

**Diversität und Abundanz des Ribulose-1,5-bisphosphat
Carboxylase/Oxygenase (RubisCO) -Gens *cbbL* autotropher
Bakterien in Agrarböden**

Draženka Selesi

GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit
Institut für Bodenökologie

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Eingereicht am: **28. April 2004**

Tag der mündlichen Prüfung: **12. November 2004**

1. Gutachter: **Prof. Dr. Anton Hartmann**

2. Gutachter: **Prof. Dr. Jörg Overmann**

*Jetzt sind die guten alten Zeiten,
nach denen wir uns in zehn Jahren zurücksehnen werden.*

Peter Ustinov

meiner Familie

Publikationsliste

Selesi, D., I. Pattis, M. Schmid, und A. Hartmann. 2002. CO₂-fixierende Bakterien in Agrarböden unterschiedlicher Nutzung; RubisCO-Gene als molekulare Marker. *Mitteilung der Bodenkundlichen Gesellschaft* **99**: 125-126.

Miltner, A., F. D. Kopinke, R. Kindler, D. Selesi, A. Hartmann, und M. Kästner. 2004. Non-phototrophic CO₂ fixation by soil microorganisms. *Plant and Soil*, in Druck.

Selesi, D., M. Schmid, und A. Hartmann. 2004. Diversity of 'green-like' and 'red-like' ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit genes (*cbbL*) in differently managed agricultural soils. *Applied and Environmental Microbiology*, in Druck.

Stein, S., D. Selesi, R. Schilling, I. Pattis, M. Schmid, und A. Hartmann. 2004. Hydrogen (H₂) treatment of soils affects general soil microbial activity, carbon dioxide fixation and the structure of soil bacterial community. *Soil Biology and Biochemistry*, eingereicht.

Selesi, D., I. Pattis, M. Schmid und A. Hartmann. Quantification of 'red-like' ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase genes (*cbbL*) in autotrophic bacterial soil communities using real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, in Vorbereitung.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	8
A. Einleitung	9
A.1. Der Kohlenstoffkreislauf.....	9
A.2. Die prokaryotische Autotrophie.....	11
A.3. Der Calvin-Benson-Bassham-Zyklus und sein Schlüsselenzym RubisCO.....	13
A.4. Organisation und Phylogenie des <i>cbbL</i> -Gens.....	15
A.5. Molekulare mikrobielle Ökologie.....	18
A.6. Boden als Habitat hochdiverser Bakteriengemeinschaften.....	19
A.7. Ziel dieser Arbeit.....	20
B. Material und Methoden	21
B.1. Kultivierung von Mikroorganismen.....	21
B.1.1. Bakterienstämme.....	21
B.1.2. Nährmedien.....	22
B.1.3. Bakterienanzucht und Stammhaltung.....	23
B.1.4. Antibiotika.....	24
B.1.5. Isolierung von Bakterienstämmen aus Boden.....	24
B.2. Molekulargenetische Methoden.....	25
B.2.1. Bodenprobenahme.....	25
B.2.2. Isolierung von Nukleinsäuren.....	25
B.2.2.1. Isolierung hochmolekularer DNA aus Boden.....	25
B.2.2.2. Isolierung chromosomaler DNA aus Bakterienstämmen.....	26
B.2.2.3. Isolierung von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab.....	26
B.2.2.4. Isolierung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab.....	27
B.2.3. Aufreinigung isolierter Gesamt-DNA und der PCR-Produkte.....	27
B.2.4. Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA in wässriger Lösung.....	28
B.2.5. Elektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten und Gelelektion.....	28
B.2.5.1. Agarosegelelektrophorese.....	29
B.2.5.2. Längenbestimmung von DNA-Fragmenten.....	29
B.2.5.3. Präparative DNA-Gelelektrophorese.....	30
B.2.6. In vitro Amplifikation von spezifischen DNA-Fragmenten durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	30
B.2.6.1. PCR-Primer.....	30
B.2.6.2. Standard-PCR.....	32
B.2.6.3. Aufreinigung von PCR-Produkten.....	33
B.2.7. Klonierung von PCR-Produkten.....	33
B.2.7.1. Prinzip.....	33
B.2.7.2. <i>TOPO TA</i> Ligation und Transformation.....	34

B.2.8.	Restriktion der Plasmid-DNA mit <i>EcoRI</i>	34
B.2.9.	Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus (RFLP).....	35
B.2.10.	Berechnung von Diversitätsindices	35
B.2.11.	Sequenzierung von DNA.....	36
B.2.12.	Phylogenetische Auswertung der Sequenzdaten.....	36
B.2.12.1.	Vergleichende Anordnung der Sequenzen (Alignment)	36
B.2.12.2.	Rekonstruktion von Stammbäumen	37
B.2.13.	„Accession-Numbers“ der ermittelten Nukleinsäuresequenzen.....	39
B.2.14.	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH)	40
B.2.14.1.	Verwendete Oligonukleotidsonden	40
B.2.14.2.	Einstellen der Konzentration von Oligonukleotidsonden.....	41
B.2.14.3.	Zellfixierung mit Reinkulturen.....	42
B.2.14.4.	Hybridisierung mit rRNA gerichteten Oligonukleotidsonden.....	43
B.2.15.	Detektion fluoreszenzmarkierter Bakterien im Epifluoreszenz-Mikroskop.....	45
B.2.16.	Quantitative „real-time“ PCR (TaqMan).....	45
B.2.16.1.	Das Prinzip	45
B.2.16.2.	Auswertung der TaqMan-PCR	47
B.2.16.3.	Herstellung der Standard-DNA für die Generierung einer Eichgeraden..	48
B.2.16.3.1	Amplifikation und Klonierung der ‚red-like‘ <i>cbbL</i> -Standard-DNA	48
B.2.16.3.2	Linearisierung der Plasmide	49
B.2.16.3.3	Quantifizierung der Standard-DNA.....	49
B.2.16.3.4	Verdünnung der Standard-DNA	49
B.2.16.4.	Durchführung der TaqMan-PCR.....	49
B.2.16.5.	Berechnung der <i>cbbL</i> -Kopienzahl pro Gramm Boden.....	51
C.	Ergebnisse	52
C.1.	Diversität von ‚green-like‘ und ‚red-like‘ <i>cbbL</i> -Genen aus Boden.....	52
C.1.1.	Charakterisierung der Bodenproben.....	52
C.1.2.	Entwicklung spezifischer PCR-Primer zur Amplifikation von ‚green-like‘ und ‚red-like‘ <i>cbbL</i> -Genen.....	53
C.1.3.	Isolierung der Gesamt-DNA aus Bodenproben.....	56
C.1.4.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur spezifischen Amplifikation von <i>cbbL</i> - Genen	57
C.1.4.1.	Amplifikation von <i>cbbL</i> -Genen aus DNA von bakteriellen Reinkulturen...	57
C.1.4.2.	Amplifikation von ‚green-like‘ <i>cbbL</i> -Genen aus Boden-DNA.....	58
C.1.4.3.	Amplifikation von ‚red-like‘ <i>cbbL</i> Genen aus Boden-DNA	59
C.1.5.	Erstellung von <i>cbbL</i> -Genbanken	59
C.1.5.1.	Erstellung von ‚green-like‘ <i>cbbL</i> Genbanken.....	60
C.1.5.2.	Erstellung von ‚red-like‘ <i>cbbL</i> -Genbanken	61
C.1.5.3.	Analyse der ‚red-like‘ <i>cbbL</i> -Genbanken mittels Restriktions- Fragmentlängen-Polymorphismus (RFLP)	62
C.1.5.4.	Berechnung von Diversitätsindices für die ‚red-like‘ <i>cbbL</i> -Genbanken..	67
C.1.6.	Phylogenetische Analyse der erhaltenen <i>cbbL</i> -Sequenzen	69

C.1.6.1.	Phylogenetische Analyse der ‚green-like‘ <i>cbbL</i> -Sequenzen aus Boden ..	69
C.1.6.2.	Phylogenetische Analyse der ‚red-like‘ <i>cbbL</i> -Sequenzen aus Boden	72
C.1.6.3.	Phylogenetische Analyse von ‚red-like‘ <i>cbbL</i> -Sequenzen aus isolierten Stämmen	75
C.1.6.3.1	Phylogenetische Analyse der ‚red-like‘ <i>cbbL</i> -Sequenzen aus Referenzstämmen	75
C.1.6.3.2	Phylogenetische Analyse der ‚red-like‘ <i>cbbL</i> -Sequenzen aus bakteriellen Isolaten aus Boden	77
C.1.7.	Molekulare Charakterisierung der Bodenisolat e	80
C.1.7.1.	Phylogenetische Analyse der 16S rRNA-Sequenzen aus den Bakterienisolaten	80
C.1.7.2.	Identifikation der Bakterienisolate mittels FISH.....	82
C.2.	Quantifizierung von ‚red-like‘ <i>cbbL</i> -Genen mit der ‚real-time‘ PCR (TaqMan)....	83
C.2.1.	Entwicklung von spezifischen Primern und Sonde zur Detektion von ‚red-like‘ <i>cbbL</i> -Sequenzen	83
C.2.2.	Herstellung der Standard-DNA und Berechnung der Kopienzahl	84
C.2.3.	Optimierung der TaqMan-PCR	85
C.2.4.	Quantifizierung der ‚red-like‘ <i>cbbL</i> -Gene	86
C.2.4.1.	Quantifizierung der ‚red-like‘ <i>cbbL</i> -Gene aus <i>R. eutropha</i>	86
C.2.4.2.	Quantifizierung der ‚red-like‘ <i>cbbL</i> -Gene in Böden	89
C.2.4.3.	Quantifizierung der ‚red-like‘ <i>cbbL</i> -Gene in Partikelgrößenfraktionen der Bodenprobe HKO	93
D. Diskussion.....		96
D.1.	Entwicklung von ‚red-like‘ und ‚green-like‘ <i>cbbL</i> -spezifischen Oligonukleotiden.	96
D.2.	Diversität von ‚green-like‘ <i>cbbL</i> -Genen in Böden	100
D.3.	Diversität von ‚red-like‘ <i>cbbL</i> -Gene in Böden	102
D.4.	16S rDNA-Phylogenie versus <i>cbbL</i> -Phylogenie	107
D.5.	Neue <i>cbbL</i> -Sequenzen aus bakteriellen Reinkulturen	111
D.6.	Quantifizierung von <i>cbbL</i> -Genen in Böden.....	113
D.7.	Ausblick.....	116
E. Zusammenfassung		118
F. Literatur		121
G. Anhang.....		132

Abkürzungsverzeichnis

Amp	Ampicillin
Abb.	Abbildung
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
CBB	Calvin-Benson-Bassham
<i>cbpL</i> (CbbL)	Gen (Protein) der großen RubisCO-Untereinheit
CO ₂	Kohlendioxid
C _T	threshold (Schwellenwert) Zyklus
Cy3	5,5'-Disulfo-(γ-carbopentynyl)-3,3,3-tetramethylindolcarbocyanin-N-hydroxysuccinimidester
d. h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat
ds	doppelsträngig
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkultur
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i> , und andere
EtOH _{abs}	absoluter Ethanol
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
Fluos	5(6)-Carboxyfluorescein-N-hydroxysuccinimidester
H ₂ O _{dem.}	entionisiertes Wasser
H ₂ O _{reinst}	entsalztes und filtriertes Wasser
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
MW	Mittelwert
OD	optische Dichte
p. a.	pro analysi
PBS	Phosphat-gepufferte-Saline-Lösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
rDNA	ribosomale Desoxyribonukleinsäure
RFLP	Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus
Rn	normalisiertes Reportersignal
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RubisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase
SDS	Natriumdodecylsulfat
sog.	sogenannt
T _M	Annealing-Temperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-Chlor-3-Indoyle-β-D-galactopyranosid

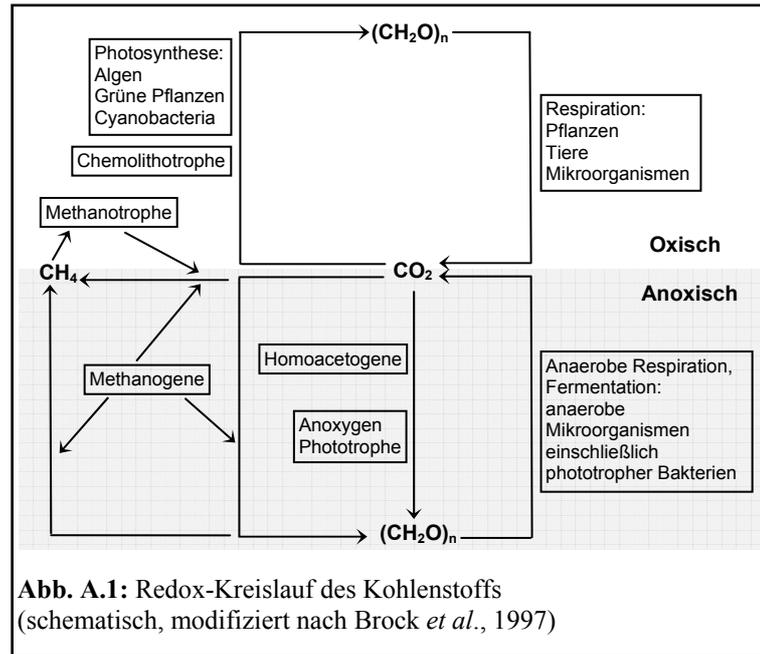
A. Einleitung

A.1. Der Kohlenstoffkreislauf

Alles Leben auf der Erde wird durch die Makroelemente Kohlenstoff, Wasserstoff, Sauerstoff, Stickstoff, Schwefel und Phosphor und ihre mannigfaltigen Verbindungen bestimmt. Dabei kommt dem Element Kohlenstoff (C) eine überaus wichtige Rolle zu Teil. Einerseits besteht die Erde bis zu etwa 50% aus Kohlenstoff und andererseits ist Kohlenstoff in Form von Kohlendioxid (CO₂) eines der wichtigsten Treibhausgase und somit für das Weltklima von herausragender Bedeutung.

Bereits vor 100 Jahren wurde die Wichtigkeit von CO₂ als Treibhausgas diskutiert, nämlich als Sven August Arrhenius erstmals das Modell aufstellte, dass die Regulation der Temperatur auf der Erde durch atmosphärisches CO₂ entscheidend beeinflusst wird (Arrhenius, 1896). Alleine während der letzten 1000 Jahre hat der atmosphärische Kohlenstoff-Gehalt von 280 auf 360 ppm und die globale mittlere Temperatur um 0,5°C zugenommen (<http://ipcc.ch>). Dieser nur scheinbar geringe Anstieg ist jedoch größer als alle bisherigen Temperaturschwankungen und hat global gesehen drastische Auswirkungen. Der Temperaturanstieg lässt sich nicht alleine durch die natürliche Variabilität erklären. Vor allem die Verbrennung fossiler Energieträger wie Kohle und Erdöl und die im hohen Maße durchgeführte Landrodung führen zum Konzentrationsanstieg aller Treibhausgase (z. B. H₂O, CH₄, O₃, CO₂) (Kerr, 2001). Obwohl der Einfluss des Menschen auf den Klimawandel sehr bedeutsam ist, steuert er nur 4-5% des gesamten biologischen Beitrags zur atmosphärischen CO₂-Freisetzung bei. Vergleichend dazu ist der Beitrag der Mikroorganismen enorm, denn sie tragen mit 86% zur biologischen CO₂-Produktion bei (King *et al.*, 2001, Shively *et al.*, 2001).

Der globale Kreislauf des Kohlenstoffes besteht aus zahlreichen Reservoirs und Prozessen, bei denen Kohlenstoff von einem Reservoir in ein anderes bewegt wird. Dabei ist der C-Kreislauf der Biosphäre durch einen maritimen und einen terrestrischen Anteil charakterisiert. Ein bedeutendes Kompartiment des terrestrischen Kohlenstoffkreislaufs sind die Böden, denn sie fungieren als Quelle oder Senke für C-Verbindungen (Shively *et al.*, 2001).



In den Böden vor allem der temperierten Klimazonen und der Wälder und Tundren sind enorme Mengen von C-Verbindungen gespeichert, wobei Böden von 0-1 m Tiefe etwa 1600 Gt C in organischer Bindung speichern (Shively *et al.*, 2001). Dies ist etwa 2,5 mal soviel organischer Kohlenstoff wie in der terrestrischen Vegetation (etwa 600 Gt C) und 2 mal soviel wie in der Atmosphäre (750 Gt C) (Shively *et al.*, 2001). Obwohl die C-Gehalte im Unterboden relativ niedrig sind, tragen sie noch zusätzlich in beträchtlichem Umfang zur insgesamt gespeicherten C-Menge bei.

Der Kohlenstoff wird von den grünen Pflanzen assimiliert und gelangt über das unterirdische Wurzelsystem und den Eintrag von Blattstreu und anderen abgestorbenen pflanzlichen und tierischen Bestandteilen in den Boden. Zurück in den CO₂-Kreislauf gelangt der lebensnotwendige Kohlenstoff über die Aktivität heterotropher Bodenmikroorganismen und Bodentiere, die organische C-Verbindungen hydrolysieren und zu CO₂ oxidieren (Abb. A.1). In anaeroben Böden (Moore, Reisfelder, Permafrostböden) wird Kohlenstoff durch anaerobe Mikroorganismen auch in Form von Methan (CH₄) freigesetzt. Daher kommt dem Kohlenstoffkreislauf, d. h. der kontinuierlichen Umwandlung der verschiedenen C-Verbindungen ineinander, in der Natur eine zentrale Bedeutung zu. Ein essentieller Prozess dabei ist die Fixierung von CO₂. Das biologische Entfernen von CO₂ aus der Atmosphäre ist das Ergebnis der CO₂-Fixierung durch Pflanzen, eukaryotische Algen und *Prokaryota*. Den Mikroorganismen kommt in der regionalen und globalen Ökologie eine wichtige Rolle zu,

denn auf Grund ihrer enormen metabolischen Diversität und Abundanz sind sie an allen Prozessen des Kohlenstoffkreislaufs sowohl aerob als auch anaerob beteiligt.

A.2. Die prokaryotische Autotrophie

Die primäre Produktion an organischem Kohlenstoff basiert auf der Assimilation von CO₂ durch autotroph lebende Organismen. Dabei erfolgt der größte Anteil der globalen Netto-CO₂-Fixierung über die oxygene Photosynthese grüner Pflanzen, Algen und Cyanobakterien (Raven, 1996). Weitere bedeutende CO₂-assimilierende Produzenten von organischem Kohlenstoff sind anoxygen photosynthetische Bakterien sowie chemolithotrophe *Bacteria* und *Archaea*.

Die Entdeckung der Autotrophie in chemolithotrophen Bakterien war von großer Bedeutung für das Verständnis der Physiologie von Mikroorganismen, denn es konnte erstmals gezeigt werden, dass CO₂ auch ohne die Beteiligung von Chlorophyll in organischen Kohlenstoff umgewandelt werden kann. Die Chemolithoautotrophie wurde erstmals 1887 von dem russischen Pflanzenphysiologen Sergei N. Winogradsky beschrieben. Er erbrachte mit Versuchen an dem filamentösen, Schwefel-oxidierenden Bakterium *Beggiatoa* den Beweis, dass Organismen anorganische Verbindungen als mögliche Energiequelle oxidieren können (Winogradsky, 1887). Weitergehende Versuche an nitrifizierenden Bakterien zeigten Winogradsky eindeutig, dass die autotrophe CO₂-Fixierung mit der Oxidation anorganischer Verbindungen (NH₄⁺ oder NO₂⁻) in Abwesenheit von Licht und Chlorophyll gekoppelt sein kann.

Abhängig von ihren metabolischen Fähigkeiten können autotrophe Mikroorganismen in zwei große Hauptgruppen unterteilt werden, die obligat und die fakultativ autotroph lebenden Organismen (Abb. A.2). Photo- und chemolithotrophe Bakterien sind durch obligate Autotrophie gekennzeichnet. Sie sind Spezialisten, deren Metabolismus vollkommen auf die Verwendung von CO₂ als Haupt-Kohlenstoff-Quelle und Licht bzw. anorganische Verbindungen als Energiequelle optimiert ist. Die fakultativ Autotrophen weisen sich hingegen durch eine größere metabolische Flexibilität in der Auswahl ihrer Nährstoffe aus, was diesen Organismen die Fähigkeit gibt, mixotroph zu wachsen, indem sie anorganische und organische C- und Energiesubstrate simultan nutzen können (Barton *et al.*, 1991).

Als Energiequelle für die CO₂-Fixierung chemolithoautotropher Bakterien dient die Oxidation diverser Elektronen-Donatoren. Es können z. B. elementarer Wasserstoff (bei *Ralstonia*

eutropha), Ammonium (bei *Nitrosomonas europaea*), Nitrit (bei *Nitrobacter winogradskyi*), Thiosulfat oder elementarer Schwefel (bei *Thiobacillus denitrificans*) als Elektronendonatoren genutzt werden. Eine Vielzahl anthropogener, biologischer und geologischer Prozesse ist für den erhöhten Eintrag dieser reduzierten Verbindungen in die Biosphäre verantwortlich. Viele der reduzierten Substrate werden im anaeroben Milieu produziert und diffundieren anschließend in die aeroben Bereiche. Substrate wie Fe^{2+} -Ionen und Sulfide werden unter aeroben Bedingungen schnell reoxidiert. Chemolithotrophe Organismen, die von Sauerstoff als Elektronen-Akzeptor abhängig sind, müssen folglich im aeroben Milieu in Konkurrenz mit der chemischen Oxidation der reduzierten, anorganischen Substrate treten. So ist es nicht verwunderlich, dass chemolithotrophe Organismen, die Sauerstoff-labile Substrate benötigen, sich an der oxisch/anoxischen Grenzfläche positionieren (Emerson *et al.*, 1979, Miyajima, 1992).

