonsäure einfach und gut reproduzierbar (Keeney & Nelson 1992).

25 ml des Filtrats wurden in Erlenmeyerkolben pipettiert, mit 1 ml 1:10 (v/v) verdünnter konzentrierter Schwefelsäure versetzt, mit Aluminiumfolie verschlossen und über Nacht inkubiert. Zu den Leerproben wurden zusätzlich 3 verkupferte Zinkgranalien gegeben. Es wurde eine Eichreihe mit Kaliumnitrat der Konzentrationen 0; 0,5; 1; 1,5 und 2 µg NO₃/ml erstellt. Danach erfolgte die photometrische Bestimmung bei 210 nm (UV/Visible Spectrophotometer, Ultrospec® 1000).

Die Nitratkonzentrationen wurden aus der Eichgeraden berechnet und in Mikrogramm pro Milliliter angegeben. Mit der nachstehenden Formel erfolgte die Berechnung des Nitratstickstoffs pro Gramm Trockensubstanz:

$$\text{NO}_3\text{-N } [\mu\text{g N/g TS}] = [(\text{VP} - \text{LP}) \times \text{V} \times 100] / (\text{EW} \times \% \text{ TG})$$

VP und LP sind die Stickstoffkonzentrationen der Voll- bzw. Leerprobe [µg/ml], EW die Bodeneinwaage [g], V das Extraktionsvolumen [ml] und % TG das prozentuale Trockengewicht.

2.3.7.2 Ammoniumbestimmung

Die Ammoniumbestimmung erfolgte mit der Methode nach Kandeler & Gerber (1988). In der Probe vorliegendes Ammonium wird durch aktives Chlor zu Chloramin oxidiert, welches mit phenolischen Verbindungen zu Chinonchloramin weiter reagiert. Mit überschüssigem Phenol verbindet sich das Chinonchloramin im Alkalischen zu einem grünen Farbkomplex, einem Indophenol, das bei 660 nm photometrisch gemessen

werden kann. Eventuelle Störungen zweiwertiger Kationen (Ca^{2+} , Mg^{2+}) werden durch den Einsatz kleiner Eluatmengen (max. 5 ml) vermieden (Keeney & Nelson 1992). Ein weiterer Vorteil besteht in der Messung der Extinktion bei 660 nm, da die teils bräunliche Humusfarbe der Bodenextrakte in diesem Wellenlängenbereich weitgehend durchlässig ist (Hoffmann & Teicher 1961).

5 ml Bodenfiltrat wurden mit 2,5 ml Mischlösung (1:1:1 (v/v/v) 0,3 M Natronlauge; Nitroprussidsalicylatlösung; *A. dest.*) und mit 1 ml 0,1 % (w/v) Dichlorcyanuaratlösung versetzt, kurz geschüttelt und 30 min inkubiert. Anschließend erfolgte die photometrische Bestimmung bei 660 nm (UV/Visible Spectrophotometer, Ultrospec® 1000).

Es wurde eine Eichreihe mit Ammoniumchloridlösung folgender Konzentrationen 0; 1; 1,5 und 2 $\mu\text{g NH}_4/\text{ml}$ erstellt. Aus der Eichgeraden wird die Konzentration des Ammoniumstickstoffs ($\text{NH}_4\text{-N}$) in Mikrogramm pro Milliliter ermittelt und nach folgender Formel auf die Trockensubstanz bezogen:

$$\text{NH}_4\text{-N } [\mu\text{g N/g TS}] = (\text{VP} \times \text{F} \times \text{V} \times 100) / (\text{EW} \times \% \text{ TG})$$

F ist der Verdünnungsfaktor, EW die Bodeneinwaage [g], V das Extraktionsvolumen [ml], %TG das prozentuale Trockengewicht und VP die Ammoniumstickstoffkonzentration der Probe [$\mu\text{g/ml}$].

2.4 Mikrobiologische Arbeitstechniken

2.4.1 Bakterienanzucht

Die Referenzbakterien wurden auf Festmedium mit Hilfe des Quadrantenausstriches vereinzelt, bei 28 °C im Brutschrank angezogen und zum Animpfen von Flüssigkulturen verwendet, wie sie z.B. für die DNA-Isolierung benötigt werden.

Die Herstellung einer Flüssigkultur erfolgte durch Animpfen des entsprechenden Mediums (10 ml) mit einer Einzelkolonie im Reagenzglas sowie der Anzucht in 1-3 Tagen bei 28 °C in einem Roller.

2.4.2 Glycerinkulturen

Von den Referenzbakterien wurden Glycerinkulturen angelegt. Die Anzucht erfolgte in dem beschriebenen Flüssigmedium (siehe 2.1.4). Aliquots der gut gewachsenen Kulturen wurden dann mit dem gleichen Volumen Glycerin vermischt. Diese Kulturen sind bei - 40 °C mehrere Jahre haltbar.

2.5 Molekularbiologische Arbeitstechniken

2.5.1 Isolierung von Gesamt-DNA aus Gram-negativen Bakterien

Mit der Methode nach Ausubel *et al.* (1987) erfolgte die Isolierung von Gesamt-DNA aus den Bakterien der Gattungen *Azomonas*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* und *Sinorhizobium*.

1,5 ml einer Stationärkultur wurden 2 min bei 13 000 upm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 500 µl TE-Puffer resuspendiert, 30 µl 10 %-ige SDS-Lösung und 3 µl (20 mg/ml Proteinase K) zugegeben, gut gemischt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl 5 M NaCl-Lösung und guter Durchmischung, wurden 80 µl CTAB/NaCl-Lösung und 5 µl RNase (10 mg/ml) zupipettiert, erneut gut gemischt und 10 min bei 65 °C inkubiert.

Anschließend erfolgt eine Extraktion mit 600 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (IAA) (25:24:1), nach dessen Zugabe kräftig geschüttelt und 5 min bei 13 000 upm zentrifugiert wurde. Nach Überführung der wässrigen Phase in ein sauberes Reaktionsgefäß erfolgte eine zweite Extraktion mit 650 µl Chloroform. Nach einer Fällung mit 0,6 Vol. Isopropanol und einer anschließenden Inkubation von mindestens 10 min bei -20 °C, wurde die DNA 5 min bei 13 000 upm abzentrifugiert, zweimal mit 500 µl 70 %-igem Ethanol gewaschen, in 100 µl *A. dest.* gelöst und bei 4 °C gelagert.

2.5.2 Isolierung von Gesamt-DNA aus Gram-positiven Bakterien

Mit Hilfe der Methode nach Eikmeier (1996), erfolgte die Gesamt-DNA Isolierung aus Gram-positiven Bakterien der Gattungen *Nocardia* und *Streptomyces*.

1,5 ml einer stationären Kultur wurden 3 min abzentrifugiert und das Pellet in 1 ml 1 M NaCl-Lösung homogenisiert. Nach einer Inkubation von 20 min bei 0 °C erfolgte die Zentrifugation der Proben für 3 min bei 13 000 upm und die Resuspendierung in 250 µl 20 %-iger Saccharose in TE-Lösung. Nach der Zugabe von 250 µl Lysozym/RNase-Lösung wurde die Probe gemischt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Handelt es sich um schwer zu homogenisierende Bakterienkulturen, z.B. der Gattung *Streptomyces*, sollten die Zellen während der Inkubation vorsichtig mit einem Eppimörser zerkleinert werden, um einen vollständigen Zellaufschluss zu gewährleisten. Es wurden 100 µl 5 %-ige Sarkosyl/Pronase-Lösung zugegeben, vorsichtig invertiert und erneut 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgt die Zugabe von 70 µl 3 M Na-Acetat-Lösung und anschließend eine doppelte Extraktion mit Phenol/Chloroform/IAA. Dazu wurden jeweils 200 µl Phenol/Chloroform/IAA (25:24:1) zugeben und 1 min kräftig invertiert. Im Anschluß an eine 10 minütigen Zentrifugation bei 13 000 upm, erfolgte die Überführung der wässrigen Phase in ein sauberen Reaktionsgefäß sowie eine weitere Extraktion mit Chloroform, eine Fällung mit 700 µl Isopropanol und eine Inkubation bei -20 °C für 10 min. Die Proben wurden danach 5 min bei 13 000 upm zentrifugiert und der Überstand quantitativ entfernt. Nach zweimaligem Waschen des Pellets mit 500 µl 70 %-igem Ethanol, einer Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur und einer Zentrifugation von 5 min bei 13 000 upm erfolgte die Abnahme des Überstands, die Trocknung des Pellets und dessen Lösung in 100 µl destiliertem Wasser. Die Gesamt-DNA wurde bei 4 °C gelagert.

2.5.3 Isolierung von Gesamt-DNA aus Boden

Die Gesamt-DNA-Isolierung aus Boden wurde mit dem FastDNA SPIN Kit (for soil) durchgeführt. Diese Methode bietet den Vorteil einer sehr schnellen Isolierung und liefert sehr saubere DNA der Größe 9-23 kb, die in die PCR einsetzbar ist (Borneman *et al.* 1996). Die Abtrennung von Huminstoffen ist sehr wichtig, da diese die DNA

maskieren und eine Amplifikation in der PCR verhindern (Tsai & Olson 1991, Porteous *et al.* 1997).

Das Prinzip dieser Isolierung beruht auf der direkten Lyse der Bakterienzellen im Boden durch physikalische Zerstörung und die Bindung der DNA an eine Silica Matrix.

Um eine repräsentative DNA-Isolierung zu ermöglichen, erfolgte zunächst die Homogenisierung der Bodenprobe (Lindahl & Bakken 1995). 500 mg Boden wurden in ein MULTIMIX 2 Tissue Matrix Tube eingewogen, 978 µl Natriumphosphatpuffer sowie 122 µl MT-Puffer zugegeben und 30 s bei maximaler Geschwindigkeit mit einer Kugelmühle homogenisiert. Nach Zentrifugation der Proben für 1 min bei 13 000 upm und Überführung des Überstands in ein sauberes Reaktionsgefäß, erfolgte die Zugabe von 250 µl Proteinfällungslösung, 10 maliges Invertieren des Reaktionsgefäßes mit der Hand und eine Zentrifugation von 5 min bei 13 000 upm. Der Überstand wurde abgenommen, 1 ml resuspendierte Binding Matrix Suspension zugegeben und das Reaktionsgefäß 2 min mit der Hand invertiert, damit die DNA an die Silica Matrix binden konnte.

Enthält die Bodenprobe sehr viele Huminstoffe (z.B. der Stadtwaldboden), so sind an dieser Stelle zusätzliche Waschschriffe notwendig (persönliche Mitteilung der Firma QBioGene). Dazu wurden die Proben bei 13 000 upm für 1 min zentrifugiert, der Überstand verworfen, und das Pellet vorsichtig in 1 ml 5,5 M Guanidine Thiocyanat-Lösung resuspendiert, erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Waschschriff wurde so lange wiederholt, bis die Matrix ihre ursprüngliche Farbe wieder erhalten hat. Nach dem letzten Waschschriff erfolgte erneut die Resuspendierung mit 1 ml Guanidine Thiocyanat-Lösung.

Die Aufarbeitung der speziell gereinigten sowie der unbehandelten resuspendierten Binding Matrix Suspension (siehe oben) ist ab diesem Schriff identisch und erfolgte durch Auftragung der Suspension in 600 µl Schritten auf den SPIN™ Filter und dessen Zentrifugation für 1 min bei 13 000 upm. Danach wurde die Matrix mit 500 µl Salt/Ethanol Wash Solution gewaschen, 1 min bei 13 000 upm zentrifugiert, der Durchlauf verworfen und noch einmal 2 min trocken zentrifugiert. Nach Überführung der SPIN™ Filter in ein sauberes Auffangreaktionsgefäß und 5 minütiger Trocknung bei Raumtemperatur, erfolgte die Elution der Gesamt-DNA mit 50 µl DNase/Pyrogen Free

Water. Zur effizienteren Elution sollte die Matrix vorsichtig mit einer Pipettenspitze resuspendiert werden. Die DNA wurde bei 13 000 upm 1 min abzentrifugiert und bei 4 °C gelagert.

2.5.4 Gelelektrophorese

Zur Identifizierung und Kontrolle wurden die PCR-Ansätze und Gesamt-DNA-Isolierungen auf einem Agarosegel gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Herstellung der Agarosegele und die Durchführung der Elektrophorese erfolgte nach Sambrook *et al.* (1989). Die Agarosekonzentration betrug 1 % für Gesamt-DNA und 1,5 % für die PCR-Ansätze. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 0,5 Vol. Ladepuffer versetzt. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 60 Volt in 1 x TBE-Puffer als Elektrophoresepuffer. Die Färbung mit Ethidiumbromid wurde im Anschluß an die Elektrophorese in einem Färbebad durchgeführt. Ethidiumbromid interkaliert in der DNA-Struktur und ermöglicht die Detektion der Fragmente auf einem UV-Licht-Transilluminator als fluoreszierende Banden. Als Größenmarker bei den PCR-Kontrollgelen diente eine 100 bp DNA Leiter. Zur Dokumentation wurden die Gele im UV-Durchlicht fotografiert (Geldokumentationssystem).

2.5.5 PCR

Die „Polymerase Chain Reaction“ (PCR) ist eine Methode zur enzymatischen Amplifizierung eines DNA-Abschnitts, der von zwei bekannten Sequenzen flankiert wird (Saiki *et al.* 1985, 1988). Als Primer dienen Oligonukleotide, die komplementär zu den flankierenden Sequenzen der „Template“-DNA sind. Durch die Wiederholung einer Abfolge aus Denaturierung, Annealing (Hybridisierung der Primer an die „Template“-DNA) und Synthese eines neuen DNA-Stranges, kommt es zur exponentiellen Vermehrung der zwischen den Primern befindlichen Sequenzen. Das Hauptprodukt des Amplifikationsprozesses ist ein DNA-Molekül, dessen Länge exakt definiert ist und mittels einer Agarosegelelektrophorese identifiziert werden kann.

In dieser Arbeit wurden drei unterschiedliche PCR-Reaktionen durchgeführt, eine eubakterienspezifische und eine aktinomycetenspezifische 16S rDNA PCR sowie eine

verschachtelte *nifH* PCR, die aus zwei hintereinander geschalteten Reaktionsschritten besteht (Newton & Graham 1994).

2.5.5.1 Amplifikationsansätze

Die Primer Com1 und Com2-Ph sind spezifisch für Eubakterien. Sie binden an der 16S rRNA der kleinen Untereinheit in den variablen Regionen V4 und V5 und rahmen ein 407 bp großes Fragment ein. Die Primerbindungsstellen entsprechen bei *Escherichia coli* den Positionen 519-536 (Com1) und 907-926 (Com-Ph) (siehe Tabelle 5). Die aktinomycetenspezifischen Primer F243 und R531-Ph binden an der 16S rDNA der kleinen Untereinheit in der variablen Region V3. Die Primerbindungsstellen entsprechen bei *E. coli* den Positionen 226-243 (F243) und 512-534 (R531-Ph) (Peters *et al.* 2000, Schwieger & Tebbe 1998, Heuer *et al.* 1997). Daraus würde bei *E. coli* ein 308 bp großes DNA Fragment resultieren.

Tabelle 5: Darstellung der Primer, die für die SSCP-Analysen zur Untersuchung der mikrobiellen Populationen eingesetzt wurden (I = Inosin, entspricht N)

Name	Sequenz (5'-3')	Annealing-temperatur	Zielregion	Fragment-größe	Referenz
Com1 Com2-Ph	CAG CAG CCG CGG TAA TAC CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT	51 °C	V4 und V5 der 16S rRNA-Gene bei Eubakterien	407 bp	Schwieger <i>et al.</i> 1998
F243 R531-Ph	GGA TGA GCC CGC GGC CTA CGG CCG CGG CTG CTG GCA CGT	60 °C	V3 der 16S rRNA-Gene bei Aktinomyceten	308 bp	Heuer <i>et al.</i> 1997
F19 F112 R463/-Ph	GCI WTI TAY GGN AAR GGN GG GGI TGT GAY CCN AAV GCN GA GCR TAI ABN GCC ATC ATY TC	48/50 °C 50/52 °C	<i>nifH</i> Gen der Stickstofffixierer	464 bp 370 bp	Widmer <i>et al.</i> 1999

Der Phosphatrest am 5'-Ende der Reverseprimer ist für die spätere Überführung der Fragmente in Einzelstrangmoleküle wichtig. Er dient als Angriffspunkt für die Lambda-Exonuklease (siehe 2.5.6.1), einem Aufarbeitungsschritt für die SSCP.

Tabelle 6: Bezeichnung der degenerierten Stellen der Primer für die *nifH*-PCR (Ibelgaufs 1993)

Platzhalter	Nukleotide
B	G, C oder T
N	A, C, G oder T
R	A oder G
V	A, G, oder C
W	A oder T
Y	C oder T

Tabelle 7: Standardreaktionsansatz für die PCR der Eubakterien und Aktinomyceten

	Konzentration der Stammlösungen	End- konzentration	Volumen (µl)
steriles Wasser			64,8
PCR-Puffer	10 x	1 x	10
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	6
dNTPs	2,5 mM	0,2 mM	8
Primer	10 µM	0,5 µM	5
Primer	10 µM	0,5 µM	5
Hot Gold Star	5 u / µl	1 u	0,2
DNA (1:100 verdünnt)			1
Gesamtvolumen			100 µl

Die Reaktionsansätze (siehe Tabelle 7 und Tabelle 8) wurden mit Hilfe eines Mastermixes pipettiert, der alle Reaktionskomponenten mit Ausnahme des „Templates“ und der Polymerase enthält. Um Kontaminationen zu verringern, erfolgte eine Bestrahlung des Mastermixes (Wasser, Puffer, MgCl₂, dNTPs, unphosphorylierter Primer) mit UV-Licht für 5 min (Fox *et al.* 1991, Niederhauser *et al.* 1994). Dazu wurde das Reaktionsgefäß auf den Transilluminator (312 nm) gelegt und gleichzeitig mit der UV-Lampe (355 nm) bestrahlt. Die Primer werden durch die UV-Bestrahlung nicht zerstört, größere DNA-Stücke (Kontaminationen) dagegen schon (Fox *et al.* 1991).

Bei der PCR der Aktinomyceten und deren Reamplifikaten konnte die Ausbeute durch Zusatz von 70 µg BSA pro Reaktionsansatz und dem Einsatz von 2 µl der 1:100 Verdünnung der Bodenprobe zum Teil erhöht werden.

Tabelle 8: Reaktionsansatz für die verschachtelte PCR der Stickstofffixierer

Reagenzien	Konzentration der Stammlösungen	Endkonzentration 1. PCR	Volumen 1. PCR (µl)	Endkonzentration 2. PCR	Volumen 2. PCR (µl)
steriles Wasser			10		36,8
PCR-Puffer	10 x	1 x	2,5	1 x	10
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	1,5	1 mM	4
BSA	20 µg/µl	0,8 µg/µl	1		
dNTPs	2,5 mM	0,2 mM	2	0,2 mM	8
Primer	10 µM	1 µM	2,5	1 µM	10
Primer	10 µM	1 µM	2,5	1 µM	10
Taq Master Lsg.					20
Taq-Polymerase (Fa. Eurogentec)	0,3 u / µl	0,3 u	1		
Taq-Polymerase (Fa. Eppendorf)	5 u/µl			1 u	0,2
DNA (1:100 verdünnt)			2		
Template aus 1.PCR (1:100 verdünnt)					1
Gesamtvolumen			25		100

Bei jeder PCR wurde eine Positivkontrolle, bestehend aus der DNA eines Referenzbakteriums als Template und eine Negativkontrolle mit sterilem Wasser statt Template durchgeführt. Zusätzlich wurde bei der verschachtelten *nifH*-PCR die Negativkontrolle der 1. PCR in dem gleichen Verdünnungsverhältnis wie die Proben in die 2. PCR eingesetzt.

Die Durchführung der PCR erfolgte in einem TRIO-Thermoblock™ mit folgendem Programm für die 16S rDNA PCR. Dabei wurden jeweils die spezifischen Temperaturen für die Primer Anlagerung abhängig von den eingesetzten Primern nach Tabelle 5 gewählt.

Erste Denaturierung: 94 °C, 10 min

35 Zyklen: 94 °C, 1 min (Denaturieren)

51 °C bzw. 60 °C, 1 min (Primer Anlagerung)

72 °C, 1,5 min (Verlängerung)

Anschließend: 72 °C, 4 min (Vervollständigung der Verlängerung)

Für die beiden PCR-Reaktionen der verschachtelten PCR wurden die Programme in Tabelle 9 verwendet.

Tabelle 9: PCR-Programme der verschachtelten *nifH* PCR

	1. PCR	2. PCR
Erste Denaturierung	95 °C, 5 min	95 °C, 5 min
Hot Start	80 °C, 1 min	
Anzahl der Zyklen	40	35
Denaturierung	94 °C, 11 s	94 °C, 11 s
Denaturierung	92 °C, 15 s	92 °C, 15 s
Primer Anlagerung	48 °C, 8 s	50 °C, 8 s
Primer Anlagerung	50 °C, 30 s	52 °C, 30 s
Verlängerung	74 °C, 10 s	74 °C, 10 s
Verlängerung	72 °C, 10 s	72 °C, 10 s
Vervollständigung der Verlängerung	72 °C, 10 min	72 °C, 10 min

In der ersten verschachtelten PCR-Reaktion wurde mit einer normalen Polymerase ein manueller Heißstart durchgeführt, indem sie von Hand nach der ersten Denaturierung bei 80 °C zugegeben wurde. Bei den restlichen PCR-Reaktionen war dies durch die Verwendung von Hot Start Polymerasen nicht erforderlich. Ein Heißstart bedeutet, daß eine oder mehrere wichtige Reaktionskomponenten, z.B. die Polymerase, erst nach der ersten Denaturierung zum PCR-Ansatz gegeben werden. Dadurch sollen unspezifische Anlagerungen der Primer an nicht komplementäre DNA-Sequenzen und deren Amplifikation verhindert werden (Newton & Graham 1994).

Die Kontrolle der PCR erfolgte auf einem 1,5 % Agarosegel in TBE-Puffer, auf dem jeweils 10 µl Probe und zur Größenabschätzung eine 100 bp-Leiter aufgetragen wurde.

2.5.5.2 Reinigung der PCR-Produkte

Die Reinigung der PCR-Produkte erfolgte mit dem NucleoSpin Extract Kit. Dabei adsorbiert das PCR-Produkt an die Silicamembran einer Säule und wird durch mehrere Waschschrte von den übrigen PCR-Reagenzien abgetrennt.

Die PCR-Probe wurde mit 4 Vol. Puffer NT2 gemischt, auf die Säule aufgetragen und 1 min bei 13 000 upm zentrifugiert. Danach wurde die Säule mit 600 µl NT3-Puffer

gewaschen, 1min bei 13 000 upm zentrifugiert und anschließend noch einmal mit 200 µl NT3-Puffer gewaschen. Um sicher zu stellen, daß kein Ethanol aus dem Waschpuffer auf der Säule verbleibt, erfolgte eine Zentrifugation von 2 min bei 13 000 upm. Nach Elution der DNA mit 30 µl NE-Puffer sowie einer Inkubation von 1 min, die die Effizienz der Elution erhöhen soll, wurde das PCR-Produkt in einer abschließenden Zentrifugation von 1 min bei 13 000 upm gewonnen.

Zur Kontrolle erfolgte die Auftragung von 3 µl der Probe auf ein Agarosegel (siehe 2.5.4).

2.5.6 SSCP

Die Methode des „Single Strand Conformation Polymorphism“ (SSCP) dient ursprünglich dazu, Mutationen zu detektieren, sie kann aber ebenfalls zur Diversitätsanalyse von mikrobiellen Populationen eingesetzt werden. Dabei werden DNA-Moleküle gleicher Länge aber unterschiedlicher Sequenz, die in der PCR gewonnen wurden, mit Hilfe des Enzyms Lambda-Exonuklease in einzelsträngige DNA-Moleküle überführt. Nach einer Reinigung der einzelsträngigen DNA-Moleküle werden diese denaturiert und bilden sequenzspezifische Sekundärstrukturen aus, die auf einem Polyacrylamidgel getrennt werden können.

2.5.6.1 Lambda-Exonuklease-Verdau

Das Enzym Lambda-Exonuklease besitzt eine einzigartige Spezifität unter den bekannten Exonukleasen, da es bei doppelsträngigen DNA-Molekülen spezifisch den Einzelstrang in 5'-3'-Richtung abbaut, der am 5'-Ende einen Phosphatrest besitzt (Little 1967, Higuchi & Ochman 1989). Der Phosphatrest am 5'-Ende wurde mit Hilfe des Reverseprimers in der PCR eingeführt (siehe 2.5.5).

Die Durchführung des Verdaus erfolgte nach dem Pipettierschema in Tabelle 10 mit einer anschließenden Inkubation von 1 h bei 37 °C.

Tabelle 10: Pipettierschema des Lambda-Exonuklease-Verdaus

Reagenzien	Einzelansatz (Konzentrationen)	Einzelansatz (Volumen)
Gereinigtes PCR-Produkt		25 µl
10x Lambda Exonuclease-Puffer	1x	3 µl
Lambda Exonuclease (5u/µl)	10 u	2 µl
Gesamtvolumen		30 µl

2.5.6.2 Reinigung der einzelsträngigen DNA-Proben

Die Reinigung der einzelsträngigen Proben erfolgte im Anschluß an den Lambda-Exonukleaseverdaus, um sie von den Abbauprodukten und dem Enzym zu befreien. Dazu wurde der Ansatz des Verdaus (siehe 2.5.6.1) mit destilliertem Wasser auf 100 µl aufgefüllt, 100 µl Phenol/Chloroform zugegeben, die Proben 10 s auf einem Vortex gemischt, 2 min bei 13 000 upm zentrifugiert und die wässrige Phase in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Nach einer zweiten Extraktion mit 100 µl Chloroform erfolgte die Fällung der DNA mit 2 Vol. eiskaltem 100 %-igen Ethanol. Im Anschluß an eine minimale Inkubationszeit von 2 Stunden bei -20 °C wurde die gefällte DNA 15 min bei 13 000 upm in einer vorgekühlten Kühlzentrifuge bei 4 °C pelletiert. Das Ethanol wurde vorsichtig abgezogen und die DNA in einem Thermoblock ca. 15 min bei 37 °C bei 300 upm getrocknet. Nach Resuspendierung der Probe in 7 µl TE-Puffer, erfolgte die Zugabe von 7 µl SSCP-Ladepuffer und die anschließende Lagerung bei minus 20 °C. Vor dem Auftragen auf ein SSCP-Gel muß die Probe 2 min bei 95 °C denaturiert und danach mindestens 3 min auf Eis inkubiert werden, damit die Einzelstränge ihre spezifische Sekundärstruktur ausbilden.

2.5.6.3 Polyacrylamid (PAA)-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wurde mit dem 2010 Macrophor Sequencing System mit Glasplatten der Länge von 21 cm und Spacern der Dicke von 0,4 mm durchgeführt. Für die SSCP-Gele erfolgte die Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen einer fertigen MDE-(Mutation Detektion Enhancement)-Gellösung (siehe Tabelle 11). Da das Gel bei der anschließenden Silberfärbung aus Stabilisierungsgründen auf der Öhrchenplatte haften bleiben sollte, wurde diese vorher mit 700 µl Bindesilan behandelt (100 µl Bindesilan, 100 µl 100 %-ige Essigsäure, 10 ml 96 %-ger Ethanol). Um das

Ablösen des Gels beim Auseinanderbauen der Apparatur zu erleichtern, erfolgte die Behandlung der Kühlplatte mit 700 µl Repelsilan. Dazu wurden die Glasplatten unter dem Abzug mit 70 %-igem Ethanol gründlich gereinigt, mit Wasser nachgewischt, das entsprechende Silan aufgetropft, vorsichtig mit einem Papiertuch verteilt und etwa 5 min getrocknet. Nach dem Polieren der Glasplatten mit einem Papiertuch und dem Nachwischen mit 70 %-igem Ethanol erfolgte der Zusammenbau der Gelapparatur. Zur Herstellung der Gellösung wurde das Wasser, der TBE-Puffer und die MDE-Lösung zusammengegeben, über eine Nutsche filtriert, 2 min entgast und nach der Zugabe von Ammoniumpersulfat (Initiator) und Tetramethylethylendiamin (Katalysator) mit Hilfe einer Spritze horizontal unter dem Abzug gegossen. In dem noch flüssigen Gel erfolgte die Positionierung des Kamms sowie seine Fixierung mit einer Kammklammer. Nach 60 min war das Gel auspolymerisiert und konnte in die Elektrophoresekammer eingespannt werden.

Tabelle 11: Gelzusammensetzung der SSCP-Gele

Reagenzien	0,6 x MDE	0,8 x MDE
2 x MDE-Lösung	7,5 ml	10 ml
10 x TBE	2,5 ml	2,5 ml
Deionisiertes H ₂ O	15 ml	12,5 ml
TEMED	10 µl	10 µl
APS	100 µl	100 µl
Gesamtvolumen	25 ml	25 ml

Die Dauer der Elektrophorese betrug etwa 17 Stunden bei 400 Volt. Als Elektrophoresepuffer wurde 1 x TBE verwendet. Um eine optimale Trennung der Banden zu erreichen, erfolgte die Wahl von unterschiedlichen Laufbedingungen (siehe Tabelle 12).

Tabelle 12: Übersicht der Parameter Gelkonzentration und Temperatur der einzelnen Systeme der SSCP

	Stickstofffixierer	Eubakterien	Aktinomyceten
Gelkonzentration	0,8 x MDE-Gellösung	0,6 x MDE-Gellösung	0,8 x MDE-Gellösung
Temperatur	28 °C	20 °C	27 °C

Nach der Elektrophorese wurden die Gelplatten vorsichtig mit einem Federblech auseinandergehoben und das Gel, das an der Öhrchenplatte haftete, mit Silbernitrat gefärbt.

2.5.6.4 Silbernitratfärbung

Die Detektion der DNA im SSCP-Gel erfolgte mit der Silbernitratfärbung nach Bassam *et al.* (1991). Dieser Nachweis kann mit der Färbemethode bei fotografischen Prozessen verglichen werden. Die Silberionen binden in der Gelmatrix durch Komplexbildung an die Makromoleküle, und die nicht komplexierten Silberionen werden durch Waschungen mit Wasser entfernt. Das sichtbare Bild entsteht durch die Ausbildung von Silberkeimen, die durch die Reduktion von Silberionen an Proteinen und Nucleinsäuremolekülen entstehen. Dabei verstärkt Formaldehyd die Reduktion des Silbernitrates, Natriumthiosulfat in der Entwicklungslösung entfernt unlösliche Silbernitrationen und verhindert dadurch die Entstehung von unspezifischen Färbungen.

Das Gel, das durch das Bindsilan fest an der Glasplatte haftet, wurde mit dieser in 10 %-iger Essigsäure 30 min fixiert. Nach dem Entfernen der Fixierungslösung durch drei 5 minütige Waschschriffe mit destilliertem Wasser, erfolgte die Färbung für 30 min mit frisch angesetzter Färbelösung im Dunkeln. Überschüssige Färbelösung wurde durch Spülen des Gels für 10-20 s mit destilliertem Wasser entfernt und das Gel anschließend in eine saubere Edelstahlwanne für die Entwicklung überführt. Diese erfolgte in zwei Schritten, im ersten erfolgte mit 150-200 ml Entwicklerlösung für ca. 30 s die Entfernung der Silbernitratrückstände am Gel, im zweiten Schritt die Entwicklung bis zur gewünschten Intensität. Mit der Fixierungslösung (10 % Essigsäure) aus dem ersten Schritt der Silberfärbung, wurde die Entwicklung nach einer Inkubation von 5 min gestoppt. Im Anschluß kann das Gel in destilliertes Wasser gelegt werden, um die restliche Essigsäure zu entfernen. Nach der Trocknung des Gels unter dem Abzug über Nacht, wurde es mit einem Agfa Arcus II Scanner (Agfa FotoLook 3.5) mit einer Auflösung von 300 dpi eingescannt und das Bild im tif-Format gespeichert. Die Auswertung der SSCP-Bilder erfolgte mit dem Programm Gelcompar II, dabei wurde die Darstellung der Ähnlichkeiten der Bandenmuster eines SSCP-Gels mit Hilfe eines Dendrogramms, das mit dem Dice Algorithmus und der UPGMA

(= unweighted pair group with mathematical averages) Cluster Analyse generiert wurde, dargestellt.

2.5.7 Elution von DNA und Sequenzierung

Einzelne Banden können aus den SSCP-Gelen ausgeschnitten und die DNA eluiert werden, um sie erneut mit Hilfe der PCR zu amplifizieren und anschließend zu sequenzieren. Nach dieser Methode wird die DNA zwar nicht quantitativ aus dem Gel herausgelöst, die eluierte Menge ist aber für die PCR ausreichend.

Das PAA-Gel wurde 2-5 min in destilliertem Wasser eingeweicht, die Bande mit einem sauberen, mit Ethanol gereinigten Skalpell vorsichtig ausgeschnitten, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 50 µl Elutionspuffer versetzt. Die ausgeschnittene Bande muß mit dem Elutionspuffer benetzt sein und sollte mit einer gelben Pipettenspitze leicht an der Wand des Reaktionsgefäßes zerquetscht werden, um die Angriffsfläche für den Puffer zu vergrößern. Nach einer dreistündigen Inkubationszeit bei 37 °C und 800 upm in einem Thermomixer wurde die Probe 1 min bei 12 000 x g abzentrifugiert, 40 µl des Überstandes abgenommen und die DNA mit 2 Vol. Ethanol bei -20 °C über Nacht gefällt. Die Zentrifugation der gefällten DNA erfolgte 15 min bei 4 °C und 24 000 x g. Nach der Trocknung (10-20 min bei 37 °C) wurde das Pellet in 12 µl TE-Puffer gelöst und von dieser Lösung 1 µl in die PCR eingesetzt. Das Amplifikationsprodukt kann anschließend sequenziert werden.

Das Prinzip der Sequenzierung nach dem Kettenabbruch-Verfahren (Sanger *et al.* 1977) beruht auf einer unidirektionalen PCR-Reaktion, bei der es zu statistisch verteilten Strangabbrüchen durch den Einbau von Didesoxynukleotiden in die neusynthetisierten DNA-Stränge kommt. Dabei erfolgt die Detektion der fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente durch einen Laserstrahl.

Die Sequenzierung wurde mit dem Sequenziergerät 3700 DNA Analyzer von Applied Biosystems (ABI) durchgeführt.

Bei diesem Sequenzierungssystem sind nicht die Primer sondern die Didesoxynukleotide jeweils unterschiedlich fluoreszenzmarkiert. Daher können alle vier Sequenzreaktionen in einem Reaktionsgefäß durchgeführt und die Primer frei gewählt werden, was für die Sequenzierung von PCR-Produkten von Vorteil ist.

Alle PCR-Produkte wurden von beiden Seiten sequenziert, die Sequenzen in einem Alignment miteinander abgeglichen und zu einer vereinigt. Alignment heißt, daß die einzelnen Positionen der Sequenzen untereinander geschrieben und dabei die einzelnen Zeichen aneinander ausgerichtet werden (Hansen 2001).