In Hydrothermalquellen der Tiefsee, in der wegen der Abwesenheit von Licht der Prozess der Photosynthese auszuschließen ist, findet man chemolithotrophe Sulfid-oxidierende Bakterien, die in Symbiose mit Invertebraten wie Röhrenwürmern leben und diese über die CO_2 -Fixierung mit organischem Kohlenstoff versorgen (Jannasch und Mottl, 1985, Cavanaugh und Robinson, 1995). Weitere chemolithotrophe Bakterien sind frei lebend in der Tiefsee vorzufinden, dabei werden die für ihr Wachstum notwendigen Substrate von der Hydrothermalquelle ausgestoßen (Black Smokers). Anscheinend tragen diese chemolithotrophen Bakterien zur primären Produktion an organischen Kohlenstoffverbindungen im Ökosystem Tiefsee bei.

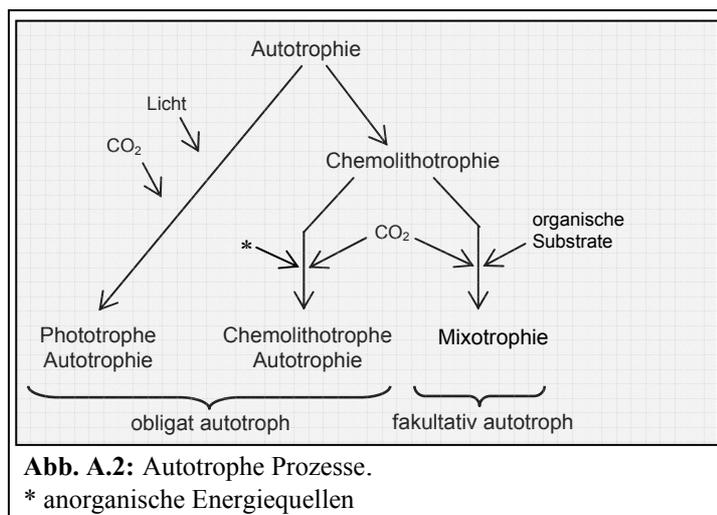


Abb. A.2: Autotrophe Prozesse.

* anorganische Energiequellen

A.3. Der Calvin-Benson-Bassham–Zyklus und sein Schlüsselenzym RubisCO

Der Calvin-Benson-Bassham–Zyklus (CBB-Zyklus) ist der am weitesten verbreitete und bedeutendste Weg der CO₂-Fixierung und wird sowohl bei *Eukaryota* wie Pflanzen und Algen, als auch bei autotrophen *Prokaryota* vorgefunden (Shively *et al.*, 1998). Andere Stoffwechselwege wie der Acetyl-CoA-Weg (Wood *et al.*, 1986), 3-Hydroxypropionat-Zyklus (Holo *et al.*, 1989) und der reduktive Tricarbonsäure-Zyklus (Evans *et al.*, 1966) sind ebenfalls für die Assimilation von CO₂ bekannt, doch das Vorkommen dieser Mechanismen scheint auf wenige autotroph lebende Spezialisten unter den *Prokaryota* beschränkt zu sein. Die Assimilation von CO₂ über den CBB-Zyklus ist abhängig von 13 enzymatischen Reaktionen, wobei zwei dieser Enzyme einmalig für den CBB-Zyklus sind: Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase (RubisCO) und Phosphoribulokinase (PRK). Die restlichen Enzyme sind bei heterotrophen und fakultativ autotrophen Bakterien ebenfalls an zentralen C-Metabolismen wie Glycolyse und Gluconeogenese involviert. PRK katalysiert die Phosphorylierung von Ribulosemonophosphat zu Ribulose-1,5-bisphosphat. Ribulose-1,5-bisphosphat ist das Substrat für RubisCO, welches die eigentliche Reaktion der CO₂-Fixierung, die Carboxylierung von Ribulose-1,5-bisphosphat mit CO₂ unter Bildung von 2 Molekülen 3-Phosphoglycerat, katalysiert (Abb. A.3). Die enorme Bedeutung dieser Reaktion spiegelt sich in der Tatsache wieder, dass RubisCO das am häufigsten vorkommende Enzym auf der Erde ist (Ellis, 1979). In Abwesenheit von CO₂ und in Gegenwart von Sauerstoff kann an der katalytisch aktiven Stelle der Carboxylierungsreaktion des RubisCO-Enzyms eine weitere Reaktion erfolgen. Dabei handelt es sich um die oxidative Degradierung von Ribulose-1,5-bisphosphat zu 3-Phosphoglycerat und 2-Phosphoglykolat (Abb. A.4).

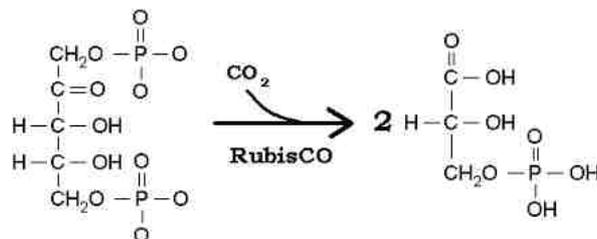


Abb. A.3. Carboxylierungsreaktion des RubisCO-Enzyms

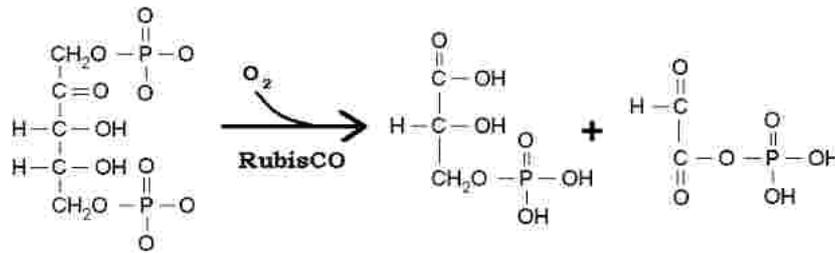


Abb. A.4: Oxygenierungsreaktion des RubisCO-Enzyms

Die Enzyme des CBB-Zyklus sind in den meisten autotrophen Bakterien im Cytoplasma lokalisiert. Eine Ausnahme bildet dabei RubisCO, welches bei zahlreichen chemoautotrophen Bakterien und allen Cyanobakterien in polyedrischen Gebilden, den sog. Carboxysomen vorzufinden ist (Shively *et al.*, 1973). Die Funktion dieser Mikrokompartimente ist noch nicht eindeutig geklärt. Es wird davon ausgegangen, dass sie die katalytischen Eigenschaften von RubisCO verstärken (Shively *et al.*, 1998).

RubisCO tritt in der Natur in multiplen Formen auf, die sich in ihrer Struktur, katalytischen Eigenschaft und Substratspezifität unterscheiden (Tabita *et al.*, 1988). Die vorherrschende Form I besteht aus je acht 55 kDa und 15 kDa großen Proteinen, den „großen“ und „kleinen“ Untereinheiten. Diese fügen sich zu einem hexadekameren Protein-Komplex zusammen (L₈S₈). Form I-RubisCO ist die höher entwickelte Form mit kinetischen Eigenschaften, die es diesem Enzym erlauben auch unter O₂-Präsenz und niedrigeren CO₂-Konzentrationen zu funktionieren; wahrscheinlich entwickelte sich diese Form als Antwort auf die ansteigenden O₂-Konzentrationen in der Atmosphäre (Kusian und Bowien, 1997). Form I-RubisCO findet man nicht nur in den Chloroplasten der Pflanzen, sondern auch bei aeroben photo- und chemoautotrophen *Prokaryota*.

Die Form II-RubisCO ist ein Dimer, welches nur aus großen Untereinheiten besteht (L₂) (Watson und Tabita, 1997). Vergleiche der Aminosäuresequenzen der Formen I und II lassen erkennen, dass sie 25% bis 30% Sequenzähnlichkeiten aufweisen (Kellogg und Juliano, 1997). Es wird angenommen, dass die gemeinsame Ur-Form des Proteins RubisCO ähnlich zum Form II-Enzym war, denn es operiert erfolgreich unter niedrigen O₂- und hohen CO₂-Konzentrationen, Bedingungen, die an die Atmosphäre der primitiven Erde erinnern (Shively *et al.*, 1998). Form II-RubisCO ist vor allem bei anaeroben photo- und chemoautotrophen Organismen zu finden.

Aus Vertretern der Domäne der *Archaea*, *Pyrococcus kodakaraensis* (Ezaki *et al.*, 1999) und *Methanococcus jannaschii* (Bult *et al.*, 1996), konnte eine weitere RubisCO-Form

identifiziert werden. Vergleiche ihrer Aminosäuresequenzen zeigten, dass diese archaealen RubisCOs die höchsten Ähnlichkeiten zu den Sequenzen der Form I- und Form II-RubisCO zeigten. Aus diesem Grund wurde vorgeschlagen, dieses O₂-sensitive Enzym der *Archaea* als Form III-RubisCO zu klassifizieren (Tabita *et al.*, 1999). Die RubisCO-Formen I bis III enthalten die katalytisch aktiven Aminosäuren, die sowohl für die Carboxylierung als auch die Oxygenierung benötigt werden (Hanson und Tabita, 2001). Seit die Sequenzieretechniken von Nucleinsäuren stark verbessert und automatisiert wurden, werden Sequenzen ganzer Genome bekannt. Dabei konnte bei der Sequenzierung der Genome von Vertretern aus der Domäne der *Bacteria* und *Archaea* eine weitere RubisCO-Form identifiziert werden. Diese Form IV-RubisCO ist durch das Fehlen der katalytisch aktiven Sequenzen charakterisiert (Hanson und Tabita, 2001). Die Form IV-RubisCO wurde bisher in den mikrobiellen Spezies *Bacillus subtilis* (Kunst *et al.*, 1997), *Chlorobium tepidum* (Hanson und Tabita, 2001) und *Archaeoglobus fulgidus* (Klenk *et al.*, 1997) identifiziert. Die Form III- und Form IV-Enzyme werden als „RubisCO-ähnliche“ Proteine bezeichnet, da ein definitiver Beweis der CO₂-Fixierung über das RubisCO-Enzym in diesen Organismen noch aussteht.

A.4. Organisation und Phylogenie des *cbbL*-Gens

Alle Gene, die ausschließlich für Enzyme des CBB-Zyklus kodieren, werden mit *cbb* bezeichnet (Tabita *et al.*, 1992). Die Anzahl und die allgemeine Anordnung der *cbb*-Gene in verschiedenen chemoautotrophen Organismen ist Spezies-, in einigen Fällen sogar Stammspezifisch und variiert sehr stark (Kusian und Bowien, 1997). Ferner ist eine Wiederholung oder Duplikation von *cbb*-Genen keine Ausnahme (Bowien *et al.*, 1989). In chemolithoautotrophen Organismen ist zudem das Vorkommen von Plasmid-kodierten *cbb*-Genen stark verbreitet. So sind die *cbb*-Gene des fakultativen, H₂-oxidierenden Bakteriums *Ralstonia eutropha* H16 auf zwei Replikons seines Genoms angeordnet, dem Chromosom und dem Megaplasmid pHG1 (Husemann *et al.*, 1988). Die Anordnung des *cbb*-Operons ist dabei identisch und sie sind sich mit einer Nucleinsäuresequenzidentität von 93% sehr ähnlich. Daraus lässt sich schließen, dass diese beiden Gencluster ursprünglich aus einer Genduplikation hervorgegangen sind. Dies ist ebenfalls für das Kohlenstoffmonoxid-oxidierende Bakterium *Oligotropha carboxidovorans* OM5 zu beobachten. Dieses beherbergt eine *cbb*-Cluster-Kopie auf seinem Chromosom und eine zweite auf dem Plasmid pHCG3 (Hugendieck und Meyer, 1991). Aber auch die Lokalisation von *cbb*-Genen ausschließlich auf

einem Plasmid tritt in der Natur auf. So trägt *Rhodococcus opacus* seine *cbb*-Gene auf einem linearisierten Plasmid (Kalkus *et al.*, 1990). Im Vergleich dazu gibt es auch Organismen mit nur Chromosom-kodierten *cbb*-Genen, so wie bei dem stickstofffixierenden Bakterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA6, welches als frei lebender Organismus fähig ist, chemoautotroph zu wachsen (McClung und Chelm, 1987).

Über dies hinaus wurden Bakterien identifiziert, die *cbb*-Gene sowohl für die Form I- als auch die Form II-RubisCO haben (Hernandez *et al.*, 1996). Zu diesen Organismen zählen die fakultativ anaeroben Schwefeloxidierer *Thiobacillus denitrificans* und *Thiobacillus intermedius* K12. Diese Ausstattung mit zwei verschiedenen RubisCO-Formen ist auch unter phototrophen *Prokaryota* verbreitet. Das Purpurbakterium *Rhodobacter sphaeroides* 2R besitzt zwei Chromosomen, wobei das eine die *cbb*-Gene der Form I-RubisCO und das andere die der Form II-RubisCO enthält (Suwanto und Kaplan, 1989). *Rhodobacter capsulatus* SB1003 ist phylogenetisch mit *R. sphaeroides* 2R nahe verwandt, doch besitzt er nur ein Chromosom, welches zwei getrennte *cbb*-Cluster für die Form I- bzw. Form II-RubisCO trägt (Paoli *et al.*, 1995).

Das Gen *cbbL*, welches für die große Untereinheit der Form I-RubisCO kodiert, ist besonders gut geeignet, um funktionelle phylogenetische Analysen durchzuführen (Kusian und Bowien, 1997). Es ist etwa 470 Aminosäuren groß und es sind ausreichend *cbbL*-Sequenzen in öffentlichen Datenbanken hinterlegt, so dass eine aussagekräftige phylogenetische Studie durchgeführt werden kann. Zurzeit sind etwa 1000 *cbbL*-Sequenzen publiziert. Die meisten dieser Sequenzen stammen jedoch von Algen und höheren Pflanzen. Im Vergleich dazu sind nur relativ wenige *cbbL*-Sequenzdaten mikrobiellen Ursprungs in öffentlichen Datenbanken abgelegt.

Die verfügbaren *cbbL*-Sequenzen der Form I-RubisCO lassen sich durch phylogenetische Analysen ihrer Nukleinsäure- und Aminosäuresequenzen in zwei Hauptentwicklungslinien, den sog. ‚green-like‘- und ‚red-like‘-Typ unterteilen (Watson und Tabita, 1997) (Abb. A.5). Die ‚green-like‘-Gruppe enthält *cbbL*-Sequenzen, die von Pflanzen, Algen, α -, β - und γ -*Proteobacteria* sowie den Cyanobakterien stammen, wohingegen in der ‚red-like‘-Linie Sequenzen aus den Gruppen der α - und β -*Proteobacteria* sowie der Rotalgen vorzufinden sind. Die Bezeichnungen ‚red‘ und ‚green‘ nehmen Bezug auf die vorherrschenden Typen von Organismen innerhalb der jeweiligen Gruppe.

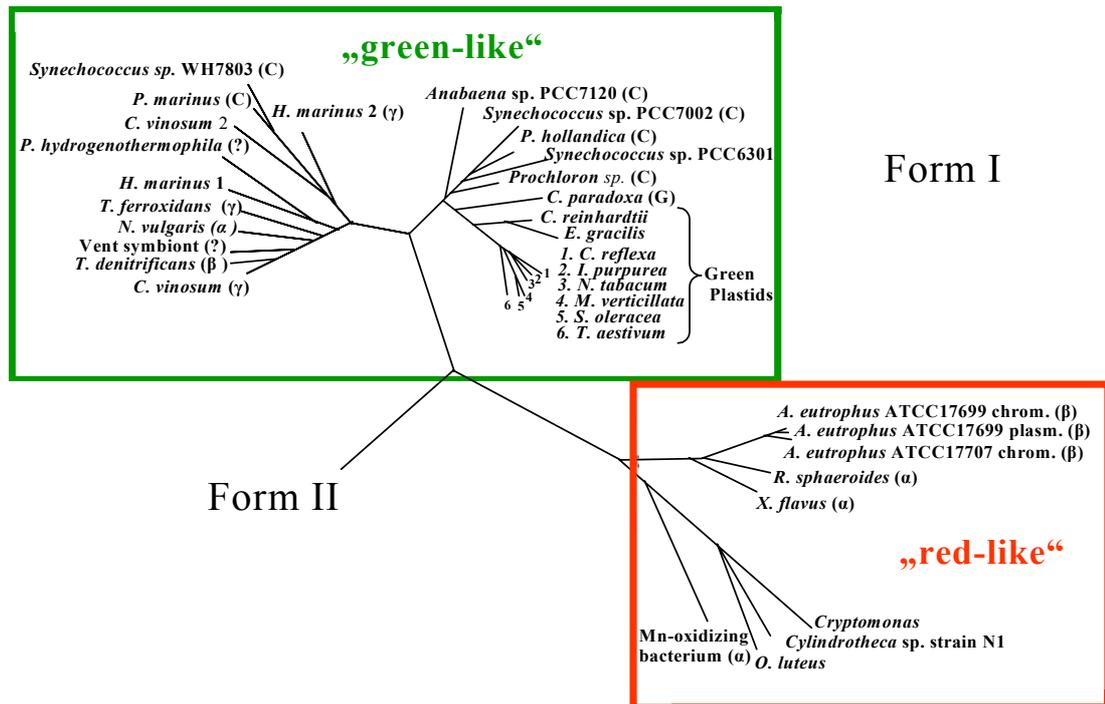


Abb. A.5: Phylogenetischer Baum ausgewählter Aminosäuresequenzen der großen RubisCO Untereinheit (CbbL) (modifiziert nach Watson und Tabita, 1997).

Die Phylogenie der *cbbL*-Sequenzen steht nicht im Einklang mit der auf 16S rDNA beruhenden Phylogenie (Delwiche und Palmer, 1996). Daraus wurde gefolgert, dass laterale Transfers und Duplikationen von *cbbL*-Genen der ‚green-like‘ und ‚red-like‘ Form I-RubisCO vorgekommen sein müssen. So findet man z. B. in *Rhodobacter capsulatus* SB1003 eine *cbbL*-Sequenz, die zur Gruppe der ‚green-like‘-Organismen gehört, wohingegen *Rhodobacter sphaeroides* 2R ein ‚red-like‘-Protein hat (Delwiche und Palmer, 1996). Zusätzlich besitzen beide eine sehr nahe verwandte Form II-RubisCO. Dies lässt darauf schließen, dass Ur-Spezies von *Rhodobacter* eine Form II-RubisCO enthielten und sich die Form I-RubisCO über lateralen Gentransfer aneigneten. Kürzlich untersuchten Uchino und Yukota (2003) die *cbbL*-Gene von *Rhodobacter azotoformans* IFO 16436. Sie konnten erstmals zeigen, dass ein Organismus *cbbL*-Gene beherbergen kann, die sowohl zur ‚green-like‘- als auch zur ‚red-like‘-Gruppe gehören.

A.5. Molekulare mikrobielle Ökologie

Die Entdeckung neuartiger Entwicklungslinien über den molekularen Nachweis der 16S rDNA ohne gleichzeitige Kultivierung von Organismen und Aufklärung der Physiologie und Funktion in einem natürlichen Habitat, ist ein grundsätzliches Problem der molekularen mikrobiellen Ökologie (Liesack *et al.*, 1997). Der Einsatz der 16S rDNA als universeller phylogenetischer Marker hat unser Wissen über die in der Natur vorkommenden Mikroorganismen immens erweitert, denn die bisher kultivierten Spezies der *Bacteria* und *Archaea* repräsentieren nur einen geringen Teil der existierenden Diversität dieser Domänen in der Umwelt. Vermutlich sind gegenwärtig weniger als 1% aller Bakterien-Spezies in Kulturen verfügbar (Amann *et al.*, 1995). Es werden fortlaufend Anstrengungen zur Isolierung und Charakterisierung dieser nicht-kultivierten Organismen unternommen (Rappe *et al.*, 2002, Kaeberlein *et al.*, 2002, Bruns *et al.*, 2003). Dem Einsatz von funktionellen genetischen Markern kommt bei der Erforschung der mikrobiellen Diversität eine wichtige Rolle zu. Funktionelle Marker sind Strukturgene, die für ein Schlüsselenzym kodieren und somit nicht nur eine phylogenetische Einteilung sondern auch Informationen über eine physiologische Fähigkeit einer sog. „funktionellen Gruppe“ ermöglichen. Die Voraussetzung, ein Strukturgen als funktionellen Marker einzusetzen, ist primär das Vorhandensein eines ausreichend konservierten Sequenzbereiches. Darüber hinaus sollten genügend Referenzsequenzen in öffentlichen Datenbanken erhältlich sein. So ist es dann möglich, geeignete Primer für die Amplifizierung mittels PCR herzuleiten und somit eine phylogenetische Einteilung der erhaltenen funktionellen Gene aus Umweltproben vorzunehmen.