Die Bestimmung der Verwandtschaft zu anderen Organismen erfolgte durch einen Datenbankvergleich mit der NCBI(= National Center for Biotechnology Information)-Datenbank unter BLAST(= Basic Local Alginment Search Tool).

Um die Verwandtschaftsverhältnisse der Organismen eines Standorts untereinander zu bestimmen, wurden die entsprechenden Sequenzen in einem multiple Alignment, d.h. mehrere Sequenzen werden gleichzeitig analysiert, mit Hilfe des Programms Clustal X miteinander verglichen und mit dem Programm Treeview (Page 1996) in einem Dendrogramm (neighbor joining Distanzbaum) dargestellt.

3 Ergebnisse

Der Ergebnisteil gliedert sich in drei Teile. Zuerst werden die physikalischen und chemischen Bodenuntersuchungen dargestellt gefolgt von der Optimierung der PCR-SSCP und der Untersuchung von sechs Modellböden in Bezug auf strukturelle (16S rDNA) und funktionelle (*nifH*) Diversitätsparameter.

3.1 Chemische und physikalische Bodenparameter

Die physikalischen und chemischen Zustände im Boden stehen mit den dort lebenden Organismen in gegenseitiger Wechselwirkung, da die Organismen an wichtigen Prozessen der Bodenbildung beteiligt sind und umgekehrt ihre Aktivität durch Prozesse im Boden gesteuert werden (Gisi *et al.* 1997). Von den sechs Modellböden, die in dieser Arbeit hinsichtlich der Bakterienpopulationen untersucht wurden, erfolgte daher zunächst die Bestimmung einiger wichtiger physikalischer und chemischer Bodenparameter. Aufgrund der geringen Probenmenge konnten für die Aralseeböden keine eigenen Untersuchungen durchgeführt werden.

Die untersuchten Parameter sind in Tabelle 13 zusammengestellt. Auf diese Ergebnisse wird in der Diskussion nicht mehr eingegangen, so daß ihre Bedeutung bereits hier beschrieben wird.

Aufgrund einer charakteristischen Horizontabfolge und der spezifischen Eigenschaften der einzelnen Bodenhorizonte lassen sich Böden in unterschiedliche Bodentypen unterteilen. Beim Gartenboden handelt es sich um einen Hortisol, der durch die anthropogene Bodenbearbeitung einen mächtigen und lockeren A-Horizont aufweist. Der Waldboden zeichnet sich durch einen humosen A-Horizont und einen durch Verwitterung verlehnten B-Horizont aus, zeigt also das typische Profil einer Braunerde. Der Rekultivierungsboden ist durch Lößaufschüttung entstanden. Er besitzt durch den Luzerneanbau einen humusarmen Oberboden und wird daher als Lockersyrosem bezeichnet. Der Bodentyp der Aralseeböden konnte nicht bestimmt werden, allerdings liegen die Probenahmestellen in der Steppenbodenzone und sind einem ariden Klima ausgesetzt.

Tabelle 13: Chemische und physikalische Parameter der untersuchten Böden (Die markierten Werte wurden von folgenden Autoren übernommen: * Jahnke & Priefer (2002), ** Dumbeck 1992, # Kremer (1999), ## Roumiantseva (persönliche Mitteilung, All-Russian Institute für Agricultural Microbiology, St. Petersburg, Rußland); ($\mu\text{gN/gTS}$ = μg Stickstoff/g Trockensubstanz; n.d. = nicht determiniert)

Untersuchter Parameter	Gartenboden	Waldboden	Rekultivierungs-boden	Aralseeböden
Bodentyp	Hortisol	Braunerde aus Löß	Lockersyrosem aus Parabraunerde und Löß	n.d.
Horizont	A _p (Pflügehorizont)	A _h (humoser Horizont)	A _i (initial Horizont)	n.d.
Sandfraktion	43,5 %	22 %	2-5 % **	n.d.
Schluff- + Tonfraktion	56,5 %	78 %	84 – 97 %	n.d.
Bodenart	sL sandiger Lehm	uL schluffiger Lehm	IU lehmiger Schluff	Sand
pH-Wert	6,5	2,8	7,5 - 8,0 *	7,1 – 9,6##
Karbonat	0,55 %	0,06 %	4,5-11 % **	n.d.
Porenvolumen	61 Vol. %	74 Vol. %	35-52 Vol. % **	n.d.
Feldkapazität	39 Vol. %	49 Vol. %	22 % *	n.d.
Humusgehalt	6,5 %	9,6 %	0,4 – 0,5 %**	n.d.
C/N-Verhältnis	16	23	10	n.d.
Gesamtstickstoff	0,41 %	0,41 %	0,02 - 0,05 %**	n.d.
Nitrat	5,6 $\mu\text{gN/gTS}$	14,3 $\mu\text{gN/gTS}$	15 $\mu\text{gN/gTS}$ #	n.d.
Ammonium	0,08 $\mu\text{gN/gTS}$	0,69 $\mu\text{gN/gTS}$	4 $\mu\text{gN/gTS}$ #	n.d.

Die massenmäßige Zusammensetzung der Bodenmatrix nach Korngrößen wird als Körnung oder Textur bezeichnet, durch die relativen Anteile der drei Hauptfraktionen Sand, Schluff und Ton beschrieben und ist eine der wichtigsten Eigenschaften für die Bodenentwicklung (Schachtschabel *et al.* 1989, Gisi *et al.* 1997). Nach der deutschen Einteilung der Bodenarten (Schroeder 1983) handelt es sich bei dem Gartenboden um sandigen Lehm, bei dem Waldboden um schluffigen Lehm, beim Rekultivierungsboden um lehmigen Schluff und bei den Aralseeböden um Sand.

Die Bodenazidität beeinflusst die chemischen, physikalischen und biologischen Bodeneigenschaften und wirkt sich u. a. auf die Verfügbarkeit von Nährstoffen und auf das Bodengefüge und damit auf die Lebensbedingungen der Bodenorganismen aus (Schachtschabel *et al.* 1989). Im Boden sind eine Reihe von Puffersystemen wirksam, welche die anfallenden Protonen reversibel oder irreversibel binden und damit den pH-Wert stabilisieren können. In Abhängigkeit des Kalkgehaltes im Ausgangsgestein ist der daraus gebildete Boden entsprechend karbonathaltig und besitzt die Fähigkeit, Säuren abzupuffern. Der Rekultivierungsboden besteht zum überwiegenden Teil aus kalkhaltigem Löß, worauf der relativ hohe Karbonatgehalt von 4,5 bis 11 % hinweist.

Durch die guten Puffereigenschaft des Kalks können Säuren neutralisiert werden, und der Boden besitzt einen leicht basischen pH-Wert von 7,5-8 (siehe Tabelle 13). Im Waldboden ist das Karbonat des ursprünglichen Löß durch die Säureeinwirkung des Regens verbraucht, daher kann die obere Bodenschicht nicht mehr abgepuffert werden, was sich in einem niedrigen pH-Wert von 2,8 zeigt. Mit 0,55 % ist der Karbonatgehalt im Gartenboden noch hoch genug, um die Säurewirkung des Regens abzupuffern, so daß sich ein annähernd neutraler pH-Wert von 6,5 einstellt.

Eine Vergleichbarkeit der pH-Werte des Garten-, Wald- und Rekultivierungsbodens mit dem der Aralseeböden ist nur eingeschränkt gegeben, da in den erstgenannten die Gesamtazidität, in den Aralseeböden dagegen die aktuelle Azidität bestimmt wurde, die im Allgemeinen ca. 0,5-0,7 Einheiten höher als die Gesamtazidität liegt. Der pH-Wert der einzelnen Proben des Aralsees ist sehr variabel und schwankt von schwach bis stark alkalisch (siehe Tabelle 13).

Die Verfügbarkeit von Wasser und Luft im Boden sind wichtige Parameter für das Leben der Bodenorganismen, da sie den Gasaustausch und den Nährstofftransport entscheidend beeinflussen. In dem sehr heterogenen System Boden kommt es zwischen den unterschiedlich großen Partikeln des Bodens zur Ausbildung eines Systems von Poren mit unterschiedlichen Durchmessern, das dem Edaphon als Lebensraum dient. Die Poren sind mit einer wäßrigen Lösung, dem Kapillarwasser oder mit Gas gefüllt (Gisi *et al.* 1997). Die Fähigkeit eines Bodens, Wasser zu speichern, ist von seinem Porenvolumen abhängig und wird durch die Feldkapazität angegeben. Aufgrund des relativ hohen Schluffanteils des Wald-, Garten- und Rekultivierungsbodens, zeigen alle drei Böden eine relativ hohe Feldkapazität in vergleichbarer gleichen Größenordnung (siehe Tabelle 13).

Als Humus wird die Gesamtheit der abgestorbenen organischen Bodensubstanz bezeichnet. Der nährstoffliefernde Nährhumus ist für die Aktivität von Mikroorganismen von entscheidender Bedeutung, der Dauerhumus, der hauptsächlich aus Huminstoffen besteht, bestimmt vor allem die physikalisch chemischen Eigenschaften des Bodens und prägt im wesentlichen den Lebensraum der Organismen (Gisi *et al.* 1997). Huminstoffe übernehmen im Boden wichtige Funktionen der Wasserspeicherung und des Ionenaustausches. Sie sind durch Bildung von Ton-Humus-

Komplexen maßgeblich an der Strukturbildung beteiligt. In Abhängigkeit von der Art der Streuauflage, den Klimaverhältnissen und Bodeneigenschaften (Wasser-, Nährstoff- und Aziditätsbedingungen) verläuft der Abbau des Nährhumus unterschiedlich, und es bilden sich drei charakteristische Humusformen aus: der schwer abbaubare Rohhumus, der leichtabbaubare Mull und als Zwischenform der Moder. Ein Maß für die Abbaubarkeit von organischen Stoffen ist das C/N-Verhältnis. Je größer es ist, desto schlechter ist der Stoff abbaubar und desto höher ist der Humusanteil in der oberen Bodenschicht und umgekehrt (Gisi *et al.* 1997). Im Rekultivierungsboden ist die Streuauflage des Luzerneanbaus relativ gut abbaubar, folglich weist die obere Bodenschicht ein relativ niedriges C/N-Verhältnis, das im Bereich von Mull liegt, sowie einen niedrigen Humusgehalt auf. Bedingt durch die schwerer abbaubare Streuauflage im Buchenwald zeigt die obere Bodenschicht ein C/N-Verhältnis von 23, liegt damit im Bereich von Moder und weist einen höheren Humusgehalt von 10 % auf. Das C/N-Verhältnis im Gartenboden liegt mit 16 gerade noch im Bereich von Mull. Durch die regelmäßige Düngung mit Kompost liegt der Humusgehalt dennoch bei 6 % (siehe Tabelle 13).

Der Gesamtstickstoff im Boden umfaßt sowohl den anorganischen Stickstoff in Form von Nitrat, Nitrit und Ammoniak als auch den im Humus organisch gebundenen. Dieser wird bei der Mineralisierung durch die Ammonifikation durch Mikroorganismen in Ammonium überführt und unter aeroben sowie bei neutralen bis schwach sauren Bedingungen durch die Nitrifikation über Nitrit zu Nitrat weiter abgebaut. Bei stark sauren Bedingungen und Sauerstoffmangel kann es zur Anreicherung von Ammonium kommen. Ansonsten liegt mehr Nitrat vor, das von den Pflanzen aufgenommen, aber leicht aus dem Boden ausgewaschen wird. Nitrat- und Ammoniumgehalte im Boden sind starken Schwankungen unterworfen, da sie abhängig vom pH-Wert, O₂-Bedingungen und dem Klima sind. Daher stellen die gemessenen Nitrat- und Ammoniumwerte nur eine Momentaufnahme dar und geben nur Größenordnungen wieder. Im Gegensatz zum Garten- und Waldboden zeigt der Rekultivierungsboden, aufgrund des geringeren Humusgehaltes einen wesentlich niedrigeren Gesamtstickstoffgehalt.

Bedingt durch die ökologische Katastrophe am Aralsee, sind die Aralseeböden sehr salzhaltig (Minashina 1995). Meßwerte der in dieser Arbeit untersuchten Bodenproben liegen jedoch nicht vor.

3.2 Etablierung und Optimierung der PCR-SSCP

Die PCR-SSCP ist eine vielversprechende neue Methode, mit der die Diversität von Bakterienpopulationen untersucht werden kann. Ausgehend von der isolierten Gesamt-DNA aus dem zu untersuchenden Umweltkompartiment wird mit Hilfe der PCR ein Stück der 16S rDNA (struktureller Ansatz) oder für eine bestimmte biochemische Reaktion notwendigen Gens (funktioneller Ansatz) vervielfältigt, in einzelsträngige Moleküle überführt und deren Sekundärstrukturen sequenzspezifisch auf einem speziellen Polyacrylamidgel aufgetrennt (siehe Abbildung 2, Einleitung). Das Bandenmuster gibt einen Überblick über die Diversität der Bakterienzönose.

In dieser Arbeit sollte mit dieser Methode sowohl ein struktureller mit der Untersuchung der 16S rDNA als auch ein funktioneller Ansatz des *nifH*-Gens verfolgt werden. Dazu war zunächst die Etablierung und Optimierung der einzelnen Reaktionsschritte mit Hilfe von Referenzbakterien nötig.

3.2.1 Optimierung der PCR

In der PCR wurde die Gesamt-DNA aus Boden als Template eingesetzt und mit den drei verschiedenen Primersystemen (siehe Tabelle 5, Material und Methoden) spezifisch für die Bakteriengruppe der Eubakterien, der Aktinomyceten und der stickstofffixierenden Bakterien PCR-Fragmente erzeugt. Dabei erfolgte die Amplifikation der 16S rDNA sowohl mit eubakterienspezifischen Primern (V4 und V5 Region, 407 bp) als auch mit aktinomycetenspezifischen Primern (V3 Region, 308 bp).

Das *nifH*-Gen, das für die Nitrogenase Reduktase, einem Schlüsselenzym der Stickstofffixierung, kodiert, weicht in verschiedenen Organismen stark voneinander ab. Selbst in konservierten Proteinregionen unterscheiden sich die Codons für die meisten Aminosäuren (Redundanz), daher müssen universelle *nifH*-Primer stark degeneriert sein, um möglichst viele Stickstofffixierer zu erfassen. Der Nachteil der daraus resultierenden geringeren Spezifität der PCR wurde durch einen verschachtelten PCR

Ansatz kompensiert (Widmer *et al.* 1999). Das in der ersten PCR mit den Primern F19 und R463 hergestellte relativ unspezifische Fragmentengemisch wird verdünnt in die zweite PCR eingesetzt und dort mit den Primern F112 und R463-Ph spezifischer amplifiziert.

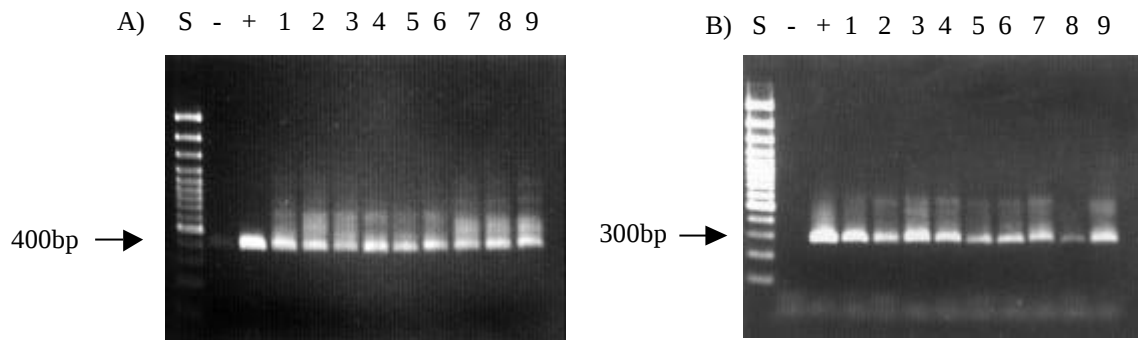


Abbildung 4: Exemplarische Kontrollgele der PCR mit Amplifikaten der 16S rDNA der V4 und V5 Region (407 bp) der Eubakterien (A) und der 16S rDNA der V3 Region (308 bp) der Aktinomyceten (B) (1,5 %-iges Agarosegel, S =Größenstandard: 100 bp DNA Ladder Plus, - = Negativkontrolle, + = Positivkontrollen: *Azotobacter chroococcum* (A), *Nocardia calcaerea* (B), 1-9 = Aralseebodenproben), es wurden 10 µl aufgetragen

Die Amplifikation der 16S rDNA aus der Gesamt-DNA aus Boden war erfolgreich (siehe Abbildung 4). Es gelang PCR-Produkte der gewünschten Größe (Eubakterien ca. 400 bp, Aktinomyceten ca. 300 bp) in ausreichender Menge herzustellen, um sie anschließend in die SSCP einzusetzen. In Abbildung 4 ist oberhalb der Bande der PCR-Produkte ein leichter „Hintergrundschmier“ zu erkennen, der trotz Optimierung der PCR-Bedingungen nicht eliminiert werden konnte. Er störte den weiteren Versuchsverlauf jedoch nicht. Trotz sterilen Arbeitens, zeigte die Negativkontrolle der eubakteriellen PCR bei einigen Reaktionen Amplifikationsprodukte. In diesen Fällen wurden diese positiven Negativkontrollen analog zu den übrigen Bodenproben weiter aufgearbeitet und ebenfalls mit auf das SSCP-Gel aufgetragen. Bei der PCR der Aktinomyceten war die Negativkontrolle in allen Reaktionen in Ordnung.

Das *nifH* Gen konnte ebenfalls erfolgreich aus der Gesamt-DNA aus Boden in einem verschachtelten PCR-Ansatz amplifiziert werden (siehe Abbildung 5). Das Ergebnis der ersten PCR zeigt mehrere Banden, unter anderem auch die des gewünschten PCR-

Produkts der Größe 464 bp, sowie einen starken Hintergrundschmier (siehe Abbildung 5A).

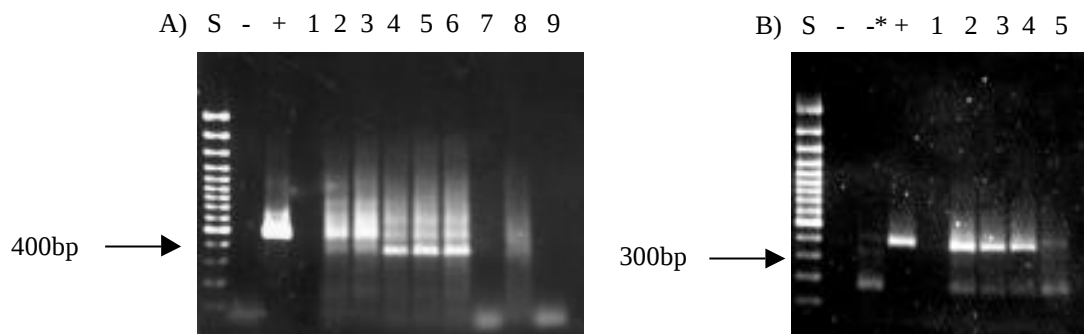


Abbildung 5: Exemplarische Kontrollgele der PCR mit Amplifikaten des *nifH* Gens, 1. verschachtelte PCR Produktgröße: 464 bp (A), 2. verschachtelte PCR Produktgröße: 370 bp (B) (1,5 %-iges Agarosegel, Größenstandard: 100 bp DNA Ladder Plus; - = Negativkontrolle, -* = Negativkontrolle aus 1. PCR, + = Positivkontrolle (*Azomonas macrocytogenes*), 1-9 = Waldbodenproben), es wurden 10 µl aufgetragen

Wird dieses PCR-Produkt verdünnt in die zweite verschachtelte PCR eingesetzt, entsteht hauptsächlich das Produkt der erwarteten Größe von 370 bp (siehe Abbildung 5B). Da eine verschachtelte PCR in besonderem Maße die Gefahr birgt, daß eventuelle Verunreinigungen sehr stark vervielfältigt werden (Newton & Graham 1994), wurden zusätzlich zu den normalen Negativkontrollen die Negativkontrolle der ersten PCR verdünnt in die zweite PCR eingesetzt (siehe 2.5.5.1, Material und Methoden). Bei diesen Kontrollen fand zum Teil eine geringe Amplifikation statt. In diesen Fällen erfolgte die Aufarbeitung dieser Kontrollen analog zu den Bodenproben bis zum Auftragen auf das SSCP-Gel.

Nach der anschließenden Aufarbeitung der PCR-Produkte (siehe 2.5.6.1 bis 2.5.6.2, Material und Methoden) wurden sie in die SSCP eingesetzt.

3.2.2 Optimierung der SSCP

Die Methode der SSCP eignet sich zur Durchführung von Diversitätsanalysen von Bakterienpopulationen. Dazu müssen die zu untersuchenden PCR-Produkte in Einzelstrangmoleküle überführt und anschließend in die SSCP eingesetzt werden (siehe 2.5.6, Material und Methoden). Die Etablierung der SSCP erfolgte an Referenzbakterien (siehe Tabelle 14), indem die Elektrophoresebedingungen wie Temperatur und

Gelkonzentration so optimiert wurden, daß eine optimale Trennung der Banden erzielt werden konnte.

Um zu prüfen, ob tatsächlich alle einzelnen Bakterien aus einer Mischungen detektierbar sind, wurde die DNA verschiedener Referenzbakterien vermischt, anschließend in die PCR eingesetzt und mittels SSCP analysiert.

Gleichzeitig dienten diese Referenzbakterien zur Erstellung eines systemspezifischen Standards, der eine Kontrolle der Elektrophoresebedingungen ermöglichen sowie die Vergleichbarkeit der Gele erhöhen sollte. Dieser Standard wurde im Gegensatz zu den DNA-Mischungen so hergestellt, daß die fertig aufgearbeiteten PCR-Amplifikate der Referenzbakterien vermischt und auf ein SSCP-Gel aufgetragen wurden.

Tabelle 14: Referenzbakterien zur Optimierung der einzelnen Systeme für die SSCP

Eubakterien	<i>Pseudomonas stutzeri</i> , <i>Azotobacter chroococcum</i> , <i>Sinorhizobium meliloti</i> , <i>Rhizobium leguminosarum</i>
Aktinomyceten	<i>Nocardia calcarrea</i> , <i>Streptomyces albus</i> , <i>Nocardia rubra</i>
Stickstofffixierer	<i>Rhizobium leguminosarum</i> , <i>Azomonas macrocytogenes</i>

Die Bakteriengemeinschaft der Eubakterien und der Aktinomyceten wurden jeweils mit einem strukturellen Ansatz (16S rDNA) untersucht.

Für den Eubakterienstandard wurden die Referenzbakterien *Pseudomonas stutzeri*, *Azotobacter chroococcum*, *Sinorhizobium meliloti* und *Rhizobium leguminosarum* ausgewählt (siehe Abbildung 6A, Spur 1). Der Aktinomycetenstandard besteht aus *Nocardia calcarrea*, *Streptomyces albus* und *Nocardia rubra* (siehe Abbildung 6B, Spur 7). *Azotobacter chroococcum* zeigt 2 bis 3 Banden im Gegensatz zu den anderen drei Referenzbakterien, die jeweils nur eine Bande auf dem SSCP-Gel zeigen.

Aus beiden Mischungen können jeweils alle Banden der Referenzbakterien detektiert werden (siehe Abbildung 6A, Spur 6 und Abbildung 6B, Spur 11).

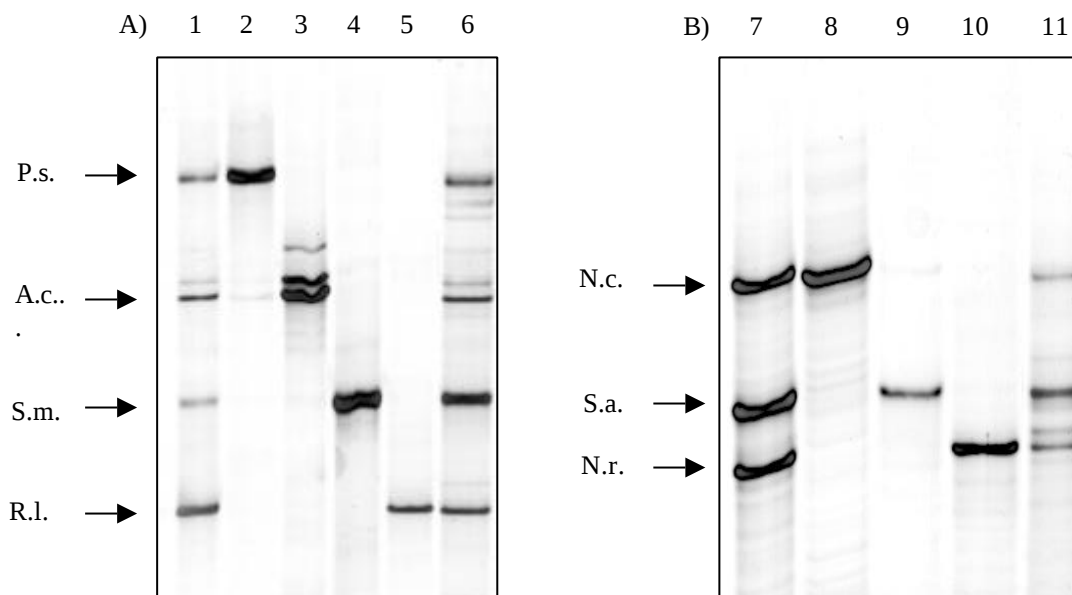


Abbildung 6: SSCP-Gele mit einzelsträngigen Amplifikaten des 16S rRNA Gens von Referenzbakterien der Eubakterien (A) und der Aktinomyceten (B); gezeigt ist jeweils der Speziesstandard (Gemisch aus fertig bearbeiteten SSCP-Proben der Referenzbakterien), die einzelnen Referenzbakterien sowie eine Mischung aus deren DNA (Mischung der DNA und anschließende Aufarbeitung für SSCP) (1= Eubakterienstandard, 2= *Pseudomonas stutzeri* (P.s.), 3= *Azotobacter chroococcum* (A.c.), 4= *Sinorhizobium meliloti* MVII (S.m.), 5= *Rhizobium leguminosarum* VF39 (R.l.), 6= Mischung der Eubakterien, 7= Aktinomycetenstandard, 8= *Nocardia calcarrea* (N.c.), 9= *Streptomyces albus* (S.a.), 10= *Nocardia rubra* (N.r.), 11= Mischung der Aktinomyceten)

Das Auftreten von mehreren Banden eines Organismus kann unterschiedliche Ursachen haben. Entweder besitzt dieser Organismus unterschiedliche Varianten eines Gens, dessen einzelsträngige DNA aufgrund der verschiedenen Sequenzen ein unterschiedliches Laufverhalten besitzt, oder das einzelsträngige DNA-Molekül bildet mehrere Sekundärstrukturen, die jeweils unterschiedliche Laufverhalten auf dem SSCP-Gel zeigen. Um die Ursache des Auftretens zweier Banden bei *Azotobacter chroococcum* zu untersuchen, wurden sie aus dem Gel ausgeschnitten, die DNA eluiert, in der PCR reamplifiziert und erneut auf ein SSCP-Gel aufgetragen (siehe Abbildung 7).

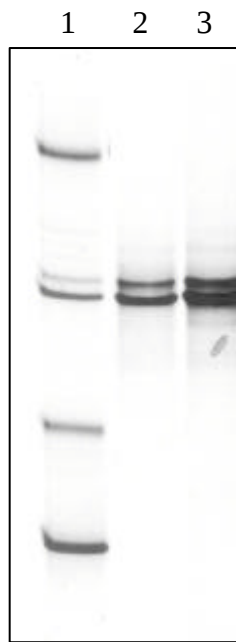


Abbildung 7: SSCP-Gel mit einzelsträngigen Reamplifikaten des 16Sr RNA-Gens (407 bp) des Referenzbakteriums *Azotobacter chroococcum* (1 = Eubakterienstandard; 2 = *Azotobacter chroococcum* (obere Bande); 3 = *Azotobacter chroococcum* (untere Bande))

Beide einzelnen ausgeschnittenen Banden zeigen nach der Reamplifikation jeweils wieder zwei Banden (siehe Abbildung 7), was darauf hindeutet, daß das einzelsträngige DNA-Molekül zwei Sekundärstrukturen ausbildet.

Die Gruppe der Stickstofffixierer wurde durch die Analyse des *nifH*-Gens untersucht.

Der Stickstofffixiererstandard besteht aus den Referenzbakterien *Rhizobium leguminosarum* und *Azomonas macrocytogenes* (siehe Abbildung 8, Spur 1). Das Bakterium *Azomonas macrocytogenes* zeigt 3 Banden auf dem SSCP-Gel (siehe Abbildung 8, Spur 3) während *Rhizobium leguminosarum* nur eine Bande zeigt.

In einer Mischung aus den Referenzbakterien *Rhizobium leguminosarum*, *Azotobacter chroococcum* und *Azomonas macrocytogenes* können ebenfalls alle Banden der Referenzbakterien detektiert werden (siehe Abbildung 8, Spur 7).

Die Ursache der Auftrennung in drei Banden bei *Azomonas macrocytogenes* wurde wie bei der strukturellen Analyse untersucht. Dabei zeigt sich, daß die obere Bande nach der Reamplifikation auch nur diese Bande darstellt, während die beiden eng beieinanderliegenden unteren Banden nach der Reamplifikation jeweils wieder zwei Banden zeigen (siehe Abbildung 9). Dies bedeutet, daß *Azomonas macrocytogenes* zwei

nifH Gene unterschiedlicher Sequenz besitzt, wobei eine zwei Sekundärstrukturen ausbildet.

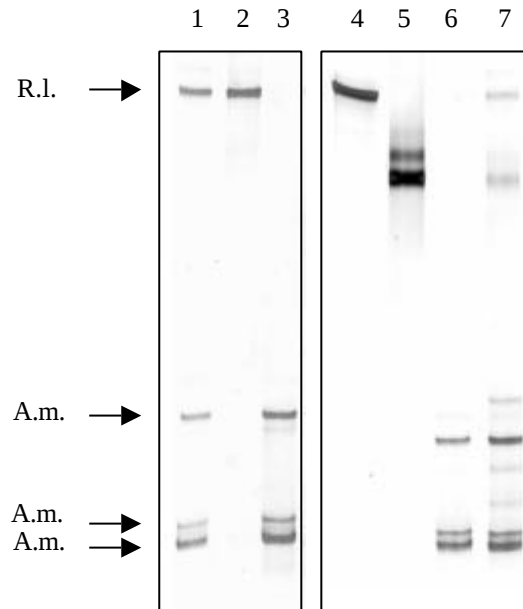


Abbildung 8: SSCP-Gele mit einzelsträngigen Amplifikaten des *nifH* Gens von Referenzbakterien der Stickstofffixierer; gezeigt ist der Speziesstandard (Gemisch aus fertig bearbeiteten SSCP-Proben der Referenzbakterien), die einzelnen Referenzbakterien sowie eine Mischung aus diesen Bakterien (Mischung auf DNA-Ebene) (1 = Stickstofffixiererstandard, 2 = *Rhizobium leguminosarum* VF39 (R.l.), 3 = *Azomonas macrocytogenes* (A.m.), 4 = *Rhizobium leguminosarum* VF39, 5 = *Azotobacter chroococcum*, 6 = *Azomonas macrocytogenes*, 7 = Mischung der Stickstofffixierer)

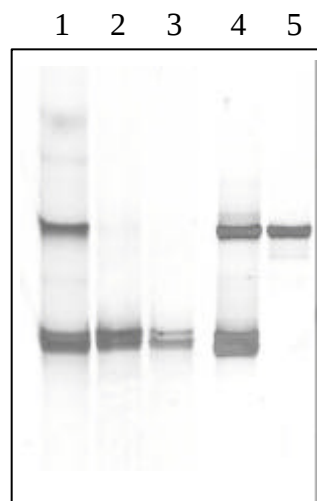


Abbildung 9: SSCP-Gel mit einzelsträngigen Reamplifikaten des *nifH* Gens (370 bp) des Referenzbakteriums *Azomonas macrocytogenes* (1+4= *Azomonas macrocytogenes*; 2= *Azomonas macrocytogenes* (mittlere Bande); 3= *Azomonas macrocytogenes* (untere Bande); 5= *Azomonas macrocytogenes* (obere Bande))

3.3 Untersuchung der sechs Modellböden mit PCR-SSCP

Nachdem die Bedingungen für Eubakterien, Aktinomyceten und Stickstofffixierer etabliert und optimiert waren, wurden diese Systeme auf ihre Anwendbarkeit in Bezug auf die Untersuchung von sechs verschiedenen Modellböden getestet.

Als Modellböden dienten Gartenerde und Waldboden aus dem Aachener Stadtgebiet, Rekultivierungsboden aus dem Braunkohletagebau von Rheinbraun sowie Bodenproben aus drei Regionen nahe des Aralsees in Mittelasien (siehe 2.3.1).

Die Gesamt-DNA aus diesen Böden wurde wie unter Kapitel 2.5.3 beschrieben isoliert und die PCR-SSCP eingesetzt. Die jeweiligen Ergebnisse sind in den nachfolgenden Abschnitten beschrieben. In allen Fällen wurden die SSCP-Gele mit dem Computerprogramm Gelcompar II ausgewertet, um die Vergleichbarkeit der Bandenmuster mit Hilfe eines Dendrogramms darzustellen. Dabei traten folgende Probleme auf: bei SSCP-Gelen, bei denen die Banden im Hintergrund verschwinden, ist es unmöglich, alle Banden mit Gelcompar zu erfassen. In diesem Fall erfolgte die Konzentration auf die prominentesten Banden. Weiterhin erfaßt das Programm nur Banden, die eine gewisse Intensität besitzen. Sind Parallelproben unterschiedlich stark konzentriert, ist es möglich, daß Banden mit der gleichen Position nicht beide von dem Programm erfaßt werden. In diesem Fall wurden die entsprechenden Banden manuell ergänzt.

Die durchschnittliche Anzahl der von Gelcompar erfaßten Banden war bei der strukturellen Analyse der Eubakterien am höchsten, gefolgt von den Aktinomyceten. Die der funktionellen Analyse der stickstofffixierenden Bakterien liegt dagegen etwas niedriger (siehe Tabelle 15).

Tabelle 15: Auswertung der Anzahl der Banden der SSCP-Gele der einzelnen Böden mit dem Programm Gelcompar II

System	Boden	Banden/Proben	Ø Banden
Eubakterien	Gartenboden	14	14
	Waldboden	10	
	Rekultivierungsboden	18	
	Aralseeböden	15	
Aktinomyceten	Gartenboden	11	12
	Waldboden	6	
	Rekultivierungsboden	17	
	Aralseeböden	12	
Stickstofffixierer	Gartenboden	9	9
	Waldboden	5	
	Rekultivierungsboden	12	
	Aralseeböden	10	

Zur Aufklärung des Ursprungs einzelner Banden der Bandenmuster der sechs Modellböden, wurden einzelne Banden willkürlich ausgewählt, ausgeschnitten, die DNA eluiert, reamplifiziert und sequenziert. Die Sequenzierung ist grundsätzlich nur dann möglich, wenn die Bande aus einem Amplifikationsprodukt besteht. Liegen mehrere Sequenzen übereinander, werden nicht auswertbare Mischsequenzen erhalten. Mit Hilfe eines Datenbankvergleichs wurde die Verwandtschaft der Sequenzen bestimmt. Sofern genügend Sequenzen zur Verfügung standen, erfolgte für jeden Boden die Erstellung eines Stammbaums aus den vorliegenden Sequenzdaten jeder untersuchten Bakteriengruppe, der die Verwandtschaftsverhältnisse wiedergeben soll. Dabei wurden eng verwandte Sequenzen aus der Datenbank in die Stammbäume integriert, um deren Aussagefähigkeit zu erhöhen.

3.3.1 Isolierung genomischer DNA aus Boden

Bei der Isolierung von Gesamt-DNA aus dem sehr komplexen Substrat Boden ist die Reinigung der DNA von den Huminstoffen besonders wichtig, um sie anschließend erfolgreich in der PCR amplifizieren zu können (Tsai & Olson 1991, Porteous *et al.* 1997).

Aus den meisten Bodenproben konnte mit Hilfe der in Material und Methoden beschriebenen Standard-Vorschrift (siehe 2.5.3) so viel DNA isoliert werden, daß sie auf einem Kontrollgel mit Ethidiumbromid problemlos nachweisbar war (siehe Abbildung 10). Bei einzelnen Bodenproben (Probe 4 des Rekultivierungsbodens, Proben 7-9 der Aralseeböden) war dies jedoch nicht möglich. Diese Proben konnten

aber trotzdem erfolgreich in die PCR eingesetzt werden (siehe 3.2.1). Der hohe Huminstoffgehalt des Waldbodens erforderte einen zusätzlichen Reinigungsschritt bei der Isolierung (siehe 2.5.3).

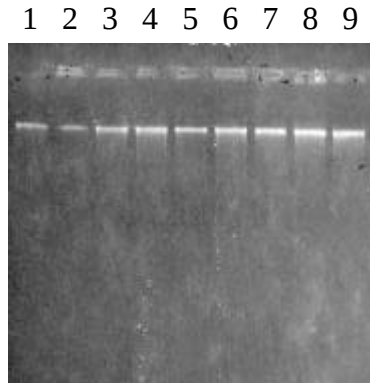


Abbildung 10: Exemplarisches Kontrollgel der Gesamt-DNA-Isolierung aus Boden am Beispiel von drei Proben des Rekultivierungsbodens (1, 2, 3= Probe 1; 4, 5, 6= Probe 2; 7, 8, 9= Probe 3), es wurden 5 µl aufgetragen

Die isolierte DNA aus einer Bodenprobe wurde jeweils in Parallelansätzen in die unterschiedlichen PCR-Reaktionen eingesetzt.

3.3.2 Strukturelle Analyse

Die Analyse der Eubakterien und Aktinomycetenpopulationen der sechs Modellböden erfolgte mit einem strukturellen Ansatz, in dem die Diversität der 16S rDNA mit der PCR-SSCP untersucht wurde.

Die strukturellen Diversitätsanalysen des Garten- und Waldbodens ergaben relativ viele unscharfe Banden auf den SSCP-Gelen, die in den Hintergrund übergehen (siehe Abbildung 11 bis Abbildung 13). Eine Ausnahme bildet die Aktinomycetengemeinschaft des Waldbodens, mit auffallend wenigen eng beieinander liegenden Banden (siehe Abbildung 14).

Im Gegensatz zu den SSCP-Gelen der Eubakterien zeigen die Aktinomycetenpopulationen im Garten- und Waldboden mit 87 bis 100 % eine sehr hohe Übereinstimmung der Bandenmuster untereinander (siehe Abbildung 12 und Abbildung 14). Bei den Eubakterien liegt die Ähnlichkeit mit nur 40-60 % dagegen deutlich niedriger. Optisch erscheint die Ähnlichkeit bei den Eubakterien zwischen den Proben

des Gartenbodens höher zu sein, was möglicherweise daran liegt, daß viele Banden im Hintergrund verschwinden und daher durch das Programm Gelcompar nicht erfaßt werden konnten.

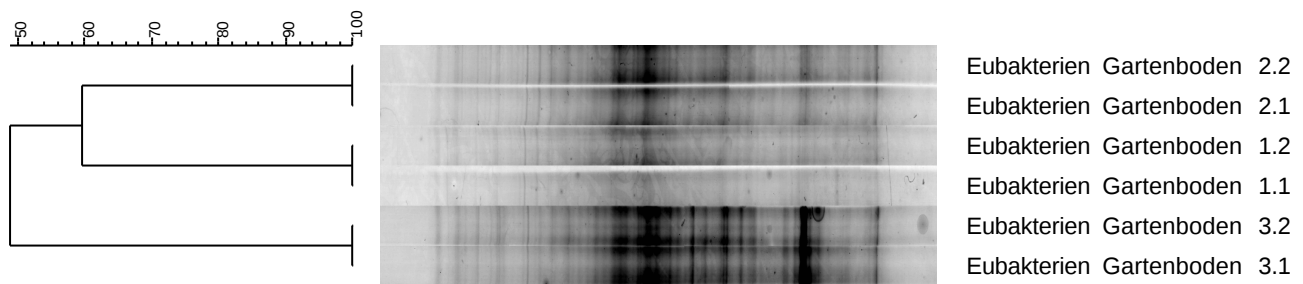


Abbildung 11: SSCP-Gel mit einzelsträngigen Amplifikaten des 16S rRNAGens (407 bp) der Eubakterien aus jeweils 2 parallelen Bodenproben der Gartenerde; die genetische Ähnlichkeit der Bandenmuster des SSCP-Gels wird durch ein UPGMA Dendrogramm (Dice Koeffizient der Ähnlichkeit) gezeigt

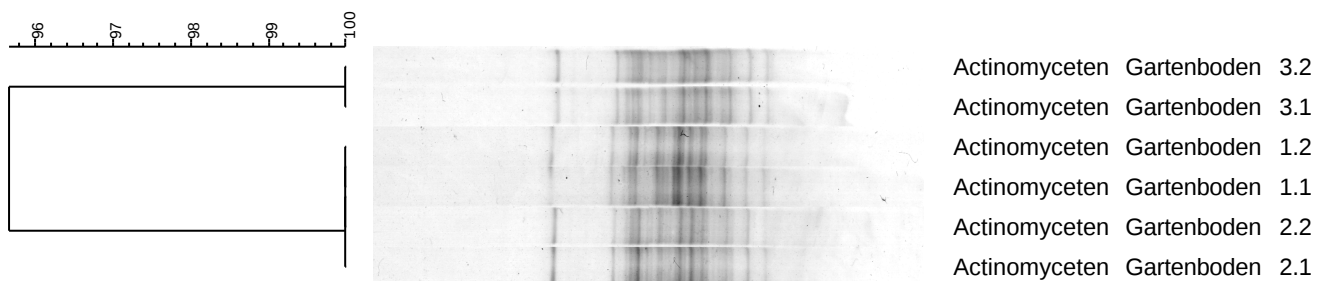


Abbildung 12: SSCP-Gel mit einzelsträngigen Amplifikaten des 16S rRNAGens (308 bp) der Actinomyceten aus jeweils 2 parallelen Bodenproben des Gartenbodens; die genetische Ähnlichkeit der Bandenmuster des SSCP-Gels wird durch ein UPGMA Dendrogramm (Dice Koeffizient der Ähnlichkeit) gezeigt

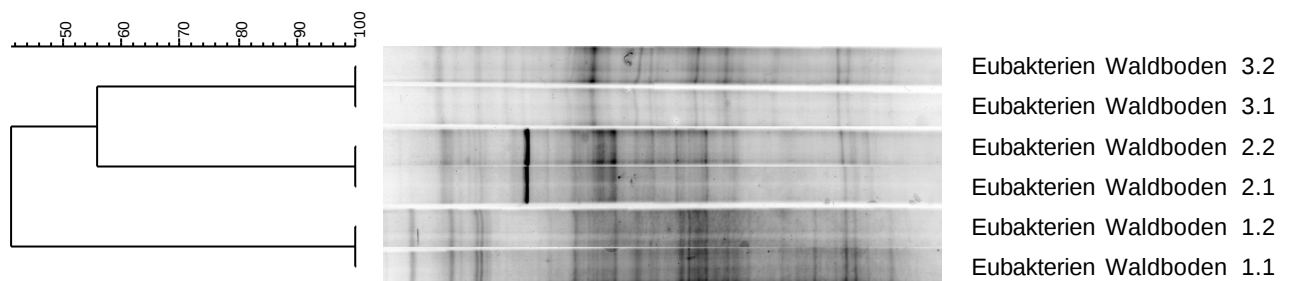


Abbildung 13: SSCP-Gel mit einzelsträngigen Amplifikaten des 16S rRNAGens (407 bp) der Eubakterien aus jeweils 2 parallelen Bodenproben des Waldbodens; die genetische Ähnlichkeit der Bandenmuster des SSCP-Gels wird durch ein UPGMA Dendrogramm (Dice Koeffizient der Ähnlichkeit) gezeigt

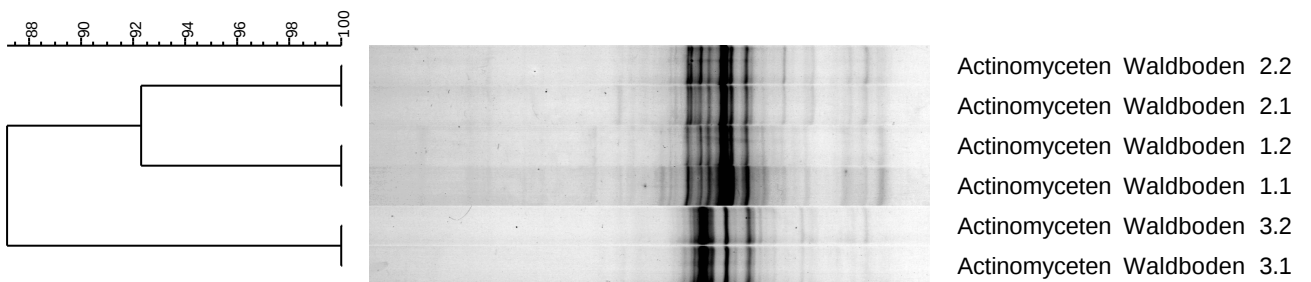


Abbildung 14: SSCP-Gel mit einzelsträngigen Amplifikaten des 16S rRNAGens (308 bp) der Aktinomyceten aus jeweils 2 parallelen Bodenproben des Waldbodens; die genetische Ähnlichkeit der Bandenmuster des SSCP-Gels wird durch ein UPGMA Dendrogramm (Dice Koeffizient der Ähnlichkeit) gezeigt

Die Parallelproben des Garten- und Waldbodens sind jeweils identisch.

Die Muster der Eubakterien im Rekultivierungsboden bestehen aus relativ vielen Banden, die in den Hintergrund übergehen (siehe Abbildung 15). Im Gegensatz dazu sind die der Aktinomyceten etwas stärker vom Hintergrund abgegrenzt (siehe Abbildung 16).

Alle Parallelproben des Rekultivierungsbodens der Eubakteriengemeinschaft besitzen identische Bandenmuster. Jedoch sind bei den Aktinomyceten nur die Parallelen der Probe 5 des Rekultivierungsbodens identisch, die der Proben 1, 2 und 3 zeigen Überein-

stimmungen über 90 %, die der Proben 4 und 6 unterschreiten 90 % (siehe Abbildung 16).

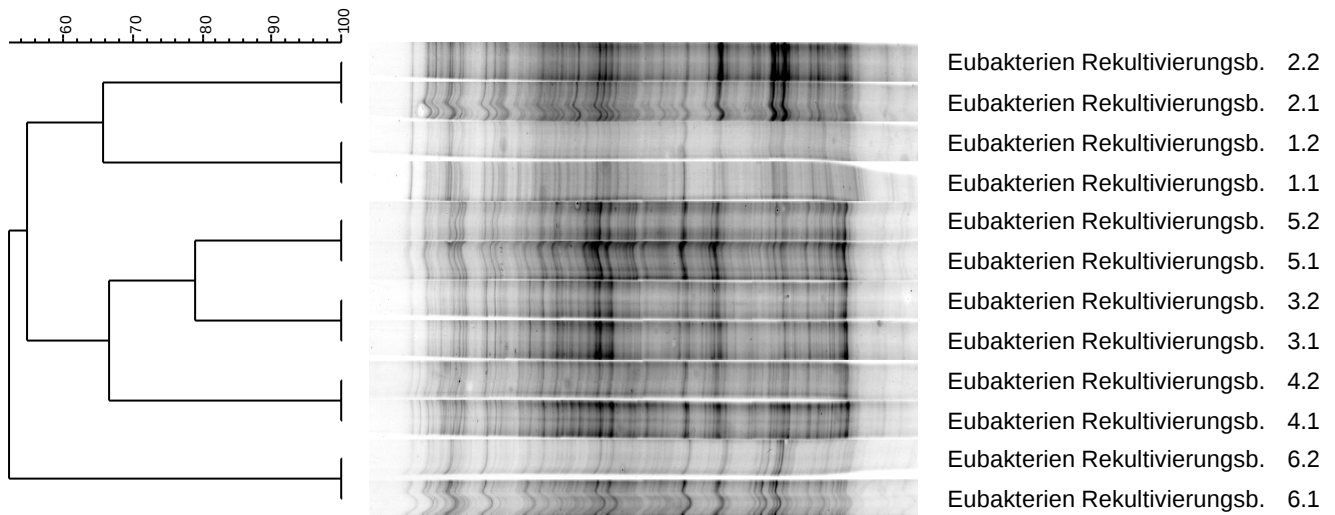


Abbildung 15: SSCP-Gel mit einzelsträngigen Amplifikaten des 16S rRNAGens (407 bp) der Eubakterien aus jeweils 2 parallelen Bodenproben des Rekultivierungsbodens; die genetische Ähnlichkeit der Bandenmuster des SSCP-Gels wird durch ein UPGMA Dendrogramm (Dice Koeffizient der Ähnlichkeit) gezeigt

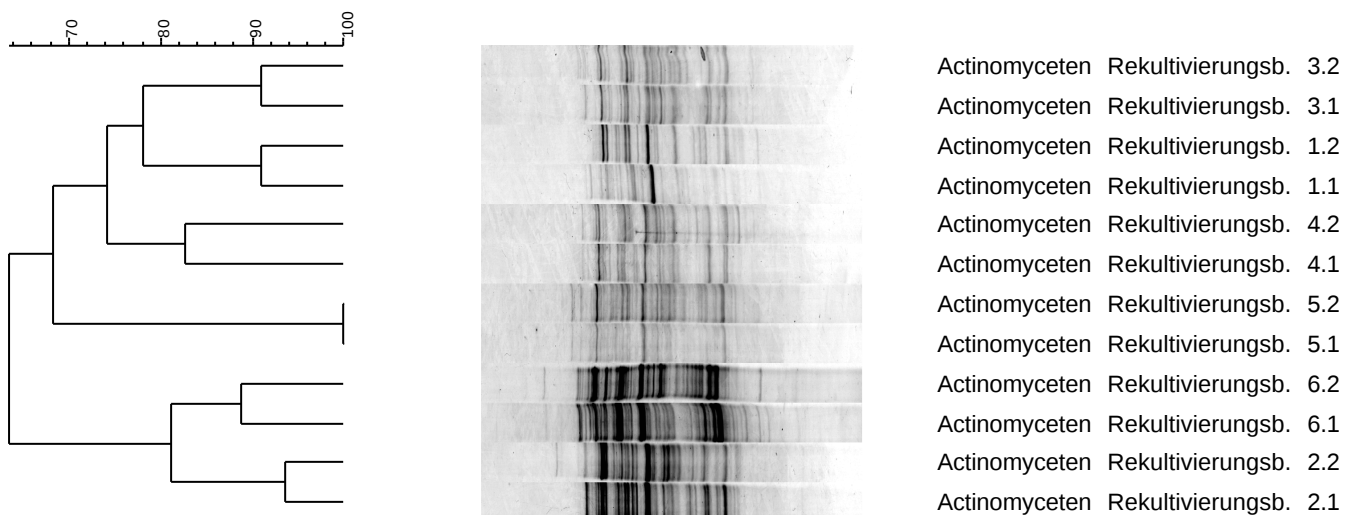


Abbildung 16: SSCP-Gel mit einzelsträngigen Amplifikaten des 16S rRNAGens (308 bp) der Actinomyceten aus jeweils 2 parallelen Bodenproben des Rekultivierungsbodens; die genetische Ähnlichkeit der Bandenmuster des SSCP-Gels wird durch ein UPGMA Dendrogramm (Dice Koeffizient der Ähnlichkeit) gezeigt

Die Bandenmuster der Aktinomyceten zeigen untereinander mit einer Übereinstimmung von 63-81 % (siehe Abbildung 16) eine etwas größere Ähnlichkeit als die der Eubakterien mit 52-79 % (siehe Abbildung 15).

Die Banden des SSCP-Gels der Eubakterien und der Aktinomyceten der Aralseeböden heben sich deutlich gegenüber dem Hintergrund ab (siehe Abbildung 17 und Abbildung 18). Bis auf drei Ausnahmen der Aktinomyceten (Proben 3, 7 und 9 mit Ähnlichkeiten von über 90 %) weisen alle Parallelproben identische Bandenmuster auf.

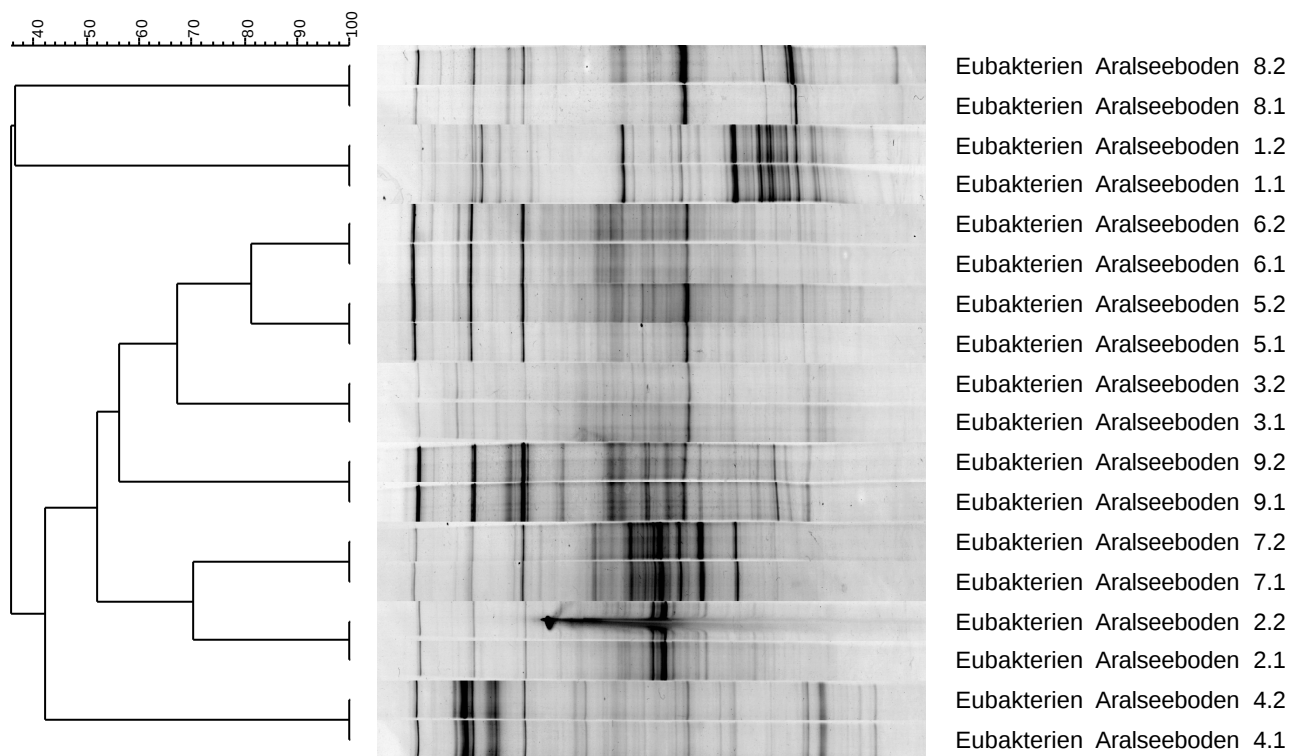


Abbildung 17: SSCP-Gel mit einzelsträngigen Amplifikaten des 16S rRNAGens (407 bp) der Eubakterien aus jeweils 2 parallelen Bodenproben der Aralseeböden; die genetische Ähnlichkeit der Bandenmuster des SSCP-Gels wird durch ein UPGMA Dendrogramm (Dice Koeffizient der Ähnlichkeit) gezeigt

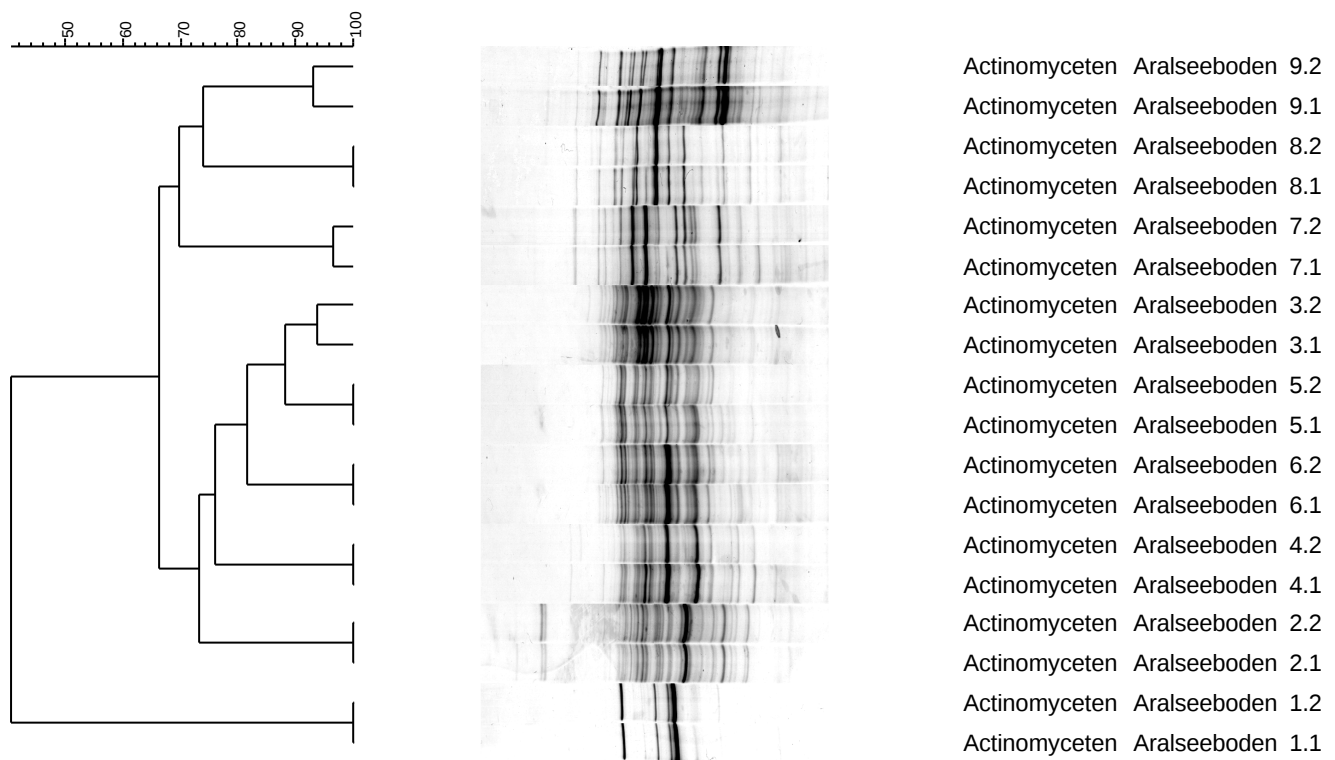


Abbildung 18: SSCP-Gel mit einzelsträngigen Amplifikaten des 16S rRNA-Gens (308 bp) der Actinomyceten aus jeweils 2 parallelen Bodenproben der Aralseeböden; die genetische Ähnlichkeit der Bandenmuster des SSCP-Gels wird durch ein UPGMA Dendrogramm (Dice Koeffizient der Ähnlichkeit) gezeigt

Mit 40-88 % zeigen die Bandenmuster der Actinomyceten der Aralseeböden eine etwas höhere Ähnlichkeit der Bodenproben untereinander (siehe Abbildung 18) als die der Eubakterien mit 36-82 % (siehe Abbildung 17). Dabei fällt auf, daß bei den Actinomyceten alle Bodenproben mit 66-88 % einander ähnlich sind und sich die Probe 1 mit nur 40 % Übereinstimmung deutlich von den anderen Proben unterscheidet.

Um die Ähnlichkeit der Bandenmuster einer Bakteriengruppe der verschiedenen Modellböden untereinander festzustellen, wurden die Parallelproben, die eine Ähnlichkeit von über 90 % aufwiesen, mit Hilfe des Programms Gelcompar miteinander verglichen.

Der Vergleich der Eubakterienmuster zeigt, daß die Unterschiede zwischen den Bodenproben mit einer Übereinstimmung von 32-82 % relativ groß sind (siehe Abbildung 19). Zum Teil bilden sich Gruppen deren Ähnlichkeit höher als 50 % ist, wie

z.B. die Proben des Rekultivierungsbodens und die Proben 2, 3, 5, 6 und 7 der Aralseeböden. Die Muster der Proben des Waldbodens bilden eine Gruppe mit 44 % Übereinstimmung, die des Gartenbodens zeigen eine größere Ähnlichkeit zu denen einzelner Aralseebodenproben untereinander. Die Ähnlichkeiten der Bandenmuster ist demnach nur im Rekultivierungs-, Wald- und eines Teils der Aralseeböden innerhalb eines Bodens so hoch, daß die Aufteilung in Gruppen der Zugehörigkeit zu den Böden entspricht. Die Proben des Aralsee- und des Gartenbodens bilden dagegen eine gemischte Gruppe.

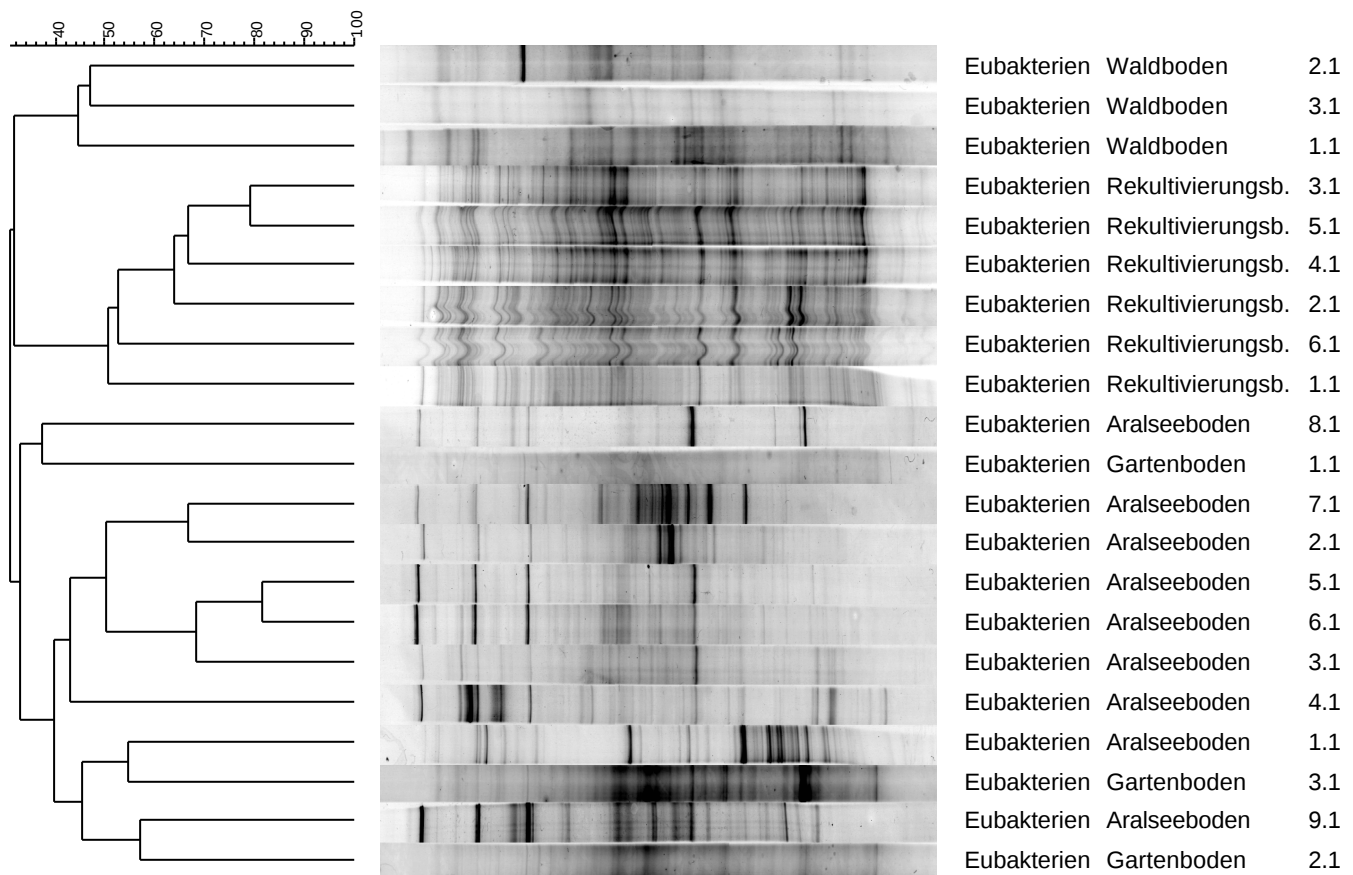


Abbildung 19: SSCP-Gel mit einzelsträngigen Amplifikaten des 16S rRNAGens (407 bp) der Eubakterien aus Bodenproben der sechs Modellböden (Wald-, Garten-, Rekultivierungs- und Aralseeböden); die genetische Ähnlichkeit der Bandenmuster des SSCP-Gels wird durch ein UPGMA Dendrogramm (Dice Koeffizient der Ähnlichkeit) gezeigt

Bei den Aktinomyceten konnten die Proben des Waldbodens nicht einbezogen werden, da auf dem entsprechenden SSCP-Gel der Speziesstandard nicht aufgetragen wurde, so

daß ein Vergleich mit den anderen Böden nicht möglich war. Es ist allerdings auffällig, daß das Gel der Aktinomyceten des Waldbodens nur wenige Banden zeigt (siehe Abbildung 14).

Die Gruppierung der Bandenmuster zeigt, daß sich der Gartenboden deutlich vom Aralsee- und Rekultivierungsboden unterscheidet, während die zuletzt genannten eine gemeinsame Gruppe bilden (siehe Abbildung 20). Die Bodenprobe 1 der Aralseeböden unterscheidet sich auch in diesem Gesamtvergleich sehr stark von den Bandenmustern der übrigen Proben, die mit einer Übereinstimmung von 54-94 % untereinander eine relativ hohe Ähnlichkeit zeigen.

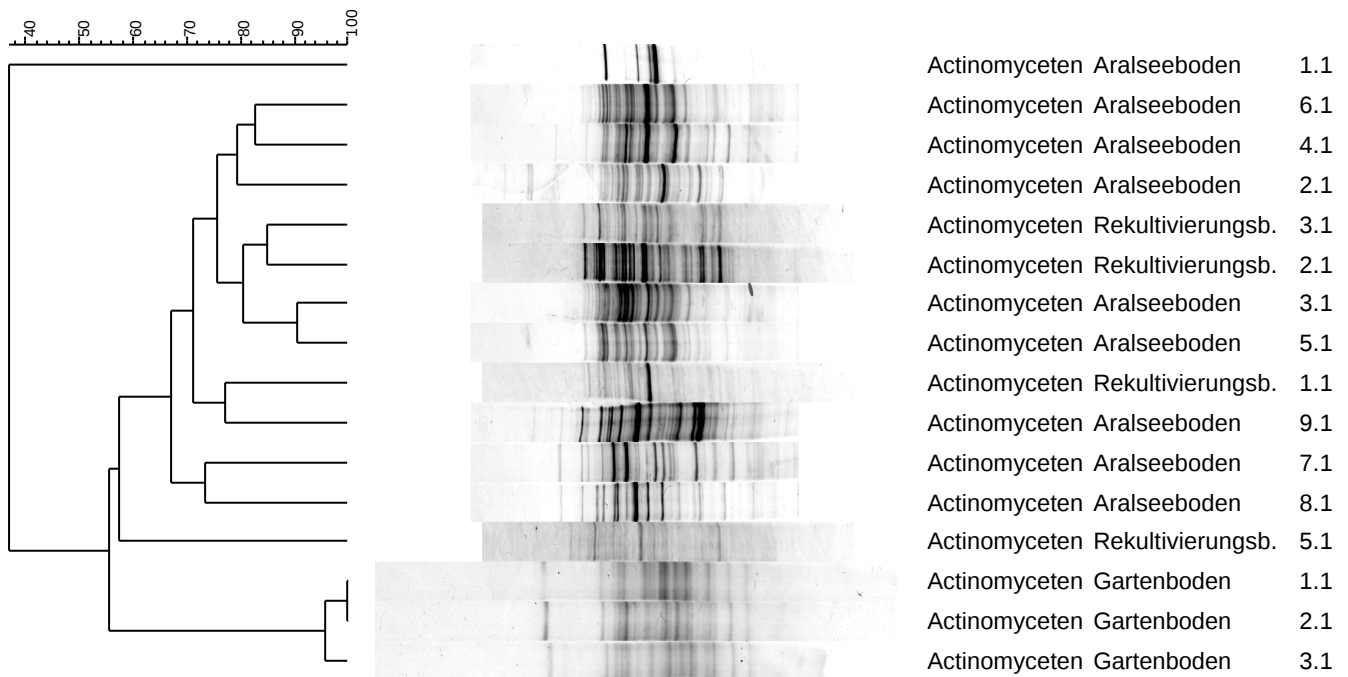


Abbildung 20: SSCP-Gel mit einzelsträngigen Amplifikaten des 16S rRNAGens (308 bp) der Aktinomyceten aus Bodenproben der fünf Modellböden (Garten-, Rekultivierungs- und Aralseeböden); die genetische Ähnlichkeit der Bandenmuster des SSCP-Gels wird durch ein UPGMA Dendrogramm (Dice Koeffizient der Ähnlichkeit) gezeigt

Die Muster der Aktinomyceten untereinander weisen eine stärkere Ähnlichkeit als die Eubakterien auf, mit Ausnahme der Probe 1 des Aralseebodens. Dabei bilden die Proben eines Bodens zum Teil Gruppierungen, die die Zugehörigkeit zu den einzelnen

Böden widerspiegeln. Teilweise bilden aber die Proben von zwei Böden eine gemeinsame Gruppe.