Die Etablierung und der Einsatz funktioneller Markermoleküle nehmen stetig zu. So konnten beispielsweise erfolgreich Ammoniumoxidierer über das Gen der Ammoniummonooxygenase (*amoA*) (Rotthauwe *et al.*, 1997) oder Methanoxidierer über ihre lösliche bzw. partikuläre Methanmonooxygenase (*pmoA*) (McDonald *et al.*, 1995) nachgewiesen werden. Der Nachweis einer funktionellen Gruppe mittels PCR erlaubt es aber noch nicht, eine Aussage über deren Diversität und Abundanz in einem Habitat zu treffen. Dafür ist der Einsatz von sog. „Fingerprinting-Techniken“ (wie z. B. RFLP, ARDRA, DGGE) erforderlich. Diese geben einen Einblick in die Dynamik bakterieller Populationen in Abhängigkeit von unterschiedlichen Umweltfaktoren.

Mit der Entwicklung Kultivierungs-unabhängiger molekular ökologischer Methoden konnte die mikrobielle Diversität in Biotopen genauer erfasst werden (Olsen *et al.*, 1986, Giovannoni *et al.*, 1988, Amann *et al.*, 1995). So konnte auch mittels molekularer Analysen basierend auf dem Gen *cbbL* die Diversität und Abundanz autotropher, mikrobieller Gemeinschaften in einer Umweltprobe untersucht werden. Paul *et al.* (1990) amplifizierten erstmals *cbbL*-Sequenzen aus einem aquatischen System in Florida. Weitere Untersuchungen bestätigten die Präsenz autotropher Mikroorganismen in Phytoplanktongemeinschaften im Golf von Mexiko (Pichard *et al.*, 1997), in arktischen Seen (Chernykh *et al.*, 1995) und in der Tiefsee (Elsaied und Naganuma, 2001). Alfreider *et al.* (2003) zeigten, dass Bakterien mit *cbbL*-Genen auch in kontaminiertem Grundwasser vorhanden sind. Erstmals wurde auch ein auf Autotrophie beruhendes terrestrisches System entdeckt. Sarbu *et al.* (1996) untersuchten in Rumänien eine Höhle, deren Ökosystem auf Chemolithotrophie basiert, wobei sich reduzierte Schwefelkomponenten als primäre Elektronendonatoren erwiesen. Diversitätsstudien basierend auf dem RubisCO-kodierenden Gen *cbbL* in Böden sind bis heute nicht bekannt.

A.6. Boden als Habitat hochdiverser Bakteriengemeinschaften

Prokaryota stellen auf Grund ihrer hohen Abundanz einen wichtigen Teil der terrestrischen Mikroflora dar. Ein Gramm Boden kann der Lebensraum von bis zu 10^9 Zellen sein (Rosello-Mora und Amann, 2001), dabei können bis zu 7000 verschiedene bakterielle Genome erwartet werden (Torsvik *et al.*, 1990). Sowohl Kultivierungs-abhängige als auch davon unabhängige Studien unterstützen die Aussage, dass der Boden eines der diversesten Habitats für *Prokaryota* ist, aus dem bislang weniger als 1% der mikroskopisch beobachteten Organismen durch Standardtechniken untersucht werden konnten (Hugenholtz *et al.*, 1998). Böden sind hoch komplexe Systeme, die aus einer Vielzahl von Mikrohabitats bestehen, in denen sich die Diversität und Aktivität der Mikroorganismen abhängig von Raum und Zeit ständig verändert. Untersuchungen zeigten, dass mehr als 80% der Bakterien in den Mikroporen stabiler Bodenmikroaggregate (2-20 μm) lokalisiert sind (Ranjard und Richaume, 2001). Diese Mikrohabitats bieten hinsichtlich der Wasser- und Substratverfügbarkeit sowie der Gasdiffusion die günstigsten Bedingungen für das mikrobielle Wachstum. In den letzten Jahren wurde eine Fülle von molekularen Methoden entwickelt, mit deren Hilfe man die mikrobiellen Gemeinschaften sowohl kultivierter als auch nicht-kultivierter

Mikroorganismen charakterisieren konnte. Die Analyse des für die 16S rRNA-kodierenden phylogenetischen Markers steht dabei meistens im Mittelpunkt der Untersuchungen. Diese Methoden geben weitreichende Informationen über die verschiedenen bakteriellen phylogenetischen Gruppen einer Umweltprobe, die aber nur in seltenen Fällen mit ihrer Funktion in Verbindung gesetzt werden können.

A.7. Ziel dieser Arbeit

Um einen besseren Einblick in das Vorkommen und die Diversität autotropher Bakterienpopulationen in Böden zu gewinnen, sollen in der vorliegenden Arbeit zumeist Werkzeuge der molekularen mikrobiellen Ökologie genutzt werden. Mit der Entwicklung und Etablierung von ‚green-like‘ und ‚red-like‘ *cbbL*-spezifischen PCR-Primern soll speziell die Diversität von *cbbL* als funktioneller Marker autotropher, bakterieller Populationen im Boden bearbeitet werden. Die Struktur und Variabilität der *cbbL*-Genfragmente in unterschiedlich gedüngten Böden soll mittels RFLP- und Phylogenie-Analyse erfasst werden. Der phylogenetische Baum der *cbbL*-Sequenzen soll durch die Erfassung von *cbbL*-Sequenzen aus Referenzorganismen sowie aus gewonnenen Bodenisolaten erweitert werden. Ferner sollen ‚red-like‘ *cbbL*-Sequenzen in Böden mittels der ‚real-time“-PCR (TaqMan) quantifiziert werden.

B. Material und Methoden

Für die Herstellung aller Lösungen wurde über eine Reinstwasseranlage (Easypure™ UV/UF D8612-33, Werner GmbH, Leverkusen, Deutschland) entsalztes und filtriertes Wasser (im Folgenden H_2O_{reinst}) verwendet. Die Verwendung von einfach entionisiertem Wasser (im Folgenden $H_2O_{\text{dem.}}$) ist bei den jeweiligen Lösungen angegeben. Chemikalien wurden, soweit dies nicht anders angegeben ist, in p.a. Qualität bezogen und verwendet. Alle Puffer, Medien und Lösungen wurden in Wasserdampf Hochdruckautoklaven (Varioklav Typ 300E bzw. Vapoklav Typ 500, H + P Labortechnik GmbH, München, Deutschland) für 20 min bei 121°C und $1,013 \times 10^5$ Pa Überdruck sterilisiert. Hitzelabile Substanzen wurden sterilfiltriert (Sterilfilter 0,22 µm Porengröße, Millipore, Eschborn, Deutschland) und anschließend den autoklavierten Lösungen unter sterilen Bedingungen zugegeben. Die pH-Werte wurden mit NaOH bzw. HCl entsprechender Normalitäten eingestellt (pH-Meter, pH 523, WTW, Weilheim, Deutschland).

B.1. Kultivierung von Mikroorganismen

B.1.1. Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Mikroorganismen sind in Tabelle B.1. aufgeführt.

Tabelle B.1: Verwendete Mikroorganismen

Spezies	Stamm/Referenz ^a
<i>Alcaligenes faecalis</i>	DSM 13644
<i>Alcaligenes</i> sp.	DSM 30128
<i>Azospirillum brasilense</i>	DSM 1690
<i>Azospirillum lipoferum</i>	GSF 19
<i>Azospirillum doebereineriae</i>	GSF 21
<i>Herbaspirillum lusitimum</i>	Valverde <i>et al.</i> , in Druck
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	DSM 6445
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	DSM 6882
<i>Ochrobactrum tritici</i>	DSM 13340
<i>Ralstonia eutropha</i>	DSM 531
<i>Ralstonia picketti</i>	DSM 6297

Tabelle B.1: Fortsetzung

Spezies	Stamm/Referenz ^a
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	ATCC 53912
<i>Rhizobium radiobacter</i>	DSM 30147
<i>Sinorhizobium fredii</i>	ATCC 35423
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	DSM 30135
<i>Sinorhizobium terangae</i>	DSM 11282
<i>Sinorhizobium xinjiangense</i>	DSM 5852
<i>Xanthobacter agilis</i>	DSM 3770
<i>Xanthobacter autotrophicus</i>	DSM 432
<i>Xanthomonas campestris</i>	DSM 1350
<i>Nitrobacter vulgaris</i>	DSM 10236
<i>Nitrobacter winogradskyi</i>	DSM 10237

^aATCC, American Type Culture Collection
 DSM, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
 GSF, Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit

B.1.2. Nährmedien

Alle Bakterienstämme wurden unter den von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen in Braunschweig (DSMZ) empfohlenen Bedingungen kultiviert. Die Verfestigung von Nährmedien erfolgte durch Zugabe von 15 g/l Agar.

<i>LB (Luria-Bertani)</i> -Medium (modifiziert nach Bertani, 1951)	Caseinhydrolysat	10 g
	NaCl	5 g
	Hefeextrakt	5 g
	ad H ₂ O _{dem.}	1 l
	pH 7,0	
<i>NB (Nutrient Broth)</i> -Medium	Pepton	5 g
	Fleischextrakt	3 g
	ad H ₂ O _{dem.}	1 l
	pH 7,0	
<i>Nitrobacter</i> -Medium	NaNO ₂	2 g
	Spurenelementlösung	1 ml
	Stammlösung	100 ml
	ad H ₂ O _{dem.}	1 l
	Der pH wurde mit NaOH oder KOH auf 8,6 eingestellt, das Medium autoklaviert und 2 bis 3 Tage stehen gelassen bis sich der pH von selbst auf 7,4 –7,6 eingestellt hat.	

<i>Stammlösung</i>	CaCO ₃	0,07 g
	NaCl	5 g
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,5 g
	KH ₂ PO ₄	1,5 g
	ad H ₂ O _{dem.}	1 l
<i>Spurenelementlösung</i>	MnSO ₄ x H ₂ O	33,8 mg
	H ₃ BO ₃	49,4 mg
	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	43,1 mg
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	37,1 mg
	FeSO ₄ x 7 H ₂ O	97,3 mg
	CuSO ₄ x 5 H ₂ O	25 mg
	ad H ₂ O _{dem.}	1 l
<i>Rhizobium-Medium</i>	Hefeextrakt	1 g
	Mannitol	10 g
	Bodenextrakt	200 ml
	ad H ₂ O _{dem.}	800 ml
	pH 7,0	
<i>Bodenextrakt</i>	luftgetrockneter Boden	80 g
	Na ₂ CO ₃	0,2 g
	ad H ₂ O _{dem.}	200 ml

Die Bodensuspension wurde 1 h bei 121°C autoklaviert. Nach Sedimentation der Bodenpartikel wurde der klare Überstand abgenommen und der pH auf 7,2 eingestellt.

B.1.3. Bakterienanzucht und Stammhaltung

Die Anzucht der Bakterienstämme erfolgte bei der jeweiligen optimalen Wachstumstemperatur in Reagenzgläsern mit 3 ml Flüssigmedium auf einem Rundschüttler (Innova 4200, New Brunswick, Edison, USA) bei 200 rpm oder auf verfestigten Nährmedien in Petrischalen. Auf festen Nährböden kultivierte Stämme wurden bei 4°C gelagert und alle 4 Wochen unter aseptischen Bedingungen neu überimpft.

Die Anzucht von *Nitrobacter vulgaris* und *Nitrobacter winogradskyi* erfolgte in autotrophem *Nitrobacter*-Medium. Dazu wurden jeweils 5 ml einer etwa drei Wochen alten Kultur in 200 ml Medium überführt und im Dunkeln ohne Schütteln bei 30°C inkubiert.

Für die langfristige Lagerung von positiven *E. coli*-Transformanten wurden Glycerinkulturen angelegt. Dazu wurde 3 ml *LB-Amp*-Medium mit einer Kolonie des entsprechenden Klons beimpft und über Nacht bei 37°C und 200 rpm in einem Rundschüttler inkubiert. 1 ml der Übernachtskultur wurde mit 500 ml 1 x *PBS-Glycerin*-Lösung (50%) vermischt und in Kryoröhrchen (Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe, Deutschland) bei –80°C gelagert.

Material:

<i>10 x PBS</i>	NaH ₂ PO ₄	100 mM
	Na ₂ HPO ₄	100 mM
	NaCl	1,3 M
	ad H ₂ O _{dem.}	1 l
	pH 7,2-7,4	
<i>1 x PBS</i>	10 x PBS	100 ml
	ad H ₂ O _{dem.}	1 l

B.1.4. Antibiotika

Für die Anzucht plasmidhaltiger *E. coli*-Stämme unter Selektionsdruck wurde Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml als Hemmstoff verwendet. Das Natrium-Salz des Ampicillins wurde bei 4°C, die Stammlösung (100 mg/ml [1:1 H₂O_{reinst} : EtOH_{abs}]) bei –20°C gelagert. Die Hemmstofflösung wurde dem Medium nach dem Autoklavieren unter sterilen Bedingungen bei einer Temperatur von etwa 45°C zugegeben. Mit Antibiotikum versehene, verfestigte Medien wurden bei 4°C gelagert. Flüssigmedien wurden jeweils frisch aseptisch mit der Hemmstoff-Stammlösung versetzt.

B.1.5. Isolierung von Bakterienstämmen aus Boden

Für die Isolierung von Bodenbakterien wurde 1 g der Bodenprobe HNPK (s. C.1.1) mit 9 ml Extraktionslösung vermengt und in einer Schwingmühle (Modell MM2, Retsch GmbH & Co. KG, Haan, Deutschland) 7 min homogenisiert. Die erhaltene Bodensuspension wurde in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und die groben Bodenpartikel wurden 20 min sedimentiert. Anschließend wurde 1 ml des Überstandes abgenommen und zur Herstellung von 10⁻² bis 10⁻⁶ Verdünnungen verwendet. Aliquots (100 µl) der jeweiligen Verdünnungen

wurden auf festes *Rhizobium*-Medium aufgebracht, das zusätzlich eine 0,1%-Biotin-Lösung enthielt. Die beimpften *Rhizobium*-Festmedien wurden zwei Tage bei 22°C inkubiert. Danach wurden Einzelkolonien in Verdünnungsausstrichen auf frischen *Rhizobium*-Platten gereinigt.

Material:

<i>Extraktionslösung</i>	NaCl	0,1 g
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,02 g
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,2 g
	Tween 80	5 g
	ad H ₂ O _{dem.}	1 l

B.2. Molekulargenetische Methoden

B.2.1. Bodenprobenahme

Die Bodenproben wurden im Oktober 2000 und Mai 2003 auf dem Dauerdüngungsversuchsfeld *Ewiger Roggenbau* in Halle im Bundesland Sachsen-Anhalt entnommen. Dieses 1878 von Julius Kühn angelegte Versuchsfeld liegt am östlichen Rand der Stadt und dient als Lehr- und Versuchsstation der Landwirtschaftlichen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Die Entnahme erfolgte bis zu einer Oberflächentiefe von 10 cm. Die Bodenproben wurden auf eine Partikelgröße von 2 mm gesiebt und entweder direkt weiterbehandelt oder bis zur Bearbeitung bei 4°C gelagert.

B.2.2. Isolierung von Nukleinsäuren

B.2.2.1. Isolierung hochmolekularer DNA aus Boden

Die Gesamtnukleinsäuren wurden mit Hilfe des *Fast DNA SPIN Kit for Soil* der Firma BIO101 (Carlsbad, CA, USA) nach Angaben des Herstellers (modifiziert) isoliert. 500 mg der jeweiligen Bodenprobe wurden in ein „MULTIMIX 2 Matrix Röhrchen“ eingewogen. Dieses Gefäß enthält eine Mischung aus Keramik- und Silika- Partikeln. Durch Schütteln kommt es zu einer effizienten Lyse nahezu aller im Boden vorkommenden Mikroorganismen. Durch Zugabe von Natriumphosphatpuffer und MT Puffer werden Proteine in Lösung gebracht. Die Ansätze wurden in einem Zellhomogenisator (*FastPrep*[®] *Instrument*, BIO101, Carlsbad, CA,

USA) 30 sec homogenisiert. Nach anschließender Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und mit PPS (protein precipitation solution)-Reagenz versetzt. PPS sorgt für die Präzipitation der Proteine. Der DNA-enhaltende Überstand wurde mit Bindematrixsuspension vermischt und 2 min invertiert. Diese Suspension wurde kurz abzentrifugiert und das Pellet zweimal mit einer 5,5 M Guanidiniumthiocyanat-Lösung gewaschen. Dieses im Kit nicht enthaltene chaotrope Reagenz wurde zusätzlich zur DNA-Isolierung eingesetzt, um mögliche Inhibitoren aus Boden (wie z. B. Huminsäuren) zu entfernen. Die Bindematrix wurde in 1 ml 5,5 M Guanidiniumthiocyanat-Lösung resuspendiert, auf einen SpinTM Filter gegeben und bei 12000 rpm 1 min zentrifugiert. Nach einem Waschschriff mit SEWS-M (salt/ethanol wash solution)-Reagenz wurde die DNA bei RT für 5 min getrocknet und anschließend mit 50 µl DES (DNA Elution Solution) eluiert. Die isolierte DNA wurde zur qualitativen Überprüfung auf einem 1%-TAE-Agarosegel elektrophoretisch untersucht. Die End-Ausbeute an DNA aus Boden wurde wie unter B.2.4 beschrieben bestimmt.

B.2.2.2. Isolierung chromosomaler DNA aus Bakterienstämmen

Zur Extraktion von chromosomaler DNA aus den Referenzstämmen wurden 3 ml des entsprechenden Mediums mit einer Einzelkolonie beimpft und bei 30°C bzw. 37°C bei 200 rpm auf einem Rundschtüttler inkubiert. Die über Nacht gewachsenen Kulturen wurden geerntet und die DNA extrahiert. Zur Gewinnung von *Nitrobacter*-DNA wurden 3-4 Wochen alte Kulturen bei 5000 rpm und 30 min (Varifuge 3.2RS, Heraeus Sepatech, München, Deutschland) geerntet. Die DNA-Extraktion wurde wie unter B.2.2.1 beschrieben mittels des *Fast DNA SPIN Kit for Soil* der Firma BIO101 durchgeführt. Alle Puffer und Lösungen wurden vom Hersteller gebrauchsfertig mitgeliefert.

B.2.2.3. Isolierung von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte mit dem *Nucleo-Spin[®] Plasmid Kit* (Machery & Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland). Dazu wurden die Transformanten in 3 ml *LB-Amp*-Flüssigmedium angesetzt und über Nacht bei 37°C und 200 rpm in einem Rundschtüttler inkubiert. Die Kulturen wurden 1 min bei 11000 rpm geerntet. Alle benötigten Puffer und Lösungen waren vom Hersteller gebrauchsfertig mitgeliefert. Die Durchführung wurde entsprechend der Angaben des Herstellers vorgenommen. Das Prinzip dieser Methode beruht auf dem Zellaufschluss durch alkalische Lyse und der anschließenden

Fällung von genomischer DNA, Proteinen und Membranbestandteilen. Die Plasmid-DNA befindet sich in der löslichen Phase. Die weitere Reinigung der Plasmid-DNA erfolgt durch Bindung an eine Silikagel-Säule unter Hochsalz-Bedingungen und einigen Waschschritten. Die Elution der Plasmid-DNA unter Niedrigsalz-Bedingungen erfolgte mit 50 µl eines schwach alkalischen Puffers (5 mM Tris-HCl, pH 8,5).

B.2.2.4. Isolierung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab

Um größere Mengen an Plasmid-DNA zu erhalten, wurde eine sog. „Midi-Präparation“ durchgeführt. Dazu wurde der Isolierungskit *High SpeedTM Plasmid Midi Kit* (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) verwendet. Alle benötigten Puffer und Lösungen waren vom Hersteller gebrauchsfertig mitgeliefert; die Durchführung entsprach den Angaben des Herstellers.

Für die Plasmid-Präparation wurden die Transformanten in 3 ml *LB-Amp*-Flüssigmedium über Nacht bei 37°C und 200 rpm schüttelnd inkubiert. Es wurde eine 1:500-Verdünnung dieser Starterkultur angesetzt und 50 ml davon wurden bei 37°C 12-16 Stunden schüttelnd inkubiert. Die Zellen wurden 15 min bei 6000 rpm und 4°C geerntet und für die Plasmid-Isolierung eingesetzt.

B.2.3. Aufreinigung isolierter Gesamt-DNA und PCR-Produkten

Die Aufreinigung isolierter Gesamt-DNA, sowie die Abtrennung amplifizierter PCR-Fragmente von den Agenzien der PCR-Reaktion und die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde mittels dem kommerziell erhältlichen *NucleoSpin[®] Extract 2 in 1 Kit* (Macherey & Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) durchgeführt. Alle benötigten Puffer und Lösungen waren vom Hersteller gebrauchsfertig mitgeliefert; die Durchführung wurde dem beigefügten Protokoll entnommen. Prinzip dieser DNA-Aufreinigung ist die Bindung der DNA an die Matrix der im Kit enthaltenen Chromatographiesäulen, wodurch eine Abtrennung von Verunreinigungen möglich wird.