Bei den Eubakterien gehen die Banden bei allen Böden mit Ausnahme der Aralseeböden in den Hintergrund über. Bei den Aktinomyceten sind sie dagegen stärker vom Hintergrund abgegrenzt. Die Aralseeböden zeigen im Gegensatz zu den anderen drei Modellböden in der SSCP-Analyse Banden, die sich bei den Eubakterien und den Aktinomyceten stark vom Hintergrund abgrenzen. Von dem Programm Gelcompar wurden bei den SSCP-Gelen der Eubakterien mehr Banden als bei den Aktinomyceten erfaßt.

Parallelproben, die nicht 100 % identisch sind, treten nur bei der Analyse der Aktinomyceten auf. Eine Ähnlichkeit von über 90 % wird aber in den meisten Fällen erreicht. Eine Ausnahme bilden zwei Proben des Rekultivierungsbodens der Aktinomyceten, bei denen die Ähnlichkeiten der Parallelproben 90 % unterschreiten.

3.3.3 Sequenzierung ausgewählter 16S rDNA Amplifikate

Willkürlich ausgewählte Banden von den SSCP-Gelen der sechs Modellböden der strukturellen Analyse wurden ausgeschnitten, ihre DNA aus dem Gel isoliert, eluiert und amplifiziert. Nach anschließender Kontrolle der Reamplifikate auf einem SSCP-Gel, um ihre Position zu überprüfen, erfolgte die direkte Sequenzierung des PCR-Produktes. Mit Hilfe eines Datenbankvergleichs mit der NCBI (= National Center for Biotechnology Information)-Datenbank wurde zu jeder 16S rDNA-Sequenzen die am nächsten verwandte Sequenz ermittelt (siehe Tabelle 18 und Tabelle 19, Anhang). Durch multiples Alignment erfolgte die Erstellung eines Bakterien-Stammbaums für jeden Boden, in den zusätzlich bekannte Sequenzen aus der Datenbank integriert wurden.

Tabelle 16: Bezeichnung der ausgeschnittenen und sequenzierten Banden

1. Buchstabe	2. Buchstabe	Nummer
E = Eubakterien	G = Gartenboden	Reihenfolge der sequenzierten Banden auf dem SSCP-Gel
A = Aktinomyceten	W = Waldboden	
N = Stickstofffixierer	R = Rekultivierungsboden	
	A = Aralseeboden	

Die Bezeichnung der ausgeschnittenen und sequenzierten Banden erfolgte nach Tabelle 16.

Fast alle ausgeschnittenen Banden der Eubakterien, Aktinomyceten und stickstofffixierenden Bakterien zeigen nach der Reamplifikation nur eine Bande. In Ausnahmefällen sind auch zwei (Abbildung 21B, Spur 7 und Abbildung 21C, Spur 6) oder drei Banden (Abbildung 21A, Spur 3 und 4) zu sehen. Traten mehrere Banden auf, wurde darauf geachtet, daß auch die in der Position der ursprünglich ausgeschnittenen darunter war. Alle Reamplifikate zeigten auf dem Kontroll-SSCP-Gel eine Bande mit identischem Laufverhalten der ursprünglich ausgeschnittenen Bande. Die Sequenzierung der ausgeschnittenen Banden der einzelnen Systeme war unterschiedlich erfolgreich (siehe Tabelle 17). Der Anteil der sequenzierbaren Banden lag bei den Eubakterien mit nur 17 % deutlich niedriger als bei den stickstofffixierenden Bakterien mit durchschnittlich 58 % und den Aktinomyceten mit durchschnittlich 55 % (siehe Tabelle 17).

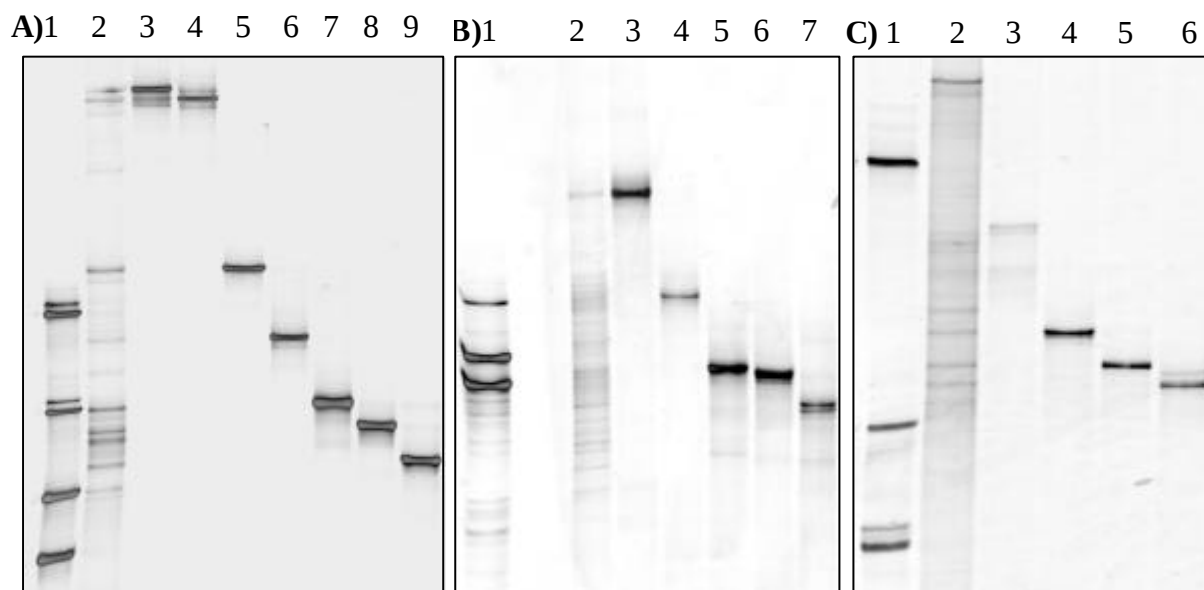


Abbildung 21: Exemplarische SSCP-Gele mit einzelsträngigen Reamplifikaten des 16S rRNA Gens von ausgeschnittenen und eluierten Banden der Eubakterien (A) und der Aktinomyceten (B) sowie des *nifH*-Gens der stickstofffixierenden Bakterien (C); gezeigt ist jeweils der Speziessstandard (1), die Bodenprobe aus der die Banden ausgeschnitten wurden (2) sowie die Reamplifikate (3-9)

Tabelle 17: Sequenzierbarkeit der ausgeschnittenen Banden aus den SSCP-Gelen der 6 Modellböden

System	Boden	Ausgeschnittene Banden	Sequenzierbare Banden	Sequenzierbare Banden (%)	Ø sequenzierbare Banden
Eubakterien	Gartenboden	19	1	5	17 %
	Waldboden	11	1	9	
	Rekultivierungsboden	6	2	33	
	Aralseeböden	40	9	22	
Aktinomyceten	Gartenboden	9	4	44	55 %
	Waldboden	15	7	54	
	Rekultivierungsboden	14	9	64	
	Aralseeböden	30	17	56	
Stickstofffixierer	Gartenboden	6	1	17	58 %
	Waldboden	11	8	73	
	Rekultivierungsboden	12	10	83	
	Aralseeböden	21	12	57	

Aufgrund der schlechten Sequenzierbarkeit der ausgeschnittenen Banden der Eubakterien (siehe Tabelle 17) war nur die Erstellung eines Stammbaums für die Aralseeböden möglich. Von der SSCP-Analyse des Gartenbodens konnte nur für eine Bande die Sequenz ermittelt werden, die zu 98 % mit der 16S rDNA eines Bakteriums übereinstimmt, das aus der Rhizosphäre von *Medicago sativa* (Luzerne) und *Chenopodium album* (weißer Gänsefuß) isoliert wurde (Schwieger & Tebbe 2000). Von dem SSCP-Gel des Waldbodens war ebenfalls nur eine ausgeschnittene Bande sequenzierbar, die zu 99 % dem 16S rRNA Gen eines unkultivierbaren Bakteriums entspricht, dessen Isolation aus einem Torfboden Mikrokosmos erfolgte (Morris *et al.* 2002). Aus den Bandenmustern des Rekultivierungsbodens gelang die Sequenzierung von zwei reamplifizierten Fragmenten. Die Bande ER 1 hat eine Ähnlichkeit von 97 % zu einem β -Proteobakterium, das aus einem Karst Aquifer (Kalkplateau) isoliert wurde. Die Bande ER 2 zeigt eine Ähnlichkeit von 99 % zu der Sequenz, zu der die des Gartenbodens sehr ähnlich war.

Bei dem SSCP-Gel der Eubakterien der Aralseeböden waren von 40 ausgeschnittenen Banden neun (EA 1 – EA 9) erfolgreich sequenzierbar (siehe Abbildung 22). Diese Sequenzen zeigen sowohl Ähnlichkeit zu nicht kultivierbaren und unbekannten als auch zu bekannten Eubakterien, dabei wurden Homologien von 89 bis 99 % erreicht (siehe Tabelle 18, Anhang). EA 4 und EA 7 zeigen die gleiche Position im SSCP-Gel und besitzen eine sehr ähnliche Sequenz.

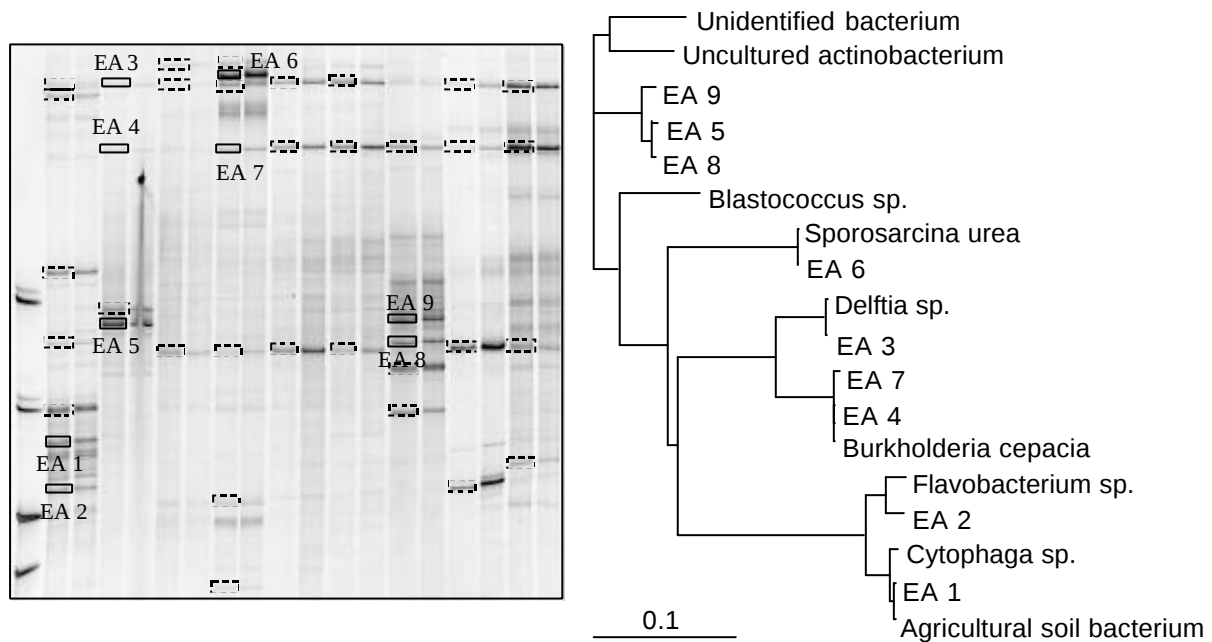


Abbildung 22: SSCP-Gel mit einzelsträngigen Amplifikaten des 16S rRNAGens (407 bp) der Eubakterien aus Bodenproben der Aralseeböden mit markierten ausgeschnittenen Banden (durchgezogene Linie = erfolgreiche Sequenzierung; gestrichelte Linie = erfolglose Sequenzierung); ein phylogenetischer Baum (neighbor joining) basierend auf der V4 und V5 Region der 16S rRNA wurde aus Sequenzen generiert, eng verwandte Sequenzen aus der Datenbank wurden ergänzt, der Balken gibt die relative genetische Distanz von 10 % an, Benennung der Sequenzen: E = Eubakterien, A = Aralseeböden

Die 16S rDNA-Sequenzen EA 5, EA 8 und EA 9 bilden eine Gruppe enger Verwandtschaft und sind einem unkultivierbaren Actinobakterium, das aus Sedimenten des Kontinentalsockels der Antarktis isoliert wurde und einem unidentifizierten Bakterium, welches aus einer australischen Höhle isoliert wurde (Holmes *et al.* 2001), sehr ähnlich. Die Sequenz EA 6 ist nahezu mit *Sporosarcina urea* identisch, einem eng mit *Bacillus* verwandten Bakterium, das im Boden weit verbreitet ist und Harnstoff abbaut (Claus *et al.* 1992). EA 3 zeigt eine hohe Übereinstimmung mit der Gattung *Delftia*, während EA 4 und EA 7 sehr nah mit dem Bakterium *Burkholderia cepacia*, einem häufig vorkommenden Bakterium, das mit Pflanzen assoziiert ist (Balandreau *et al.* 2001), verwandt sind. EA 1 ist fast identisch mit einem „Agricultural soil bacterium“, das aus der Rhizosphärengemeinschaft von Kartoffelpflanzen isoliert wurde und wahrscheinlich der Cytophagagruppe angehört, während EA 2 etwas entfernter mit *Flavobacterium* verwandt ist. *Flavobacterium* gehört zur Familie Cytophagales und ist ein weit verbreitetes Bakterium, das aus Süß- und Salzwasser, Boden und ozeanischen Sedimenten isoliert wurde (Holmes 1992). *Cytophaga* sind die verbreitetsten gleitenden

Bakterien in Gewässern und Böden, die Habitate mit viel organischem Material bevorzugen (Reichenbach 1992).

Alle Sequenzen zeigen starke Ähnlichkeit zu bekannten Eubakterien, die überwiegend im Boden verbreitet sind.

Der Sequenzierungserfolg der ausgeschnittenen Banden der 16S rDNA-Sequenzen der Aktinomyceten war erheblich höher als bei den Eubakterien. Aus diesem Grund standen mehr Sequenzen zur Verfügung, und es konnte zu jedem Modellboden ein Stammbaum erstellt werden. Die Sequenzen zeigten mit Homologien von 93 bis 100 % sowohl enge Verwandtschaft zu unbekannten und unkultivierbaren als auch zu bekannten Bakterien. Der Hauptteil der in den Stammbäumen ergänzten Sequenzen kann eindeutig Aktinomyceten zugeordnet werden. Auf eine eindeutige Zuordnung der nicht-identifizierten oder unbekannten Bakterien zu den Aktinomyceten mußte verzichtet werden. Die Ähnlichkeit der Sequenzen der Aktinomyceten untereinander ist höher als bei den Eubakterien, was an der kleineren Einheit der phylogenetischen Stammbäume zu erkennen ist.

Von den ausgeschnittenen Banden des SSCP-Gels der Aktinomyceten des Gartenbodens waren 4 von 9 sequenzierbar (siehe Abbildung 23). Die Sequenzen AG 1 und AG 2 zeigen sowohl eine identische Position im SSCP-Gel als auch identische Sequenzen, die nah mit einem unidentifizierten Eubakterium, isoliert aus Boden, verwandt sind (Marilley & Aragno 1999). AG 3 und AG 4 bilden ebenfalls eine Gruppe und weisen eine relativ hohe Übereinstimmung zu einem unkultivierbaren Bakterium, das aus der mikrobiellen Gemeinschaft eines heißen, synthetischen Komposts isoliert wurde (Dees & Ghiorse 2001), auf.

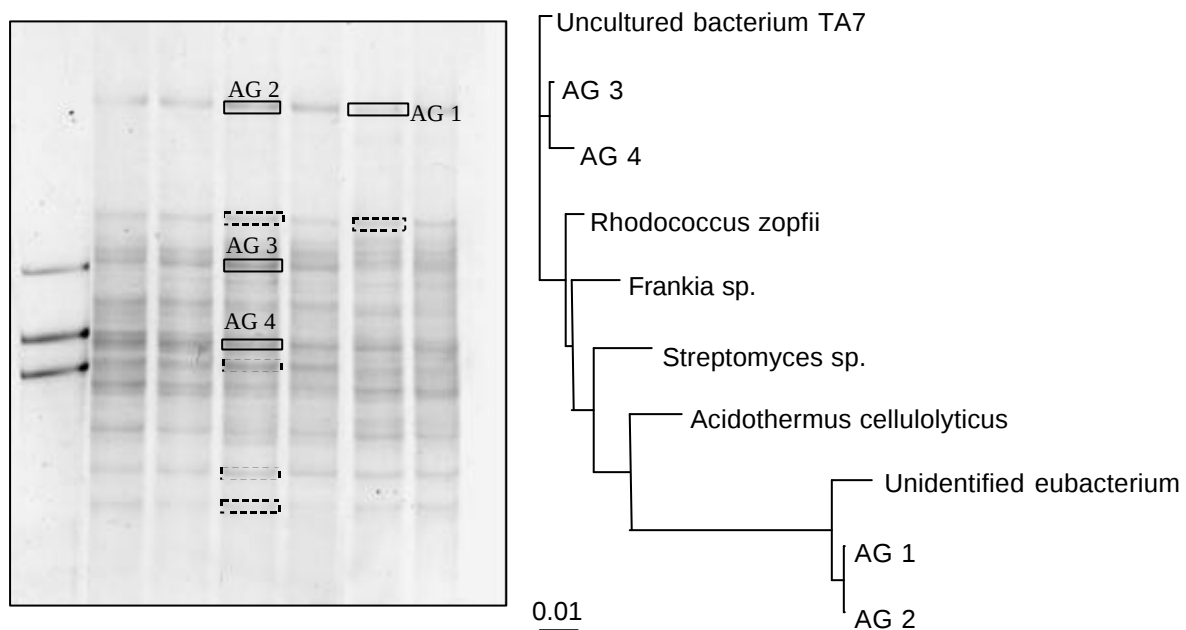


Abbildung 23: SSCP-Gel mit einzelsträngigen Amplifikaten des 16S rRNA Gens (308 bp) der Aktinomyceten aus Bodenproben des Gartenbodens mit markierten ausgeschnittenen Banden (durchgezogene Linie = erfolgreiche Sequenzierung; gestrichelte Linie = erfolglose Sequenzierung); der phylogenetische Baum (neighbor joining) basierend auf der V3 Region der 16S rRNA wurde aus Sequenzen generiert, eng verwandte Sequenzen aus der Datenbank wurden ergänzt, der Balken gibt die relative genetische Distanz von 1 % an, Benennung der Sequenzen: A = Aktinomyceten, G = Gartenboden

Im Waldboden waren 7 von 15 Fragmenten sequenzierbar (siehe Abbildung 24). Von den Banden, die im SSCP-Gel die gleiche Position zeigen, haben AW 2 und AW 7 auch die gleiche Sequenz, bei AW 1 und AW 5 unterscheiden sich die Sequenzen allerdings. Weiterhin fällt auf, daß die Sequenz von AW 4 mit AW 2 identisch ist, obwohl sie aus unterschiedlichen Banden einer Probe stammen. Alle Sequenzen sind relativ eng verwandt mit den Aktinomyceten *Acidothermus cellulolyticus*, das ursprünglich aus sauren heißen Quellen im Yellowstone National Park isoliert wurde und zu den Zellulose abbauenden Bakterien gehört (Coughlan & Mayer 1991), *Streptomyces sp.* einem außerordentlich häufigen Bodenbakterium (Gisi *et al.* 1997) und *Frankia sp.*, das die Fähigkeit zur Stickstofffixierung in einer Symbiose mit Nichtleguminosen besitzt (Gisi *et al.* 1997).

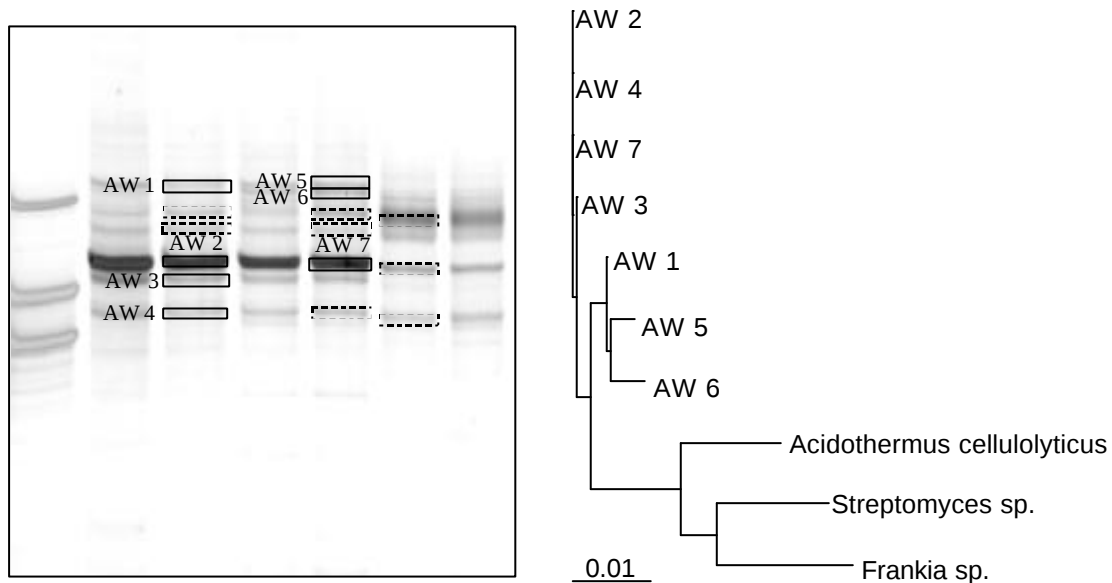


Abbildung 24: SSCP-Gel mit einzelsträngigen Amplifikaten des 16S rRNA Gens (308 bp) der Aktinomyceten aus Bodenproben des Waldbodens mit markierten ausgeschnittenen Banden (durchgezogene Linie = erfolgreiche Sequenzierung; gestrichelte Linie = erfolglose Sequenzierung); der phylogenetische Baum (neighbor joining) basierend auf der V3 Region der 16S rRNA wurde aus Sequenzen generiert, eng verwandte Sequenzen aus der Datenbank wurden ergänzt, der Balken gibt die relative genetische Distanz von 1 % an, Benennung der Sequenzen: A = Aktinomyceten, W = Waldboden

Von den ausgeschnittenen Banden der SSCP-Analyse des Rekultivierungsbodens waren 9 von 14 PCR-Produkten sequenzierbar (siehe Abbildung 25). Die Banden, die im Gel die gleiche Position zeigen, besitzen fast identische Sequenzen (AR 2, AR 4, AR 5, AR 8 und AR 1, AR 3, AR 6). AR 7 bildet zusammen mit den Gattungen der Aktinomyceten *Frankia* und *Blastococcus*, das im Bottnischen Meer zwischen Schweden und Finnland vorkommt (Akkermans *et al.* 1992) und *Geodermatophilus*, das von verwitterten Steinen im mediterranen Becken isoliert wurde (Urzi *et al.* 2001), eine Gruppe im Stammbaum, während AR 9 eine hohe Ähnlichkeit zu der Sequenz eines Bakteriums zeigt, das aus Regenwurmauswurf isoliert wurde (Furlong *et al.* 2002). Die drei Sequenzen AR 1, AR 3 und AR 6 sind relativ eng mit denen eines unkultivierbaren Bakteriums, isoliert aus dem Boden eines italienischen Reisfeldes, verwandt (Ludemann & Conrad 2000). AR 2, AR 4, AR 5 und AR 8 zeigen relativ hohe Ähnlichkeit zu der Sequenz eines Vertreters der Gattung *Streptomyces*.

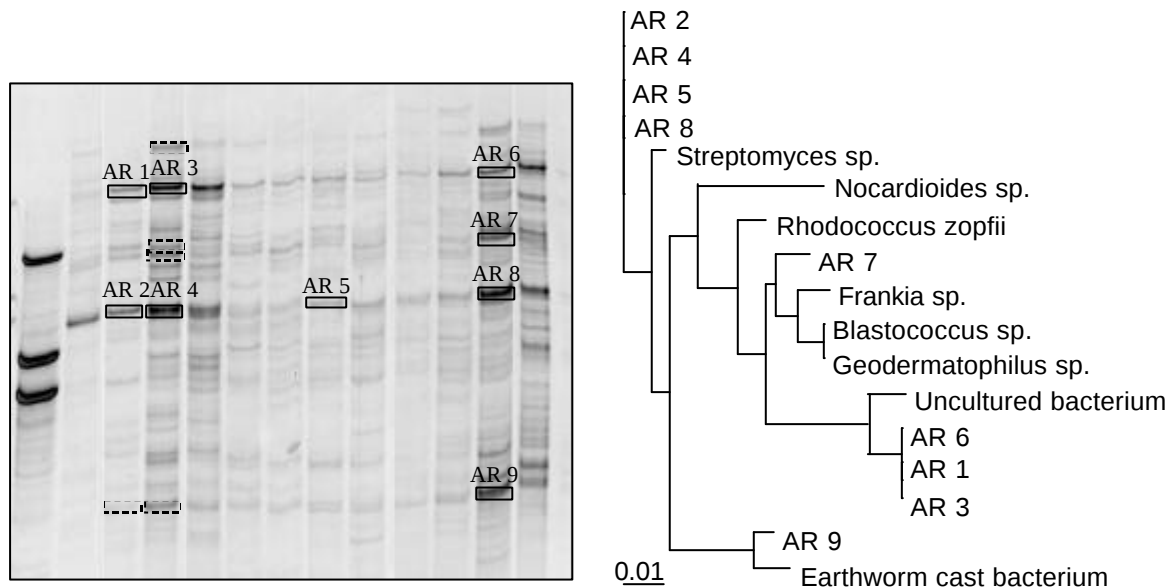


Abbildung 25: SSCP-Gel mit einzelsträngigen Amplifikaten des 16S rRNA Gens (308 bp) der Aktinomyceten aus Bodenproben des Rekultivierungsbodens mit markierten ausgeschnittenen Banden (durchgezogene Linie = erfolgreiche Sequenzierung; gestrichelte Linie = erfolglose Sequenzierung); der phylogenetische Baum (neighbor joining) basierend auf der V3 Region der 16S rRNA wurde aus Sequenzen generiert, eng verwandte Sequenzen aus der Datenbank wurden ergänzt, der Balken gibt die relative genetische Distanz von 1 % an, Benennung der Sequenzen: A = Aktinomyceten, R = Rekultivierungsboden

Bei den Aralseeböden waren 17 von 30 Banden sequenzierbar (siehe Abbildung 26). Die Sequenzen bilden 3 Gruppen. AA 8, AA 9, AA 11 und AA 12 besitzen fast identische Sequenzen und sind im SSCP-Gel durch die gleiche Position gekennzeichnet. AA 1, AA 2, AA 3, AA 15 und AA 16 weisen im SSCP Gel unterschiedliches Laufverhalten auf, bestehen aber aus sehr ähnlichen Sequenzen. AA 5, AA 14 und AA 17 zeigen im Gel die gleiche Lage, allerdings sind nur die Sequenzen von AA 14 und AA 15 identisch, die von AA 5 unterscheidet sich geringfügig von den anderen beiden.

AA 7 ist zu der Sequenz von *Rhodococcus rhodochrous*, einem sehr weit verbreiteten Bakterium, das zur Familie der Nocardiaceae gehört, die ebenfalls zu den Aktinomyceten zählt (Goodfellow 1992), und zu der Sequenz eines unkultivierbaren Bakterium TA7, das aus heißem synthetischen Kompost isoliert wurde (Dees & Ghiorse 2001), verwandt. Die Sequenz von AA 13 ist zu der eines unkultivierbaren Bodenbakteriums und die Sequenz von AA 10 mit der eines Bakteriums der Gattung *Nocardioide*, ebenfalls zugehörig zu den Aktinomyceten, sehr ähnlich. AA 6 zeigt

enge Verwandtschaft mit der Sequenz eines unkultivierbaren Bakteriums, das aus aridem australischen Boden isoliert wurde (Holmes *et al.* 2000) und AA 4 bildet mit der Gruppe AA 5, AA 14 und AA 17 ein Gruppe hoher Ähnlichkeit.

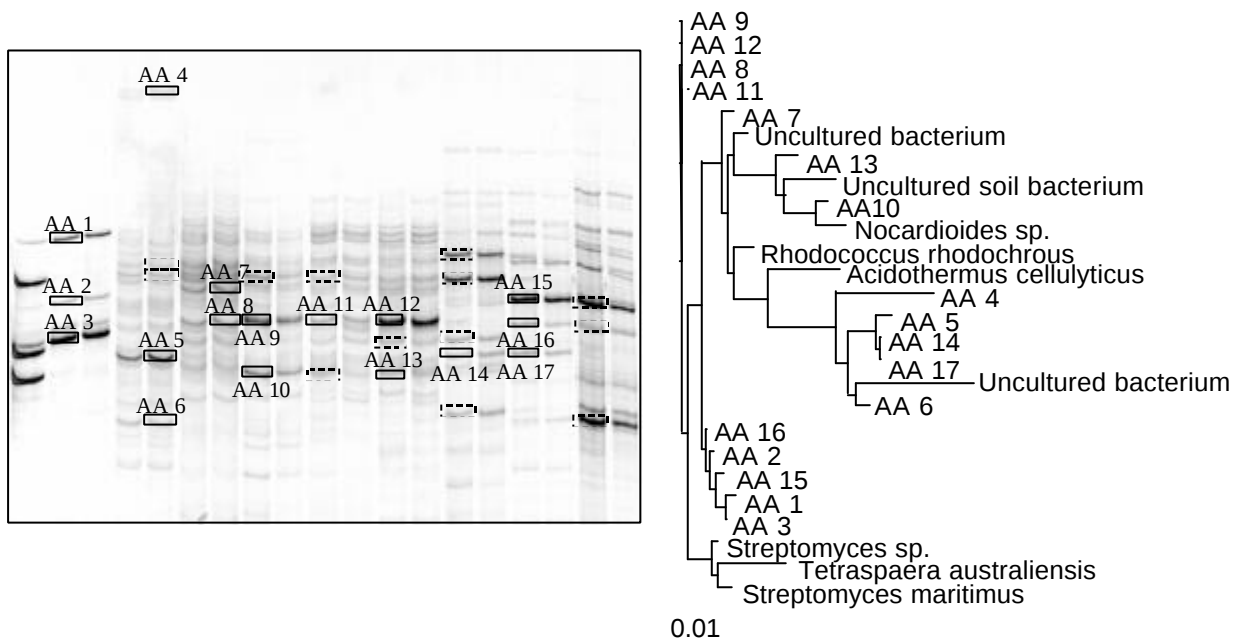


Abbildung 26: SSCP-Gel mit einzelsträngigen Amplifikaten des 16S rRNA Gens (308 bp) der Aktinomyceten aus Bodenproben der Aralseeböden mit markierten ausgeschnittenen Banden (durchgezogene Linie = erfolgreiche Sequenzierung; gestrichelte Linie = erfolglose Sequenzierung); der phylogenetische Baum (neighbor joining) basierend auf der V3 Region der 16S rRNA wurde aus Sequenzen generiert, eng verwandte Sequenzen aus der Datenbank wurden ergänzt, der Balken gibt die relative genetische Distanz von 1 % an, Benennung der Sequenzen: A = Aktinomyceten, A = Aralseeböden

Zusammenfassend läßt sich aus diesen strukturellen Untersuchungen festhalten, daß die Sequenzierung einzelner Banden der SSCP-Gele prinzipiell möglich, im System der Aktinomyceten im Gegensatz zu dem der Eubakterien aber erfolgreicher ist. Fragmente, die auf dem SSCP-Gel die gleiche Position zeigen, besitzen in den meisten Fällen identische oder fast identische Sequenzen. Im Waldboden wurden zwei Banden der gleichen Sequenz in dem Bandenmuster einer Probe detektiert, die allerdings ein unterschiedliches Laufverhalten im Gel aufwiesen. Die sequenzierten Banden sind sowohl mit unkultivierbaren als auch mit kultivierbaren Bakterien verwandt. Dabei gehören die eng verwandten Bakterien auch jeweils zu der Bakteriengruppe, die untersucht werden sollte, d.h. die Sequenzen der Eubakterien gehören ausschließlich zu

dieser Bakteriengruppe, das gleiche gilt für die Analyse der Aktinomyceten. Bei den Datenbankvergleichen wurden relativ hohe Homologieraten von 89-100 % (siehe Tabelle 18 und Tabelle 19, Anhang) erreicht. Verwandte Bakterien, die in den Stammbäumen ergänzt wurden, sind überwiegend als Bodenbakterien, vereinzelt auch als aquatische Mikroorganismen beschrieben worden. Bei den Sequenzen der Aktinomyceten fällt auf, daß sie insgesamt eine stärkere Ähnlichkeit untereinander aufweisen als die Sequenzen der Eubakterien.

3.3.4 Funktionelle Analyse am Beispiel des *nifH* Gens

In einem funktionellen Ansatz wurde die Diversität der stickstofffixierenden Bakterien anhand des *nifH*-Gens mit der PCR-SSCP in den sechs Modellböden untersucht.

Das SSCP-Gel des Gartenbodens der Stickstofffixierer zeigt viele, meist schwache Banden, die in den Hintergrund übergehen (siehe Abbildung 27). Die Parallelproben sind zu 100 % identisch. Die Muster der unterschiedlichen Bodenproben unterscheiden sich mit einer Ähnlichkeit von 28-48 % relativ stark.

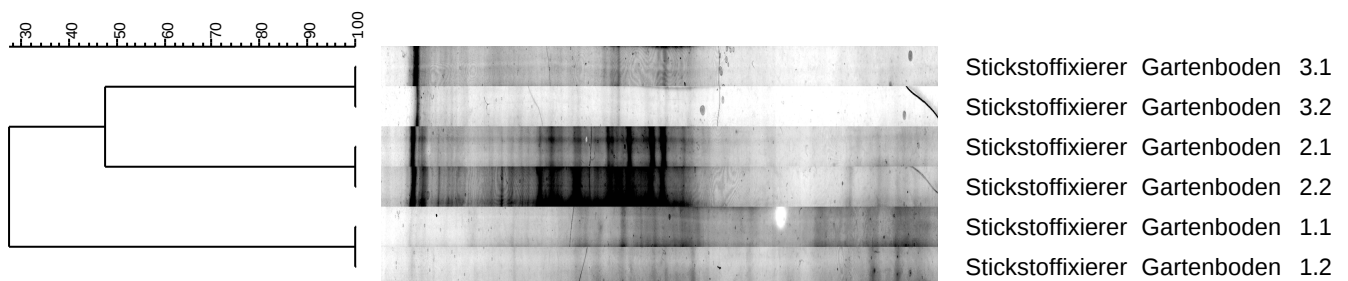


Abbildung 27: SSCP-Gel mit einzelsträngigen Amplifikaten des *nifH* Gens (370 bp) der Stickstofffixierer aus jeweils 2 parallelen Bodenproben des Gartenbodens; die genetische Ähnlichkeit der Bandenmuster des SSCP-Gels wird durch ein UPGMA Dendrogramm (Dice Koeffizient der Ähnlichkeit) gezeigt

Der Waldboden liefert ein SSCP-Gel der Stickstofffixierer, das dagegen aus einer vergleichsweise niedrigen Anzahl von Banden besteht, die sich deutlich gegen den Hintergrund abgrenzen und in dieser Hinsicht dem SSCP-Gel der Aktinomyceten entsprechen (siehe Abbildung 28). Die Parallelproben der Probe 2 stimmen nur zu 86 %

überein, da bei der Probe 2.1 im oberen Teil des SSCP-Gels eine Bande auftritt (siehe Pfeil in Abbildung 28), die in Probe 2.2 fehlt. Die Proben 1 und 2 zeigen mit einer Übereinstimmung von 84 % ein relativ ähnliches Bandenmuster, während sich die Probe 3 mit nur 30 % Übereinstimmung sehr stark von den anderen unterscheidet.

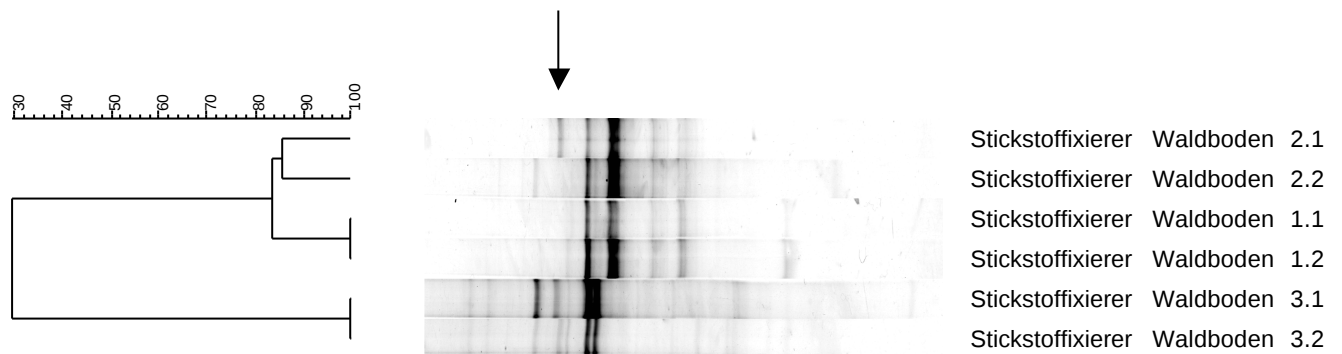


Abbildung 28: SSCP-Gel mit einzelsträngigen Amplifikaten des *nifH* Gens (370 bp) der Stickstofffixierer aus jeweils 2 parallelen Bodenproben des Waldbodens; die genetische Ähnlichkeit der Bandenmuster des SSCP-Gels wird durch ein UPGMA Dendrogramm (Dice Koeffizient der Ähnlichkeit) gezeigt, der Pfeil markiert eine Bande, die nur in einer Parallelprobe auftritt

Die SSCP-Gele der Stickstofffixierer des Rekultivierungs- und der Aralseeböden zeigen Muster, die aus einigen Banden schwacher Intensität bestehen, die in den Hintergrund übergehen und aus einigen Banden mit starker Intensität, die sich klar gegenüber dem Hintergrund abgrenzen (siehe Abbildung 29 und Abbildung 30). Beim Rekultivierungsboden sind die Parallelproben der Probe 2 mit weniger als 90 % Übereinstimmung als einzige nicht identisch. Die Bodenproben unterscheiden sich relativ stark voneinander, da sich aus der SSCP-Analyse nur eine Ähnlichkeit von 36-56 % zwischen den verschiedenen Bodenproben ergibt.

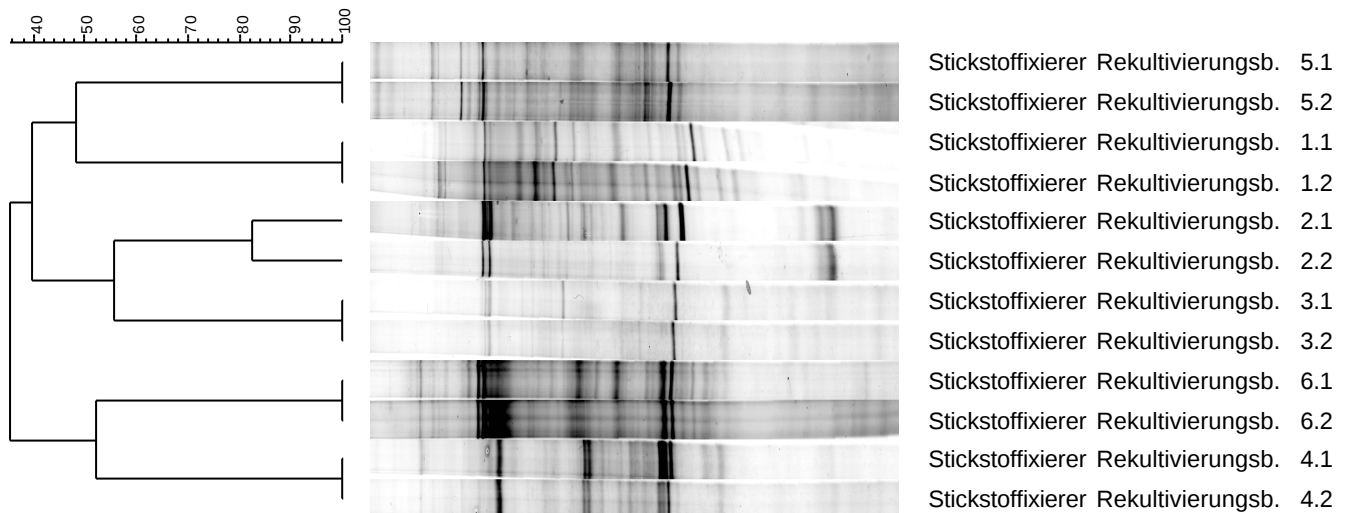


Abbildung 29: SSCP-Gel mit einzelsträngigen Amplifikaten des *nifH* Gens (370 bp) der Stickstofffixierer aus jeweils 2 parallelen Bodenproben des Rekultivierungsbodens; die genetische Ähnlichkeit der Bandenmuster des SSCP-Gels wird durch ein UPGMA Dendrogramm (Dice Koeffizient der Ähnlichkeit) gezeigt

Die Ähnlichkeiten der Parallelproben des SSCP-Gels der Stickstofffixierer der Aralseeböden zeigen in keinem Fall 100 %-ige Übereinstimmung (siehe Abbildung 30). Die Bandenmuster der Bodenproben 4 und 9 zeigen eine Übereinstimmung von über 90 %, die der restlichen Proben unterschreiten 90 %. Die Proben 5 und 7 waren in der PCR nicht amplifizierbar und fehlen aus diesem Grund auf diesem SSCP-Gel.

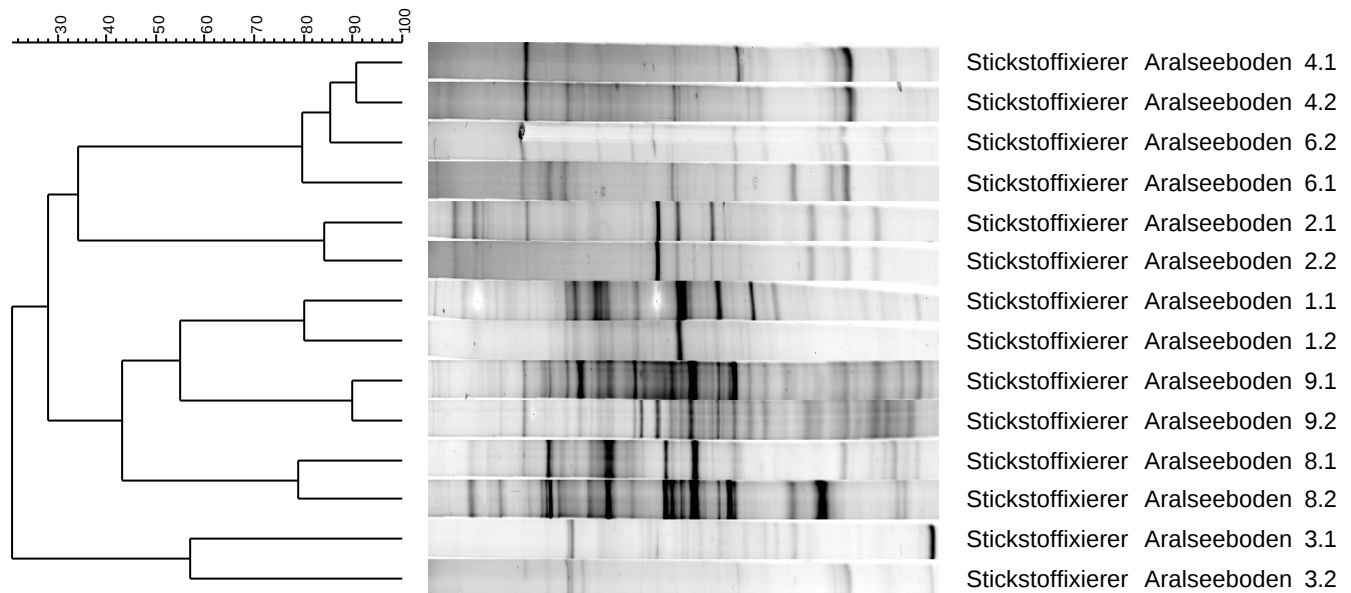


Abbildung 30: SSCP-Gel mit einzelsträngigen Amplifikaten des *nifH* Gens (370 bp) der Stickstofffixierer aus jeweils 2 parallelen Bodenproben der Aralseeböden; die genetische Ähnlichkeit der Bandenmuster des SSCP-Gels wird durch ein UPGMA Dendrogramm (Dice Koeffizient der Ähnlichkeit) gezeigt

Die Bandenmuster der Bodenproben der sechs Modellböden, deren Parallelproben eine Ähnlichkeit von mehr als 90 % zeigen, wurden wiederum miteinander verglichen und weisen mit einer Ähnlichkeit von nur 17-58 % eine relativ hohe Diversität auf (siehe Abbildung 31). Auch die Muster der entsprechenden Proben eines jeden Modellbodens sind so unterschiedlich, daß sich anhand der Ähnlichkeit der Bandenmuster nicht die Zugehörigkeit der Proben zu einem Boden widerspiegelt.

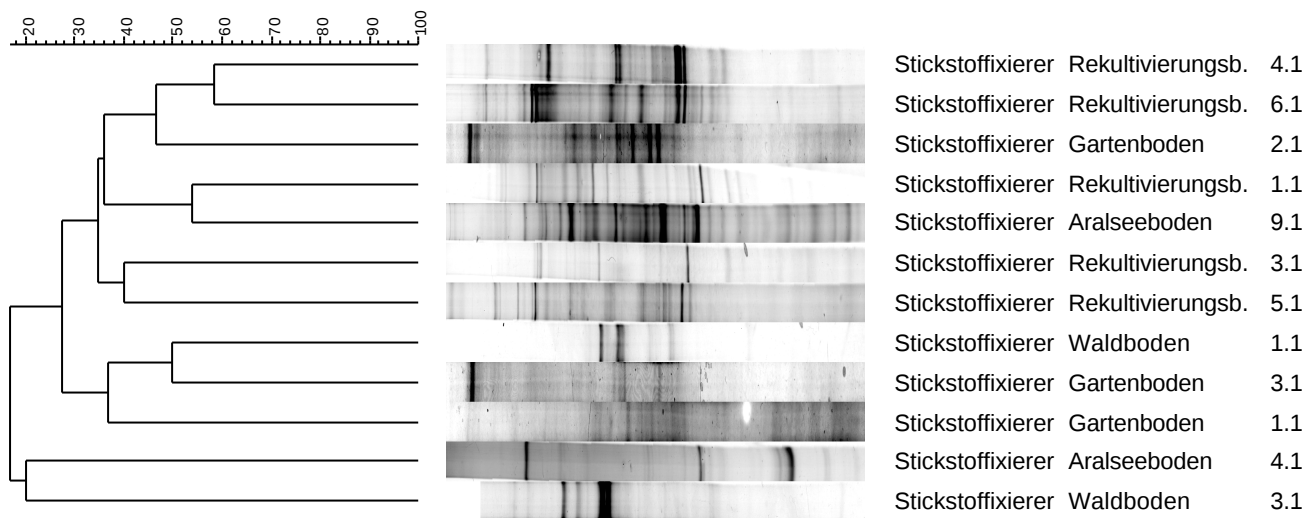


Abbildung 31: SSCP-Gel mit einzelsträngigen Amplifikaten des *nifH* Gens (370 bp) der Stickstofffixierer aus den sechs Modellböden (Wald-, Garten-, Rekultivierungs- und Aralseeböden); die genetische Ähnlichkeit der Bandenmuster des SSCP-Gels wird durch ein UPGMA Dendrogramm (Dice Koeffizient der Ähnlichkeit) gezeigt

Während die Banden der Muster des Gartenbodens in den Hintergrund übergehen, erscheinen die des Waldbodens deutlich abgegrenzt. Der Rekultivierungs- und die Aralseeböden stellen eine Mischung aus diesen Extremen dar. Insgesamt fällt auf, daß die Bandenmuster der SSCP der funktionellen Analyse etwas weniger Banden zeigen als die der strukturellen (siehe Tabelle 15).

Nur beim Gartenboden sind alle parallelen Bodenproben identisch. Sowohl im Wald- als auch im Rekultivierungsboden bildet jeweils eine Bodenprobe mit Übereinstimmung von weniger als 90 % die Ausnahme. Bei den Aralseeböden zeigt dagegen keine der Parallelproben 100 %-ige Übereinstimmung. Zwei Parallelproben zeigen Ähnlichkeiten von über 90 %, fünf liegen darunter. Damit weisen die Parallelproben der funktionellen Analyse eine schlechtere Übereinstimmung als bei der strukturellen Analyse auf.

3.3.5 Ergebnisse der Sequenzierung des *nifH*-Gens

Auch bei der funktionellen Analyse der stickstofffixierenden Bakterien wurden die Sequenzen der ausgeschnittenen Banden erfolgreich einem Datenbankvergleich unterzogen (siehe Tabelle 20, Anhang). Sie zeigten ausschließlich Verwandtschaft zu

nifH Sequenzen von stickstofffixierenden Bakterien, wobei Homologien von 80 bis 98 % erreicht wurden. Die Sequenzen zeigen sowohl Ähnlichkeiten zu unkultivierten als auch zu bekannten kultivierbaren Bakterien. Mit Hilfe von eng verwandten Sequenzen aus der Datenbank erfolgte die Erstellung von Stammbäumen für jeden Boden.

Von den sechs ausgeschnittenen Banden der stickstofffixierenden Bakterien der Gartenerde war nur eine sequenzierbar. Im Datenbankvergleich zeigte ihre Sequenz 95 % Homologie zu einem unkultivierbaren stickstofffixierenden Bakterium B3, das aus dem Boden eines Tannenwaldes in den Bergen des Staates Oregon der Vereinigten Staaten isoliert wurde (Widmer *et al.* 1999).

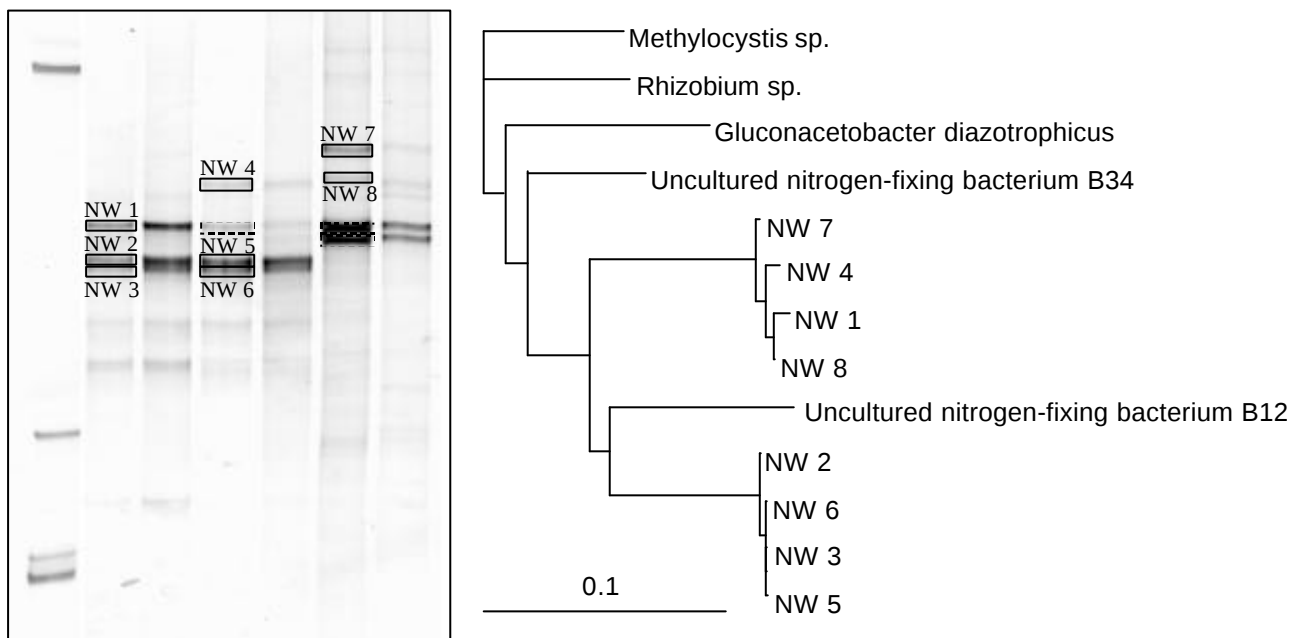


Abbildung 32: SSCP-Gel mit einzelsträngigen Amplifikaten des *nifH* Gens (370 bp) der Stickstofffixierer aus Bodenproben des Waldbodens mit markierten ausgeschnittenen Banden (durchgezogene Linie = erfolgreiche Sequenzierung; gestrichelte Linie = erfolglose Sequenzierung); der phylogenetische Baum (neighbor joining) basierend auf dem *nifH* Gen wurde aus Sequenzen generiert, eng verwandte Sequenzen aus der Datenbank wurden ergänzt, der Balken gibt die relative genetische Distanz von 10 % an, Benennung der Sequenzen: N = Stickstofffixierer, W = Waldboden

Von den Banden der stickstofffixierenden Bakterien des Waldbodens waren 8 von 11 sequenzierbar (siehe Abbildung 32). Die Sequenzen bilden zwei deutlich voneinander abgegrenzte Gruppen enger Verwandtschaft. Banden mit gleicher Position auf dem SSCP-Gel zeigen im Fall von NW 3 und NW 6 eine identische, NW 2 und NW 5

dagegen eine leicht unterschiedliche Sequenz. Beide Gruppen weisen die höchste Ähnlichkeit zu den unkultivierbaren stickstofffixierenden Bakterien B12 und B34 aus einem Tannenwaldboden in Oregon (Widmer *et al.* 1999) auf.

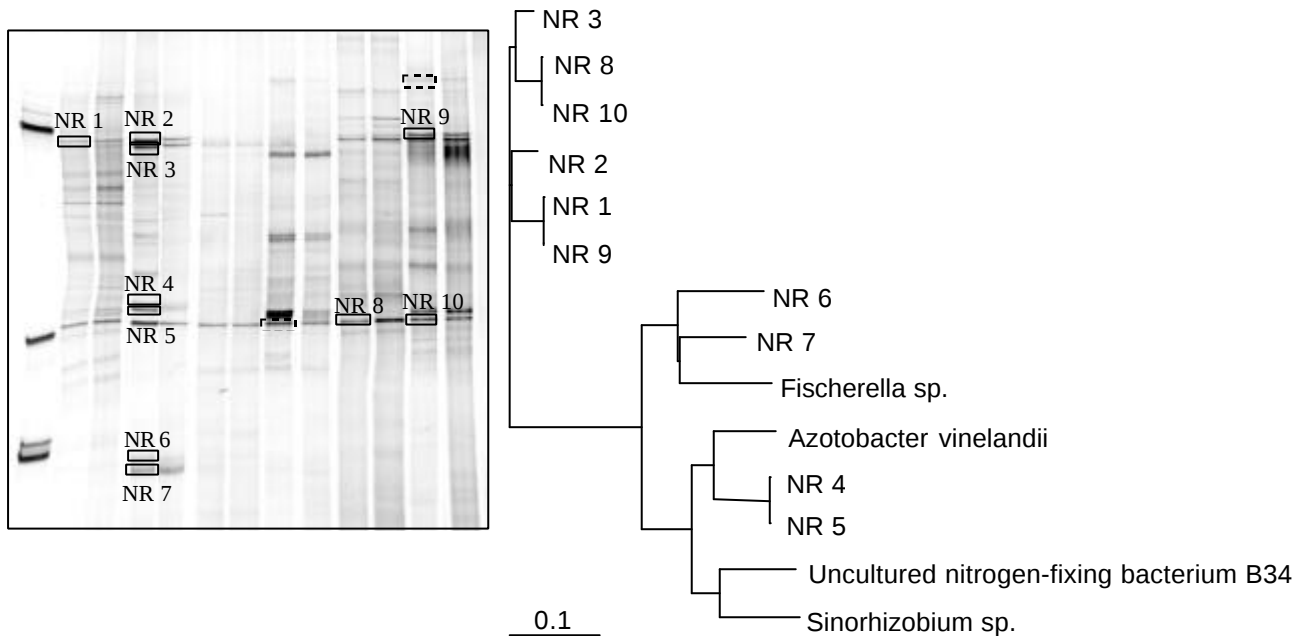


Abbildung 33: SSCP-Gel mit einzelsträngigen Amplifikaten des *nifH* Gens (370 bp) der Stickstofffixierer aus Bodenproben des Rekultivierungsbodens mit markierten ausgeschnittenen Banden (durchgezogene Linie = erfolgreiche Sequenzierung; gestrichelte Linie = erfolglose Sequenzierung); der phylogenetische Baum (neighbor joining) basierend auf dem *nifH* Gen wurde aus Sequenzen generiert, eng verwandte Sequenzen aus der Datenbank wurden ergänzt, der Balken gibt die relative genetische Distanz von 10 % an, Benennung der Sequenzen: N = Stickstofffixierer, R = Rekultivierungsboden

10 von 12 Banden der stickstofffixierenden Bakterien des Rekultivierungsbodens ließen sich sequenzieren (siehe Abbildung 33). NR 8 und NR 10 zeigen sowohl identische Positionen auf dem SSCP-Gel als auch identische Sequenzen. Bei den Banden NR 1, NR 2 und NR 9, die ebenfalls gleiche Positionen auf dem SSCP-Gel aufweisen, sind sich die Sequenzen von NR 1 und NR 9 sehr ähnlich. NR 2 zeigt dagegen einen deutlichen Unterschied. Die Sequenzen NR 4 und NR 5 sind identisch, stammen aber von unterschiedlichen Banden aus einer Spur.

Die Sequenzen NR 1, NR 2, NR 3, NR 8, NR 9 und NR 10 bilden zusammen eine Gruppe, die keine enge Verwandtschaft mit bekannten *nifH* Sequenzen aufweist. NR 6 und NR 7 bilden mit der *nifH* Sequenz von *Fischerella*, einem thermophilen

Cyanobacterium, eine Gruppe. NR 4 und NR 5 sind eng mit *Azotobacter vinelandii*, einem typischen freilebenden stickstofffixierenden Bodenbakterium, verwandt.

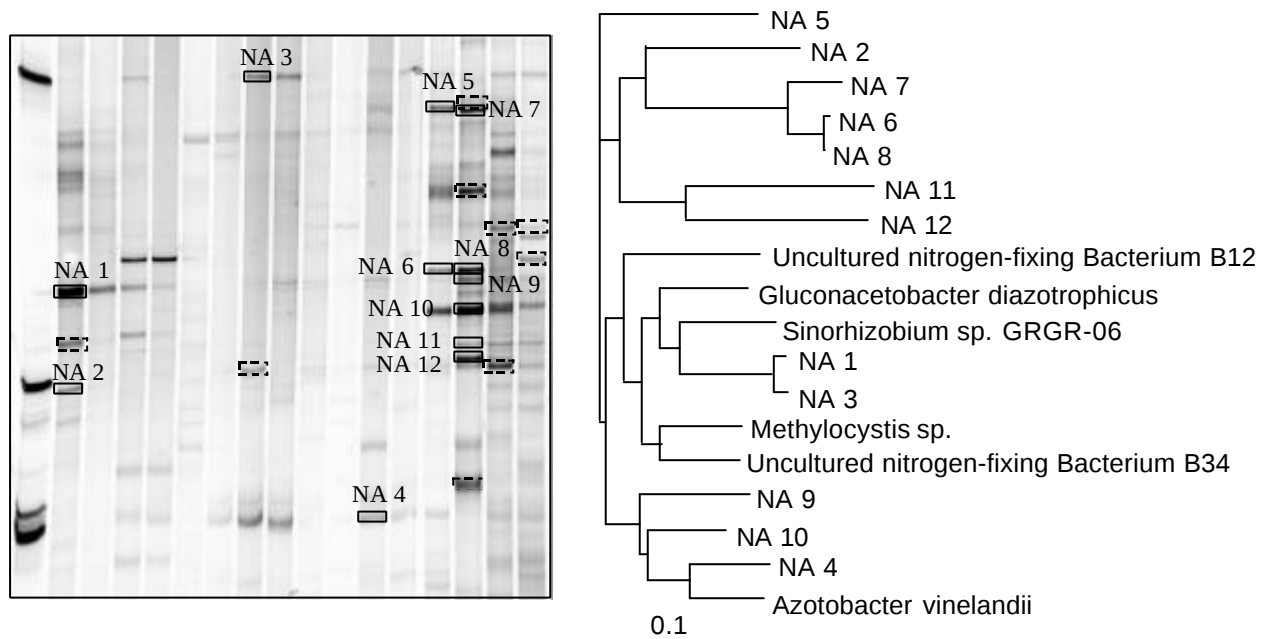


Abbildung 34: SSCP-Gel mit einzelsträngigen Amplifikaten des *nifH* Gens (370bp) der Stickstofffixierer aus Bodenproben der Aralseeböden mit markierten ausgeschnittenen Banden (durchgezogene Linie = erfolgreiche Sequenzierung; gestrichelte Linie = erfolglose Sequenzierung); der phylogenetische Baum (neighbor joining) basierend auf dem *nifH* Gen wurde aus Sequenzen generiert, eng verwandte Sequenzen aus der Datenbank wurden ergänzt, der Balken gibt die relative genetische Distanz von 10 % an, Benennung der Sequenzen: N = Stickstofffixierer, A = Aralseeböden

Von den Banden der stickstofffixierenden Bakterien der Aralseeböden waren 12 von 21 sequenzierbar (siehe Abbildung 34). Die Banden NA 6 und NA 8 zeigen auf dem SSCP-Gel die gleiche Position, die Sequenzen sind sich ebenfalls sehr ähnlich, aber nicht identisch. Die Sequenzen NA 1 und NA 3 sind eng mit der *nifH* Sequenz von *Sinorhizobium* sp. GR-06, einem Bodenbakterium, das in Symbiose mit *Phaseolus vulgaris* Stickstoff fixieren kann (Laguerre *et al.* 2001), und der von *Gluconacetobacter diazotrophicus*, einem Endophyten der Zuckerrohrpflanze (Sevilla *et al.* 1998), verwandt. NA 4, NA 9 und NA 10 bilden mit *Azotobacter vinelandii* eine Gruppe. Die Sequenzen NA 2, NA 5, NA 6, NA 7, NA 8, NA 11 und NA 12 bilden zusammen eine Gruppe, die keine engere Verwandtschaft mit einem bekannten Bakterium aufweist.

Wie bei der strukturellen Analyse zeigt sich auch bei der funktionellen Analyse, daß eine Sequenzierung einzelner Banden der SSCP-Gele möglich ist. Die Fragmente gleicher Position auf dem SSCP-Gel besitzen identische bzw. in einigen Fällen fast identische Sequenzen. Die Sequenzierbarkeit von durchschnittlich 58 % liegt im Bereich derjenigen der Aktinomyceten und ist damit wesentlich erfolgreicher als bei den Eubakterien. Im Datenbankvergleich sind alle Sequenzen zu *nifH*-Sequenzen anderer stickstofffixierender Bodenbakterien ähnlich. Die Sequenzen beider Systeme zeigen sowohl Ähnlichkeit zu unkultivierbaren als auch zu bekannten kultivierbaren Bakterien. Bei der strukturellen Analyse werden allerdings höhere Homologien erreicht als bei der funktionellen Analyse. Bei der fällt allerdings auf, daß in den phylogenetischen Stammbäumen Gruppen auftreten, die keine hohe Ähnlichkeit mit bekannten Sequenzen aufweisen.

4 Diskussion

Die Diskussion gliedert sich in zwei Teile. Im ersten wird auf die Methode der SSCP eingegangen, während im zweiten Teil die Ergebnisse der strukturellen und funktionellen Untersuchungen der Modellböden einschließlich der DNA-Sequenzanalyse diskutiert werden.

4.1 Methodendiskussion der SSCP

Die PCR-SSCP ist eine relativ neue Methode, mit der die Diversität bakterieller Gemeinschaften untersucht werden kann (Lee et al. 1996). Weiterentwickelt nach Schwieger & Tebbe (1998) bietet sie gegenüber der sehr ähnlichen Methode der DGGE den Vorteil, daß durch direktes Auftragen einzelsträngiger DNA die Heteroduplexbildung, die durch die Bindung („Reannealing“) von komplementären Einzelsträngen unterschiedlicher Organismen entsteht, ausgeschlossen werden kann. Diese Methode wurde in der vorliegenden Arbeit übernommen, um zum einen die strukturelle Diversität der Eubakterien und Aktinomyceten zu untersuchen und zum anderen am Beispiel des *nifH* Gens aus stickstofffixierenden Bakterien die funktionelle PCR-SSCP erstmalig zu etablieren.

Bevor mit diesen drei Ansätzen Modellböden untersucht wurden, erfolgte die DNA-Isolierung aus dem Boden sowie die Optimierung der PCR und der SSCP.

4.1.1 DNA-Isolierung

Bei der DNA-Isolierung aus Boden ist die Wahl der DNA-Extraktions-Methode entscheidend, da sie die nachfolgenden Untersuchungen beeinflusst. Dies hängt unter anderem damit zusammen, daß nicht alle Bakterienzellen gleich gut lysiert werden (Amann *et al.* 1994). In dieser Arbeit wurde die Gesamt-DNA aus Boden mit einer direkten Extraktionsmethode (Ogram *et al.* 1988) gewonnen, d.h. die Zellen werden direkt im Boden physikalisch zerstört und anschließend deren DNA extrahiert. Diese Methode bietet den Vorteil, daß relativ große Mengen an DNA isoliert werden können. Allerdings stammt die extrahierte DNA nicht ausschließlich von Bakterien (Steffan *et*

al. 1988, Porteus *et al.* 1997). Weiterhin erfordert sie anschließend die Abtrennung der Huminstoffe aus dem Boden, da diese die nachfolgende PCR-Reaktion stören würden. Es gelang in dieser Arbeit aus allen verwendeten Böden Gesamt-DNA zu isolieren, jedoch waren die Ausbeuten zum Teil auch bei den Bodenproben eines Bodens sehr verschieden. Dies könnte an unterschiedlichen DNA-Gehalten im Boden liegen oder daran, daß es keine ideale DNA-Isolierungsmethode für alle Mikroorganismen und alle Bodentypen gibt (Chandler *et al.* 1997). Möglicherweise stammen die verschiedenen Bodenproben aus inhomogenen Teilen des Bodens, so daß die gleiche DNA-Extraktionsmethode nicht bei allen Proben in der gleichen Ausbeute resultiert. Die Notwendigkeit der Wahl von unterschiedlichen DNA-Extraktionen für verschiedene Böden beweist der zusätzliche Reinigungsschritt, den der hohe Huminstoffgehalt des Waldbodens erforderlich machte. Aus einigen Bodenproben konnte nur so wenig DNA isoliert werden, daß sie nicht mehr durch Ethidiumbromidfärbung nachweisbar war. Damit muß die isolierte Menge deutlich unter 5 ng liegen, da weniger als 5 ng DNA pro Bande mit Ethidiumbromid detektierbar sind (Ibelgaufs 1993). Die niedrigen Ausbeuten der DNA-Isolierungen aus Boden stellten jedoch für den weiteren Versuchsverlauf kein Hindernis dar, da für die sehr sensitive Methode der PCR prinzipiell eine DNA-Matrize zur Amplifikation ausreichend ist.

4.1.2 PCR

Die PCR zeigt bei der Amplifikation von bakteriellen Gemeinschaften aus der Umwelt Probleme, wie z.B. die Inhibierung der PCR-Reaktion durch Kontaminationen sowie die Bildung von Artefakten, d.h. von künstlich erzeugten Fragmenten. Die Amplifikation von DNA aus bakteriellen Reinkulturen ist dagegen weniger problematisch (Von Wintzingerode *et al.* 1997).

Kontaminationen können durch die Isolierung der Template-DNA aus Boden eingebracht werden. Dabei stören Huminsäuren und Tonminerale besonders, da sie die DNA Amplifikation in der PCR inhibieren (Griffiths *et al.* 2000, Porteous *et al.* 1997). Huminsäuren maskieren die DNA (Steffan *et al.* 1988), so daß sie in der PCR nicht mehr vermehrt werden kann (Porteous *et al.* 1997).

Die Gefahr des Auftretens von PCR-Artefakten besteht bei allen Analysen komplexer mikrobieller Gemeinschaften die PCR verwenden (Von Wintzingerode *et al.* 1997). Bisher wurden drei unterschiedliche Typen von Artefakten beschrieben, Chimere Moleküle, Deletionsmutationen und Punktmutationen (Von Wintzingerode *et al.* 1997). Chimere Moleküle sind aus Teilen zweier Sequenzen zusammengesetzt und entstehen durch *in vitro* Rekombination homologer DNA. Deletionsmutationen können auftreten, wenn die Template-DNA stabile Sekundärstrukturen ausbildet. Das Auftreten von Punktmutationen wird durch den Einbau falscher Nukleotide verursacht. Die Fehlerrate der Taq-Polymerase liegt bei 3×10^{-3} bis 2×10^{-4} , abhängig von den verwendeten Reaktionsbedingungen (Von Wintzingerode *et al.* 1997). Aufgrund der relativ geringen Größe der in dieser Arbeit erzeugten PCR-Produkte, dürfte nach dieser Angabe maximal eine Punktmutation pro PCR-Fragment auftreten und der Fehler deshalb zu vernachlässigen sein. Bei zwei hintereinander geschalteten PCR-Reaktionen steigt allerdings die Gefahr der Anreicherung solcher Fehler (Von Wintzingerode *et al.* 1997). Durch die Verwendung einer „proof reading“-Polymerase könnte die Fehlerrate verringert werden.

Obwohl das Phänomen der PCR-induzierten Mutationen gut bekannt ist, wurde ihr Effekt auf die Untersuchung von mikrobiellen Gemeinschaften noch nicht ausreichend thematisiert und untersucht. Es konnte aber festgestellt werden, daß das Auftreten von Artefakten mit der Erhöhung der Speziesdiversität steigt (Qiu *et al.* 2001). Das eigentliche Problem liegt in der Detektion der Artefakte. Chimere und Heteroduplexe können nach der Klonierung detektiert werden, was in dieser Arbeit aber nicht durchgeführt wurde. Dagegen besteht keine Möglichkeit, PCR induzierte Punktmutationen in natürlichen Proben zu identifizieren (Qiu *et al.* 2001). Bei der SSCP würde sich das Auftreten von Artefakten durch das Erscheinen von zusätzlichen Banden äußern.