B.2.4. Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA in wässriger Lösung

Die zu vermessende DNA wurde in Quarzküvetten ($d = 10 \text{ mm}$, neoLab, München, Deutschland) mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ verdünnt. Da das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren bei $\lambda = 260\text{nm}$ liegt, wurde die Absorption bei dieser Wellenlänge gegen $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ im Spektralphotometer (CE 3021, Cecil Instruments Ltd., Cambridge, Großbritannien) bestimmt. Außerdem wurde zur Reinheitskontrolle die Absorption auch bei $\lambda = 230\text{nm}$ und $\lambda = 280\text{nm}$ ermittelt. Die Berechnung der Konzentration erfolgte gemäß der Formel (Clark und Swika, 1977):

$$\text{OD}_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor}/22 = \text{Konzentration (mg/ml)}$$

Da eine $\text{OD}_{260\text{nm}}$ von 1,0 $50 \mu\text{g/ml}$ entspricht (Cryer *et al.*, 1975), ergibt sich folgende vereinfachte Gleichung:

$$\text{OD}_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 = \text{Konzentration } (\mu\text{g/ml})$$

Verunreinigungen der DNA mit Protein oder Phenol erhöhen die Absorption bei 280nm, Verunreinigungen mit RNA die Absorption bei 230nm. Für eine ausreichend reine DNA-Probe nimmt der Absorptionskoeffizient $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$ einen Wert größer 2,0 und der Absorptionskoeffizient $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{230\text{nm}}$ einen Wert größer 1,8 ein (Marmur, 1961, Sambrook *et al.*, 1989).

B.2.5. Elektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten und Gelelution

Die Geschwindigkeit, mit der lineare DNA-Fragmente im elektrischen Feld in Richtung der Anode wandern, ist innerhalb einer Agarosegelmatrix abhängig von ihrem Molekulargewicht. In mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegelen ist es deshalb möglich, anhand von Fragmenten mit bekannter Größe die Länge von linearisierten, unbekanntem DNA-Fragmenten zu bestimmen. Nach Ausschneiden gewünschter Fragmente aus dem Gel und Auflösung der Gelmatrix können bestimmte Fragmentgrößen präpariert werden.

Material:

<i>50 x TAE</i>	Tris/HCl	2 M
	EDTA	0,1 M
	ad H ₂ O _{dem.}	1 l
	pH 8,8 mit Eisessig	

<i>Ethidiumbromidlösung:</i>	Ethidiumbromid (1% w/v)	50 µl
	ad H ₂ O _{dem.}	500 µl

B.2.5.1. Agarosegelelektrophorese

Es wurde ein horizontales Gelelektrophoresesystem der Firma PeqLab (Erlangen, Deutschland) verwendet. Die 1-3,5%ige (w/v) Agarose (PeqLab) wurde in 1 x TAE-Puffer durch Kochen gelöst und in die Gelträger mit eingesetzten Probenkämme gegossen. Nach dem Erstarren wurde das Gel in die mit 1 x TAE-Puffer gefüllte Elektrophoreseapparatur gelegt und die Probenkämme entfernt. Die DNA-Lösung wurde mit 1/6 des Endvolumens mit *6 x Loading Dye Solution* (Fermentas GmbH, St. Leon-Roth, Deutschland) versetzt, in die Geltaschen gefüllt und bei 80-120 mA elektrophoretisch aufgetrennt. Durch die im Auftragspuffer enthaltenen Farbmarker (Bromphenolblau, Xylen-Cyanol) kann der Lauf optisch mitverfolgt werden. In einem 0,8%-Agarosegel verhält sich Bromphenolblau wie ein DNA-Fragment von 300 bp Größe, Xylen-Cyanol hingegen wie ein 4000 bp Fragment. Zur Anfärbung wurde das Agarosegel nach der Elektrophorese 15-30 min in die Ethidiumbromidlösung gelegt. Die Detektion der DNA-Fragmente erfolgte unter UV-Licht bei $\lambda = 312\text{nm}$ am Transilluminator (Vilber Lourmat, Marne La Vallée, Frankreich) und wurde mit einem Video-Dokumentationssystem (NTAS, Göttingen, Deutschland) fotografisch dokumentiert.

B.2.5.2. Längenbestimmung von DNA-Fragmenten

Die elektrophoretischen Laufstrecken von linearisierten DNA-Fragmenten stehen in linearer Beziehung zum dekadischen Logarithmus ihres Molekulargewichts. Daher lässt sich durch Auftragen eines DNA-Längenstandards zusammen mit einer zu analysierenden DNA-Probe die Größe einer unbekanntenen Probe bestimmen. In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Längenstandards verwendet:

GeneRuler™ 1kb DNA-Ladder (Fermentas GmbH):

DNA-Fragmente der Größe von 10000-100 bp

GeneRuler™ 100bp DNA-Ladder (Fermentas GmbH):

DNA-Fragmente der Größe von 1000-80 bp

B.2.5.3. Präparative DNA-Gelelektrophorese

Die präparative DNA-Gelelektrophorese dient der Abtrennung von DNA-Fragmenten aus einem Gemisch von DNA-Banden unterschiedlicher Größe. Sie verläuft nach demselben Prinzip, wie die unter B.2.5.1 beschriebene analytische Agarosegelelektrophorese. Um eine möglichst schonende Isolation des gewünschten DNA-Fragmentes zu erreichen, sind einige Besonderheiten zu beachten. Zur schärferen Abtrennung größerer DNA-Mengen wird die Gelelektrophorese mit geringerer Stromstärke (60-100 mA) durchgeführt und das Agarosegel wird nur kurz mit frischer Ethidiumbromidlösung gefärbt. Zudem erfolgt die Detektion des zu isolierenden DNA-Fragments rasch im UV-Licht und die entsprechende Bande wird mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten. Die Elution der DNA aus dem Agarosegel erfolgt wie unter B.2.3 beschrieben.

B.2.6. In vitro Amplifikation von spezifischen DNA-Fragmenten durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

B.2.6.1. PCR-Primer

Die in vorliegender Arbeit verwendeten PCR-Primer wurden bei *Thermo Electron Corporation* (Ulm, Deutschland) synthetisiert. Die lyophilisierte Primer-DNA wurde in H_2O_{reinst} gelöst, so dass die Konzentration der Stammlösungen 100 pmol/ μl betrug. Die Primer-Lösungen wurden bei -20°C gelagert.

Die Annealing-Temperatur (T_M) ist abhängig von der Länge und Zusammensetzung der Oligonukleotidprimer. Zur Bestimmung der Temperatur kann näherungsweise die „2+4“-Regel angewendet werden (Suggs *et al.*, 1981):

$$T_M [^\circ\text{C}] = 2 (A + T) + 4 (G + C)$$

Die in vorliegender Arbeit verwendeten Primer und deren spezifische Annealing-Temperaturen sind in den Tabellen B.2, B.3 und B.4 aufgeführt.

Tabelle B.2: ‚Red-like‘ *cbbL*-spezifische Oligonukleotidprimer

Primer ¹	Sequenz (5'-3') ²	Bindungsposition ³	T _M
<i>cbbLR1-F</i>	AAG GAY GAC GAG AAC ATC	634-651	57°C
<i>cbbLR1-R</i>	TCG GTC GGS GTG TAG TTG AA	1435-1454	57°C
<i>cbbLR1int-R</i>	TGC AGS ATC ATG TCR TT	892-908	59°C

¹F: „Forward“ (Vorwärts)-Primer, bindet an den -Strang
R: „Reverse“ (Rückwärts)-Primer, bindet an den +Strang
int-R: „Reverse“ (Rückwärts)-Primer für die TaqMan-PCR
²Basensymbole: Y = (C/T), S = (G/C), R = (G/A)
³Position in der *cbbL*-Sequenz von *Ralstonia eutropha* H16

Tabelle B.3: ‚Green-like‘ *cbbL*-spezifische Oligonukleotidprimer

Primer ¹	Sequenz (5'-3') ²	Bindungsposition ³	T _M
<i>cbbLG1-F</i>	GGC AAC GTG TTC GGS TTC AA	397-416	62°C
<i>cbbLG1-R</i>	TTG ATC TCT TTC CAC GTT TCC	1413-1433	62°C

¹F: „Forward“ (Vorwärts)-Primer, bindet an den -Strang
R: „Reverse“ (Rückwärts)-Primer, bindet an den +Strang
²Basensymbole: S = (G/C)
³Position in der *cbbL*-Sequenz von *Nitrobacter vulgaris* T3

Tabelle B.4: 16S rDNA-spezifische Oligonukleotidprimer

Primer ¹	Sequenz (5'-3') ²	Bindungsposition ³	T _M
616V	AGA GTT TGA TYM TGG CTC AG	8-27	50°C
630R	CAK AAA GGA GGT GAT CC	1528-1544	50°C

¹V: Primer bindet an den zur 16S rRNA komplementären Strang
R: Primer bindet an den mit der 16S rRNA identischen Strang
Die eingesetzten Primer wurden von Juretschko *et al.* (1998) entwickelt.
²Basensymbole: Y = (T/C), M = (A/C), K = (G/T)
³Position in der rRNA von *E. coli* (Brosius *et al.*, 1981)

B.2.6.2. Standard-PCR

Alle PCR-Reaktionen wurden in einem Thermocycler (Primus 25 oder Primus 96, MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland) durchgeführt. Die verwendete thermostabile DNA Polymerase stammt aus *Thermus aquaticus* (*Taq*) und katalysiert eine 5'-3' DNA-Synthese. Dieses Enzym besitzt keine 3'-5'-Exonukleaseaktivität, wodurch die Replikation der Matrize zwar schneller erfolgen kann, aber mit einer höheren Fehlerrate. Sie eignet sich besonders zur Amplifikation von DNA-Fragmenten, die zur Klonierung mit dem *TOPO TA Cloning*[®] Kit (s. B.2.7) vorgesehen sind, da die überhängenden A-Enden der PCR-Produkte, die bei der Ligation von entscheidender Bedeutung sind, nicht durch eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität der Polymerase entfernt werden.

Für alle PCR-Reaktionen wurden *Taq* DNA-Polymerase, Reaktionspuffer, MgCl₂ und Nukleotide von der Firma Fermentas GmbH (St. Leon-Roth, Deutschland) verwendet. Die PCR-Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl angesetzt.

<u>Reaktionsansatz für eine Standard-PCR:</u>	10 x Puffer	5 µl
	10 x 2 mM dNTP-Mix	5 µl
	25 mM MgCl ₂	5 µl
	Primer (100 pmol/µl)	je 0,8 µl
	Taq Polymerase (5 U/µl)	0,4 µl
	Template-DNA	x µl
	ad H ₂ O _{reinst}	50 µl

<u>PCR-Standardprogramm:</u>	1 x	Startdenaturierung	4 min, 94°C
	32 x	{ Denaturierung Annealing Elongation	1 min, 94°C
			1 min, x°C
			(s. Tabelle B.2, B.3, B.4)
	1 x	finale Elongation	1 min, 72°C
			10 min, 72°C

Der PCR-Reaktionsansatz und das verwendete Programm wurden je nach Template-DNA modifiziert. So verringerte sich die Annealing- und Elongationszeit bei Amplifikation kürzerer Fragmente auf 30 sec. Außerdem führte auch die Variation der standardmäßig verwendeten MgCl₂-Konzentration neben einer für die jeweils verwendeten Primerpaare optimierten Annealing-Temperatur zu einer höheren Spezifität. Bei einigen Ansätzen war

auch die Zugabe von 10%-Glycerin oder DMSO erforderlich, um entweder überhaupt ein PCR-Produkt zu erhalten oder das Ergebnis entsprechend zu optimieren.

B.2.6.3. Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung von PCR-Amplifikaten und die Abtrennung von PCR-Reaktionsbestandteilen wie Primer und Puffer erfolgte mit dem *NucleoSpin[®] Extract 2 in 1 Kit* nach Angaben des Herstellers (s. B.2.3). Bei Auftreten von unspezifischen PCR-Nebenprodukten wurde das gewünschte DNA-Fragment über ein präparatives Agroseigel abgetrennt (s. B.2.5.3).

B.2.7. Klonierung von PCR-Produkten

In vorliegender Arbeit wurde der kommerziell erhältliche Klonierungskit *TOPO TA Cloning[®] Kit* der Firma Invitrogen (Carlsbad, USA) mit chemokompetenten *E. coli* TOP10F' Zellen verwendet. Als Klonierungsvektor wurde das Plasmid pCR[®]2.1-TOPO (Tabelle B.5) verwendet. Alle benötigten Lösungen waren vom Hersteller gebrauchsfertig mitgeliefert; die Durchführung entsprach den Angaben des Herstellers.

Tabelle B.5: Verwendetes Plasmid

Plasmide	Eigenschaften	Herkunft
pCR [®] 2.1-TOPO	Amp ^R , Km ^R , <i>lacZ</i> α , Klonierungsvektor	Invitrogen, Carlsbad, USA

B.2.7.1. Prinzip

Der Klonierungsvektor pCR[®]2.1-TOPO trägt an den freien 3'-Enden Desoxythymidin, so dass eine Ligation von *Taq* DNA Polymerase generierten PCR-Amplifikaten möglich ist. Diese Polymerase weist eine „template“-unabhängige terminale Transferaseaktivität auf, durch die an die 3'-Enden des Amplifikats Desoxyadenin angehängt wird, was die Voraussetzung für die Ligation durch die kovalent an den Vektor gebundene Topoisomerase ist. Des Weiteren trägt das Plasmid eine Ampicillinresistenz und eine multiple Klonierungsstelle (MCS), die für das α -Peptid der β -Galaktosidase (*lacZ*-Gen) kodiert. Das α -Peptid komplementiert das *lacZ* ω -Fragment der Wirtszelle, so dass β -Galaktosidase gebildet werden kann. Bei Zugabe des chromogenen Substrates X-Gal, einem Derivat des natürlichen

Substrates Lactose, wird dieses gespalten und die Klone sind an ihrer blauen Farbe zu erkennen. Wenn ein DNA-Fragment in die MCS inseriert wird, wird der Leserahmen von *lacZ* unterbrochen, die Bildung des α -Peptids und somit der β -Galaktosidase unterbleibt, X-Gal kann nicht gespalten werden und die Zellen erscheinen weiß (Blau-Weiß-Selektion). Um auf rekombinante Zellen zu selektieren, muss dem Medium neben Ampicillin und X-Gal auch IPTG als Induktor der β -Galaktosidase zugesetzt werden.

Material:

<i>X-Gal</i> -Lösung	40 mg/ml X-Gal in Dimethylformamid
<i>IPTG</i> -Lösung	100 mM IPTG ad H ₂ O _{dem.}

B.2.7.2. TOPO TA Ligation und Transformation

Durch die Ligationsaktivität der DNA-Topoisomerase I und bei Verwendung eines „aktivierten“ Vektors erfolgte bei diesem Klonierungskit die Ligation in 5 min bei RT.

<i>TOPO TA Ligationsansatz:</i>	gereinigtes PCR-Amplifikat	4 μ l
	Salzlösung (1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl ₂)	1 μ l
	pCR [®] 2.1-TOPO (10 ng/ μ l)	1 μ l

Zur Transformation wurden 2 μ l des Ligationsansatzes in chemokompetente *E. coli* Zellen (TOP10F⁺) gegeben und 5 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42°C für 30 sec wurde 250 μ l des SOC-Mediums zu den Zellen gegeben und 1 h schüttelnd bei 37°C inkubiert. Jeweils 50-100 μ l des Transformationsansatzes wurden auf *LB-Amp-X-Gal-IPTG*-Festmedien ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

B.2.8. Restriktion der Plasmid-DNA mit *EcoRI*

Zur Überprüfung des Ligationserfolgs und Erfassung der Größe der inserierten Fragmente wurden isolierte Plasmide einer Restriktionsanalyse mit der Endonuklease *EcoRI* (Fermentas GmbH) unterzogen. Die Restriktionen wurden nach Empfehlung des Herstellers in dem entsprechenden Reaktionspuffer durchgeführt. Es wurden jeweils 2 U des Enzyms und

2 µl der Plasmidpräparation in einem Volumen von 10 µl eingesetzt und 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Der Erfolg der Restriktion wurde auf einem 1,5% TAE-Agarosegel analysiert.

B.2.9. Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus (RFLP)

Plasmide mit einem Insert der richtigen Größe wurden mit den entsprechenden Primerpaaren reamplifiziert (s. B.2.6.1) und die PCR-Produkte zur RFLP-Analyse eingesetzt. Dabei wurde die Restriktionsendonuklease *BbvI* eingesetzt (Tabelle B.6). Um die Bildung unterschiedlich großer, unterscheidbarer Subfragmente zu gewährleisten, erfolgte die Optimierung der RFLP-Analyse für *cbbL*-Amplifikate zusätzlich mit der Restriktionsendonuklease *MspI*. Die Restriktionen wurden nach Empfehlungen des Herstellers in den entsprechenden Reaktionspuffern durchgeführt. Es wurden jeweils 2 U des Enzyms und 10 µl des PCR-Amplifikats in einem Volumen von 20 µl eingesetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Tabelle B.6: Verwendete Restriktionsendonukleasen für die RFLP-Analyse

Enzyme	Temp. (°C)	Erkennungssequenz	Herkunftsorganismus	Hersteller
<i>BbvI</i>	37	GCAGC	<i>Bacillus brevis</i>	Fermentas GmbH
<i>MspI</i>	37	CCGG	<i>Moraxella species</i>	Fermentas GmbH

B.2.10. Berechnung von Diversitätsindices

Um die Diversität in den erstellten Genbanken miteinander vergleichen zu können, wurden verschiedene Diversitätsindices berechnet.

Der Shannon-Weaver Index wird wie folgt berechnet: $H = -\sum p_i \ln p_i$, wobei p der Anteil an Sequenzen einer sog. „operational taxonomic unit (OTU)“ relativ zur Gesamtzahl aller Sequenzen einer Umweltprobe ist (Shannon und Weaver, 1963). Der Simpson's Index der Diversität wird aus der Formel $D = 1/\sum (p_i)^2$ berechnet (Simpson *et al.*, 1949).

Ein weiterer Index ist „Eveness“ (J), der die aktuelle Diversität mit der maximal möglichen vergleicht: $J = H/\ln S$ (Margalef, 1958).

Die „Homologous Coverage“ (C) einer Genbank X wird mit der Formel $C = 1 - (N_x/n)$ berechnet, wobei N_x die Anzahl einmaliger Sequenzen (d. h. Sequenzen ohne Replikate in einer Genbank) und n die Gesamtzahl an Sequenzen ist (Good, 1953).

Eine weitere Methode ist die „Rarefaction“-Analyse (Simberloff, 1978), welche durch die auf der Webseite „<http://www.uga.edu/~strata/software/AnRareReadme.html>“ verfügbare Software möglich ist. Diese Analyse resultiert in einer graphischen Kurve, bei der die Gesamtzahl an Individuen gegen die Gesamtzahl an identifizierten Spezies aufgetragen wird. Die „Rarefaction“-Analyse zeigt an, ob ein Habitat ausreichend beprobt wurde, um die tatsächliche Diversität widerzuspiegeln.

B.2.11. Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde von der Firma Sequiserve (Vatterstetten, Deutschland) mit dem Sequenzierautomaten ABI Prism 377 *DNA-Sequencer* durchgeführt. Dabei wurden zur Sequenzierung von Plasmid-Inserts die plasmidlokalisierten Primer M13reverse und T7 Promoter eingesetzt (Tabelle B.7). Für die Sequenzierung der etwa 1400 bp langen 16S rDNA-Fragmente wurde zusätzlich der Primer 612RII eingesetzt.

Tabelle B.7: Für die Sequenzierung eingesetzte Primer

Primer	Sequenz (5'-3') ¹	Bindungsposition ²
M13reverse	CAG GAA ACA GCT ATG AC	Klonierungsvektor
T7 Promoter	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	Klonierungsvektor
612RII	GTA AGG TTY TNC GCG T	969-984

¹ Basensymbole: Y = (T/C), N = (A/G/C/T)

² Position in der rRNA von *E. coli* (Brosius *et al.*, 1981)

B.2.12. Phylogenetische Auswertung der Sequenzdaten

B.2.12.1. Vergleichende Anordnung der Sequenzen (Alignment)

Mit Hilfe der vom *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) angebotenen Suchmaschine „BLAST“ (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) wurden die erhaltenen *cbbL*- und 16S rDNA-Sequenzdaten mit den in der Datenbank GenBank abgelegten Sequenzen verglichen. Eventuell vorhandene Vektorsequenzen wurden entfernt, um sie nicht in phylogenetische Vergleiche mit einzubeziehen. Sequenzen, die auf Nukleinsäureebene keine Ähnlichkeit zu bisher bekannten Sequenzen aufwiesen, wurden von den weiteren Analysen ausgeschlossen.

Grundlage für sinnvolle phylogenetische Analysen ist die Erstellung eines korrekten Alignments. Um dies zu gewährleisten, wurden zunächst alle bereits bekannten bakteriellen *cbbL*-Sequenzen aus öffentlichen Datenbanken in das Softwarepaket ARB (www.arb-home.de) importiert und dort zum Aufbau eines auf *cbbL*-Sequenzen basierenden Datensatzes verwendet. Alle *cbbL*-Nukleinsäuresequenzen wurden in die jeweilige Aminosäuresequenz übersetzt. Mit dem im Softwarepaket ARB enthaltenen „GDE Editor“ wurden die Sequenzdaten manuell derart ausgerichtet, dass sich homologe Bereiche an der gleichen Position befanden. Anschließend wurden die eigenen *cbbL*-Sequenzen in das Softwarepaket ARB importiert, in Aminosäuren übersetzt und in das vorhandene *cbbL*-Alignment eingeordnet.

Neu importierte 16S rDNA-Sequenzen wurden zunächst mit Hilfe des im Softwarepaket ARB enthaltenen automatischen „fast aligner“-Tools mit bereits vorhandenen Sequenzen in ein Alignment gebracht. Hierbei wurde ebenfalls darauf geachtet, dass sich die homologen Positionen nach der Anordnung an der gleichen Stelle befanden. In den variablen Sequenzbereichen dienten Sekundärstrukturanalysen oder kleinere Gruppen konservierter Basenfolgen als Orientierung bei der Bestimmung homologer Positionen. Das Alignment wurde gegebenenfalls manuell korrigiert. Die neu im Alignment befindlichen Sequenzen wurden über den Maximum Parsimony-Algorithmus in einen Gesamtbaum, der alle im Datensatz enthaltenen Sequenzen enthält, einberechnet. Dieser Gesamtbaum/Datensatz enthält zurzeit etwa 20.000 16S rDNA-Sequenzen. Es ist nun möglich, die nächstverwandten Sequenzen zu identifizieren und diese als Grundlage für weitere phylogenetische Analysen und Baumberechnungsverfahren, die im Programmpaket ARB implementiert sind (Maximum Parsimony, Neighbour Joining und Maximum Likelihood), auszuwählen.

B.2.12.2. Konstruktion von Stammbäumen

Um die Topologie der Stammbäume auf ihre Stabilität zu überprüfen, wurden verschiedene Baumberechnungsverfahren für die ausgewählten Sequenzen durchgeführt. Zusätzlich wurden zur Berechnung verschiedene Sequenzfilter eingesetzt, die es ermöglichen, nur spezifische Sequenzabschnitte in das Baumberechnungsverfahren mit einzubeziehen. Um den Einfluss hochvariabler Positionen, deren phylogenetischer Informationsgehalt aufgrund hoher Mutationsraten fraglich ist, auf das Ergebnis der 16S rRNA-basierenden phylogenetischen Analysen zu minimieren, werden vielfach Konservierungsfiler verwendet. Diese schließen Positionen aus, deren Konservierungsgrad innerhalb des verwendeten Datensatzes unterhalb eines festgesetzten Wertes (z. B. 50%) liegt.

Weiterhin wurden zur phylogenetischen Baumberechnung Filter eingesetzt, die die dritte, variable Codonposition ausschließen oder die Sequenzen auf bestimmte Subfragmente, die zwischen zwei Sequenzpositionen liegen, einschränken.

Für die phylogenetische Analyse wurden Distanz-basierende (Distanz-Matrix) und Merkmals-basierende (Maximum Likelihood, Maximum Parsimony) Berechnungsverfahren verwendet (Ludwig *et al.*, 1998).

Das Distanz-Matrix-Verfahren erstellt zunächst aus dem verwendeten Datensatz eine Ähnlichkeitsmatrix, welche die Sequenzähnlichkeiten aller denkbaren Sequenzpaare enthält. Diese Distanzwerte werden nachfolgend nach verschiedenen Evolutionsmodellen (Jukes und Cantor, 1969, Kimura, 1983) in phylogenetische Distanzen umgerechnet. Mit der Neighbour Joining-Methode (Saitou und Nei, 1987) werden die Distanzwerte als Dendrogramme dargestellt. Der Vorteil dieser Methode ist der geringe Rechen- und Zeitaufwand. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass bei dieser Methode die Originaldaten nur indirekt d. h. in Form von Distanzwerten in die Baumtopologie eingehen.

Das Maximum Parsimony-Verfahren basiert auf der Annahme, dass in der Evolutionsgeschichte die Erhaltung eines Merkmals (Nukleotide oder Aminosäuren) wahrscheinlicher als die Veränderung ist (Basen-oder Aminosäureaustausch). Im Gegensatz zur Distanz-Matrix-Verfahren werden hier die eigentlichen Sequenzdaten verwendet. Bei der Parsimony-Methode wird von allen möglichen Baumtopologien diejenige mit der geringsten Gesamt-Baum-Länge (Fitch, 1971) und der minimalsten Anzahl an Mutationen gesucht („sparsamster Baum“).

Bei der Maximum Likelihood-Methode wird basierend auf verschiedenen Evolutionsmodellen, deren Parameter wie das Verhältnis Transversion/Transition, der Konservierungsgrad an bestimmten Positionen oder die Wahrscheinlichkeit für Konservierung im Gegensatz zu Mutation zugrunde liegen, von allen möglichen Bäumen der wahrscheinlichste rekonstruiert (Felsenstein, 1981). Diese Methode gilt derzeit als die exakteste Methode zur Rekonstruktion phylogenetischer Beziehungen und verwendet ein Maximum an Informationsgehalt der Originalsequenzen. Allerdings sind Maximum Likelihood- Verfahren sehr rechen- und zeitintensiv, wodurch die Anzahl der zu verrechnenden Sequenzen stark eingeschränkt ist (Ludwig *et al.*, 1998).

Ein weiterer Faktor, der bei der Berechnung von phylogenetischen Beziehungen einen entscheidenden Einfluss auf die Baumtopologie nehmen kann, ist die Auswahl der Außengruppe. Eine Außengruppe beinhaltet Organismen, die nicht zu der eigentlich

untersuchten Gruppe einer phylogenetischen Analyse gehören. Außengruppen fungieren als Wurzel in den eigentlich ungewurzelten Bäumen. Voraussetzung ist hierbei, dass die untersuchten Gene und die Gene der Außengruppe einen gemeinsamen Vorfahren haben. Da die rRNA-Gene in allen *Bacteria* vertreten sind, ergab sich für die Erstellung der 16S rRNA-basierenden Bäume kein Problem. Für die phylogenetische Analyse der 'red-like' *cbbL*-Sequenzen wurden *cbbL*-Sequenzen der 'green-like'-Gruppe herangezogen und umgekehrt. Da die Zusammensetzung der Außengruppe die Baumtopologie beeinflussen kann (Dalevi *et al.*, 2001), wurden die phylogenetischen Berechnungen mit unterschiedlichen Außengruppen durchgeführt. Für die 16S rRNA-basierenden Neighbour Joining-Bäume hat sich eine relativ umfangreiche Außengruppe mit Referenzsequenzen aus allen bekannten Phyla der *Bacteria* und *Archaea* bewährt. Die Außengruppen in Maximum Likelihood-Bäumen sind dagegen durch die zeitaufwendige Berechnung limitiert.

Die Baumtopologien, die sich aus den unterschiedlichen Berechnungsverfahren ergaben, wurden miteinander verglichen und in einem phylogenetischen „Konsensusbaum“ zusammengefasst. Dabei wurde diejenige Topologie für den „Konsensusbaum“ ausgewählt, die durch die verschiedenen Verfahren am häufigsten unterstützt wurde. Dieser Baum wird als größtmögliche Annäherung an die wahren phylogenetischen Beziehungen der untersuchten Sequenzen angesehen (Ludwig *et al.*, 1998).

B.2.13. „Accession-Numbers“ der ermittelten Nukleinsäuresequenzen

Die in dieser Arbeit ermittelten Nukleinsäuresequenzen wurden in der GenBank-Datenbank (NCBI) unter folgenden „Accession-Numbers“ abgelegt:

AY572110 bis AY572155: 'red-like' *cbbL*-Bodensequenzen

AY572169 bis AY572192: 'green-like' *cbbL*-Bodensequenzen

AY572156 bis AY572168: *cbbL*-Sequenzen der Bakterienisolate

AY572464 bis AY572473: *cbbL*-Sequenzen der Referenzstämme

AY572474 bis AY572486: 16S rDNA-Sequenzen der Bakterienisolate

B.2.14. Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Diese Methode ermöglicht die phylogenetische Identifizierung und Quantifizierung einzelner Mikroorganismen direkt in ihrem Mikrohabitat. Als Zielmolekül dient dabei meistens die 16S oder 23S rRNA, die wegen ihrer funktionellen Konstanz, der hohen Kopienzahl und der Struktur mit konservierten und variablen Regionen besonders gut für phylogenetische Analysen geeignet ist. Die verwendeten Oligonukleotide sind zu unterschiedlich konservierten Sequenzen der rRNA komplementär, wodurch je nach Spezifität der Sonde eine Unterscheidung von Mikroorganismen bis auf Artniveau möglich ist.

Material

<i>Carbonatpuffer:</i>	NaHCO ₃	1 M
	Na ₂ CO ₃	1 M
	ad H ₂ O _{reinst}	1 l
	pH 9,0	
<i>10 x PBS:</i>	NaH ₂ PO ₄	100 mM
	Na ₂ HPO ₄	100 mM
	NaCl	1,3 M
	ad H ₂ O _{dem.}	1 l
	pH 7,2-7,4	
<i>0,5 M EDTA-Lösung:</i>	Na ₂ -EDTA	186 g
	NaOH Plättchen	20 g
	ad H ₂ O _{dem.}	1 l
	pH 8,0	

B.2.14.1. Verwendete Oligonukleotidsonden

In Tabelle B.8 sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Oligonukleotidsonden aufgeführt. Jede der Sonden ist an einen fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt. Eine Auflistung der verwendeten Fluorochrome, ihrer Anregungs- und Emissionswellenlängen findet sich in Tabelle B.11. Alle Oligonukleotidsonden mit den fluoreszierenden Farbstoffen Cy3 und Fluorescein (Fluos) wurden von *Thermo Electron Corporation* (Ulm, Deutschland) bezogen.

Tabelle B.8: Verwendete rRNA gerichtete Oligonukleotidsonden

Sonde	Spezifität	Bindungsposition ¹	Sondensequenz 5'-3'	% FA ²	Referenz
EUB338 I ³	<i>Bacteria</i> ohne <i>Planctomycetales</i> , <i>Verrucomicrobiales</i>	16S, 338-355	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	35	Amann <i>et al.</i> , 1990
EUB338 II ³	<i>Planctomycetales</i>	16S, 338-355	GCA GCC ACC CGT AGG TGT	35	Daims <i>et al.</i> , 1999
EUB338 III ³	<i>Verrucomicrobiales</i>	16S, 338-355	GCT GCC ACC CGT AGG TGT	35	Daims <i>et al.</i> , 1999
HGC69a	Gram-positive Bakterien mit hohem G+C-Gehalt	23S, 1901-1918	TAT AGT TAC CAC CGC CGT	35	Roller <i>et al.</i> , 1994
LGC354A ⁴	Gram-positive Bakterien mit niedrigem G+C-Gehalt	16S, 354-371	TGG AAG ATT CCC TAC TGC	35	Meier <i>et al.</i> , 1999
LGC354B ⁴	Gram-positive Bakterien mit niedrigem G+C-Gehalt	16S, 354-371	CGG AAG ATT CCC TAC TGC	35	Meier <i>et al.</i> , 1999
LGC354C ⁴	Gram-positive Bakterien mit niedrigem G+C-Gehalt	16S, 354-371	CCG AAG ATT CCC TAC TGC	35	Meier <i>et al.</i> , 1999

¹ Position in der rRNA von *E. coli* (Brosius *et al.*, 1981)

² verwendete Formamidkonzentration in Prozent (v/v) im Hybridisierungspuffer

³ EUB338I, II, III werden als äquimolare Mischung zur Detektion der Domäne *Bacteria* eingesetzt.

⁴ LGC354A, B, C werden als äquimolare Mischung zur Detektion der Gram-positiven Bakterien mit niedrigem G+C-Gehalt eingesetzt.

B.2.14.2. Einstellen der Konzentration von Oligonukleotidsonden

Die DNA- Konzentration der Oligonukleotidsonden pro ml Stammlösung wurde photometrisch bestimmt. Dazu wurden Cy3-markierte Sonden in H₂O_{reinst}, Fluos-markierte in Carbonatpuffer gelöst und im Spektralphotometer (CE 3021, Cecil Instruments Limited, Cambridge, Großbritannien) in einer 1:200-Verdünnung vermessen. Das Absorptionsmaximum für DNA liegt bei 260nm, für die Farbstoffe siehe Tabelle B.11. Die Farbstoffmarkierungsrate konnte anhand des Quotienten aus Nukleotidabsorption (OD_{260nm}) und Farbstoffabsorption überprüft werden. Der ermittelte Wert war bei vollständiger Umsetzung gleich dem Quotienten der entsprechenden molaren Extinktionskoeffizienten (ε). Geht man von einer mittleren Länge von 18 Basen für die Oligonukleotide aus, ist dieser Wert bei Fluos-markierten 2,5-3 und bei Cy3-markierten Sonden etwa 2. Die DNA- Konzentration von einzelsträngiger DNA in wässriger Lösung wurde näherungsweise nach folgender Formel berechnet (Cryer *et al.*, 1975):

$$1 \text{ OD}_{260\text{nm}} \cong 20 \text{ } \mu\text{g ssDNA/ml}$$

Aus diesen Stammlösungen wurden Arbeitslösungen in $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ in den folgenden Konzentrationen hergestellt:

Cy3, Cy5	→ 30 μg DNA/ml
Fluos	→ 50 μg DNA/ml

Stamm- und Arbeitslösungen wurden bei -20°C gelagert.

B.2.14.3. Zellfixierung mit Reinkulturen

Die Zellen Gram-negativer Bakterien wurden mit einer 4%-Paraformaldehyd-(PFA)-Lösung fixiert (Amann *et al.*, 1990). Die Fixierung mit PFA macht die Zellwände durchlässig für fluoreszenzmarkierte Sonden und erhält gleichzeitig die morphologische Integrität der Zellen während der Hybridisierung aufrecht. Für Gram-positive Bakterien mit ihrer vielschichtigen Zellwand ist dieses Verfahren nicht geeignet. In diesem Fall kann das Eindringen der Sonden durch eine Behandlung der Zellen mit Ethanol erreicht werden (Jurtshuk *et al.*, 1992).

Zellfixierung Gram-negativer Bakterien:

2 ml einer Übernachtskultur wurden 2-3 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden in 200 μl 1 x PBS-Lösung resuspendiert, zur Fixierung mit 600 μl 4%-PFA vermischt und für mindestens 1 h bei 4°C inkubiert. Die Kulturen wurden anschließend abzentrifugiert, 2 mal mit 1 x PBS gewaschen und in einer 1:1 PBS/ EtOH_{abs} -Lösung bis zur Hybridisierung bei -20°C gelagert.

Zellfixierung Gram-positiver Bakterien:

Um die dicke Mureinschicht Gram-positiver Bakterien für Oligonukleotidsonden durchlässig zu machen, wurde die Zellfixierung mit EtOH_{abs} durchgeführt. Hierzu wurde 1 ml einer Übernachtskultur mit 1 ml EtOH_{abs} vermischt und für 3 h bei 4°C inkubiert. Die Kulturen wurden anschließend abzentrifugiert und 2-mal in einem geeigneten Volumen 1 x PBS gewaschen. Die fixierten Zellen wurden in einer 1:1 PBS/ EtOH_{abs} -Lösung bis zur Hybridisierung bei -20°C gelagert.

B.2.14.4. Hybridisierung mit rRNA gerichteten Oligonukleotidsonden

Für die Hybridisierung von Reinkulturen wurden je nach Zelldichte 1-3 µl der fixierten Bakteriensuspension auf Objektträger mit 6 bzw. 10 Aussparungen (Roth, Karlsruhe, Deutschland) pipettiert. Der Objektträger mit dem Probenmaterial wurde in einer aufsteigenden Ethanolreihe (50%, 80%, 100% v/v) für je 3 min entwässert und anschließend luftgetrocknet. Bei der folgenden Hybridisierung wurde die Stringenz (Bindungsstärke) durch Zugabe von Formamid zum Hybridisierungspuffer eingestellt, wobei durch Schwächung der Wasserstoffbrücken zwischen DNA-Oligonukleotidsonde und rRNA die Bindungsstärke des Hybrids verringert wird. So erniedrigt die Zugabe von 1%-Formamid zum Hybridisierungspuffer die Dissoziationstemperatur des Hybrids um etwa 0,5°C, d. h. also je mehr Formamid im Puffer enthalten ist, desto stringenter sind die Hybridisierungsbedingungen.

Die verwendete Formamidkonzentration war abhängig von der jeweils eingesetzten Oligonukleotidsonde und wurde der entsprechenden Literatur entnommen. Die Zusammensetzung des Hybridisierungspuffers war wie folgt:

Hybridisierungspuffer:

NaCl (5 M)	360 µl
Tris/HCl (1 M, pH 8,0)	40 µl
Formamid	siehe Tabelle B.9
H ₂ O _{reinst}	siehe Tabelle B.9
SDS (10% w/v)	2 µl

Tabelle B.9: Formamidkonzentration im Hybridisierungspuffer bei 46°C Hybridisierungstemperatur

Formamid [%]	Formamid [µl]	H ₂ O _{reinst} [µl]
0	0	1600
5	100	1500
10	200	1400
15	300	1300
20	400	1200
25	500	1100
30	600	1000
35	700	900
40	800	800
45	900	700
50	1000	600
55	1100	500
60	1200	400
65	1300	300
70	1400	200
75	1500	100
80	1600	0

Zur Hybridisierung wurde auf jedes Feld mit Reinkulturen eine Mischung von 1 μl Sondenarbeitslösung (30 $\mu\text{g/ml}$ DNA) und 9 μl Hybridisierungspuffer pipettiert. Zur Hybridisierung mit zwei Sonden bei derselben Formamidkonzentration wurde von der zweiten Sonde ebenfalls 1 μl in denselben Reaktionsansatz gegeben. Der mit Hybridisierungslösung bedeckte Objektträger wurde anschließend in ein 50 ml Probengefäß überführt. Um ein Verdunsten der Hybridisierungslösung zu verhindern, wurde der Rest des hergestellten Hybridisierungspuffers auf ein Stück Zellstofftuch gegeben und ebenfalls in das Probengefäß überführt. Die Proben wurden für mindestens 1,5 h bei 46°C inkubiert.

Nach der Hybridisierung erfolgte ein stringenter Waschschrift, um unspezifisch gebundene Sonden zu entfernen. Damit die Menge an toxischem Formamidabfall möglichst gering gehalten wurde, erfolgte die Einstellung der benötigten Stringenz durch Variation der NaCl-Konzentration im Waschpuffer. Ab 20%-Formamid wurde zusätzlich zur Komplexierung störender zweiwertiger Kationen 500 μl 0,5 M Na-EDTA-Lösung zugegeben.

<i>Waschpuffer:</i>	Tris/HCl (1 M, pH 8,0)	1 ml
	Na-EDTA (0,5 M, pH 8,0)	500 μl
	NaCl (5 M)	siehe Tabelle B.10
	ad H ₂ O _{reinst}	50 ml
	SDS (10% w/v)	50 μl

Tabelle B.10: NaCl-Konzentration im Waschpuffer bei 48°C Waschtemperatur

Formamid im Hybridisierungspuffer [%]	NaCl [mol]	μl NaCl [5 M] (von 20-65%-FA Zugabe von 500 μl 0,5 M Na-EDTA)
0	0,900	9000
5	0,636	6300
10	0,450	4500
15	0,318	3180
20	0,225	2150
25	0,159	1490
30	0,112	1020
35	0,080	700
40	0,056	460
45	0,040	300
50	0,028	180
55	0,020	100
60	0,014	40
65	0,010	-
70	0,007	350 μl Na-EDTA
75	0,005	250 μl Na-EDTA
80	0,0035	175 μl Na-EDTA

Die Objektträger wurden 10-15 min im vorgewärmten Waschpuffer bei 48°C in einem Wasserbad inkubiert, anschließend vorsichtig in H₂O_{reinst} geschwenkt und luftgetrocknet. Um Ausbleichungseffekte während der mikroskopischen Auswertung zu vermindern, wurden die fertigen Präparate in Citifluor-AF1 (Citifluor Ltd., London, Großbritannien) eingebettet. Die Objektträger wurden mit einem Deckglas versehen.

B.2.15. Detektion fluoreszenzmarkierter Bakterien im Epifluoreszenz-Mikroskop

Die Detektion von fluoreszenzmarkierten Bakterien erfolgte mit einem Epifluoreszenz-Mikroskop der Firma Zeiss (Axioplan, Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Zur Auswertung wurde ein Ölimersionsobjektiv (Plan-Neofluar Objektiv, numerische Apertur 1,3) mit 100-facher Vergrößerung verwendet. Mit der zusätzlichen Vergrößerung durch das Okular (10x) erfolgte die Detektion der Bakterien mit einer 1000-fachen Gesamtvergrößerung. Das Anregungslicht wurde durch eine Quecksilberlampe (HBO50/AC, Zeiss) erzeugt. Die verwendeten Fluoreszenzfiltersätze sind in der Tabelle B.11 aufgeführt.

Tabelle B.11: Kenndaten der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe sowie der verwendeten Filtersätze

Fluorochrom	Anregung [nm]	Emission [nm]	Anregungsfilter	Farbteiler	Emissionsfilter
Grüne Fluoreszenz; Fluorescein	460-500	510-560	HQ 480/40	Q 505LP	HQ 535/50
Rote Fluoreszenz, Cy3	510-560	572-648	HQ 535/50	Q565LP	HQ 605/75

B.2.16. Quantitative „real-time“ PCR (TaqMan)

B.2.16.1. Das Prinzip

Diese von Lee *et al.* (1993) bei PE Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland) entwickelte Technik basiert auf der Anwendung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und auf dem Einsatz der 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der *Taq* Polymerase in Verbindung mit einer Fluoreszenz-markierten Sonde. Als Sonde wird ein sequenzspezifisches Oligonukleotid verwendet, das zwischen den beiden Primern an die Zielsequenz bindet und am 5'-Ende mit

einem fluoreszierenden „Reporter“-Farbstoff (Fluorescein-Derivat) markiert ist. Das 3'-Ende der Sonde trägt einen „Quencher“-Farbstoff (Rhodamin-Derivat) und ist darüber hinaus mit einem Phosphatrest blockiert, der eine Verlängerung des Sondenstrangs verhindert (Tabelle B.12).