Von Wintzingerode *et al.* (1997) beschrieb die Amplifikation von ribosomalen RNA Genen bakterieller DNA als sehr anfällig für Kontaminationen, da universelle, konservierte Regionen der bakteriellen Gene als Zielsequenzen dienen. Genau dieses Problem ergab sich bei dem Primerpaar, das für die sehr große Domäne der Eubakterien spezifisch ist. Hier kam es häufig zu „positiven“ Negativkontrollen. Bei der PCR der Aktinomyceten stellte die Negativkontrolle dagegen kein Problem dar, da die Primer

eine Spezifität für eine wesentlich kleinere Bakteriengruppe besitzen. Die verschachtelte *nifH* PCR zeigte ebenfalls das Problem der positiven Negativkontrolle, da dieser Reaktionstyp sehr anfällig für Kontaminationen ist.

Weiterhin können Beeinflussungen durch die PCR auftreten, da aufgrund der Spezifität der Primer oder spezifischen Sekundärstrukturen manche Templates bevorzugt amplifiziert werden können (Amann *et al.* 1994). Bindet der Primer am 3'-Ende schlecht, treten Probleme bei der Bindung der DNA-Polymerase auf, und das entsprechende Template kann nur schwach oder gar nicht amplifiziert werden. Bildet die Matrizen-DNA eine Sekundärstruktur aus, kann die Polymerase möglicherweise nicht optimal an die Ziel-DNA binden, dissoziiert während der Amplifikation ab und unterbricht die Synthese. Eine hohe Konzentration eines PCR-Fragments aus einem Gemisch nach einer PCR-Reaktion kann sowohl durch eine hohe Ausgangskonzentration als auch durch eine gute Primerbindung an das Template verursacht werden. Aus diesen Gründen kann von dem PCR-Ergebnis nicht auf das Mengenverhältnis der Ausgangs-DNA geschlossen werden (Amann *et al.* 1994). Auf dem SSCP-Gel macht sich eine hohe Konzentration eines PCR-Produkts durch eine Bande hoher Intensität bemerkbar. Aus diesen Gründen ist es nachvollziehbar, daß die Bandenmuster der SSCP nicht generell quantitativ auswertbar sind (Schwieger & Tebbe 1998). Die sehr ähnliche Methode der DGGE soll dagegen semiquantitativ auswertbar sein (Muyzer *et al.* 1993). Die Interpretation der Bandenintensitäten ist noch nicht endgültig geklärt.

4.1.3 SSCP

Die unterschiedlichen Parameter der SSCP (Temperatur und Gelkonzentration) wurden in dieser Arbeit mit Hilfe von Referenzbakterien optimiert. Eine Änderung des Originalprotokolls war notwendig, um eine ideale Trennung der Banden auf den SSCP-Gelen zu erreichen. Dabei wurde für jedes System ein Standard aus verschiedenen Referenzbakterien erstellt und verschiedene Bakterien aus einer Mischung detektiert, um die Funktionalität der Methode zu beweisen.

4.1.3.1 Auflösungsvermögen

Bei dem System der Eubakterien fiel auf, daß *Azotobacter chroococcum* zwei eng beieinander liegende Banden auf dem SSCP-Gel verursacht. Durch Ausschneiden beider Banden, Elution, Reamplifikation der DNA in der PCR und Analyse der Reamplifikate auf einem SSCP-Gel konnte gezeigt werden, daß es sich um eine Sequenz handelt, die zwei Konformationen ausbildet, welche miteinander im Gleichgewicht stehen. Dieses Phänomen wurde schon von Schwieger & Tebbe (1998) und Clapp (1999) diskutiert. Grundsätzlich besteht eine Korrelation zwischen der Anzahl der Banden und der Anzahl der Bakterienarten bzw. der Kopien des Zielgens auf einem SSCP-Gel (Schwieger & Tebbe 1998). Manche Organismen verursachen allerdings mehrere Banden entweder aus den oben genannten Gründen oder weil sie verschiedene 16S rRNA Gene unterschiedlicher Sequenz besitzen (Fogel *et al.* 1999). Umgekehrt ist es auch möglich, daß unterschiedliche einzelsträngige DNA-Moleküle das gleiche Laufverhalten auf dem SSCP-Gel ausbilden. Schmalenberger *et al.* (2001) zeigten am Beispiel von 13 Bakterienspezies, daß, abhängig von der amplifizierten 16S rDNA Region, die meisten Bakterien mehr als eine Bande auf dem SSCP-Gel aufweisen. Bei dem Vergleich von drei Primerpaaren, die unterschiedliche variable Regionen auf der 16S rDNA einrahmen, konnten sie demonstrieren, daß die Primer für die variablen Regionen V4 und V5, verglichen mit den beiden anderen Primerpaaren, relativ wenige Banden auf dem SSCP-Gel verursachen. Dieses für Eubakterien spezifische Primerpaar, das auch in dieser Arbeit eingesetzt wurde, eignet sich daher besonders gut für die Analyse komplexer mikrobieller Gemeinschaften. Die Untersuchung der Referenzbakterien dieser Arbeit zeigte, daß nur *Azotobacter chroococcum* zwei Banden auf dem SSCP-Gel ausbildete, die restlichen Referenzbakterien zeigten nur eine Bande. Um das Ergebnis von Schmalenberger *et al.* (2001) zu untermauern, mußten jedoch mehr Bakterienspezies untersucht werden.

Bei dem funktionellen Ansatz, der zur Untersuchung der stickstofffixierenden Bakterien im Boden dienen sollte, wurde das Referenzbakterium *Azomonas macrocytogenes* durch drei Banden auf dem SSCP-Gel repräsentiert. Durch Ausschneiden der drei Banden, Elution und Reamplifikation der DNA sowie erneutes Auftrennen auf einem SSCP-Gel konnte gezeigt werden, daß die beiden eng beieinander liegenden unteren Banden verschiedene Konformationen der gleichen Sequenz darstellen, während die oberste

eine andere Sequenz besitzt. Durch die Sequenzierung der drei Banden konnte dies bestätigt werden. Die Sequenzen der beiden unteren Banden sind identisch und zeigen 90 % Übereinstimmung mit dem *nifH* Gen von *Azomonas agilis*, einem stickstofffixierenden Bakterium der gleichen Gattung. Die *nifH* Sequenz von *Azomonas macrocytogenes* ist in der NCBI-Datenbank noch nicht beschrieben. Die Sequenz der obersten Bande von *Azomonas macrocytogenes* zeigt 83 % Übereinstimmung mit dem *anfH* Gen, das für die alternative Nitrogenase 3 von *Azotobacter vinelandii* kodiert, und läßt daher vermuten, daß *Azomonas macrocytogenes* ebenfalls eine alternative Nitrogenase besitzt (siehe Tabelle 20, Anhang). *AnfH* ähnliche Sequenzen wurden bisher in diesem Bakterium noch nicht beschrieben. Auf alternative Nitrogenasen wird im Kapitel 4.1.5 genauer eingegangen.

Die Referenzbakterien *Rhizobium leguminosarum* und *Azotobacter chroococcum* zeigen beide in der funktionellen Analyse eine Bande auf dem SSCP-Gel. In einigen Experimenten trat jedoch bei *Rhizobium leguminosarum* noch eine zweite und bei *Azotobacter chroococcum* zwei weitere Banden auf. Diese zusätzlich auftretenden Banden ließen sich nach dem Ausschneiden und der Elution der DNA nicht reamplifizieren. Es ist verwunderlich, daß die alternative Nitrogenase von *Azotobacter chroococcum* nicht detektiert werden konnte, da die Sequenz des *vnfH* Gens der des *nifH* Gens so ähnlich ist, daß es ebenfalls durch die verwendeten Primer amplifiziert werden sollte. Möglicherweise besitzen beide Sequenzen das gleiche Laufverhalten in der Elektrophorese und bilden eine Bande. Aus diesem Grund kann nicht davon ausgegangen werden, daß in den Proben dieser Arbeit alle alternativen Nitrogenasen gefunden werden.

Das Auftreten mehrerer Banden könnte prinzipiell auch den Grund haben, daß das entsprechende stickstofffixierende Bakterium mehrere *nifH*-Gene unterschiedlicher Sequenzen besitzt. Rosado *et al.* (1998) zeigten durch Untersuchungen der Diversität des *nifH* Gens in *Paenibacillus azotofixans* Stämmen mit Hilfe der DGGE, daß sie mehrere Kopien des *nifH* Gens besitzen.

Bei allen drei Referenzsystemen (Eubakterien, Aktinomyceten, stickstofffixierende Bakterien) gelang es, aus Bakterienmischungen die einzelnen Banden zu detektieren. Dies ist ein Beweis dafür, daß die SSCP die Auftrennung unterschiedlicher Sequenzen

ermöglicht und zur Diversitätsanalyse mikrobieller Gemeinschaften eingesetzt werden kann. Positive Negativkontrollen aus der PCR zeigten in der SSCP sehr schwache Banden im oberen Gelabschnitt des SSCP-Gels. Aus diesem Grund wurden nur die Bandenmuster unterhalb dieses Abschnittes ausgewertet.

4.1.3.2 Parallelproben und Reproduzierbarkeit

Da die PCR den entscheidenden Reaktionsschritt der SSCP darstellt, wurde in dieser Arbeit viel Wert darauf gelegt, die Reproduzierbarkeit der PCR durch Parallelproben zu untersuchen. Dazu wurden Aliquots der isolierten DNA in die PCR eingesetzt und parallel weiter aufgearbeitet. Die Reproduzierbarkeit erwies sich in beiden strukturellen Analyse als relativ hoch, da in den meisten Fällen die Parallelproben identische Bandenmuster bzw. eine Ähnlichkeit von über 90 % zeigen. Eine Ausnahme stellen zwei Proben des SSCP-Gels der Aktinomyceten des Rekultivierungsbodens dar, da hier die Ähnlichkeit von 90 % unterschritten wird. Beide Proben sind aufgrund dieser schlechten Reproduzierbarkeit nicht auswertbar. Eine nicht 100 %-ige Ähnlichkeit der Bandenmuster ist sowohl durch Fehler in der PCR als auch zum Teil durch die Problematik der Erfassung der Banden des Computerprogramms Gelcompar zu erklären. Auf diesen Punkt wird ausführlicher im Kapitel 4.1.3.3 eingegangen.

Da als Template gemischte DNA eingesetzt wurde, können abhängig von der zufälligen Primerbindung möglicherweise in zwei parallelen PCR-Reaktionen verschiedene Produkte unterschiedlich stark angereichert werden. Zur Reproduzierbarkeit wurde in anderen Studien herausgefunden, daß weder unterschiedliche PCR-Ausbeuten noch die Erhöhung des Volumens der PCR-Reaktion einen Einfluß auf die Qualität des Bandenmusters der SSCP haben (Nakao & Popovic 1998). Hennessy *et al.* (1998) zeigte, daß die Reproduzierbarkeit der SSCP am stärksten durch unterschiedliche Primerkonzentrationen beeinflusst wird. Die Magnesiumchloridkonzentration, die DNA-Konzentration, denaturierende Agentien und die Kühlung der Probe zeigen dagegen keinen großen Einfluß (Hennessy *et al.* 1998). Die oben aufgeführten Gründe mögen ihre Berechtigung haben, allerdings kann in dieser Arbeit davon ausgegangen werden, daß alle Proben gleich behandelt wurden und daher nicht erklärbar ist, warum diese Probleme ausschließlich bei zwei Proben des SSCP-Gels des Rekultivierungsbodens der Aktinomyceten auftraten.

In der Literatur werden für die DGGE-Bandenmuster von Parallelproben Ähnlichkeiten zwischen 73 und 100 % beschrieben. Da dort aber Proben aus getrennten DNA-Isolierungen untersucht wurden, sind sie mit den hier beschriebenen Parallelproben nicht vergleichbar (Smit *et al.* 2001, Kandeler *et al.* 2000, Griffith *et al.* 2000, Normander & Prosser 2000). Nicht identische Bandenmuster können bei diesen Proben die Ursache haben, daß innerhalb der Bodenproben tatsächlich Unterschiede in der Zusammensetzung der bakteriellen DNA auftraten. Es muß davon ausgegangen werden, daß jeder Bodenpartikel von unterschiedlichen Mikroorganismen besiedelt ist, was durch vorherige Homogenisierung der Bodenprobe nicht immer aufgehoben werden kann. Möglicherweise waren aber auch die gleichen Probleme, wie sie in der vorliegenden Arbeit auftraten, nämlich ein Fehler in der PCR, dafür verantwortlich. Zusätzlich kommt erschwerend hinzu, daß in vielen Veröffentlichungen keine Computer gestützte Auswertung der Ähnlichkeit der Bandenmuster durchgeführt wurde (Piceno *et al.* 1999, Heuer *et al.* 1999, Schwieger & Tebbe 2000, Peters *et al.* 2000, Schwieger & Tebbe 1998, Øvreås *et al.* 1997).

Untersuchungen unterschiedlicher Verdünnungen der gleichen Ausgangs-DNA bakterieller Gemeinschaften sowohl aus der Rhizosphäre als auch aus einem See wiesen jeweils sehr ähnliche Bandenmuster auf (Schwieger & Tebbe 1998, Øvreås *et al.* 1997), eine Auswertung mit einem Computerprogramm wurde allerdings nicht durchgeführt. Nakatsu *et al.* (2000) erwähnten, daß bei Parallelproben aus homogenisierten Bodenproben die Bandenmuster der DGGE gleich waren. Sie zeigen jedoch weder ein Bild noch eine Computer gestützte Auswertung. Zum Teil wird in der Literatur auch vollständig auf die Untersuchung von Parallelproben verzichtet (Teske *et al.* 1996).

Die Ergebnisse dieser Arbeit demonstrieren, daß durchaus Verfälschungen der Bandenmuster durch die PCR auftreten können, die durch keine herkömmlichen PCR-Kontrollen angezeigt werden. Aus dieser Sicht ist es daher empfehlenswert, die Reproduzierbarkeit der PCR durch Parallelproben routinemäßig zu prüfen.

4.1.3.3 Computerauswertung

Die Auswertung der SSCP-Gele erfolgte mit dem Programm Gelcompar, wobei folgende Probleme auftraten. Bei SSCP-Gelen mit Proben einer sehr hohen Diversität,

konnten die Bandenmuster nicht mehr ausreichend aufgelöst werden, da die Banden mit dem Hintergrund verschwammen. War es aufgrund zu vieler eng beieinander liegender Banden unmöglich, alle zu erfassen, wurden nur die prominentesten berücksichtigt. Als problematisch stellte sich in diesem Zusammenhang die Erfassung von Parallelproben heraus, wenn sie in sehr unterschiedlichen Konzentrationen auf das SSCP-Gel aufgetragen wurden, da die schwachen Banden in der gleichen Position aufgrund einer zu niedrigen Intensität vom Programm nicht detektiert werden konnten. In diesem Fall wurden sie manuell ergänzt. Da diese Vorgehensweise subjektiv ist, wurde die Reproduzierbarkeitsgrenze von Parallelproben auf 90 % festgelegt, um so die Schwierigkeiten der Gelcompar Auswertung zu kompensieren. Das bedeutet, daß Muster von Parallelproben, die laut Gelcompar Auswertung eine größere Ähnlichkeit als 90 % zeigen, für reproduzierbar gehalten werden, während Bandenmuster, die laut Gelcompar weniger als 90 % Ähnlichkeit aufweisen, als nicht reproduzierbar angesehen werden. Allerdings muß in diesem Zusammenhang beachtet werden, daß bei Mustern mit wenigen Banden das Fehlen oder Auftreten einer zusätzlichen Bande prozentual stärker ins Gewicht fällt als bei einem Bandenmuster mit einer hohen Anzahl von Fragmenten. Dies könnte möglicherweise ein Grund sein, warum die SSCP-Gele der Aktinomyzeten und der stickstofffixierenden Bakterien schlechter reproduzierbar als die der Eubakterien sind. In die weitere Auswertung wurden nur die Proben einbezogen, deren Parallelproben eine Übereinstimmung von mindestens 90 % zeigten.

Eine höhere Reproduzierbarkeit sowie eine bessere Vergleichbarkeit der Gele untereinander läßt sich durch die Verwendung von fluoreszenzmarkierten Primern in Verbindung mit einem automatischen Sequenziergerät erreichen (Widjojoatmodjo *et al.* 1995, Zumstein *et al.* 2000). Eine weitere Untersuchung der Banden sowie die Sequenzierung der DNA ist dann jedoch nicht möglich. Dieser Ansatz konnte jedoch in dieser Arbeit nicht weiterverfolgt werden.

4.1.4 Sequenzanalyse

Die Sequenzierungsergebnisse der strukturellen Analyse zeigen, daß die direkte Sequenzierung einzelner Banden prinzipiell möglich ist. Bei komplexen SSCP-Mustern steigt allerdings die Wahrscheinlichkeit der Überlagerung von Sequenzen stark an. In diesem Fall werden Mischsequenzen erhalten, die sich nicht mehr direkt auflösen

lassen. Durch Klonierung wäre es möglich, diese zu trennen und anschließend zu sequenzieren.

Werden weniger diverse Bakteriengemeinschaften wie z.B. Aktinomyceten oder stickstofffixierende Bakterien untersucht, sind die Muster erwartungsgemäß weniger komplex. Die Banden sind zum Teil besser gegenüber dem Hintergrund abgegrenzt, und die Wahrscheinlichkeit, daß sie sich überlagern, ist geringer, was sich in einer merklich besseren Sequenzierbarkeit äußert.

Da Primer, die für eine bestimmte Bakteriengruppe spezifisch sind, auf der Basis von bekannten Sequenzen entwickelt wurden, ist es immer fraglich, inwieweit damit noch unbekannten Bakterien detektiert werden können (Heuer *et al.* 1997). Die Tatsache, daß Sequenzen sowohl zu unkultivierbaren als auch zu kultivierbaren Bakterien enge Verwandtschaft aufweisen, zeigt, daß die Methode der PCR-SSCP geeignet ist, unkultivierbare und unbekannte Bakterien zu detektieren. Die Spezifität der verwendeten Primerpaare konnte ebenfalls bestätigt werden.

Bei der funktionellen Analyse wurden sowohl beim Waldboden, beim Rekultivierungsboden und beim Aralseeboden Sequenzen gefunden, die keine enge Verwandtschaft zu bekannten *nifH*-Sequenzen zeigten. Dies legt die Vermutung nahe, daß stark degenerierte Primer durch eine höhere Flexibilität in der Anlagerung an unterschiedliche Sequenzen eine zusätzliche Fähigkeit besitzen, unbekannte Sequenzen zu detektieren.

4.1.5 Alternative Nitrogenasen

Bei der funktionellen Analyse besteht zusätzlich die Möglichkeit, daß alternative Nitrogenasengene von den verwendeten Primern erfaßt werden (siehe Abbildung 35) (Dean & Jacobson 1992).

Alternative Nitrogenasen wurden zuerst an den Organismen *Azotobacter vinelandii* und *Azotobacter chroococcum* untersucht (Pau 1991, Robson 1991). Neben der allgemein verbreiteten Nitrogenase 1, die Molybdän als Kofaktor benötigt, sind in diesen Bakterien noch zwei weitere alternative Nitrogenasen beschrieben, die sich in den benötigten Metall-Kofaktoren unterscheiden. Beide Bakterien besitzen zusätzlich eine Vanadium-Nitrogenase (Nitrogenase 2), die von den *vnf* (vanadium-nitrogen-fixing)-