Wird die intakte Sonde bei einer spezifischen Wellenlänge (488nm) zur Fluoreszenz angeregt, so wird die Fluoreszenz des „Reporter“-Farbstoffs aufgrund der räumlichen Nähe zum „Quencher“ durch einen Fluoreszenz-Energietransfer (FRET) unterdrückt, so dass nur die Emission des „Quenchers“ messbar ist. Während der PCR hybridisieren Primer und Sonde zunächst an den Matrizenstrang. In der Extinktionsphase (Abb. B.1) trifft die *Taq* Polymerase dann auf die Sonde, und beginnt sie vom Strang zu verdrängen. Dabei entsteht eine Y-förmige Sekundärstruktur, wodurch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der *Taq* Polymerase aktiviert und die Sonde geschnitten wird. Freie, nicht-hybridisierte Sondenmoleküle bleiben dagegen intakt. Durch die Sondenhydrolyse wird die räumliche Nähe und damit auch der Fluoreszenz-Energietransfer zwischen „Reporter“ und „Quencher“ aufgehoben. „Reporter“ und „Quencher“ fluoreszieren nun in zwei getrennten Wellenlängenbereichen. Entsprechend der Akkumulation des PCR-Produktes steigt auch die Fluoreszenz des freigesetzten „Reporters“ mit jedem Amplifikationszyklus an. Dabei führt weder die unspezifische Bindung der Primer noch die der Sonde zu einem Anstieg der „Reporter“-Fluoreszenz, da die Sondenhydrolyse nur dann erfolgt, wenn zwischen den Primern auch die Sonde an diejenige Sequenz bindet, die während der PCR amplifiziert wird.

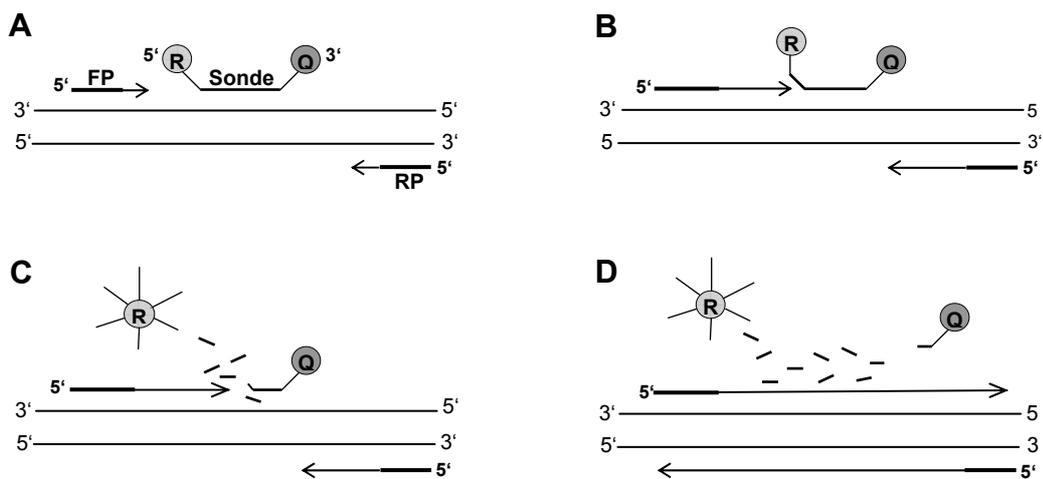


Abb.: B.1: Prinzip der TaqMan-PCR. A: Primer-Extension (R = Reporter, Q = Quencher, FP = Vorwärts-Primer, RP = Rückwärts-Primer), B: Ausbildung der Y-förmigen Sekundärstruktur, C: Sondenhydrolyse, D: Abschluss der Polymerisation.

Die Fluoreszenzanregung erfolgt im PRISM 7700 *Sequence Detectors* (PE Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) mit einem Argonlaser, wobei der Anstieg des „Reporter“-Fluoreszenzsignals erfasst und über einen *Power Macintosh 7200* gesteuert wird. Dadurch ist es möglich, den gesamten Verlauf der PCR-Reaktion darzustellen. Auf diese Weise kann die Quantifizierung des Fluoreszenzsignals verschiedener Proben unabhängig von ihrer Ausgangskonzentration zu einem Zeitpunkt erfolgen, an dem sie sich alle in der exponentiellen Phase der Amplifikation befinden. Die Verwendung einer Standardkurve, die auf bekannten Konzentrationen des Zielgens basiert, macht es möglich, das in der untersuchten Probe vorhandene Gen zu quantifizieren.

Tabelle B.12: Eingesetzte Farbstoffe

Farbstoff	Bezeichnung nach IUPAC	Typ/Funktion	Anregung [nm]	Emission [nm]
FAM	6-Carboxy-fluorescein	Reporter	488	518
TAMRA	6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin	Quencher	488	582
ROX	6-Carboxy-X-rhodamin	Passiver Referenzfarbstoff	488	602

B.2.16.2. Auswertung der TaqMan-PCR

In der frühen Phase der PCR ändert sich das Fluoreszenzsignal kaum. In dieser Phase wird das Hintergrundsignal ermittelt (Abb. B.2). Als Maß für die Fluoreszenz dient der ΔR_n -Wert, der aus dem normalisierten „Reporter“-Signal (R_n) abzüglich des Hintergrundsignals berechnet wird. Der R_n -Wert entspricht dabei dem Quotienten der Emissionsintensität des „Reporter“-Farbstoffs dividiert durch die Emissionsintensität des Referenzfarbstoffes ROX, der dem Reaktionspuffer zugesetzt ist. Die Normalisierung durch den Referenzfarbstoff dient dem Ausgleich unspezifischer Schwankungen, wie z. B. Konzentrationsschwankungen aufgrund von Volumenänderungen (z. B. Pipettierfehler).

Die Quantifizierung erfolgt über den C_T -Wert (*threshold cycle*), der die Zyklenzahl ausdrückt, an dem die „Reporter“-Fluoreszenz erstmals einen bestimmten Schwellenwert (engl. threshold) oberhalb der Basislinie erreicht. Der Schwellenwert wird so gewählt, dass er die Amplifikationskurven der zu vergleichenden Proben in der exponentiellen Phase schneidet. Je

höher die Ausgangskonzentration der Zielsequenz zu Beginn der PCR ist, desto eher wird der Schwellenwert erreicht und desto niedriger ist der C_T -Wert.

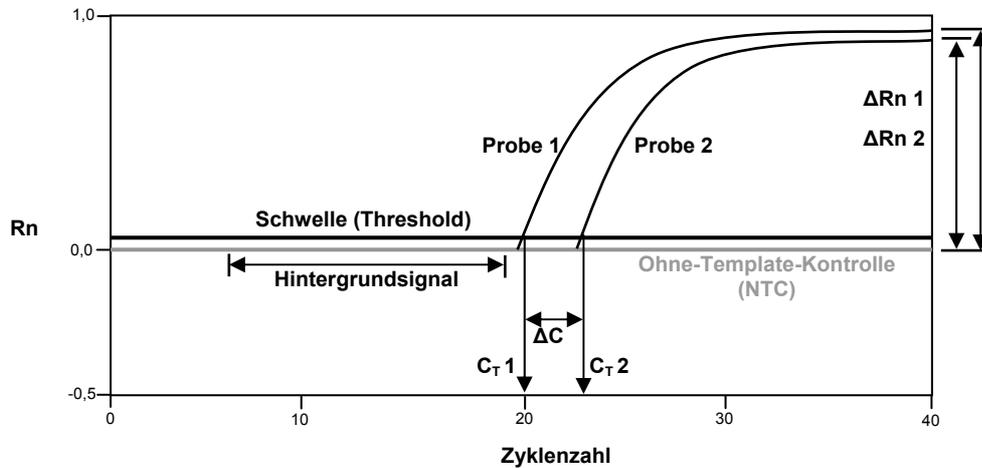


Abb. B.2: Schema eines TaqMan-Amplifikationsplots

B.2.16.3. Herstellung der Standard-DNA für die Generierung einer Eichgeraden

B.2.16.3.1 Amplifikation und Klonierung der ‚red-like‘ *cbbL*-Standard-DNA

Für die Generierung einer Eichgeraden benötigt man relativ große Mengen an spezifischen *cbbL*-Fragmenten. Da entsprechende PCR-Produkte nicht über eine ausreichende Stabilität verfügen, ist es sinnvoll, diese Fragmente über Klonierung zu generieren (Öhlmann, PE Applied Biosystems, pers. Mitteilung). Die PCR-Produkte wurden auf einem 2,5%-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und aus dem Gel eluiert (s. B.2.5.3). Die Klonierung der PCR-Amplifikate erfolgte mit dem Klonierungskit *TOPO TA Cloning*[®] Kit der Firma Invitrogen (Carlsbad, USA) mit chemokompetenten *E. coli* TOP10F' Zellen (s. B.2.7). Von jeder Klonierung wurden 5 weiße Klone ausgewählt, die Plasmid-DNA im präparativen Maßstab präpariert (s. B.2.2.4) und der Ligationserfolg nach Restriktion mit *EcoRI* überprüft (s. B.2.8). Plasmid-DNA, die nach der *EcoRI*-Restriktion ein inseriertes Fragment der richtigen Größe aufwies, wurde einer Sequenzanalyse unterzogen (s. B.2.11).

Die Herstellung der Standard-DNA erfolgte für die ‚red-like‘ *cbbL*-Genfragmente. Dafür wurde genomische DNA aus *Sinorhizobium meliloti* extrahiert und für die Amplifikation mit dem Primerpaar *cbbLR1-F/cbbLR1int-R* eingesetzt (Tabelle B.2).

B.2.16.3.2 Linearisierung der Plasmide

Die Plasmide wurden mit *Hind*III (Fermentas GmbH) ÜN bei 37°C linearisiert. Die Reaktionen wurden in dem vom Hersteller mitgelieferten Puffer und nach Angaben des Herstellers angesetzt. Die vollständige Linearisierung wurde nach Restriktion auf einem 1%-Agarosegel überprüft.

Puffer (10 x)	2 µl
<i>Hind</i> III (2 U/µl)	1 µl
Plasmid	10 µl
H ₂ O _{reinst}	ad 20 µl

B.2.16.3.3 Quantifizierung der Standard-DNA

Die Konzentration der Standard-DNA wurde photometrisch bestimmt (s. B.2.4).

B.2.16.3.4 Verdünnung der Standard-DNA

Die Stammlösung der Standard-DNA wurde in 5 µl Aliquots bei -20°C gelagert. Die Standard-DNA wurde durch serielle Verdünnungen zu gewünschten Konzentrationen verdünnt, um eine Eichgerade zur Quantifizierung zu erhalten.

B.2.16.4. Durchführung der TaqMan-PCR

Für die TaqMan-PCR wurde die *Ampli*TaqGold DNA-Polymerase mit dazugehörigem Puffer A von PE Applied Biosystems verwendet. Der Puffer A enthält den zur Normalisierung des „Reporter“-Signals erforderlichen internen, passiven Referenzfarbstoff ROX. Die Optimierung der quantitativen PCR erfolgte durch Variation der Konzentration ausgewählter Einzelkomponenten wie MgCl₂, Primer und Sonde.

Die Quantifizierung der ‚red-like‘ *cbbL*-Gene erfolgte mit den Primern *cbbLR1*-F und *cbbLR1int*-R (Tabelle B.2), die ein Produkt von 270 bp Größe bilden, sowie mit der 5’-FAM- und 3’-TAMRA-markierten Sonde REDpro (Tabelle B.13). Die Konstruktion der ‚red-like‘ *cbbL*-spezifischen Primer und Sonden erfolgte mit dem im Softwarepaket ARB erstellten *cbbL*-Datensatz, der *cbbL*-Sequenzen aus der öffentlichen Datenbank NCBI und die in dieser Arbeit ermittelten *cbbL*-Boden- und Referenzsequenzen enthält (s. C.2.1). Ein wichtiger Parameter bei der Konstruktion von Primer und Sonde ist, dass diese dicht hintereinander

angeordnet sind, wodurch sehr kurze Amplifikate (100-300 bp) entstehen. Dadurch wird eine sehr hohe Amplifikationseffizienz erzielt.

Tabelle B.13: ‚Red-like‘ *cbbL*-spezifische TaqMan-Sonde

Sonde ¹	Sequenz (5'-3') ²	Bindungsposition ³	T _M
REDpro	CAT GCA YTG GCG CGA CCG	666-683	60°C

¹ Sonde ist am 5'-Ende FAM- und am 3'-Ende TAMRA-markiert.

² Basensymbole: Y = (C/T)

³ Position in der *cbbL*-Sequenz von *Ralstonia eutropha* H16

Die PCR wurde in 50 µl Reaktionsansätzen durchgeführt, wobei jeder Reaktionsansatz mindestens als Duplikat angesetzt wurde und aus folgenden Einzelkomponenten bestand:

10 x Puffer A	5 µl
10 x 2 mM dNTP-Mix	5 µl
25 mM MgCl ₂	x µl
Primer (100 pmol/µl)	x µl
Sonde (100 pmol/µl)	x µl
Taq Polymerase (5 U/µl)	0,4 µl
Template-DNA	1 µl
ad H ₂ O _{reinst}	50 µl

Es wurde eine 2-Schritt-PCR nach folgendem Temperaturprofil durchgeführt:

1 x	Aktivierung der <i>AmpliTaqGold</i> DNA-Polymerase	10 min, 95°C
40 x	{ Denaturierung Annealing	15 sec, 95°C 1 min, 60°C

Eine Extinktionstemperatur unter 72°C begünstigt die Bindung der Sonde, so dass ihre Hydrolyse durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der *AmpliTaqGold* Polymerase effizienter verläuft.

Für die Analyse wurden spezielle Reaktionsgefäße (PE Applied Biosystems) verwendet:

Optical Plates (96 wells, *MicroAmp*[®] *Optical*, PE Applied Biosystems)

Optical Tubes (8er Streifen, *MicroAmp*[®] *Optical*, PE Applied Biosystems)

Optical Caps (8er Streifen, *MicroAmp*[®] *Optical*, PE Applied Biosystems)

B.2.16.5. Berechnung der *cbbL*-Kopienzahl pro Gramm Boden

Mit Hilfe der Standardkurve ist es möglich, die Kopienzahl eines untersuchten Gens in einer unbekannt Probe pro Reaktionsansatz zu bestimmen. Aus dieser Kopienzahl und der photometrisch bestimmten DNA-Konzentration lässt sich die Anzahl der Genkopien/g Boden hochrechnen. Im Folgenden ist die Berechnung beispielhaft für den Einsatz von 10 ng DNA aus der Bodenprobe HKO aufgeführt:

Aus 0,5 g Boden wurden 50 µl DNA-Lösung mit einer Konzentration von 30 ng/µl erhalten. Bei einem standardisierten Einsatz von 10 ng DNA-Lösung in der TaqMan-PCR ergab sich pro Ansatz eine Genkopienzahl von $3,5 \times 10^4$. Daraus folgt für die Berechnung der Genkopienzahl/g Boden:

$$\begin{aligned}
 &3,5 \times 10^4 \text{ Genkopien in } 10 \text{ ng DNA-Lösung} \\
 &\times 3 \text{ (hochrechnen der Kopienzahl auf } 30 \text{ ng/}\mu\text{l HKO-DNA)} \\
 &= y \text{ (} cbbL\text{-Kopienzahl/}\mu\text{l HKO-DNA),}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 &y \times 50 \mu\text{l (Gesamtvolumen der extrahierten DNA aus } 0,5 \text{ g Boden)} \times 2 \\
 &= cbbL\text{-Genkopien/g Boden}
 \end{aligned}$$

C. Ergebnisse

C.1. Diversität von ‘green-like’ und ‘red-like’ *cbbL*-Genen aus Boden

C.1.1. Charakterisierung der Bodenproben

Die in dieser Arbeit untersuchten Bodenproben wurden auf dem im Jahre 1878 angelegten Dauerdüngungsversuch *Ewiger Roggenbau* in Halle entnommen. Das nach seinem Begründer benannte Julius-Kühn-Feld befindet sich im Süden des Bundeslandes Sachsen-Anhalt und dient als Lehr- und Versuchstation der Landwirtschaftlichen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Mit dieser Anlage sollte in erster Linie die dauerhafte Eignung der Mineraldüngung zur Aufrechterhaltung der Ertragsfähigkeit der Böden untersucht werden. Geographisch gehören die Dauerdüngungsversuchsfelder zum östlichen Harzvorland. Infolge seiner Lage im Regenschatten des Harzes gehört der Standort zum mitteldeutschen Trockengebiet. Dieses Gebiet zählt zu den niederschlagsärmsten in Deutschland. Stadt- und Industrienähe und die damit verbundenen vielfältigen Einflüsse auf die Umwelt sind weitere prägende Elemente für den Standort. So ist das Versuchsfeld auf Grund der nahe gelegenen Braunkohleindustrie durch Ablagerung von Flugasche charakterisiert. Der Boden des Julius-Kühn-Feldes ist als lessivierte Schwarzerde beschrieben. Der Anteil an Korngrößen setzt sich aus 69% Sand, 23% Schluff und 8% Ton zusammen. Der durchschnittliche pH-Wert des Bodens beträgt 6,3.

Das Kernstück des Düngungsversuchs stellen die folgenden drei Düngungsvarianten dar, die auch Bestandteil vorliegender Arbeit sind:

HKO - Ungedüngt

HNPK- Mineralische Volldüngung mit 60 kg N, 24 kg P und 75 kg K ha⁻¹ a⁻¹

HSM - Stallmistdüngung mit 12 t ha⁻¹ a⁻¹

C.1.2. Entwicklung spezifischer PCR-Primer zur Amplifikation von ‘green-like’ und ‘red-like’ *cbbL*-Genen

Um ein PCR-gestütztes Verfahren zur Detektion von *cbbL*-Genen aus Boden zu entwickeln, wurden alle aus der öffentlichen Datenbank NCBI verfügbaren bakteriellen *cbbL*-Sequenzen in das Softwareprogramm ARB importiert und dort einer vergleichenden Sequenzanalyse unterzogen. Dieses Programm ermöglicht es, die *cbbL*-Nukleinsäuren in die entsprechenden Aminosäuren zu translatieren und mit Unterstützung des im ARB implementierten Programms GDE_Editor, die Sequenzen basierend auf ihren Nukleinsäuren und Aminosäuren nach Sequenzähnlichkeiten in einem Alignment anzuordnen. Dies diente dazu, möglichst konservierte Bereiche innerhalb der Zielregion zu erkennen und somit effektiv spezifische Amplifikationsprimer konstruieren zu können. Zusätzlich ermöglicht dieses Programm, Sequenzidentitäten untereinander mit Hilfe von Distanzmatrizen zu berechnen. Die Sequenzidentitäten aller *cbbL*-Nukleinsäuren variieren mit Werten von 22 bis 100% sehr stark. Basierend auf der Aminosäuresequenz der großen RubisCO-Untereinheit sind diese Werte gering höher und rangieren zwischen 31,2% und 100%. Auf Grund dieser hohen Sequenzvariabilität war es nicht möglich, ein effektives PCR-Primerpaar zu konstruieren, das alle bekannten *cbbL*-Sequenzen der Umwelt erfasst. Deshalb wurden zwei unterschiedlich spezifische Primerpaare entwickelt, die so degeneriert waren, dass sie für die

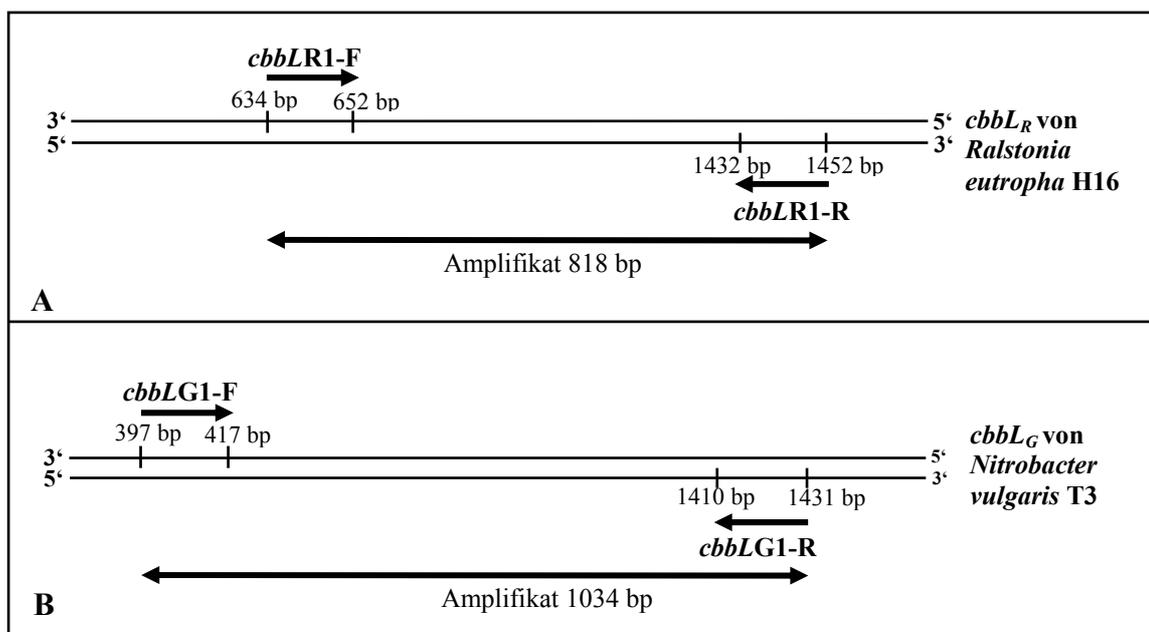


Abb. C.1: Schematische Übersicht der komplementären Sequenzbereiche der ‘red-like’ (A) und ‘green-like’ (B) *cbbL*-spezifischen Primer. Angezeigt sind die Primerkombinationen, Primerbindungspositionen und die Länge der Amplifikate. Angegebene Primerpositionen beziehen sich auf das ‘red-like’ *cbbL*-Gen von *R. eutropha* H16 bzw. ‘green-like’ *cbbL*-Gen von *N. vulgaris* T3.

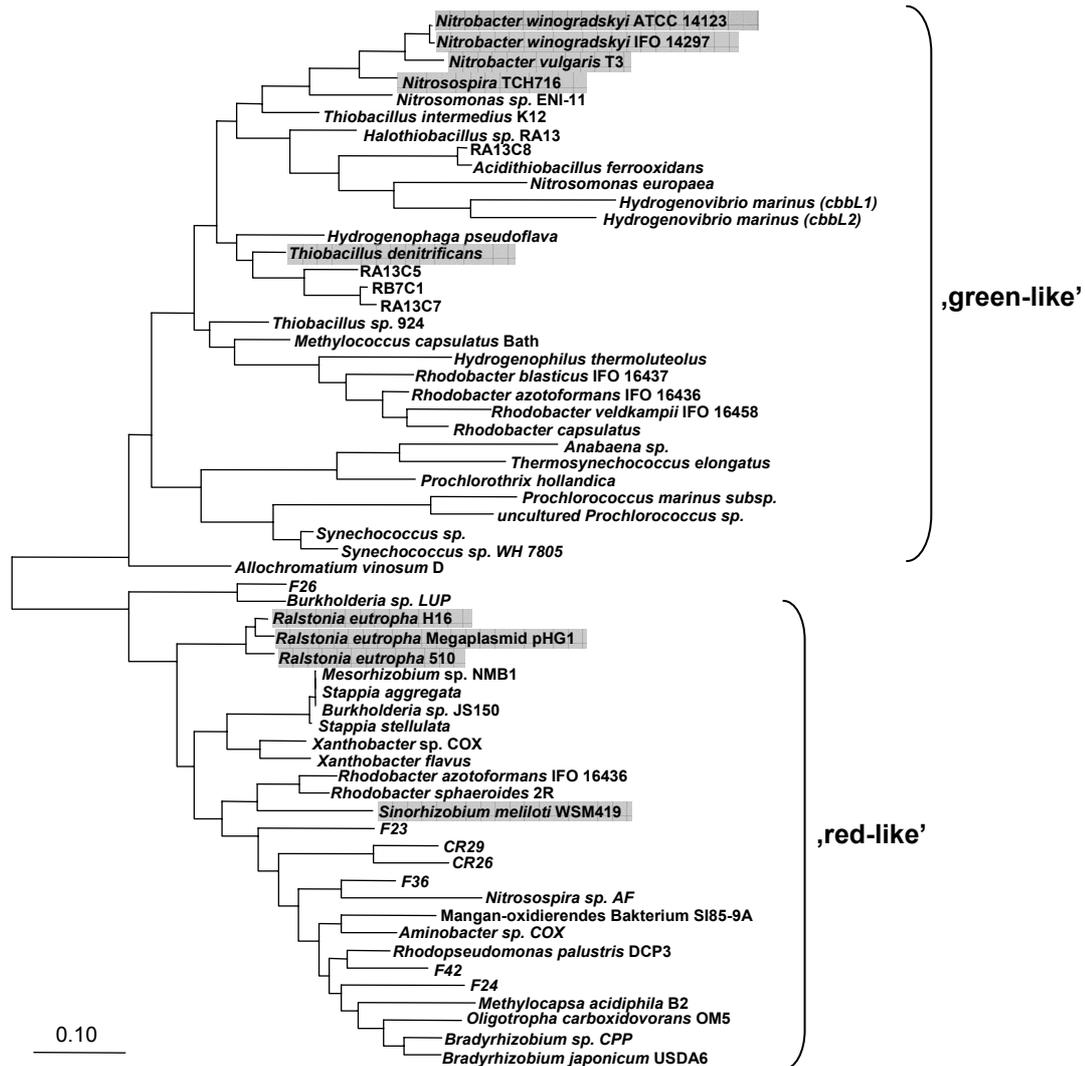


Abb. C.2: Phylogenetischer Baum, der die Verwandtschaftsverhältnisse der bakteriellen 'red-like' und 'green-like' *cbbL*-Sequenzen aus der NCBI Datenbank darstellt. Der Baum wurde nach der Maximum Likelihood-Methode berechnet, wobei keine Einschränkungen, die die Positionen betreffen, vorgenommen wurden. Bakterielle kultivierte Vertreter wurden mit Namen und unkultivierte mit Ziffern und Buchstaben bezeichnet. *CbbL*-Sequenzen, die zur Entwicklung der Oligonukleotidprimer verwendet wurden, sind grau unterlegt. Der Balken repräsentiert einen Sequenzunterschied von 10%.

Amplifikation ausgewählter *cbbL*-Sequenzen der 'green-like'- und 'red-like'- Gruppe geeignet waren (Abb. C.2). Bei der Entwicklung dieser PCR-Primer wurde darauf geachtet, dass die erfassten *cbbL*-Sequenzen möglichst von terrestrischen, chemolithotrophen Bakterien stammen. Ein weiterer wichtiger Aspekt für die Konstruktion der Primer war ebenfalls die Länge des Amplifikats, denn nur mit ausreichend langen Sequenzen ist es möglich, eine aussagekräftige Phylogenie zu betreiben. Das *cbbL*-Gen weist eine Länge von ca. 1400 bp auf. Es konnte für die 'green-like' *cbbL*-Sequenzen ein spezifisches Primerpaar konstruiert werden, welches ein PCR-Produkt von etwa 1030 bp Länge bildet. Dabei bindet der Vorwärts-Primer *cbbLG1-F* an die Sequenzpositionen 397-417 und der Rückwärtsprimer

cbbLG1-R an die Positionen 1410-1431 (Abb. C.1). Die Basenpositionen beziehen sich auf das ‘green-like’ *cbbL*-Gen von *N. vulgaris* T3. Das Amplifikat für die ‘red-like’ *cbbL*-Sequenzen war mit etwa 820 bp geringfügig kürzer. Der Vorwärtsprimer *cbbLR1-F* bindet an die Sequenzpositionen 634-652 und der Rückwärtsprimer *cbbLR1-R* an die Positionen 1432-1452, wobei sich die Positionen auf das ‘red-like’ *cbbL*-Gen von *R. eutropha* H16 beziehen (Abb. C.1). Die Primersequenzen und die erfassten Zielorganismen sind in Abbildung C.3 und C.4 dargestellt.

Die entwickelten Primer wurden im weiteren Verlauf zur Amplifikation von ‘red-like’ und ‘green-like’ *cbbL*-Genen aus Bakterien-DNA sowie Boden-DNA herangezogen.

Primer <i>cbbLR1-F</i> ^a	5' -AAGGAYGACGAGAACATC ^b -3'
<i>Ralstonia eutropha</i> H16	-----T-----
<i>Ralstonia eutropha</i> megapl.pHG1	-----C-----
<i>Ralstonia eutropha</i> 510	-----T-----
<i>Mesorhizobium</i> sp. NMB1	-----C-----
<i>Stappia aggregata</i>	-----C-----
<i>Stappia</i> sp. CV812-530	-----C-----
<i>Burkholderia</i> sp. JS150	-----C-----
<i>Stappia stellulata</i>	-----C-----
<i>Xanthobacter flavus</i> H4-14	-----T-----
<i>Xanthobacter</i> sp. COX	-----C-----
<i>Sinorhizobium meliloti</i> WSM419	-----C-----
<i>Rhodobacter azotoformans</i> IFO 16436	-----C-----
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> 2R	-----C-----
<i>Burkholderia</i> sp. LUP	-----C-----
Mangan-oxidierendes Bakterium SI85-9A	-----C-----
<i>Aminobacter</i> sp. COX	-----C-----
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA6	-----C-----
<i>Bradyrhizobium</i> sp. CPP	-----C-----
<i>Oligotropha carboxidovorans</i> OM5	-----C-----
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> DCP3	-----C-----
<i>Methylocapsa acidiphila</i> B2	-----C-----
<i>Nitrospira</i> sp. 40KI	-----C-----
clone CR29	-----C-----
clone CR36	-----C-----
clone F26	-----C-----
clone F23	-----C-----
clone F42	-----C-----
clone F30	-----C-----
clone F38	-----C-----
clone F36	-----C-----
Primer <i>cbbLR1-R</i> ^a	5' -TCGGTCGGSGTGTAGTTGAA ^b -3'
<i>Ralstonia eutropha</i> H16	-----G-----
<i>Ralstonia eutropha</i> megapl.pHG1	-----G-----
<i>Ralstonia eutropha</i> 510	-----G-----
<i>Sinorhizobium meliloti</i> WSM419	-----C-----

Abb. C.3: Primersequenzen für die ‘red-like’ *cbbL*-Sequenzen und die erfassten Zielorganismen.

^a PCR-Primer, die spezifisch für ‘red-like’ *cbbL*-Sequenzen sind, wurden mit *cbbLR1* bezeichnet. Vorwärts- und Rückwärts-Primer werden mit F oder R als letzten Buchstaben bezeichnet.

^b Y = C oder T; S = G oder C.

Primer <i>cbbLG1-F</i>^a	5'-GGCAACGTGTTCCGGSTTCAA^b-3'
<i>Nitrobacter vulgaris</i> T3	-----G-----
<i>Nitrobacter winogradskyi</i> IFO14297	-----G-----
<i>Nitrobacter winogradskyi</i> AF14123	-----G-----
<i>Nitrosospira</i> sp. TCH716	-----G-----
<i>Allochromatium vinosum</i> D	-----C-----
<i>Rhodobacter veldkampii</i> IFO 16458	-----C-----
<i>Thiobacillus</i> sp. 924	-----C-----
<i>Methylococcus capsulatus</i> Bath	-----C-----
<i>Thiobacillus denitrificans</i>	-----C-----
<i>Hydrogenophaga pseudoflava</i>	-----C-----
Primer <i>cbbLG1-R</i>^a	5'-TTGATCTCTTTCCACGTTTCC-3'
<i>Nitrobacter vulgaris</i> T3	-----
<i>Nitrobacter winogradskyi</i> IFO 14297	-----
<i>Nitrobacter winogradskyi</i> ATCC 14123	-----
<i>Nitrosospira</i> sp. TCH716	-----
<i>Thiobacillus denitrificans</i>	-----

Abb. C.4: Primersequenzen für die 'green-like' *cbbL*-Sequenzen und die erfassten Zielorganismen.
^a PCR-Primer, die spezifisch für 'green-like' *cbbL*-Sequenzen sind, wurden mit *cbbLG1* bezeichnet.
 Vorwärts- und Rückwärts-Primer werden mit F oder R als letzten Buchstaben im Namen bezeichnet.
^b S = G oder C.

C.1.3. Isolierung der Gesamt-DNA aus Bodenproben

Die Gesamt-DNA aus jeweils 500 mg der Bodenproben HKO, HSM und HNPk wurde mittels des *Fast DNA Spin Kit for Soil* isoliert. Dieser Kit ermöglicht die Extraktion der DNA aus der Umweltprobe ohne störende Huminsäuren, die, da sie stark an Nukleinsäuren binden, unter Verwendung klassischer Extraktionsmethoden mit den Gesamtnukleinsäuren isoliert werden und somit die weiteren Analysen beeinträchtigen. Zusätzlich wurde für die Extraktion eine im Protokoll nicht aufgeführte 5,5 M Guanidiniumthiocyanat-Lösung eingesetzt, die als chaotropes Reagenz weitere störende Proteine denaturiert und somit unterstützend auf die weiteren Analysen wirkt.

Die Größe der isolierten Fragmente wurde gelelektrophoretisch bestimmt. Dabei wiesen die Fragmente eine Größe von über 10 kb auf (Abb. C.5). Die Ausbeuten der extrahierten Gesamtnukleinsäuren aus den drei Bodenproben betrug 30 bis 120 ng/μl.

Um die Gesamt-DNA aus bakteriellen Reinkulturen zu isolieren, wurde ebenfalls der *Fast DNA Spin Kit for Soil* angewendet. Die Extraktion wurde dabei strikt nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die Ausbeuten der extrahierten DNA aus Bakterien waren deutlich höher als die aus Boden und rangierten von 120 bis 350 ng/μl.

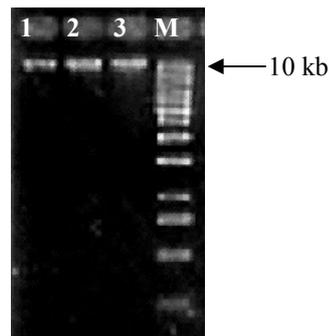


Abb. C.5: Extrahierte Gesamt-DNA aus den Bodenproben HKO, HSM und HNPK nach 1%-Agarose-Gelelektrophorese. Spur 1: HKO, Spur 2: HSM, Spur 3: HNPK, DNA-Längenstandard: *GeneRuler™ 1kb DNA-Ladder*.

C.1.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur spezifischen Amplifikation von *cbbL*-Genen

C.1.4.1. Amplifikation von *cbbL*-Genen aus DNA von bakteriellen Reinkulturen

Um die Spezifität der neu konstruierten ‘red-like’ und ‘green-like’ *cbbL*-Primer zu untersuchen, wurde eine PCR mit DNA aus bakteriellen Referenzorganismen durchgeführt. Die Amplifikation mit dem ‘red-like’ *cbbL*-Primerpaar *cbbLR1-F/cbbLR1-R* erfolgte mit DNA aus *Ralstonia eutropha* und *Sinorhizobium meliloti* und führte für beide Proben zur Bildung eines spezifischen PCR-Produkts von etwa 820 bp Größe. Die PCR mit den ‘green-like’-Primerpaar *cbbLG1-F/cbbLG1-R* wurde mit DNA aus *Nitrobacter vulgaris* und *Nitrobacter winogradskyi* durchgeführt. In diesem Fall konnte ebenfalls das erwartete DNA-Fragment von etwa 1030 bp Größe amplifiziert werden.

Um den Datensatz an verfügbaren ‘red-like’ *cbbL*-Sequenzen zu erweitern, wurden zusätzlich verschiedene bakterielle Organismen auf das Vorhandensein dieser ‘red-like’ *cbbL*-Gene untersucht. Die ‘red-like’ *cbbL*-spezifische PCR wurde mit extrahierter DNA aus 17 verschiedenen Bakterien durchgeführt. Dabei konnte aus 10 der untersuchten Bakterien erfolgreich das spezifische Produkt von 820 bp Länge amplifiziert werden. In Tabelle C.1 sind die getesteten Organismen und die Ergebnisse aus der Amplifikation aufgeführt. Die Amplifikation erwies sich jedoch als schwierig, da es in allen Proben neben der Bildung eines spezifischen Fragments ebenfalls zur Bildung von unspezifischen Produkten kam, deren Größen abhängig von der eingesetzten DNA stark variierten. Aus diesem Grund wurden die Banden mit der korrekten Größe aus dem Gel eluiert und zur Transformation chemokompetenter *E. coli*-Zellen eingesetzt. Dies gewährte eine ausreichende Ausbeute an ‘red-like’ *cbbL*-DNA-Fragmenten für die Sequenzierung.

Tabelle C.1: Verwendete Mikroorganismen zur Amplifikation von ‚red-like‘ *cbbL*-Genfragmenten und die erhaltenen PCR-Produkte

Spezies	Stamm ^a	erhaltene PCR-Produkte
<i>Alcaligenes faecalis</i>	DSM 13644	+
<i>Alcaligenes</i> sp.	DSM 30128	+
<i>Azospirillum brasilense</i> Sp7	DSM 1690	-
<i>Azospirillum lipoferum</i>	GSF 19	+
<i>Azospirillum doebereineriae</i>	GSF 21	-
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	DSM 6445	-
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	DSM 6882	+
<i>Ochrobactrum tritici</i>	DSM 13340	+
<i>Ralstonia picketti</i>	DSM 6297	-
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	ATCC 53912	+
<i>Rhizobium radiobacter</i>	DSM 30147	+
<i>Sinorhizobium fredii</i>	ATCC 35423	+
<i>Sinorhizobium terangaie</i>	DSM 11282	+
<i>Sinorhizobium xinjiangense</i>	DSM 5852	-
<i>Xanthobacter agilis</i>	DSM 3770	+
<i>Xanthobacter autotrophicus</i>	DSM 432	+
<i>Xanthomonas campestris</i>	DSM 1350	-

^aATCC, American Type Culture Collection

DSM, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen

GSF, Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit

C.1.4.2. Amplifikation von ‚green-like‘ *cbbL*-Genen aus Boden-DNA

Die PCR von ‚green-like‘ *cbbL*-Sequenzen aus Boden wurde mittels extrahierter DNA aus den Proben HKO, HSM und HNPK und dem Primerpaar *cbbLG1-F/cbbLG1-R* durchgeführt. Die Amplifikation der DNA aus HKO- und HNPK führte für beide Proben zur Bildung eines spezifischen DNA-Fragments von 1030 bp Größe. Für die DNA aus dem HSM-Boden konnte kein Fragment dieser Größe erhalten werden. Um mögliche Inhibitoren in der DNA aus HSM zu detektieren, wurde in einem Kontrollansatz HSM-DNA mit *N. vulgaris* DNA versetzt. Diese Amplifikation führte zur Bildung des spezifischen Produkts, womit Boden-Inhibitoren als Ursache für die Nicht-Amplifizierbarkeit der DNA aus der Bodenprobe HSM ausgeschlossen wurden (Abb. C.6).

Die spezifischen Banden an der Position mit der Größe von 1030 bp der Proben HKO und HNPK wurden für die weiteren Untersuchungen aus dem Gel eluiert und zur Erstellung von ‚green-like‘ *cbbL*-Genbanken eingesetzt.

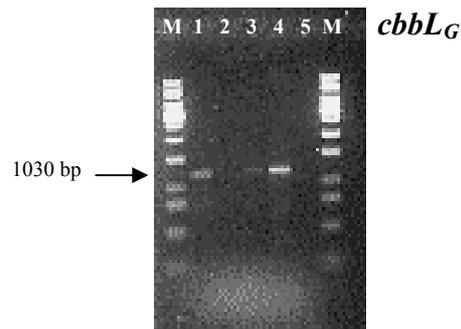


Abb. C.6: Agarosegel (1,5%-Agarose) nach Elektrophorese der PCR-Produkte, die mit den ‘green-like’ *cbbL*-spezifischen Primern *cbbLG1-F/cbbLG1-R* amplifiziert wurden. Spur 1: HKO, 2: HSM, 3: HNPK, 4: HSM mit *Nitrobacter vulgaris*. 5. Negativkontrolle (ohne Template-DNA), M DNA-Längenstandard: *GeneRuler™ 1kb DNA-Ladder*.

C.1.4.3. Amplifikation von ‘red-like’ *cbbL* Genen aus Boden-DNA

Die Amplifikation der DNA aus den Bodenproben HKO, HSM und HNPK mittels der ‘red-like’ *cbbL*-spezifischen Primern *cbbLR1-F* und *cbbLR1-R* führte für alle Proben zur Bildung eines spezifischen DNA-Fragments von 820bp Größe. Ebenfalls zeigte die Kontrolle mit DNA aus *R. eutropha* die Bildung des spezifischen Produkts (Abb. C.7).

Die PCR-Produkte der drei Bodenproben wurden aus dem Gel eluiert und zur Erstellung von ‘red-like’ *cbbL*-Genbanken eingesetzt.

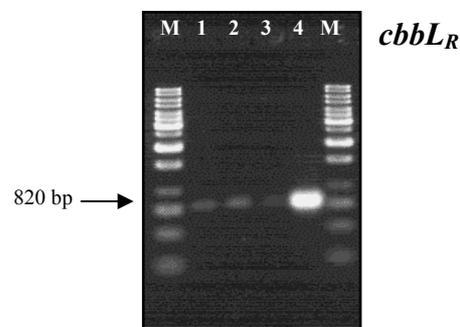


Abb. C.7: Agarosegel (1,5%-Agarose) nach Elektrophorese der PCR-Produkte, die mit den ‘red-like’ *cbbL*-spezifischen Primern *cbbLR1-F/cbbLR1-R* amplifiziert wurden. Spur 1: HKO, 2: HSM, 3: HNPK, 4: *R. eutropha*, DNA-Längenstandard: *GeneRuler™ 1kb DNA-Ladder*.