Genen kodiert wird. Die Nitrogenase 3, die als Kofaktor Eisen benötigt und von den *anf* (alternative-nitrogen-fixing)-Genen kodiert wird, ist dagegen nur in *Azotobacter vinelandii* beschrieben. Die Strukturgene der Nitrogenase 1 und 3 sind jeweils in einem Operon (*nifHDK* und *anfHDGK*), die der Nitrogenase 2 dagegen in zwei Operons (*vnfH* und *vnfDGK*) organisiert (siehe Abbildung 36). Das Enzym Nitrogenase besteht aus zwei Komponenten, der Nitrogenase-Reduktase, die aus zwei Untereinheiten besteht, die vom *nifH* Gen kodiert werden und der Dinitrogenase, die aus jeweils zwei α - und β -Untereinheiten besteht, die von *nifD* und *nifK* kodiert werden. Die Systeme 2 und 3 besitzen zusätzlich noch das Strukturgen *vnfG* bzw. *anfG*, das für die dritte Untereinheit d der Dinitrogenase 2 bzw. 3 kodiert. Es ist noch ungeklärt, ob diese Untereinheit für die vollständige Aktivität dieser Dinitrogenasen notwendig ist. Dem ferredoxin-ähnlichen Protein im System 2 konnte noch keine Funktion zugeordnet werden (Bishop & Premakumar 1992). Beide alternativen Nitrogenasen besitzen ähnliche physikalische und chemische Eigenschaften wie die Molybdän-Nitrogenase. Die größten Unterschiede liegen im Metallgehalt, der Struktur der Untereinheiten sowie einer niedrigeren Effizienz, Stickstoff zu fixieren (Pau 1991).

```

                                19F
                                GCNWTNTAYGGNAARGGNGG
nifH  GCGTCAATGCGCCATCTACGGCAAAGGTGGTATCGGTAAGTCCACCACTACTCAGAACCT
anfH  TCGTAAAGTAGCCATTTACGGAAAAGGCGGTATCGGCAAATCCACCACTACCCAGAATAC
vnfH  GCGTCAGTGTGCAATTTACGGCAAAGGTGGCATCGGCAAGTCCACCACCACCCAGAACCT
      *** *      ** ** ***** ** ** * * * * * * * * * * * * * * * *

                                112F
                                GGNTGTGAYCCNAA
nifH  GGTGGCAGCCCTGGCTGAGATG - - GGCAAGAAGGTCATGATCGTTGGTTGTGACCCGAA
anfH  TGCCGCAGCGCTGGCCTATTTCCACGACAAGAAAGTCTTCACTCACGGCTGCGACCCCAA
vnfH  GGTGCGCGCCCTCGCCGAAGCC - - GGCAAGAAAGTATGATGATCGTCGGTTGTGACCCGAA
      *  ** ** ** ** *      *  * * * * * * * * * * * * * * * *

VGCNGA
nifH  AGCTGACTCCACCCGCCTGATCCTGCACTCCAAGGCCCAGAACACCATCATGGAAATGGC
anfH  GGGCGACTCCACCCGCCTGATTCTCGGCGGCAAACCTGAGGAGACCCTGATGGACATGGT
vnfH  AGCCGACTCCACCCGCCTGATCCTGCACTCCAAGGCCCAGGGCACCGTCATGGAAATGGC
      ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

nifH  TGCCGAAGCCGGTACCGTGGAAGATCTGGAGCTGGAAGACGTGCTGAAGGCTGGCTACGG
anfH  GCGCGACAAGGGCGCCG - AAAAGATACCAAC - - GACGACGTGATCAAAAAAGGCTTTCT
vnfH  CGCGTCCGCGGCTCGGTGGAAGACCTGGAGCTGGAAGACGTGCTGCAGATCGGCTTCGG
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

nifH  CGGCGTCAAGTGCGTTGAGTCCGGTGGTCCGGAGCCGGGCGTTGGCTGCGCCGGCCGTGG
anfH  GGACATCCAGTGCGTGGAGTCCGGCGGCCCGAGCCGGGCGTTGGTTGCGCTGGCCGCGG
vnfH  CGGCGTCAAGTGCGTGAATCCGGTGGCCCGGAGCCGGGCGTCGTTGCGCCGGCCGTGG
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

nifH  TGTTATCACCGCCATCAACTTCCTGGAAGAGGAAGGCGCCTACGAAGACGATCTGGACTT
anfH  CGTGATCACCGCCATCGACCTGATGGAAGAAAACGGCGCCTATACCGATGACCTGGATTT
vnfH  CGTGATCACCGCGATCAACTTCCTGGAAGAAGAAGGCGCCTACAGCGACGACCTGGACTT
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

nifH  CGTATTCTACGACGTGCTGGGCGACGTGGTGTGTGGCGGCTTCGCCATGCCGATCCGCGA
anfH  CGTGTTCTTCGACGATCTGGGCGACGTGCTGTGCGGCGGTTTCGCCATGCCGATCCGCGA
vnfH  CGTGTTCTATGACGTGCTGGGCGACGTGGTATGCGGCGGCTTCGCCATGCCGATCCGCGA
      *** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

                                463R
                                GARATGATGGCNVTNTAYGC
nifH  GAACAAGGCCCAGGAAATCTACATCGTCTGCTCCGGTGAGATGATGGCCATGTACGCCGC
anfH  CGGCAAGGCCCAGGAAAGTCTACATCGTGGCTTCCGGGGAGATGATGGCCATTTATGCGGC
vnfH  GAACAAGGCCCAGGAAATCTACATCGTCTGCTCCGGCGAGATGATGGCCATGTACGCCGC
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

N = G, A, T oder C
 R = A oder G
 V = A, G oder C
 Y = C oder T
 W = A oder T

Abbildung 35: Alignment der verschiedenen Nitrogenasegene (*anfH*, *vnfH*, *nifH*) von *Azotobacter vinelandii* (* = übereinstimmende Basen; - = Lücke; A = Adenin; C = Cytosin; T = Thymin; G = Guanin; 19F = Forward Primer der 1.PCR; 112F = Forward Primer der 2.PCR; 463R = Reverse Primer für 1. und 2.PCR)

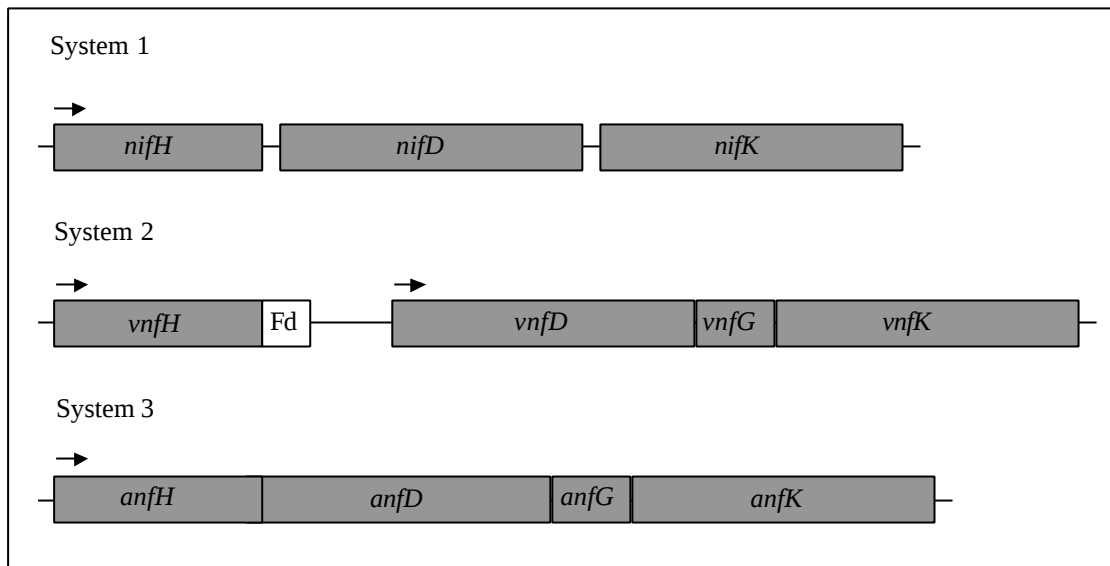


Abbildung 36: Organisation der Strukturgene der drei Nitrogenasesysteme von *Azotobacter vinelandii* (nach Bishop & Premakumar 1992); (Pfeile = Promotorregionen mit Transkriptionsrichtung; graue Kästchen = Strukturgene)

Inzwischen wurden ebenfalls *vnfG* ähnliche Sequenzen *Azotobacter salinestris*, sowie *anfG* ähnliche Sequenzen *Azomonas macrocytogenes*, *Rhodospirillum rubrum* und *Heliobacterium gestii* beschrieben (Loveless & Bishop 1999).

Aufgrund der Tatsache, daß in *Azomonas macrocytogenes* auf dem SSCP-Gel drei Banden zeigt, wovon eine 83 % Übereinstimmung mit dem *anfH* Gen von *Azotobacter vinelandii* zeigt, kann die Annahme unterstützt werden, daß *Azomonas macrocytogenes* tatsächlich ein alternatives Nitrogenasesystem besitzt, welches der Nitrogenase 3 ähnelt.

4.2 Strukturelle und funktionelle Diversitätsanalysen der Modellböden

Mit der Untersuchung der Modellböden in dieser Arbeit sollte die Anwendbarkeit der PCR-SSCP getestet werden. Aus diesem Grund wurden nur wenige Bodenproben untersucht und der Schwerpunkt nicht auf eine statistisch ausreichende Beprobung der einzelnen Böden gelegt.

Die Muster der SSCP-Gele der Eubakterien des Garten-, Wald-, und Rekultivierungsbodens bestanden aus vielen Banden, die in den Hintergrund übergehen, während die der Aktinomyceten deutlicher abgegrenzt waren. Dieses Ergebnis veranschaulicht die wesentlich höhere Diversität innerhalb der Domäne der Eubakterien, die sehr viele Bakterienreiche mit den dazu gehörenden Gruppen, zu denen auch die Aktinomyceten zählen, umfaßt (Madigan *et al.* 2000). Von dem Programm Gelcompar werden bei dem System der Eubakterien zwar durchschnittlich einige Banden mehr als bei dem der Aktinomyceten registriert (siehe Tabelle 15, Ergebnisse), dadurch wird aber nicht die wesentlich höhere Artenvielfalt der Eubakterien gegenüber den Aktinomyceten widerspiegelt, die durch die schwachen, durch Gelcompar nicht erfaßbaren Banden deutlich wird. Mit der SSCP kann demnach eine sehr hohe Diversität prinzipiell dargestellt, aber von dem Program nicht vollständig erfaßt werden.

Eine Reihe von Untersuchungen der mikrobiellen Diversität in unterschiedlichen Böden mit SSCP und DGGE, die ebenfalls sehr komplexe nicht auflösbare Bandenmuster der 16S rRNA Gene ergaben, bestätigen dieses Ergebnis (Schwieger & Tebbe 1998, Schmalenberger *et al.* 2001, Smit *et al.* 2001, Nakatsu *et al.* 2000, Fantroussi *et al.* 1999). Legt man eine Anzahl von 10^4 unterschiedlichen bakteriellen Genomen im Boden zugrunde (Torsvik *et al.* 1990, 1998), ist das Auflösungsvermögen der DGGE und TGGE nicht groß genug, um alle amplifizierten 16S rDNA Fragmente zu trennen (Muyzer & Smalla 1998). Auch Heuer *et al.* (1997) beschrieb die Schwierigkeit, hohe Diversität zu charakterisieren.

Extreme Böden mit einer niedrigeren bakteriellen Diversität, wie z.B. die Aralseeböden, ermöglichen aber sehr wohl die Untersuchung der eubakteriellen Gemeinschaft, da sie ein weniger komplexes Bandenmuster zeigen. Im Unterschied zu den anderen drei Modellböden waren die Banden der Eubakterien und der Aktinomyceten bei den

Aralseeböden deutlich gegenüber dem Hintergrund abgegrenzt. Die niedrigere Diversität dieser Böden ist vermutlich durch seine hohe Salinität und das aride Klima zu erklären. Da Mikroorganismen im Boden hauptsächlich an die Ton- und Schlufffraktion assoziiert sind (Kandeler *et al.* 2000), tragen möglicherweise die sandigen Eigenschaften des Aralseebodens ebenfalls zu der niedrigen Diversität bei. Weitere Ursachen könnten eventuell in der Verunreinigung der Böden mit PCB-Verbindungen, Schwermetallen und Pestiziden liegen (Jensen *et al.* 1997). Je stärker die äußeren Bedingungen des Bodens vom ungestörten Zustand abweichen, desto geringer ist die Mannigfaltigkeit der Arten und um so größer die Individuenzahl einer Art. Unter Extrembedingungen überwiegen diejenigen sogenannten Spezialisten, die an diese Bedingungen angepaßt sind (Gisi *et al.* 1997).

Torsvik *et al.* (1998) beschrieben in gestörten und verschmutzten Umwelten eine deutlich geringere Existenz von funktionellen Nischen sowie ein merklich reduziertes Substratangebot, das sich in einer niedrigeren bakteriellen Diversität bemerkbar macht. Dies konnte auch durch weitere Studien an gestörten Böden bestätigt werden. So fanden Nakatsu *et al.* (2000) z.B. in einem Boden, der mit PAKs (polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen) kontaminiert war, eine klar reduzierte Bakteriendiversität. Fantroussi *et al.* (1999) bestätigten ebenfalls eine geringere Bakteriendiversität von Böden, die mit Phenylharnstoffherbiziden behandelt wurden, gegenüber unbehandelten Böden. Kandeler *et al.* (2000) konnten dagegen in Schwermetall belasteten Böden keine Veränderung der bakteriellen Gemeinschaft anhand des Bandenmusters der DGGE feststellen.

Eine Möglichkeit, die Komplexität zu reduzieren, ist die Untersuchung von kleineren oder funktionellen Gruppen (Heuer *et al.* 1997, Kowalchuk *et al.* 1997). So wurden in Boden und Sedimenten Bakteriengruppen wie die Archaeobakterien (Nakatsu *et al.* 2000) und funktionelle Gruppen wie Ammonium oxidierende Bakterien (Kowalchuk *et al.* 1999), diazotrophe Mikroorganismen (Piceno *et al.* 1999) und Methan oxidierenden Bakterien (Henkel *et al.* 1999) mit der Methode der DGGE untersucht, die deutlich weniger komplexe Bandenmuster zeigten. Dieser prinzipielle Ansatz wurde in der vorliegenden Arbeit durch die Untersuchung der mikrobiellen Gemeinschaft der Aktinomyceten und der stickstofffixierenden Bakterien verwirklicht.

Ähnlich wie bei der strukturellen Analyse der Aktinomyceten fällt auch bei der funktionellen der stickstofffixierenden Bakterien auf, daß die Muster durchschnittlich weniger Banden aufweisen als bei der strukturellen Analyse der Eubakterien. Bei der funktionellen Analyse gehen jedoch einige Banden in den Hintergrund über. Da nach Chandler *et al.* (1997) stickstofffixierende Bakterien häufig eine Minderheit im Boden darstellen, sind diese nur schwer mit einer hohen Diversität der stickstofffixierenden Bakterien zu erklären.

Ein Grund für das Auftreten vieler Banden könnte eher in der Verwendung von stark degenerierten Primern liegen. Diese binden aufgrund schlechter Sequenzübereinstimmungen nur schwach, was eine geringe Amplifikation erklären würde. Dieser mögliche Grund schließt eine quantitative Auswertung der Bandenmuster der funktionellen *nifH* PCR-SSCP auf jeden Fall aus.

Die Diversitätsanalysen des Waldbodens der Aktinomyceten und der stickstofffixierenden Bakterien zeigen, verglichen mit den anderen Modellböden, Bandenmuster mit auffallend wenigen Banden. Der pH-Wert des Waldbodens ist mit 2,8 gegenüber den anderen Böden extrem niedrig. Da Bakterien im allgemeinen neutrale bis basische Umgebung bevorzugen (Gisi *et al.* 1997, Schlegel & Schmidt 1985), wäre hier ebenfalls nur eine geringe eubakterielle Diversität zu erwarten. Die Ergebnisse zeigen aber das Gegenteil. Mergel *et al.* (2001) fand überraschenderweise ebenfalls in sehr saurem Waldboden normal hohe Bakterienzahlen. Möglicherweise reagieren nur einzelne Bakteriengruppen, wie z.B. die Aktinomyceten und stickstofffixierenden Bakterien, sehr empfindlich auf niedrige pH-Werte. Da im Boden sehr viele Faktoren das Leben der Mikroorganismen beeinflussen, kann die niedrige Diversität dieser Bakteriengruppen auch andere Gründe haben.

Ein Vergleich der Modellböden untereinander zeigt, daß die Bandenmuster der strukturellen Analyse der Aktinomyceten (mit Ausnahme der Probe 1 des Aralseebodens) untereinander eine höhere Übereinstimmung aufweisen als die der Eubakterien. Dabei spiegeln die Gruppierungen der Bodenproben aufgrund der Ähnlichkeit der Bandenmuster nur zum Teil die Zugehörigkeit zu den einzelnen Böden wider, teilweise bilden aber auch die Proben zweier Böden eine Gruppe. So besteht bei den Eubakterien eine höhere Ähnlichkeit zwischen einzelnen Bodenproben des Aralsee-

und des Gartenbodens, bei den Aktinomyceten dagegen zwischen einzelnen Proben des Aralsee- und des Rekultivierungsbodens. Dieses Ergebnis zeigt, daß bei der strukturellen Analyse zwischen den Bandenmustern einzelner Bodenproben unterschiedlicher Böden sehr wohl eine gewisse Ähnlichkeit auftreten kann und die Gruppierung nicht in allen Fällen die Zugehörigkeit zu den Böden widerspiegeln muß.

Der Vergleich der Ähnlichkeit der Bandenmuster der funktionellen Analyse der unterschiedlichen Modellböden zeigt im Gegensatz dazu so große Unterschiede innerhalb der Proben eines Bodens, daß die Zugehörigkeit der einzelnen Proben zu den einzelnen Böden sich in der Gruppierung der Proben überhaupt nicht widerspiegelt. Demnach scheint die Gemeinschaft der stickstofffixierenden Bakterien eher heterogen im Boden verteilt zu sein. Neben der Tatsache, daß Böden oft sehr inhomogen sind und die bakterielle Gemeinschaft innerhalb kurzer Distanzen stark variieren kann (Parkin 1990), wurde dieses Phänomen schon von Poly *et al.* (2001) beschrieben, die die Zusammensetzung des *nifH* Genpools in sechs unterschiedlichen Böden untersuchten. Sie fanden sowohl innerhalb der Proben eines Bodens als auch zwischen den unterschiedlichen Böden eine starke Variation des *nifH* Gens und stellten die Vermutung auf, daß die Zusammensetzung des *nifH* Genpools wahrscheinlich von der Menge und der Form des im Boden vorkommenden Stickstoffs abhängig ist. Diese hängt wiederum von der Bewirtschaftung des Bodens, den vorkommenden Pflanzenarten und den physikalischen und chemischen Eigenschaften des Bodens ab. Demnach scheinen die Zusammenhänge zwischen der Zusammensetzung der Gemeinschaft der stickstofffixierenden Bakterien und den dafür verantwortlichen Faktoren sehr komplex zu sein.

Durchschnittlich wurden mit der strukturellen Analyse in dieser Arbeit 12-14 Banden pro Bodenprobe mit dem Programm Gelcompar erfaßt. Dies sind weniger, als in mikrobiellen Gemeinschaften in der Literatur beschrieben wurden. Schwieger & Tebbe (1998) detektierten visuell, mit den gleichen Primern für Eubakterien, die auch in dieser Arbeit eingesetzt wurden, ungefähr 25 Banden in Proben der bakteriellen Gemeinschaften aus der Rhizosphäre. Dies könnte daran liegen, daß dort aufgrund des Rhizosphäreneffekts die Anzahl der Bakterien wesentlich höher ist (Gisi *et al.* 1997). Der entscheidende Grund für die geringere Bandenanzahl ist aber der, daß in diesen Proben viele Banden aufgrund ihrer niedrigen Intensität mit dem Hintergrund

verschmelzen, die zwar visuell aber nicht durch das Programm Gelcompar erfaßt werden können. Kandeler *et al.* (2000) detektierten durchschnittlich 20 Banden in ihren DGGE-Analysen der Eubakterienpopulationen aus Bodenproben, die mit Schwermetallen kontaminiert waren.

Torsvik *et al.* (1998) zeigten durch Untersuchungen mit DGGE, daß menschliche Eingriffe, wie Agrarkultur, Fischfarm und Umweltverschmutzung tiefgreifende Veränderungen in der Gemeinschaftsstruktur sowie eine Reduktion der bakteriellen Diversität bewirken. Da in dieser Arbeit nur eine Momentaufnahme der untersuchten Böden dargestellt werden konnte, kann über die Auswirkung der menschlichen Eingriffe auf die Bakteriendiversität keine Aussage gemacht werden.

4.2.1 Datenbankvergleiche

Bei den Datenbankvergleichen der strukturellen Analyse wurden relativ hohe Homologieraten von 89-100 % (siehe Tabelle 18 und Tabelle 19, Anhang) erreicht. Das liegt daran, daß im Vergleich zu anderen Genen die 16S rDNA am besten untersucht ist und von diesem Gen die meisten Sequenzen in den Datenbanken existieren (Amann *et al.* 1994, Glöckner *et al.* 2000, Maidak *et al.* 2000).

Das vollständige 16S rRNA Gen (ca. 1520 bp, Neefs *et al.* 1993) ist zu stark konserviert, um eine Auflösung bis zum Spezieslevel zu gewährleisten, da die Unterschiede zwischen einzelnen Spezies nur 0-3 % Unterschied in der 16S rDNA Sequenz ausmachen (Stackebrandt & Rainey 1995). Da in dieser Arbeit nur 300-400 bp der 16S rDNA sequenziert wurden, ist die Aussage der Sequenzanalysen auf dem Artniveau folglich begrenzt.

Die Sequenzen der Aktinomyceten weisen insgesamt eine stärkere Ähnlichkeit untereinander auf als die der Eubakterien, da die Aktinomyceten eine kleine Bakteriengruppe darstellen, die sich in ihrer 16S Phylogenie und in ihren physiologischen Eigenschaften entsprechen ähnlich sind. Vergleicht man die V3-Region der 16S rDNA-Sequenzen der Aktinomyceten, die in dieser Arbeit untersucht wurde, mit anderen Bakterien, z.B. mit *Escherichia coli*, so fällt auf, daß ein Bereich von 20 bp fehlt (siehe Abbildung 37). Aus diesem Grund sind die PCR-Produkte nicht wie bisher in der Literatur angegeben 308 bp sondern nur 298 bp groß.

Die *nifH* Sequenzen zeigen im Datenbankvergleich niedrigere Übereinstimmungen von 80-98 % im Gegensatz zur strukturellen Analyse mit 90-100 %. Dies ist darin begründet, daß die 16S rRNA aufgrund ihrer Funktion wesentlich stärker konserviert ist, als das *nifH*-Gen, welches auf Proteinebene konserviert ist. Zusätzlich ist das 16S rRNA Gen in unterschiedlichen Organismen wesentlich besser als das *nifH* Gen untersucht. Dadurch ist die Wahrscheinlichkeit einer hohen Übereinstimmung zwischen einer unbekannten *nifH* Sequenz mit einer aus der Datenbank geringer.

<i>Strept.</i>	GGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGACGG
AG 1	GGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAACGGCCACCAAGGCGACGACGG
<i>E.coli</i>	GGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCC
	***** ** *
<i>Strept.</i>	GTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTAC
AG 1	GTAGCTGGTCTGAGAGGACGGCCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTAC
<i>E.coli</i>	CTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTAC
	**** *
<i>Strept.</i>	GGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCAC - AATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCG
AG 1	GGGAGGCAGCAGTGGGGGATCTTGCCTAATGCGCGAAAGCGTGACGCAGCGACGCCGCG
<i>E.coli</i>	GGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCAC - AATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCG
	***** *
<i>Strept.</i>	TGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAA-----
AG 1	TGGGGGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACCCCTTTTCGGCAGGGACGAAGGGAA-----
<i>E.coli</i>	TGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTT
	** *
<i>Strept.</i>	-----AGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAG
AG 1	-----ACTGACGGTACCTGCAGAAGAAGTCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAG
<i>E.coli</i>	AATACCTTTGCTCATTGACGTTACCCGAGGAAGAAGCACCAGGCTAACTCCGTGCCAGCAG
	* *
<i>Strept.</i>	CCGCGGTAA
AG 1	CCGCGGCCG
<i>E.coli</i>	CCGCGGTAA

Abbildung 37: Sequenzvergleich einer Teilsequenz der 16S rRNA Gene von *E. coli*, *Streptomyces* (Strep.) und der Sequenz AG 1 aus Gartenboden (* = übereinstimmende Basen; - = Lücke; A = Adenin; C = Cytosin; T = Thymin; G = Guanin)

Aus diesem Grund sind oft nur Teilsequenzen des *nifH* Gens verfügbar. Eine Teilsequenz aus der Datenbank konnte aber nur dann für einen phylogenetischen Vergleich mit Sequenzen in dieser Arbeit verwendet werden, wenn der Bereich dieser Teilsequenz sich mit dem in dieser Arbeit untersuchten Fragment vollständig überschneidet.

Diese zum Teil auftretende Diskrepanz zwischen den einzelnen Datenbankvergleichen (siehe Tabelle 20, Anhang) und den phylogenetischen Bäumen (siehe Abbildung 32 bis Abbildung 34, Ergebnisse) ist dadurch zu erklären, daß sich die Homologien bei einem Datenbankvergleich immer nur auf das verglichene Sequenzstück beziehen, das kleiner als die ursprüngliche Länge der zu vergleichenden Sequenz sein kann. Bei einem multiplen Alignment, aus dessen Daten im Anschluß ein phylogenetischer Baum erstellt werden kann, können dagegen nur Sequenzen einbezogen werden, die gleich lang wie die in dieser Arbeit untersuchte *nifH* Sequenz sind. Daher spiegeln sich hohe Homologien kurzer Fragmente nicht im phylogenetischen Baum wider.

Die phylogenetischen Stammbäume der funktionellen Analyse zeigen Gruppen, die keine hohe Ähnlichkeit mit bekannten *nifH* Sequenzen aufweisen. Dies ist damit erklärbar, daß das *nifH* Gen wesentlich schlechter als die 16S rDNA untersucht ist und viele *nifH* Gene, die im Boden vorkommen, noch nicht bekannt sind. Niedrigere Homologien zwischen *nifH* Sequenzen sind durch eine weniger starke Konservierung des *nifH* Gens gegenüber der 16S rDNA zu erklären.

Beim Rekultivierungsboden bilden 6 Sequenzen eine Gruppe, die keine Ähnlichkeit zu schon bekannten *nifH* Sequenzen aufweist. Diese Sequenzen zeigen im Datenbankvergleich nur Übereinstimmungen von 80-87 % mit Sequenzstücken der Länge 116-280 bp (siehe Tabelle 20, Anhang). Beim Aralseeboden bilden 7 Sequenzen eine Gruppe enger Verwandtschaft, die keine Ähnlichkeit zu schon bekannten stickstofffixierenden Bakterien aufweisen und bei denen in den Datenbankvergleichen nur Übereinstimmungen von 81-88 % in Fragmenten der Länge 101-237 bp gefunden wurden. Da nur ein Stück der untersuchten Sequenz homolog zu bekannten *nifH* Sequenzen ist, kann das Auftreten von chimären Molekülen nicht ausgeschlossen werden. Es ist allerdings unwahrscheinlich, daß diese in so hohem Maße auftreten. Im Rahmen dieser Arbeit war eine weitere Untersuchung dieser Sequenzen nicht möglich.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Diversität von Bakteriengemeinschaften der Eubakterien und der Aktinomycceten mit einem strukturellen, die Gemeinschaft der stickstofffixierenden Bakterien mit einem funktionellen Ansatz in sechs sehr unterschiedlichen Modellböden mit der PCR-SSCP untersucht. Dabei konnte zum ersten Mal gezeigt werden, daß sich auch funktionelle Gene, wie das *nifH* Gen zur Diversitätsanalyse mit der PCR-SSCP eignen.

Die Etablierung und Optimierung der Parameter Temperatur und Gelkonzentration der SSCP erfolgte mit Hilfe von Referenzbakterien, so daß eine optimale Trennung der Banden auf dem SSCP-Gel erreicht wurde. Im Anschluß daran wurde die Anwendbarkeit der Methode an Garten-, Buchenwald-, Rekultivierungs- und verschiedenen Aralseebodenproben getestet.

Die Reproduzierbarkeit der PCR, dem entscheidenden Reaktionsschritt der SSCP, war dabei nicht in allen Fällen gegeben, daher ist für weitere Untersuchungen die Kontrolle der PCR durch Parallelproben empfehlenswert. Dieses Problem ist zum Teil auf die Auswertung der Bandenmuster mit dem Programm Gelcompar zurückzuführen. Bei den meisten Proben konnte jedoch eine Ähnlichkeit der Parallelproben von über 90 % erreicht werden.

Die Sequenzierbarkeit der Banden im Gel ist von der Diversität der zu untersuchenden Bakteriengruppe abhängig. So sind die Banden der Aktinomycceten und der stickstofffixierenden Bakterien wesentlich besser als die der Eubakterien sequenzierbar, da durch die erheblich höhere Diversität der Domäne der Eubakterien die einzelnen Banden auf dem SSCP-Gel nicht mehr getrennt werden können. Es konnte gezeigt werden, daß die Primer spezifisch sind und ein großes Potential zur Erfassung von unkultivierbare und unbekannte Mikroorganismen besitzen. In dieser Hinsicht scheinen die stark degenerierten Primer der stickstofffixierenden Bakterien besonders geeignet zu sein.

Darüber hinaus kann mit den Sequenzierungsergebnissen dieser Arbeit die Annahme unterstützt werden, daß *Azomonas macrocytogenes* eine alternative Nitrogenase besitzt, die der Nitrogenase 3 ähnlich ist.

Ein grundlegender Unterschied zwischen der strukturellen und funktionellen Analyse ist der, daß das 16S rRNA Gen stärker konserviert ist als das *nifH* Gen. Zudem ist das *nifH* Gen im Gegensatz zur 16S rDNA wesentlich schlechter untersucht, was sich ebenfalls in einer geringeren Übereinstimmungen bei den Datenbankvergleichen bemerkbar macht. Das äußert sich darin, daß bei der strukturellen Analyse höhere Homologien bei den Datenbankvergleichen als bei denen der funktionellen Analyse erreicht wurden.

Die Methode der PCR-SSCP ist in der Lage, die Unterschiede des komplexen Substrates Boden, bei dem jeder Bodenpartikel von anderen Bakterien besiedelt sein kann, sichtbar zu machen. Da bei hoher Diversität die Banden auf den SSCP-Gelen oft mit dem Hintergrund verschmelzen, ist in diesem Fall eine Computerauswertung problematisch.

Die sechs Modellböden zeigten in einer Momentaufnahme sehr unterschiedliche Diversitäten der einzelnen untersuchten Bakteriengruppen. Dabei waren die Bandenmuster der Aktinomyceten und stickstofffixierenden Bakterien, weniger komplex als die der Eubakterien.

6 Ausblick

Je weniger komplex die Bandenmuster der Diversitätsanalysen der SSCP sind, desto besser können sie ausgewertet werden. Daher ist die Fähigkeit der Primer wichtig, möglichst wenige Banden pro Bakterium auf dem SSCP-Gel zu erzeugen. Es wäre sinnvoll, Primer auf diese Eigenschaft hin zu untersuchen bzw. zu entwickeln, wie dies schon durch Schmalenberger *et al.* (2001) begonnen wurde. Eine Untersuchung dieses Aspekts wäre für die in dieser Arbeit verwendeten *nifH*-Primer besonders interessant.

Die Reproduzierbarkeit der PCR, dem entscheidenden Reaktionsschritt der SSCP, war nicht bei allen Bodenproben dieser Arbeit gegeben, daher ist für weitere Untersuchungen die Kontrolle der PCR durch Parallelproben empfehlenswert. Möglicherweise läßt sich eine höhere Reproduzierbarkeit sowie eine bessere Vergleichbarkeit der Gele untereinander durch die Verwendung von fluoreszenzmarkierten Primern in Verbindung mit einem automatischen Sequenziergerät erreichen (Widjojoatmodjo *et al.* 1995, Zumstein *et al.* 2000). Dies birgt jedoch den Nachteil, daß keine Banden ausgeschnitten und deren DNA amplifiziert und sequenziert werden können.

Das große Potential der PCR-SSCP liegt in der Vergleichbarkeit von Proben eines oder unterschiedlicher Standorte über längere Zeiträume. Poly *et al.* (2001) und Shaffer *et al.* (2000) zeigten in ihren Untersuchungen jeweils eine hohe Stabilität des *nifH* Genpools über mehrere Monate. Die Untersuchung anderer Standorte sowie die Erforschung der Zusammenhänge zwischen dem Einfluß von äußerlichen Faktoren und der Stabilität des *nifH* Genpools würden einen interessanten Einblick in die Dynamik der Population der stickstofffixierenden Bakterien ermöglichen. Ueda *et al.* (1995) fanden in der Rhizosphäre von Reispflanzen mehr stickstofffixierende Bakterien, als der umliegende Boden. Mit der SSCP könnte untersucht werden, ob dies für die Rhizosphäre anderer Pflanzen ebenfalls gültig ist.

Die PCR-SSCP ist mit großer Wahrscheinlichkeit auch auf andere funktionelle Gene übertragbar, dies muß allerdings für jedem Einzelfall getestet werden. Dabei ist die Wahl geeigneter Primer der entscheidende Punkt für den Erfolg der Methode.

Ein weiteres Einsatzgebiet der PCR-SSCP stellt die Untersuchung des Einflusses von freigesetzten transgenen Pflanzen oder Organismen auf die Bakterienpopulation im Boden dar. Sie ermöglicht einen relativ schnellen und einfachen Nachweis der Veränderungen von Bakterienpopulationen und ist daher für solche Untersuchungen ausgesprochen gut geeignet.

7 Abkürzungen

μ	mikro
A	Adenin
a	anno
A. dest.	Destilliertes Wasser
APS	Ammoniumpersulfat
ARDRA	Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis
ATP	Adenosintriphosphat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
C/N	Kohlenstoff/Stickstoff
CTAB	Hexadecyl-Trimethyl-Ammonium-Bromid
DGGE	Denaturierende Gradient Gel Elektrophorese
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxy-Nucleosid-Triphosphat
ERIC	Enterobacterial Repetitive Intergeneric Consensus
et al.	und andere
F	Forward
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
G	Guanin
h	Stunde
ha	Hektar
IAA	Isoamylalkohol
IGS	Intergenic Spacer
l	Liter
MDE	Mutation Detection Enhancement
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nm	Nanometer
PAA	Polyacrylamid

PCR	Polymerase Chain Reaction
R	Reverse
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
REP	Repetitive Extragenic Palindromic
RNA	Ribonucleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonucleinsäure
s	Sekunde
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
T	Thymin
t	Tonne
TBE	Trisborat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TGGE	Temperatur Gradient Gel Elektrophorese
T-RFLP	Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism
U	Unit
UPGMA	unweighted pair group with mathematical averages
upm	Umdrehungen pro Minute
V1-V9	variable Regionen 1-9

8 Literaturverzeichnis

- Akkermans D.L.**, van Elsas J.D. and Bruijn F.J. (1995) *Molecular Microbial Ecology Manual*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands
- Akkermans A.D.L.**, Hahn D. and Baker D.D. (1992) The Family Frankiaceae. In: Balows A., Trüper H.G., Dworkin M., Harder W., Schleifer K.-H. (eds.): *The Prokaryotes*. Second Edition, Vol. 2, Springer Verlag, Chapter 45, pp. 1069-1084
- Amann R.I.**, Ludwig W. and Schleifer K.H. (1994) Identification of Uncultured Bacteria: a Challenging Task for Molecular Taxonomists. *ASM News* 60: 360-365
- Amann R.I.**, Ludwig W. and Schleifer K.H. (1995) Phylogenetic Identification and *In Situ* Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. *Microbiol. Rev.* 59: 143-169
- Ausubel F.M.**, Brent R. and Kingston R. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley, New York
- Balandreau J.**, Viallard V., Cournoyer B., Coenye T., Laevens S. and Vandamme P. (2001) *Burkholderia cepacia* Genomovar III is a Common Plant-Associated Bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 982-985
- Bassam B.J.**, Caetano-Anollés G. and Gresshoff P.M. (1991) Fast and Sensitive Silver Staining of DNA in Polyacrylamide Gels. *Anal. Biochem.* 196: 80-83
- Bennasar A.**, Guasp C., Tesar M. und Lalucat J. (1998) Genetic Relationships among *Pseudomonas stutzeri* Strains Based on Molecular Typing Methods. *J. Appl. Microbiol.* 85: 643-656
- Bishop P.E.** and Premakumar R. (1992) Alternative Nitrogen Fixation Systems. In: Stacey G., Burris R.H., Evans G., *Biological Nitrogen Fixation*, Chapman and Hall, New York, pp. 736-762
- Blaine Metting Jr.F.** (1992) *Soil Microbiol. Ecology*. Marcel Dekker, Inc. New York, pp. 3-95
- Blume H.P.**, Deller B., Leschber R., Paetz A., Schmidt S. and Wilke B.M. (2000) *Handbuch der Bodenuntersuchung, Abschnitt 2.1.2a, Band 2*, Wiley-VCH, Beuth
- Borneman J.**, Skroch P.W., O'Sullivan K.M., Palus J.A., Rumjanek N.G., Jansen J.L., Nienhuis J. and Triplett E.W. (1996) Molecular Microbial Diversity of an Agricultural Soil in Wisconsin. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1935-1943
- Braker G.**, Zhou J., Wu L., Devol A.H. and Tiedje J.M. (2000) Nitrite Reductase Genes (*nirK* and *nirS*) as Functional Markers to Investigate Diversity of Denitrifying Bacteria in Pacific Northwest Marine Sediment Communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2096-2104
- Capone D.G.** (1988) Benthic Nitrogen Fixation. In: Sorensen J. (ed.) *Nitrogen Cycling in Coastal Marine Environments*. Blackburn TH, John Wiley & Sons Ltd., New York, pp. 85-123

- Chandler D.P.**, Schreckhise R.W., Smith J.L. and Bolton Jr.H. (1997) Electroelution to Remove Humic Compounds from Soil DNA and RNA Extracts. *J. Microbiol. Meth.* 28: 11-19
- Chapin F.S.**, Walker B.H., Hobbs R.J., Hooper D.U., Lawton J.H., Sala O.E. and Tilman D. (1997) Biotic Control over the Functioning of Ecosystems. *Science* 277: 500-503
- Clapp J.P.** (1999) The Identification of Root-Associated Fungi by Polymerase Chain Reaction-Single-Strand Conformational Polymorphism (PCR-SSCP) In: Akkermans A.D.L., Van Elsas J.D., De Bruijn F.J. (eds.): *Molecular Microbial Ecology Manual*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, Vol., 3.4.7. pp. 1-18
- Claus D.**, Fritze D. and Kocur M. (1992) Genera Related to the Genus *Bacillus* – *Sporolactobacillus*, *Sporosarcina*, *Planococcus*, *Filibacter* and *Caryophanon*. In: Balows A., Trüper H.G., Dworkin M., Harder W., Schleifer K.-H. (eds.): *The Prokaryotes*. Second Edition, Vol. 2, Springer Verlag, Chapter 79, pp. 1769-1791
- Coughlan M.P.** and Mayer F. (1991) The Cellulose-Decomposing Bacteria and their Enzyme Systems. In: Balows A., Trüper H.G., Dworkin M., Harder W., Schleifer K.-H. (eds.): *The Prokaryotes*. Second Edition, Vol. 1, Springer Verlag, Chapter 20, pp. 460-516
- Crocker F.H.**, Fredrickson J.K., White D.C., Ringelberg D.B. and Balkwill D.L. (2000) Phylogenetic and Physiological Diversity of *Arthrobacter* Strains Isolated from Unconsolidated Subsurface Sediments. *Microbiol.* 146: 1295-1310
- Daffonchio D.**, De Biase A., Rizze A. and Sorlini C. (1998) Interspecific, Intraspecific and Interoperonic Variability in the 16S rRNA Gene of Methanogens Revealed by Length and Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis. *FEMS Microbiol. Let.* 164: 403-410
- Dean D.R.** and Jacobson M.R. (1992) Biochemical Genetics of Nitrogenase. In: G. Stacey, R.H. Burris, and H.J. Evans (eds.): *Biological Nitrogen Fixation*. Chapman and Hall, New York, pp. 763-834.
- Dees P.M.** and Ghiorse W.C. (2001) Microbial Diversity in Hot Synthetic Compost as Revealed by PCR-Amplified rRNA Sequences from Cultivated Isolates and Extracted DNA. *FEMS Microbiol. Ecol.* 35: 207-216
- Dobereiner J.** (1997) Biological Nitrogen Fixation in the Tropics: Social and Economic Contributions. *Soil. Biol. Biochem.* 29: 771-774
- Dobrovol'skaya T.G.**, Lysak L.V., Zenova G.M. and Zvyagintsev D.G. (2001) Analysis of Soil Bacterial Diversity: Methods, Potentiality, and Prospects. *Microbiol.* 70: 119-132
- Dumbeck G.** (1992) Bodenkundliche Aspekte bei der landwirtschaftlichen Rekultivierung im Rheinischen Braunkohlerevier 9: 8-11
- Eady R.R.** (1992) The Dinitrogen-Fixing Bacteria. In: Balows A., Trüper H.G., Dworkin M., Harder W., Schleifer K.-H. (eds.): *The Prokaryotes*. Second Edition, Vol I, Springer Verlag, New York, pp. 534-553

- Eikmeier N.** (1996) Untersuchungen zum Transport von bodenbewohnenden Bakterien der Gattung *Rhizobium* durch den Totengräber *Nicrophorus vespilloides* (Coleoptera, Silphidae) im Mikrokosmos. Diplomarbeit, RWTH-Aachen
- Ensign J.C.** (1992) Introduction to the Actinomycetes. In: Balows A., Trüper H.G., Dworkin M., Harder W., Schleifer K.-H. (eds.): The Prokaryotes. Second Edition, Vol. 1, Springer Verlag
- Fantroussi S.E.,** Verschuere L., Verstraete W. and Top E.M. (1999) Effect of Phenylurea Herbicides on Soil Microbial Communities Estimated by Analysis of 16S rRNA Gene Fingerprints and Community-Level Physiological Profiles. Appl. Environ. Microbiol. 65: 982-988
- Fogel G.B.,** Collins C.R., Li J. and Brunk C.F. (1999) Prokaryotic Genome Size and SSU rDNA Copy Number: Estimation of Microbial Relative Abundance from a Mixed Population. Microb. Ecol. 38: 93-113
- Fogg G.E.** and Stewart W.D.P. (1968) *In situ* Determinations of Biological Nitrogen Fixation in Antarctica. Br. Antarct. Surv. Bull. 15: 39-46
- Fox J.C.,** Ait-Khaled M., Webster A. and Emery V.C. (1991) Eliminating PCR Contamination: is UV Irradiation the Answer? J. Virol. Meth. 33: 375-382
- Franklin R.B.,** Garland J.L., Bolster C.H. and Mills A.L. (2001) Impact of Dilution on Microbial Community Structure and Functional Potential: Comparison of Numerical Simulations and Batch Culture Experiments. Appl. Environ. Microbiol. 67: 702-712
- Furlong M.A.,** Singleton D.R., Coleman D.C. and Whitman W.B. (2002) Molecular and Culture-Based Analyses of Prokaryotic Communities from an Agricultural Soil and the Burrows and Casts of the Earthworm *Lumbricus rubellus*. Appl. Environ. Microbiol. 68: 1265-1279
- Giovanni G.,** Poggio G. and Sequi P. (1975) Use of an Automatic CHN Analyser to Determine Organic and Inorganic Carbon in Soils. Commun. Soil Sci. and Plant Anal. 6: 39-49
- Gisi U.,** Schenker R., Schulin R., Stadelmann F.X. and Sticher H. (1997) Bodenökologie, 2. Neubearbeitete und erweiterte Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart New York
- Glöckner F.O.,** Zaichikov E., Belkova N., Denissova L., Pernthaler J., Pernthaler A. and Ammann R. (2000) Comparative 16S rRNA Analysis of Lake Bacterioplankton Reveals Globally Distributed Phylogenetic Clusters Including an Abundant Group of Actinobacteria. Appl. Environ. Microbiol. 66: 5053-5065
- Goodfellow M.** (1992) The Family Nocardiaceae. In: Balows A., Trüper H.G., Dworkin M., Harder W., Schleifer K.-H. (eds.): The Prokaryotes. Second Edition, Vol. 2, Springer Verlag, Chapter 51, pp. 1188-1213
- Griffiths R.I.,** Whiteley A.S., O'Donnell A.G. and Bailey M.J. (2000) Rapid Method for Coextraction of DNA and RNA from Natural Environments for Analysis of Ribosomal DNA and rRNA-Based Microbial Community Composition. Appl. Environ. Microbiol. 66: 5488-5491

- Hansen A.** (2001) BIOINFORMATIK – Ein Leitfaden für Naturwissenschaftler, Birkhäuser Verlag, Basel Boston Berlin
- Haselkorn R.** (1978) Heterocysts. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 29: 319-344
- Hayashi K.** (1992) PCR-SSCP: a Method for Detection of Mutations. *Genet. Anal. Tech. Appl.* 9: 73-79
- Henckel T.,** Friedrich M. and Conrad R. (1999) Molecular Analyses of the Methane-Oxidizing Microbial Community in Rice Field Soil by Targeting the Genes of the 16S rRNA, Particulate Methane Monooxygenase and Methanol Dehydrogenase. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1980-1990
- Henckel T.,** Jäckel U. and Conrad R. (2001) Vertical Distribution of the Methanotrophic Community after Drainage of Rice Field Soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 34: 279-291
- Hennessy L.K.,** Teare J. and Ko C. (1998) PCR Conditions and DNA Denaturants Affect Reproducibility of Single-Strand Conformation Polymorphism Patterns for BRCA1 Mutations. *Clin. Chem.* 44: 879-882
- Heuer H.,** Hartung K., Wieland G., Kramer I. and Smalla K. (1999) Polynucleotide Probes that Target a Hypervariable Region of 16S rRNA Genes To Identify Bacterial Isolates Corresponding to Bands of Community Fingerprints. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1045-1049
- Heuer H.,** Krsek M., Baker P., Smalla K. and Wellington E.M.H. (1997) Analysis of Actinomycete Communities by Specific Amplification of Genes Encoding 16S rRNA and Gel-Electrophoretic Separation in Denaturing Gradients. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3233-3241
- Higuchi R.G.** and Ochman H. (1989) Production of Single-Stranded DNA Templates by Exonuclease Digestion Following the Polymerase Chain Reaction. *Nucl. Acids. Res.* 17: 5865
- Hoffmann G.** and Teicher K. (1961) Ein kolorimetrisches Verfahren zur Bestimmung der Ureaseaktivität in Böden. *Zeitschrift für Pflanzenernährung, Düngung, Bodenkunde* 95: 55-63
- Holben W.E.** and Harris D. (1995) DNA-based Monitoring of Total Bacterial Community Structure in Environmental Samples. *Mol. Ecol.* 4: 627-631
- Holmes A.J.,** Bowyer J., Holley M.P., O'Donoghue M., Montgomery M. and Gillings M.R. (2000) Diverse, Yet-to-be-Cultured Members of the Rubrobacter Subdivision of the Actinobacteria are Widespread in Australian Arid Soils. *FEMS Microbiol. Ecol.* 33: 111-120
- Holmes A.J.,** Tujula N.A., Holley M., Contos A., James J.M., Rogers P. and Gillings M.R. (2001) Phylogenetic Structure of Unusual Aquatic Microbial Formations in Nullarbor Caves, Australia. *Environ. Microbiol.* 3: 256-264
- Holmes B.** (1992) The Genera *Flavobacterium*, *Sphingobacterium* and *Weeksellia*. In: Balows A., Trüper H.G., Dworkin M., Harder W., Schleifer K.-H. (eds.): *The Prokaryotes*. Second Edition, Vol. 4, Springer Verlag; Chapter 198, pp. 3620-3630

- Horne A.J.** (1971) The Ecology of Nitrogen Fixation of Signy Island, South Orkney Islands. Br. Antarct. Surv. Bull. 27: 843-902
- Ibelgaufits H.** (1993) Gentechnologie von A bis Z, Studienausgabe, Weinheim Cambridge: VCH, New York, Basel
- Jahnke J.** and Priefer U.B. (2002) Phototrophic Biofilms of Restored Fields in Rhenish Lignite Mining Area: The Development of Soil Algal, Bacterial and Fungal Biomass. Soil Biol. Biochem. 34: 1157-1165
- Jensen S.,** Mazhitova Z. and Zetterström R. (1997) Environmental Pollution and Child Health in the Aral Sea Region in Kazakhstan. Science of the Total Environ. 206: 187-193
- Kandeler E.** and Gerber H. (1988) Short-Term Assay of Soil Urease Activity Using Colorimetric Determination of Ammonium. Biol. Fertil. Soils 6: 68-72
- Kandeler E.,** Tscherko D., Bruce K.D., Stemmer M., Hobbs P.J., Bardgett R.D. and Amelung W. (2000) Structure and Function of the Soil Microbial Community in Microhabitats of Heavy Metal Polluted Soil. Biol. Fertil. Soils 32: 390-400
- Keeney D.R.** and Nelson D.W. (1992) Nitrogen – Inorganic Forms. In: Black C.A., Evans D.D., J. L. White, L. E. Ensminger, F. E. (eds.): Clark Methods of Soil Analysis. Am. Soc. Agron., Madison WI, USA, Part 2 pp. 643-698
- Kirshtein J.D.,** Paerl H.W. and Zehr J. (1991) Amplification, Cloning, and Sequencing of a *nifH* Segment from Aquatic Microorganisms and Natural Communities. Appl. Environ. Microbiol. 57: 2645-2650
- Kloos K.,** Hüsken U.M. and Bothe H. (1998) DNA-Probing for Genes Coding for Denitrification, N₂-Fixation and Nitrification in Bacteria Isolated from Different Soils. Z. Naturforsch. 53c: 69-81
- Klucas R.V.** (1991) Associative Nitrogen Fixation in Plants. In: M.J. Dilworth (ed.) Biology and Biochemistry of Nitrogen Fixation. pp. 187-198
- Kowalchuk G.A.,** Stephen J.R., Deboer W., Prosser J.I., Embley T.M. and Woldendorp J.W. (1997) Analysis of Ammonia-Oxidizing Bacteria of the β Subdivision of the Class Proteobacteria in Coastal Sand Dunes by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Sequencing of PCR-Amplified 16S Ribosomal DNA Fragments. Appl. Environ. Microbiol. 63: 1489-1497
- Kowalchuk G.A.,** Naoumenko Z.S., Derikx P.J.L., Felske A., Stephen J.R. and Arkhipchenko I.A. (1999) Molecular Analysis of Ammonia-Oxidizing Bacteria of the β Subdivision of the Class *Proteobacteria* in Compost and Composted Materials. Appl. Environ. Microbiol. 65: 396-403
- Kremer C.** (1999) Untersuchungen zum Stickstoffhaushalt der Bodenoberflächenschicht rekultivierter Böden des rheinischen Braunkohletagebaus im 1. und 3. Jahr des Luzerneanbaus. Diplomarbeit, RWTH-Aachen
- Laguerre G.,** Nour S.M., Macheret V., Sanjuan J., Drouin P. and Amarger N. (2001) Classification of Rhizobia Based on *nodC* and *nifH* Gene Analysis Reveals a Close Phylogenetic Relationship among *Phaseolus vulgaris* Symbionts. Microbiol. 147: 981-993

- Lawton J.H.** (1994) What Do Species Do in Ecosystems? *Oikos* 71: 367-374
- Lee D.**, Zo Y. and Kim S. (1996) Nonradioactive Method to Study Genetic Profiles of Natural Bacterial Communities by PCR-Single-Strand-Conformation Polymorphism. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3112-3120
- Lee D.-H.**, Noh S.-A. and Kim C.-K. (2000) Development of Molecular Biological Methods to Analyze Bacterial Species Diversity in Freshwater and Soil Ecosystems. *J. Microbiol.* 38: 11-17
- Lee S.** and Fuhrman J.A. (1990) DNA Hybridization to Compare Species Composition of Natural Bacterioplankton Assemblages. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 739-746
- Lindahl V.** and Bakken L.R. (1995) Evaluation of Methods for Extraction of Bacteria from Soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 16: 135-142
- Little J.W.** (1967) An Exonuclease Induced by Bacteriophage Lambda. *J. Biol. Chem.* 242: 679-686
- Loveless T.M.** and Bishop P.E. (1999) Identification of Genes Unique to Mo-Independent Nitrogenase Systems in Diverse Diazotrophs. *Can. J. Microbiol.* 45: 312-317
- Lowell J.L.** and Klein D.A. (2001) Comparative Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) and Microscopy-Based Analysis of Nitrogen Cultivation Interactive Effects on the Fungal Community of a Semiarid Steppe Soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 36: 85-92
- Ludemann H.** and Conrad R. (2000) Molecular Retrieval of Large 16S rRNA Gene Fragments from an Italian Rice Paddy Soil Affiliated with the Class Actinobacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 23: 582-584
- Madigan M.T.**, Martinko J.M. and Parker J. (2000) Brock, Biology of Microorganisms. Ninth Edition, Prentice Hall International, Inc.
- Magurran A.E.** (1988) Ecological Diversity and its Measurement. Princeton University Press, Princeton, N.J.
- Maidak B.L.**, Cole J.R., Lilburn T.G., Parker C.T., Saxman P.R., Stedwick J.M., Garrity G.M., Li B., Olsen G.J., Pramanik S., Schmidt T.M. and Tiedje J.M. (2000) The RDP (Ribosomal Database Project) Continues. *Nucleic Acids Res.* 28: 173-174
- Marilley L.** and Aragno M. (1999) Phylogenetic Diversity of Bacterial Communities from Different Proximity to *Lolium perenne* and *Trifolium repens* roots. *Appl. Soil. Ecol.* 13: 127-136
- McNaughton S.J.** (1977) Diversity and Stability of Ecological Communities: a Comment on the Role of Empiricism in Ecology. *Am. Nat.* 111: 515-525
- Mergel A.**, Schmitz O., Mallmann T. and Bothe H. (2001) Relative Abundance of Denitrifying and Dinitrogen-Fixing Bacteria in Layers of a Forest Soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 36: 33-42
- Minashina N.G.** (1995) Soil Environmental Changes and Soil Reclamation Problems in the Aral Sea Basin. *Eurasian Soil Science* 28: 184-195

- Moriarty D.J.W.** and O'Donohue M.J. (1993) Nitrogen Fixation in Seagrass Communities During Summer in the Gulf of Carpentaria, Australia. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.* 44: 117-125
- Morris S.A.**, Radajewski S., Willison T.W. and Murrell J.C. (2002) Identification of the Functionally Active Methanotroph Population in a Peat Soil Microcosm by Stable-Isotope Probing. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 1446-1453
- Murray P.A.** and Zinder S. (1984) Nitrogen Fixation by a Methanogenic Archaeobacterium. *Nature* 312: 284-286
- Muyzer G.** and Smalla K. (1998) Application of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) and Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TGGE) in Microbial Ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* 73: 127-141
- Muyzer G.**, De Waal E.C. and Uitterlinden A.G. (1993) Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 695-700
- Muyzer G.**, Hottenträger S., Teske A. and Wawer C. (1995) Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of PCR-Amplified 16S rDNA – A New Molecular Approach to Analyse the Genetic Diversity of Mixed Microbial Communities. *Molec. Microb. Ecol. Manual* 3.4.4.: 1-22
- Myers R.M.**, Maniatis T. and Lerman L.S. (1987) Detection and Localization of Single Base Changes by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Meth. Enzymol.* 155: 501-527
- Naeem S.**, Thompson L.J., Lawler S.P., Lawton J.H. and Woodfin R.M. (1994) Declining Biodiversity Can Alter the Performance of Ecosystems. *Nature* 368: 734-737
- Nakao H.** and Popovic T. (1998) Development of a Rapid Ribotyping Method for *Corynebacterium diphtheriae* by Using PCR Single-Strand Conformation Polymorphism: Comparison with Standard Ribotyping. *J. Microbiol. Meth.* 31: 127-134
- Nakatsu C.H.**, Torsvik V. and Øvreås L. (2000) Soil Community Analysis Using DGGE of 16S rDNA Polymerase Chain Reaction Products. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 64: 1382-1388
- Navone R.** (1964) Proposed Method for Nitrate in Potable Waters. *J. AWWA* 56: 781-783
- Neefs J.-M.**, Van der Peer Y., De Rejk P., Chapelle S. and De Wachter R. (1993) Compilation of Small Ribosomal Subunit RNA Structures. *Nucleic Acids Res.* 21: 3025-3049
- Newton C.R.** and Graham A. (1994) PCR. BIOS Scientific Publisher Limited, Oxford
- Niederhauser C.**, Höfelein C., Wegmüller B., Lüthy J. and Candrian U. (1994) Reliability of PCR Decontamination Systems. *PCR Meth. Appl.* 4: 117-123

- Normander B.** and Prosser J.I. (2000) Bacterial Origin and Community Composition in the Barley Phytosphere as a Function of Habitat and Presowing Conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4372-4377
- Ogram A.**, Sayler G.S. and Barkay T. (1988) The Extraction and Purification of Microbial DNA from Sediments. *J. Microbiol. Methods* 7: 57-66
- Ohkuma M.**, Noda S. and Kudo T. (1999) Phylogenetic Diversity of Nitrogen Fixation Genes in the Symbiotic Microbial Community in the Gut of Diverse Termites. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4926-4934
- Ohkuma M.**, Noda S., Usami R., Horikoshi K. and Kudo T. (1996) Diversity of Nitrogen Fixation Genes in the Symbiotic Intestinal Microflora of the Termite *Reticulitermes speratus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2747-2752
- Olsen G.J.**, Lane D.J., Giovannoni S.J., Pace N.R. and Stahl D.A. (1986) Microbial Ecology and Evolution: a Ribosomal RNA Approach. *Annu. Rev. Microbiol.* 40: 337-365
- Olson J.B.**, Litaker R.W. and Paerl H.W. (1999) Ubiquity of Heterotrophic Diazotrophs in Marine Microbial Mats. *Aquat. Microb. Ecol.* 19: 29-36
- Olson J.B.**, Steppe T.F., Litaker R.W. and Paerl H.W. (1998) N₂-Fixing Microbial Consortia Associated with the Ice Cover of Lake Bonney, Antarctica. *Microb. Ecol.* 36: 231-238
- Orita M.**, Iwahana H., Kanazawa H., Hayashi K. and Sekiya T. (1989) Detection of Polymorphisms of Human DNA by Gel Electrophoresis as Single Strand Conformation Polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2766-2770
- Øvreås L.**, Forney L., Daae F.L. and Torsvik V. (1997) Distribution of Bacterioplankton in Meromictic Lake Saelevannet, as Determined by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of PCR-Amplified Gene Fragments Coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3367-3373
- Pace N.R.** (1996) New Perspective on the Natural Microbial World: Microbial Ecology. *ASM News* 62: 463-470
- Page R.D.M.** (1996) TREEVIEW: An Application to Display Phylogenetic Trees on Personal Computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12: 357-358
- Parkin T.B.** (1990) Characterizing the Variability of Soil Denitrification. In: N.P. Revsbech, J. Sørensen (eds.) *Denitrification in Soil and Sediment*. Plenum Press, New York, pp. 212-228
- Pau R.N.** (1991) The Alternative Nitrogenases. In: Dilworth M.J., Glenn A.R., *Biology and Biochemistry of Nitrogen-Fixation*. pp. 37-57
- Peters S.**, Koschinsky S., Schwieger F. and Tebbe C. (2000) Succession of Microbial Communities During Hot Composting as Detected by PCR-Single-Strand-Conformation Polymorphism-Based Genetic Profiles of Small-Subunit rRNA Genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 930-936
- Piceno Y.M.**, Noble P.A. and Lovell C.R. (1999) Spatial and Temporal Assessment of Diazotroph Assemblage Composition in Vegetated Salt Marsh Sediments Using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis. *Microb. Ecol.* 38: 157-167

- Pichard S.L.**, Campbell L. and Paul J.H. (1997) Diversity of the Ribulose Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase Form Gene (*rbcL*) in Natural Phytoplankton Communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3600-3606
- Pimm S.L.** (1984) The Complexity and Stability of Ecosystems. *Nature* 307: 321-326
- Poly F.**, Ranjard L., Nazaret S., Gourbière F. and Monrozier L.J. (2001) Comparison of *nifH* Gene Pools in Soils and Soil Microenvironments with Contrasting Properties. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2255-2262
- Porteus L.A.**, Seidler R.J. and Watrud L.S. (1997) An Improved Method for Purifying DNA from Soil for Polymerase Chain Reaction Amplification and Molecular Ecology Applications. *Mol. Ecol.* 6: 787-791
- Putman R.J.** (1994) *Community Ecology*. Chapman & Hall Publishers, London, England
- Qiu X.**, Wu L., Huang H., McDonel P.E., Palumbo A.V., Tiedje J.M. and Zhou J. (2001) Evaluation of PCR-Generated Chimeras, Mutations, and Heteroduplexes with 16S rRNA Gene-Based Cloning. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 880-887
- Ranjard L.**, Poly F. and Nazaret S. (2000) Monitoring Complex Bacterial Communities Using Culture-Independent Molecular Techniques: Application to Soil Environment. *Res. Microbiol.* 151: 167-177
- Reichenbach H.** (1992) The Order Cytophagales. In: Balows A., Trüper H.G., Dworkin M., Harder W., Schleifer K.-H. (eds.): *The Prokaryotes*. Second Edition, Vol. 4, Springer Verlag; Chapter 199, pp. 3631-3675
- Ribbe M.**, Gadkari D. and Meyer O. (1997) N₂ Fixation by *Streptomyces thermoautotrophicus* Involves a Molybdenum-Dinitrogenase and a Manganese-Superoxide Oxidoreductase that Couple N₂ Reduction to the Oxidation of Superoxide Produced from O₂ by a Molybdenum-CO Dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 272: 26627-26633
- Robson R.L.** (1991) In: Dilworth M.J., Glenn A.R., *Biology and Biochemistry of Nitrogen-Fixation*. pp. 142-161
- Rosado A.S.**, Duarte G.F., Seldin L. and van Elsas J. D. (1998) Genetic Diversity of *nifH* Gene Sequences in *Paenibacillus azotofixans* Strains and Soil Samples Analyzed by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of PCR-Amplified Gene Fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2770-2779
- Rosenzweig M.L.** (1995) *Species Diversity in Space and Time*. Cambridge University Press, New York
- Rotthauwe J.H.**, Witzel K.P. and Liesack W. (1997) The Ammonia Monooxygenase Structural Gene *amoA* as a Functional Marker: Molecular Fine-Scale Analysis of Natural Ammonia-Oxidizing Populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4704-4712
- Saiki R.K.**, Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B. and Erlich H.A. (1988). Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science* 239: 487-491

- Saiki R.**, Scharf S., Falloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A. and Arnheim N. (1985). Enzymatic Amplification of β -Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sick Cell Anemia. *Science* 230: 1350-1354
- Sambrook J.**, Fritsch E.F. and Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning* (2nd Edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Sanger F.**, Nicklen S. and Coulson A.R. (1977) DNA-Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74: 5463-5467
- Schachtschabel P.**, Blume H.-P., Brümmer G., Hartge K.-H. und Schwertmann U. (1989) *Lehrbuch der Bodenkunde*, 12., neu bearbeitete Auflage, Ferdinand Enke Verlag Stuttgart
- Scharpf H.C.** and Wehrmann J. (1976) Die Bedeutung des Mineralstickstoffvorrats des Bodens zu Vegetationsbeginn für die Bemessung der N-Düngung zu Winterweizen. *Landw. Forsch.* 32: 100-114
- Scheinert P.**, Krausse R., Ullmann U., Söller R. and Krupp G. (1996) Molecular Differentiation of Bacteria by PCR Amplification of the 16S-23S rRNA Spacer. *J. Microbiol. Meth.* 26: 103-117
- Schinner F.**, Öhlinger R., Kandeler E. und Margesin R. (1993) *Bodenbiologische Arbeitsmethoden*. (2. Auflage). Springer-Verlag, Berlin
- Schlegel H.G.** and Schmidt K. (1985) *Allgemeine Mikrobiologie*, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, p. 176
- Schmalenberger A.**, Schwieger F. and Tebbe C. (2001) Effect of Primers Hybridizing to Different Evolutionarily Conserved Regions of the Small-Subunit rRNA Gene in PCR-Based Microbial Community Analyses and Genetic Profiling. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 3557-3563
- Schroeder D.** (1983) *Bodenkunde in Stichworten*. 4. Auflage, Ferdinand Hirt Verlag
- Schwieger F.** and Tebbe C. (1998) A New Approach to Utilize PCR-Single-Strand-Conformation Polymorphism for 16S rRNA Gene-Based Microbial Community Analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4870-4876
- Schwieger F.** and Tebbe C. (2000) Effect of Field Inoculation with *Sinorhizobium meliloti* L33 and the Composition of Bacterial Communities in Rhizospheres of a Target Plant (*Medicago sativa*) and a Non-Target Plant (*Chenopodium album*) – Linking of 16S rRNA Gene-Based Single-Strand Conformation Polymorphism Community Profiles to the Diversity of Cultivated Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3556-3565
- Sevilla M.Q.**, de Oliveira A., Baldani I. and Kennedy C. (1998) Contributions of the Bacterial Endophyte *Acetobacter diazotrophicus* to Sugarcane Nutrition: a Preliminary Study. *Symbiosis* 25: 181-192
- Shaffer B.T.**, Widmer F., Proteous L.A. and Seidler R.J. (2000) Temporal and Spatial Distribution of the *nifH* Gene of N₂ Fixing Bacteria in Forests and Clearcuts in Western Oregon. *Microb. Ecol.* 39: 12-21

- Sheffield V.C.**, Beck J.S., Kwitek A.E., Sandstrom D.W. and Stone E.M. (1993) The Sensitivity of Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis for the Detection of Single Base Substitutions. *Genomics* 16: 325-332
- Sihorsch W.** (1992) Die neue Agrarlandschaft – Landwirtschaft und landwirtschaftliche Rekultivierung im Wandel –. *Braunkohle* 9: 5-8
- Smit E.**, Leeftang P., Gommans S., van den Broek J., van Mil S. and Wernars K. (2001) Diversity and Seasonal Fluctuations of the Dominant Members of the Bacterial Soil Community in a Wheat Field as Determined by Cultivation and Molecular Methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2284-2291
- Stackebrandt E.** and Rainey F.A. (1995) Partial and Complete 16S rDNA Sequences, their Use in Generation of 16S rDNA Phylogenetic Trees and their Implications in Molecular Ecological Studies. In: *Molecular Microbial Ecology Manual* (eds. Akkermans, A.D.L., van Elsas, J.D. and DeBruijn, F.J.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 3.1.1: 1-17
- Steffan R.J.**, Goksoyr J., Bej A.K. and Atlas R.M. (1988) Recovery of DNA from Soils and Sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2908-2915
- Steppe T.F.**, Olson J.B., Paerl H.W., Litaker R.W. and Belnap J. (1996) Consortial N₂ Fixation: a Strategy for Meeting Nitrogen Requirements of Marine and Terrestrial Cyanobacterial Mats. *FEMS Microbiol. Ecol.* 21: 149-156
- Steubing L.** and Fangmeier A. (1992) *Pflanzenökologisches Praktikum*, Ulmer Stuttgart
- Teske A.**, Wawer C., Muyzer G. and Ramsing N.B. (1996) Distribution of Sulfate-Reducing Bacteria in a Stratified Fjord (Mariager Fjord, Denmark) as Evaluated by Most-Probable-Number Counts and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of PCR-Amplified Ribosomal DNA Fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1405-1415
- Tibbles B.J.** and Rawlings D.E. (1994) Characterization of Nitrogen-Fixing Bacteria from a Temperate Saltmarsh Lagoon, Including Isolates That Produce Ethane from Acetylene. *Microb. Ecol.* 27: 65-79
- Tjepkema J.D.**, Ormerod W. and Torrey J.G. (1980) Vesicle Formation and Acetylene Reduction Activity in *Frankia* sp. CP11 Cultured in Defined Nutrient Media. *Nature* 287: 633-635
- Torsvik V.**, Daae F.L., Sandaa R.-A. and Øvreås L. (1998) Novel Techniques for Analysing Microbial Diversity in Natural and Perturbed Environments. *J. Biotechnol.* 64: 53-62
- Torsvik V.**, Goksøyr J. and Daae F.L. (1990) High Diversity in DNA of Soil Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 782-787
- Torsvik V.**, Sørheim R. and Goksøyr J. (1996) Total Bacterial Diversity in Soil and Sediment – a Review. *J. Ind. Microbiol.* 17: 170-178
- Tsai Y.-L.** and Olson B.H. (1991) Rapid Method for Direct Extraction of DNA from Soil and Sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1070-1074

- Ueda T.**, Suga Y., Yashiro N. and Matsuguchi T. (1995) Remarkable N₂-Fixing Bacterial Diversity Detected in Rice Roots by Molecular Evolutionary Analysis of *nifH* Gene Sequences. *J. Bacteriol.* 177: 1414-1417
- Urzi C.**, Brusetti L., Salamone P., Sorlini C., Stackebrandt E. and Daffonchio D. (2001) Biodiversity of Geodermatophilaceae Isolated from Altered Stones and Monuments in the Mediterranean Basin. *Environ. Microbiol.* 3: 471-479.
- Von Wintzingerode F.**, Göbel U.B. and Stackebrandt E. (1997) Determination of Microbial Diversity in Environmental Samples: Pitfalls of PCR-based rRNA Analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* 21: 213-229
- Wawer C.** and Muyzer G. (1995) Genetic Diversity of *Desulfovibrio* spp. in Environmental Samples Analyzed by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of [NiFe] Hydrogenase Gene Fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2203-2210
- Widjoatmodjo M.N.**, Fluit A.C. and Verhoef J. (1994) Rapid Identification of Bacteria by PCR-Single-Strand Conformation Polymorphism. *J. Clin. Microbiol.* 32: 3002-3007
- Widjoatmodjo M.N.**, Fluit A.C. and Verhoef J. (1995) Molecular Identification of Bacteria by Fluorescence-Based PCR-Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis of the 16S rRNA Gene. *J. Clin. Microbiol.* 33: 2601-2606
- Widmer F.**, Shaffer B.T., Porteous L.A. and Seidler R.J. (1999) Analysis of *nifH* Gene Pool Complexity in Soil and Litter at a Douglas Fir Forest Site in the Oregon Cascade Mountain Range. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 374-380
- Woese C.R.** (1987) Bacterial Evolution. *Microbiol. Rev.* 51: 221-271
- Young J.P.W.** (1992) Phylogenetic Classification of Nitrogen-Fixing Organisms. In: G. Stacey, R.H. Burris, and H.J. Evans (eds.), *Biological Nitrogen Fixation*. Chapman and Hall, New York, pp. 43-86
- Zani S.**, Mellon M.T., Collier J.L. and Zehr J.P. (2000) Expression of *nifH* Genes in Natural Microbial Assemblages in Lake George, New York, Detected by Reverse Transcriptase PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3119-3124
- Zehr J.P.**, Mellon M. and Zani S. (1998) New Nitrogen-Fixing Microorganisms Detected in Oligotrophic Oceans by Amplification of Nitrogenase (*nifH*) Genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3444-3450
- Zehr J.P.**, Mellon M., Braun S., Litaker W., Steppe T. and Paerl H.W. (1995) Diversity of Heterotrophic Nitrogen Fixation Genes in a Marine Cyanobacterial Mat. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2527-2532
- Zumstein E.**, Moletta R. and Godon J.-J. (2000) Examination of Two Years of Community Dynamics in an Anaerobic Bioreactor Using Fluorescence Polymerase Chain Reaction (PCR) Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis. *Environ. Microbiol.* 2: 69-78

9 Anhang

Tabelle 18: Datenbankvergleiche der 16S rDNA-Sequenzen der Eubakterien

Bande	Boden	Sequenz mit größter Homologie	Homologie (%)
EG 1	Gartenboden	Bacterium P16L841 (AF214140.1)	396/404 (98 %)
EW 1	Waldboden	Uncultured bacterium clone L013.5 (AF358019.1)	404/408 (99 %)
ER 1	Rekultivierungs- boden	Beta proteobacterium Wuba68 (AF336359.1)	399/408 (97 %)
ER 2	Rekultivierungs- boden	Bacterium P16L841 (AF214140.1)	401/405 (99 %)
EA 1	Aralseeboden	Agricultural soil bacterium clone SC-I-41 (AJ252635.1) u. a.	398/400 (99 %)
EA 2	Aralseeboden	<i>Flavobacterium</i> sp. A265 (U85888.1)	395/405 (97 %)
EA 3	Aralseeboden	<i>Delftia</i> sp. AN3 (AY052781.1) u. a.	406/408 (99 %)
EA 4	Aralseeboden	<i>Burkholderia cepacia</i> isolate WS11.7 (AF311972.1) u.a.	405/408 (99 %)
EA 5	Aralseeboden	Uncultured actinobacterium MERTZ_OCM_206 (AF424423.1)	367/412 (89 %)
EA 6	Aralseeboden	<i>Sporosarcina urea</i> (AF202057) u.a.	409/410 (99 %)
EA 7	Aralseeboden	<i>Burkholderia cepacia</i> isolate WS11.7 (AF311972.1) u.a.	401/410 (97 %)
EA 8	Aralseeboden	Unidentified bacterium wb1_J07 (AF317767.1)	370/414 (89 %)
EA 9	Aralseeboden	Uncultured actinobacterium MERTZ_OCM_206 (AF424423.1)	375/413 (90 %)

Tabelle 19: Datenbankvergleiche der 16S rDNA-Sequenzen der Aktinomyceten

Bande	Boden	Sequenz mit größter Homologie	Homologie (%)
AG 1	Gartenboden	Unidentified eubacterium (AJ232831.1)	281/285 (98 %)
AG 2	Gartenboden	Unidentified eubacterium (AJ232831.1)	281/285 (98 %)
AG 3	Gartenboden	Uncultured bacterium TA7 (AF252312.1)	283/289 (97 %)
AG 4	Gartenboden	Uncultured bacterium TA7 (AF252312.1)	283/289 (97 %)
AW 1	Waldboden	<i>Streptomyces</i> sp. OB-35 (AF112179.2) u.a.	278/285 (97 %)
AW 2	Waldboden	<i>Acidothermus cellulolyticus</i> (AJ007290.1)	274/277 (98 %)
AW 3	Waldboden	<i>Acidothermus cellulolyticus</i> (AJ007290.1)	279/285 (98 %)
AW 4	Waldboden	<i>Acidothermus cellulolyticus</i> (AJ007290.1)	280/285 (98 %)
AW 5	Waldboden	<i>Acidothermus cellulolyticus</i> (AJ007290.1)	278/285 (97 %)
AW 6	Waldboden	<i>Streptomyces</i> sp. VTT E-99-1335 (B323) (AF429399.1) u.a.	280/285 (98 %)
AW 7	Waldboden	<i>Acidothermus cellulolyticus</i> (AJ007290.1)	281/285 (98 %)
AR 1	Rekultivierungs- boden	Uncultured bacterium ARFS-5 (AJ277689.1)	283/285 (99 %)
AR 2	Rekultivierungs- boden	<i>Streptomyces padanus</i> (AF455813.1) u.a.	285/285 (100 %)
AR 3	Rekultivierungs- boden	Uncultured bacterium ARFS-5 (AJ277689.1)	283/285 (99 %)
AR 4	Rekultivierungs- boden	<i>Streptomyces padanus</i> (AF455813.1) u.a.	285/285 (100 %)
AR 5	Rekultivierungs- boden	<i>Streptomyces padanus</i> (AF455813.1) u.a.	285/285 (100 %)
AR 6	Rekultivierungs- boden	Uncultured bacterium ARFS-5 (AJ277689.1)	283/285 (99 %)
AR 7	Rekultivierungs- boden	<i>Blastococcus</i> sp. BC448 (AJ316571.1) u.a.	284/285 (99 %)
AR 8	Rekultivierungs- boden	<i>Streptomyces padanus</i> (AF455813.1) u.a.	285/285 (100 %)
AR 9	Rekultivierungs- boden	Earthworm cast bacterium C10D1 (AY039461.1)	284/285 (99 %)
AA 1	Aralseeboden	<i>Streptomyces</i> sp. IM-7235 (AF131574.1) u.a.	283/285 (99 %)
AA 2	Aralseeboden	<i>Streptomyces</i> sp. VTT E-99-1335 (B323) (AF429399.1) u.a.	285/285 (100 %)
AA 3	Aralseeboden	<i>Streptomyces</i> sp. IM-7235 (AF131574.1) u.a.	284/285 (99 %)
AA 4	Aralseeboden	Uncultured bacterium #0319-7L14 (AF234156.1)	266/284 (93 %)
AA 5	Aralseeboden	Uncultured bacterium #0319-7L14 (AF234156.1)	274/284 (96 %)
AA 6	Aralseeboden	Uncultured bacterium #0319-7L14 (AF234156.1)	273/286 (95 %)
AA 7	Aralseeboden	Uncultured bacterium TA7 (AF252312.1)	284/290 (97 %)
AA 8	Aralseeboden	<i>Streptomyces</i> sp. VTT E-99-1333 (B306) (AF429397.1) u.a.	285/285 (100 %)
AA 9	Aralseeboden	<i>Streptomyces</i> sp. VTT E-99-1333 (B306) (AF429397.1) u.a.	285/285 (100 %)
AA 10	Aralseeboden	<i>Nocardioides</i> sp. (NCFB3007) (X76179.1) u.a.	284/285 (99 %)
AA 11	Aralseeboden	Uncultured <i>Streptomyces</i> sp. Clone ActinM3s20 (AF424762.1)	287/288 (99 %)
AA 12	Aralseeboden	<i>Streptomyces</i> sp. VTT E-99-1333 (B306) (AF429397.1) u.a.	285/285 (100 %)
AA 13	Aralseeboden	Uncultured soil bacterium clone 528-1 (AF423273.1)	281/287 (97 %)
AA 14	Aralseeboden	Uncultured bacterium #0319-7L14 (AF234156.1)	271/286 (94 %)
AA 15	Aralseeboden	<i>Streptomyces</i> sp. OB-23 (AF112177.1) u.a.	285/285 (100 %)
AA 16	Aralseeboden	<i>Streptomyces lateritius</i> (AF454764.1) u.a.	285/285 (100 %)
AA 17	Aralseeboden	Uncultured bacterium #0319-7L14 (AF234156.1)	272/285 (95 %)

Tabelle 20: Datenbankvergleiche der *nifH*-Sequenzen

Bande	Boden	Sequenz mit größter Homologie	Homologie (%)
NG 1	Gartenboden	Uncultured nitrogen-fixing bacterium B3 (AF099785.1)	253/368 (95 %)
NW 1	Waldboden	Uncultured nitrogen-fixing bacterium B34 (AF099794.1)	309/368 (83 %)
NW 2	Waldboden	Uncultured nitrogen-fixing bacterium B12 (AF099788.1)	315/368 (85 %)
NW 3	Waldboden	Uncultured nitrogen-fixing bacterium B12 (AF099788.1)	313/368 (85 %)
NW 4	Waldboden	Uncultured nitrogen-fixing bacterium B34 (AF099794.1)	311/368 (84 %)
NW 5	Waldboden	Uncultured nitrogen-fixing bacterium B12 (AF099788.1)	306/360 (85 %)
NW 6	Waldboden	Uncultured nitrogen-fixing bacterium B12 (AF099788.1)	313/368 (85 %)
NW 7	Waldboden	Uncultured nitrogen-fixing bacterium B34 (AF099794.1)	315/368 (85 %)
NW 8	Waldboden	Uncultured nitrogen-fixing bacterium B34 (AF099794.1)	310/368 (84 %)
NR 1	Rekultivierungs- boden	Bacterial clone TKY12 (D83104.1)	101/116 (87 %)
NR 2	Rekultivierungs- boden	Unidentified marine eubacterium isolate Lower Mat 55 (U23637.1)	231/280 (82 %)
NR 3	Rekultivierungs- boden	Unidentified marine eubacterium isolate Lower Mat 55 (U23637.1)	191/233 (81 %)
NR 4	Rekultivierungs- boden	<i>Azotobacter vinelandii</i> (M20568.1)	287/327 (87 %)
NR 5	Rekultivierungs- boden	<i>Azotobacter vinelandii</i> (M20568.1)	287/327 (87 %)
NR 6	Rekultivierungs- boden	<i>Nostoc</i> sp. (AF124379.1)	318/322 (98 %)
NR 7	Rekultivierungs- boden	<i>Fischerella</i> Utex1931 alternative nitrogenase reductase (<i>nifH</i>) (U49515.1)	270/320 (84 %)
NR 8	Rekultivierungs- boden	Unidentified marine eubacterium isolate Lower Mat 55 (U23637.1)	218/270 (80 %)
NR 9	Rekultivierungs- boden	Unidentified marine eubacterium isolate Lower Mat 55 (U23637.1)	216/269 (80 %)
NR 10	Rekultivierungs- boden	Unidentified marine eubacterium isolate Lower Mat 55 (U23637.1)	218/270 (80 %)
NA 1	Aralseeboden	<i>Sinorhizobium</i> sp. GR-06 und GR-X8 (AF275671.1)	291/338 (86 %)
NA 2	Aralseeboden	Uncultured bacterium NR1614 (AF035498.1)	210/237 (88 %)
NA 3	Aralseeboden	<i>Sinorhizobium</i> sp. GR-06 und GR-X8 (AF275671.1)	283/328 (86 %)
NA 4	Aralseeboden	<i>Azomonas agilis</i> (AF216883.1)	295/324 (91 %)
NA 5	Aralseeboden	Unidentified nitrogen-fixing bacteria clone X7 (AF216892.1)	160/182 (87 %)
NA 6	Aralseeboden	Unidentified bacterium (AF016600)	172/207 (83 %)
NA 7	Aralseeboden	Marine proteobacterium WC1-2 (LW) (U43442.1)	158/188 (84 %)
NA 8	Aralseeboden	Unidentified bacterium (AF016600.1)	172/207 (83 %)
NA 9	Aralseeboden	Uncultured bacterium clone 15 (70) (AF331990.1)	278/317 (87 %)
NA 10	Aralseeboden	Unidentified nitrogen-fixing bacterium clone C1 (AF216927.1)	303/336 (90 %)
NA 11	Aralseeboden	Uncultured nitrogen-fixing bacterium clone MB57S3 (AF329993.1)	88/101 (87 %)
NA 12	Aralseeboden	Uncultured bacterium clone BS0799 (2130) (AY040520.1)	147/180 (81 %)

10 Danksagung

Bei Frau Prof. Dr. U. Priefer möchte ich mich für die Bereitstellung des Themas, die freie Arbeitsatmosphäre, ihre Diskussionsbereitschaft und ihre Unterstützung bedanken. Herrn Prof. Dr. Klinner danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Für die engagierte Betreuung dieser Arbeit im Labor sowie seine Unterstützung und sein Interesse geht ein herzliches Dankeschön an Bob. Bei Zhang möchte ich mich für die Begleitung der ersten zwei Jahre und die Einführung in das chinesische Englisch bedanken. Für die hilfreiche Unterstützung und die wertvollen Tips bei der Optimierung der funktionellen SSCP danke ich Christoph Tebbe und Achim Schmalenberger.

Mein Dank gilt der gesamten Bodenöko-Gruppe für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, im besonderen Jürgen für seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft und die guten Ideen und Herrn Jahnke für die Hilfe bei den chemischen und physikalischen Bodenuntersuchungen. Maria danke ich für ihre ansteckende, gute Laune, den sportlichen Ausgleich in Form des wöchentlichen Joggens und der freundlichen Überlassung der Erde ihres Gartens.

Meinen beiden Forschungspraktikantinnen, Sabine Kahlau und Silke Grannemann, sei an dieser Stelle für ihre engagierte und gute Arbeit, die maßgeblich in diese Arbeit eingeflossen ist, und für die nette Zusammenarbeit im Labor gedankt.

Für das Korrigieren dieser Arbeit und die hilfreiche konstruktive Kritik geht ein herzliches Dankeschön an Verena Hoppmann, Jürgen Prell, Antje Wichels und Herrn Jahnke. Thomas Horstmann bin ich zutiefst für jegliche Hilfe in Sachen Computer dankbar.

Allen Freunden, die mich während dieser Zeit unterstützt haben, besonders Verena Hoppmann und Tanja Gehring möchte ich ebenfalls danken.

Falk danke ich für seine Liebe, sein Verständnis und seinen Rückhalt, die mich durch alle Höhen und Tiefen dieser Arbeit begleitet haben.

Ein herzlicher Dank gilt meinen Eltern, die mir das Studium in dieser Form ermöglicht haben.

11 Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name: Anja Seibold
Anschrift: Pumpwerkstr.3
69502 Hemsbach
Telefon: 06201/4709444
Email: Anja.Seibold@web.de

Geburtsdatum: 14. April 1973
Geburtsort: Stade
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulischer Werdegang:

1979 - 1983 Grundschule Radenberg, Wuppertal
1983 - 1992 Städtisches Gymnasium, Wuppertal

Akademische Ausbildung:

10/92 -06/97 Studium Diplom-Biologie, RWTH-Aachen
06/97 - 06/98 Diplomarbeit, Biologische Anstalt Helgoland
08/98 - 12/01 Doktorarbeit, Institut für Biologie I (Ökologie des Bodens),
RWTH-Aachen