C.1.5. Erstellung von *cbbL*-Genbanken

Die aus dem Agarosegel eluierten PCR-Produkte wurden in den Vektor pCR[®]2.1-TOPO ligiert und dieser Ansatz wurde zur Transformation von *E. coli* eingesetzt. Durch Inkubation mit der Restriktionsendonuclease *EcoRI* wurde auf das Vorhandensein eines

Inserts mit der richtigen Größe untersucht. Positive Klone wurden in Glycerinkulturen konserviert.

C.1.5.1. Erstellung von ‘green-like’ *cbbL* Genbanken

Für die Erstellung von ‘green-like’ *cbbL*-Genbanken wurden PCR-Produkte eingesetzt, die aus der Boden-DNA HKO bzw. HNPk amplifiziert wurden. Die erstellten Genbanken erhielten die Bezeichnungen HKOG und HNPkG, wobei die zugehörigen Klone mit arabischen Ziffern durchnummeriert wurden. Klone mit richtigem Insert wiesen nach der Restriktion mit *EcoRI* eine Größe von 1050 bp (1030 bp Insert + 20 bp Vektorsequenz) auf. Die prozentualen Anteile an positiven Transformanden in den ‘green-like’-Genbanken war sehr gering und variierte sehr stark, wie in Tabelle C.2 dargelegt. So konnten aus 59 überprüften Klonen der Genbank HKOG nur 12 Transformanden mit einem Insert der richtigen Größe identifiziert werden. Dies entspricht einem prozentualen Anteil von 20%. Die Erstellung der HNPkG-Genbank war noch weniger effizient, da die Ausbeute an positiven Transformanden deutlich niedriger war als in HKOG. Um dennoch einen Einblick in die Diversität gewinnen zu können, wurde hier eine höhere Anzahl an Klonen überprüft. Insgesamt wurden 155 Klone analysiert, wobei nur 12 Klone als positiv identifiziert wurden. Dies entspricht einer prozentualen Ausbeute von 7%.

Die Elektrophorese der Klone nach *EcoRI*-Restriktion zeigte, dass viele Klone der ‘green-like’ *cbbL*-Genbanken im Plasmid ein Insert trugen, dessen Größe aber nicht der gesuchten Größe entsprach. Um auszuschließen, dass es sich bei diesen Klonen tatsächlich nicht um *cbbL*-Fragmente handelte, wurden einige der Inserts mit etwas abweichender Größe einer Sequenzanalyse unterzogen. Da keine dieser überprüften Sequenzen nach Datenbankabgleich (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) Sequenzähnlichkeiten zu bisher abgelegten *cbbL*-Genen zeigte, wurden alle Inserts mit falscher Länge von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Da die Ausbeute an positiven ‘green-like’ *cbbL*-Transformanden gering war, wurden alle ‘green-like’ *cbbL*-Klone sequenziert.

Tabelle C.2: Überblick über die ‘green-like’ *cbbL*-Genbanken

‘green-like’ <i>cbbL</i> -Genbank	HKOG	HNPkG
Anzahl überprüfter Klone	59	155
davon positive Klone (in %)	12 (20%)	12 (7%)

C.1.5.2. Erstellung von ‘red-like’ *cbbL*-Genbanken

Die Erstellung der ‘red-like’ *cbbL*-Genbanken erfolgte ebenfalls mit den spezifischen PCR-Produkten aus den Bodenproben HKO, HSM und HNPk. Die Genbanken wurden mit HKOR, HSMR und HNPkR bezeichnet. Die entsprechenden Klone wurden mit arabischen Nummern gekennzeichnet. Klone mit richtigem Insert wiesen nach der Restriktion mit *EcoRI* eine Größe von 840 bp (820 bp Insert + 20 bp Vektorsequenz) auf.

Die Ausbeute an positiven *cbbL*-Transformanden der ‘red-like’-Genbanken ist in Tabelle C.3 aufgeführt. Innerhalb der ‘red-like’-Genbanken wurden insgesamt 624 Klone auf das Vorhandensein eines Insert mit der richtigen Größe überprüft. Nach der *EcoRI*-Restriktion wurden davon 405 Klone als positiv identifiziert. In der Genbank HKOR ließen sich von 196 Klonen 161 als positiv identifizieren, was einer prozentualen Ausbeute von 82% entsprach. Dieser Wert war für die Genbanken HSMR mit 65% und für HNPkR mit 64% deutlich niedriger.

Die ‘red-like’ *cbbL*-Genbanken enthielten, wie es auch schon für die ‘green-like’ *cbbL*-Genbanken beobachtet wurde, Klone mit kürzer oder länger inserierten Fragmenten. Zudem war nach der Elektrophorese zu beobachten, dass einige Transformanden nach der *EcoRI*-Restriktion zwei Banden niedrigeren Molekulargewichts aufwiesen (200 bp und 650 bp). Exemplarisch wurden diese Klone einer Sequenzanalyse unterzogen und bezüglich ihrer Sequenzähnlichkeiten zu bekannten *cbbL*-Sequenzen aus öffentlichen Datenbanken untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass es sich bei den Inserts, die nach der *EcoRI*-Inkubation zwei Banden zeigten, tatsächlich um *cbbL*-Fragmente handelte. Die Inserts, die durch ein kürzeres oder längeres Fragment gekennzeichnet waren, zeigten keine Sequenzähnlichkeiten zu bekannten *cbbL*-Sequenzen und wurden somit von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.

Positive ‘red-like’ *cbbL*-Transformanden wurden einer RFLP-Analyse unterzogen.

Tabelle C.3: Überblick über die ‘red-like’ *cbbL*-Genbanken

‘red-like’ <i>cbbL</i> -Genbank	HKOR	HSMR	HNPkR
Anzahl überprüfter Klone	196	192	236
davon positive Klone	161	125	152
(in %)	(82%)	(65%)	(64%)
RFLPs insgesamt	158	121	126
davon unterschiedliche Muster	24	38	35
(in %)	(15%)	(31%)	(28%)

C.1.5.3. Analyse der 'red-like' *cbbL*-Genbanken mittels Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus (RFLP)

Alle Transformanden, die ein Insert der richtigen Größe aufwiesen, wurden einer Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus-(RFLP)-Analyse unterzogen. Die RFLP-Analyse gab einen ersten Überblick über die Diversität der erstellten 'red-like' *cbbL*-Genbanken. Es wurden Restriktionsenzyme eingesetzt, deren Erkennungssequenzen geeignet waren, *cbbL*-Fragmente in verschieden große Subfragmente zu spalten. Auf Grund von Sequenzunterschieden des *cbbL*-Gens wurden DNA-Fragmente erwartet, die sich in Größe und Anzahl unterscheiden. Die Auswahl geeigneter Restriktionsenzyme erfolgte mit dem Programm *NEBcutter*, das auf der Webseite der Firma *New England Biolab* (<http://tools.neb.com>) zur Verfügung gestellt wird. Mit dem *NEBcutter* ist es möglich, eine Gensequenz mit diversen Restriktionsenzymen imaginär zu schneiden und die Größe der dabei gebildeten Fragmente zu vergleichen. Für die RFLP-Analyse der *cbbL*-Transformanden wurden die Enzyme *BbvI* und *MspI* ausgewählt und an *cbbL*-Klonen getestet. Gleiche Klone wurden in separaten Reaktionsansätzen mit den Enzymen *BbvI* und *MspI* behandelt und die gebildeten Restriktionsmuster nach Agarosegelelektrophorese verglichen. Dabei zeigte sich, dass die von *MspI* gebildeten Subfragmente zu klein waren, um verschiedene RFLP-Muster miteinander vergleichen zu können. Demgegenüber erwies sich das Restriktionsenzym *BbvI* eher für die RFLP-Analyse der *cbbL*-Genfragmente geeignet, da die Restriktion mit *BbvI* zu verschieden großen Fragmenten führte, die sich in Abhängigkeit des untersuchten Klons deutlich unterscheiden und gut miteinander verglichen werden konnten.

Aus den Genbanken HKOR, HSMR und HNPKR wurden insgesamt 405 Klone auf ihren RFLP-Typ untersucht, wobei 55 verschiedene Restriktionsmuster unterschieden werden konnten (Abb. C.9, C.10, C.11). Diese verschiedenen Muster, die sich in der Anzahl der gebildeten Fragmente unterschieden, traten mit unterschiedlichen Häufigkeiten in den entsprechenden Genbanken auf (Abb. C.8). Die Muster wurden mit den Ziffern 1 bis 55 bezeichnet.

Von der Genbank HKOR wurden insgesamt 158 Klone mittels RFLP analysiert. Unter diesen 158 Restriktionsmustern konnten 24 verschiedene Muster unterschieden werden, deren Anzahl an Subfragmenten zwischen zwei und sechs variierte. Auffallend war, dass drei RFLP-Muster in der Genbank HKOR am stärksten vertreten waren. Das Muster 2 wurde 54-mal, das Muster 48 wurde 58-mal und das Muster 52 wurde 8-mal identifiziert. In den beiden anderen Genbanken HSMR oder HNPKR waren diese Muster sehr wenig oder gar nicht vorhanden.

Aus der Genbank HSMR wurden 121 Klone einer RFLP-Analyse unterzogen und dabei konnten 38 Muster unterschieden werden. Das vorherrschende RFLP-Muster in HSMR war Muster 15, welches 23-mal vertreten war. Dieses war ebenfalls in nur geringer Anzahl in den beiden anderen Genbanken vorhanden.

Unter den insgesamt 126 Klonen der Genbank HNPKR, die mittels RFLP untersucht wurden, traten 35 verschiedene Muster auf. In der HNPKR-Genbank konnte Muster 55 als häufigstes Muster (24-mal) identifiziert werden, das in HKOR und HSMR nicht vertreten war. Auffallend war ferner das Vorkommen von Restriktionsmustern, die nur durch einen Klon repräsentiert wurden. In der Genbank von HKOR konnten insgesamt 13 einzigartige Muster entdeckt werden. In den Genbanken von HSMR und HNPKR war die Anzahl der Muster, die nur durch einen *cbbL*-Klon vertreten waren, mit 17 bzw. 14 geringfügig höher. Der Vergleich der Restriktionsmuster der drei Genbanken ließ auch erkennen, dass zahlreiche Muster nur in einer Genbank vertreten waren. Wie oben schon aufgeführt, war das häufigste Muster (55) von HNPKR mit 24 Klonen nur in dieser Genbank vertreten. Ähnliche Häufungen von RFLP-Mustern traten in den anderen ‚red-like‘ *cbbL*-Genbanken ebenfalls auf.

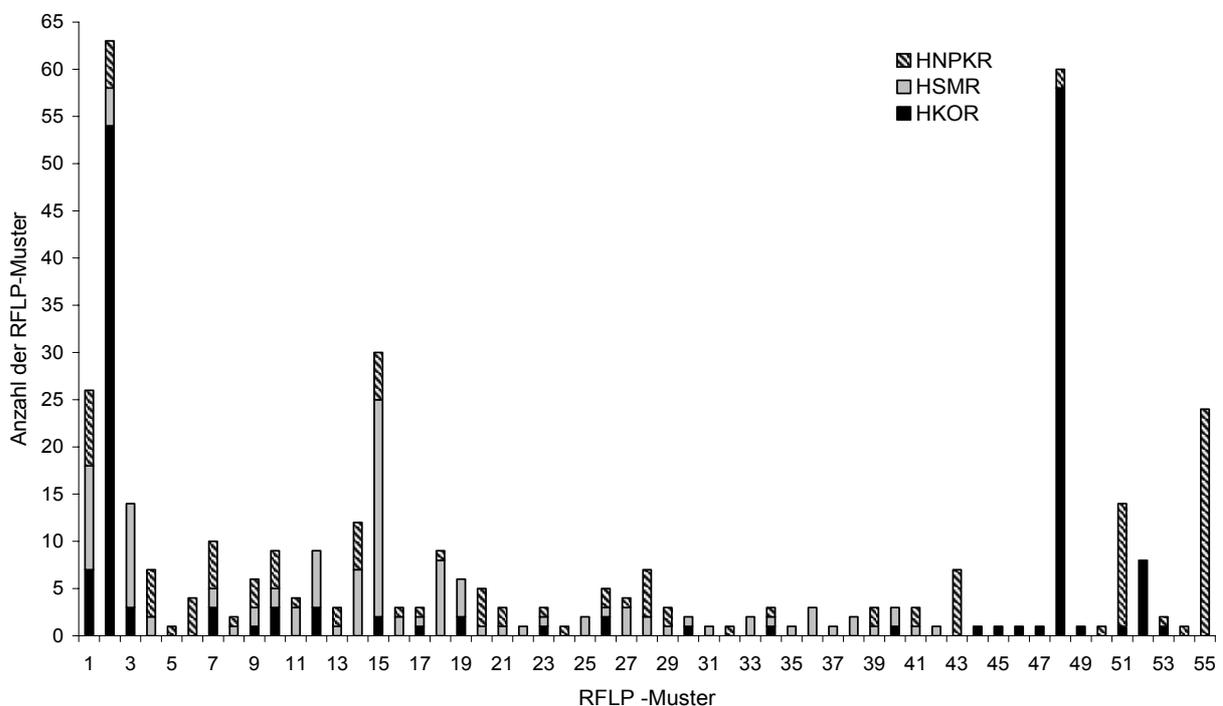


Abb. C.8: Häufigkeitsverteilung der RFLP-Muster innerhalb der ‚red-like‘ *cbbL*-Genbanken.

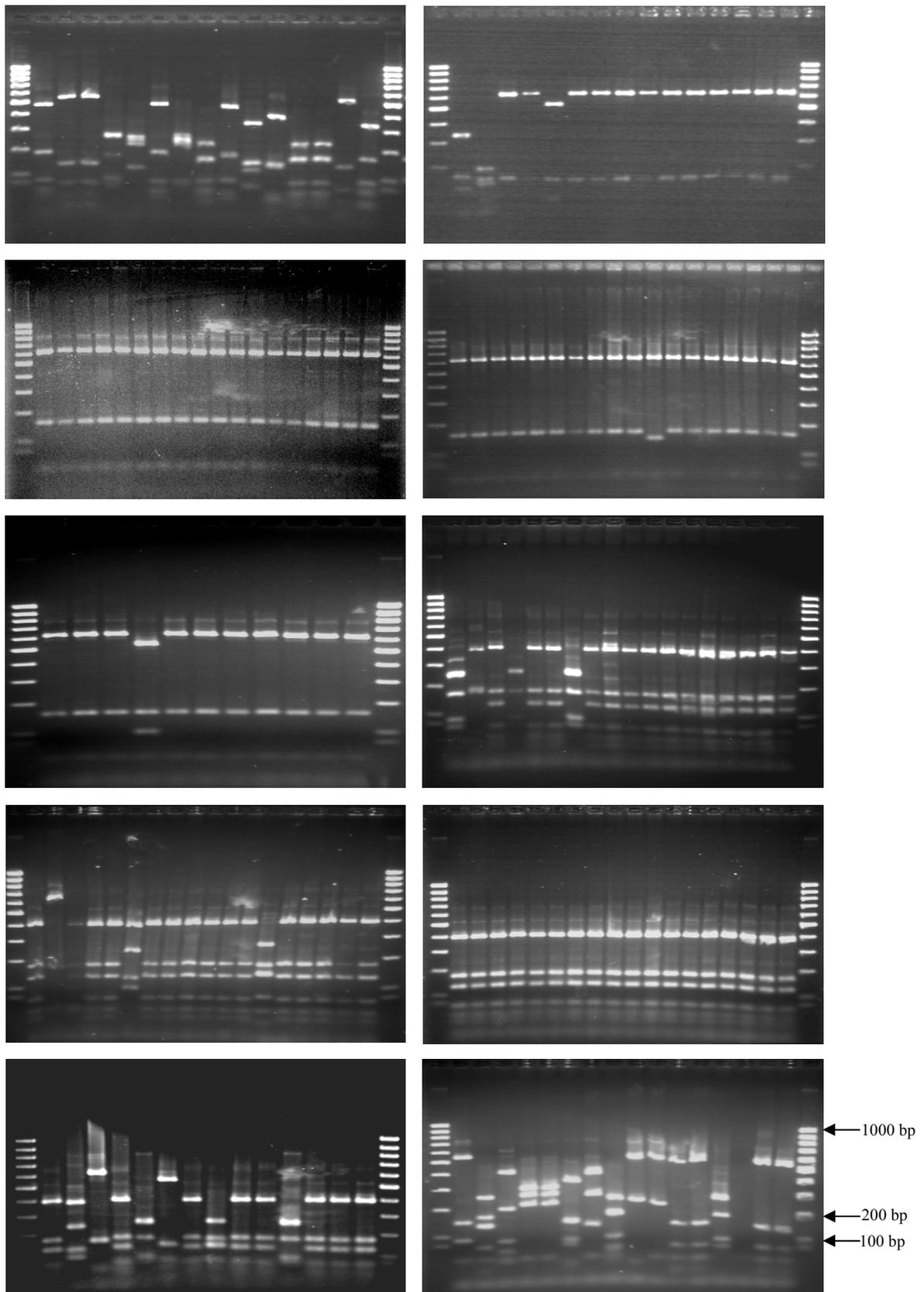


Abb. C.9: RFLP-Muster positiver HKOR-Transformanden nach Gelelektrophorese (3,5%-Agarose), DNA-Längenstandard: *GeneRulerTM 100 bp DNA-Ladder*.

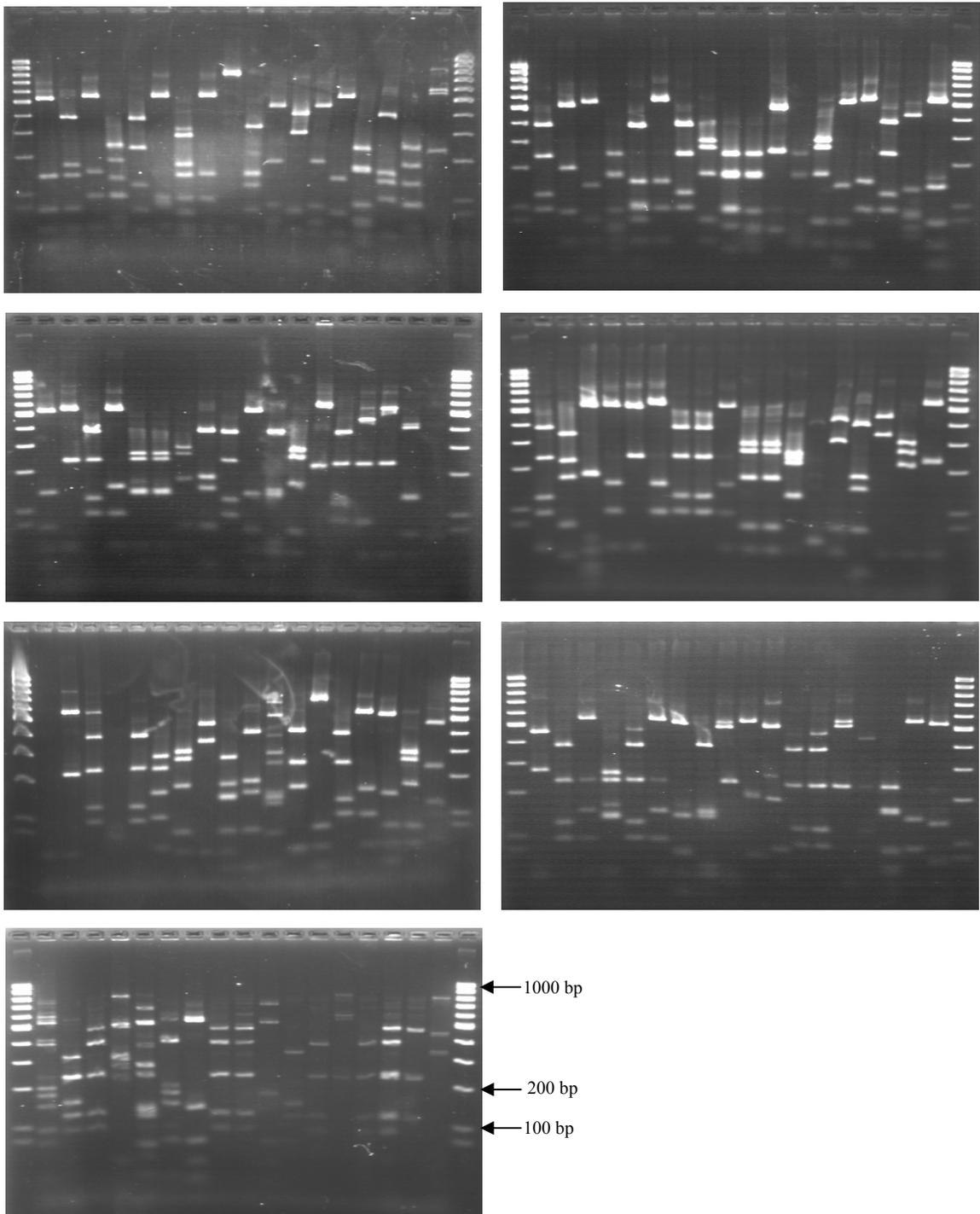


Abb. C.10: RFLP-Muster positiver HSMR-Transformanden nach Gelelektrophorese (3,5%-Agarose)
DNA-Längenstandard: *GeneRulerTM 100 bp DNA-Ladder*.

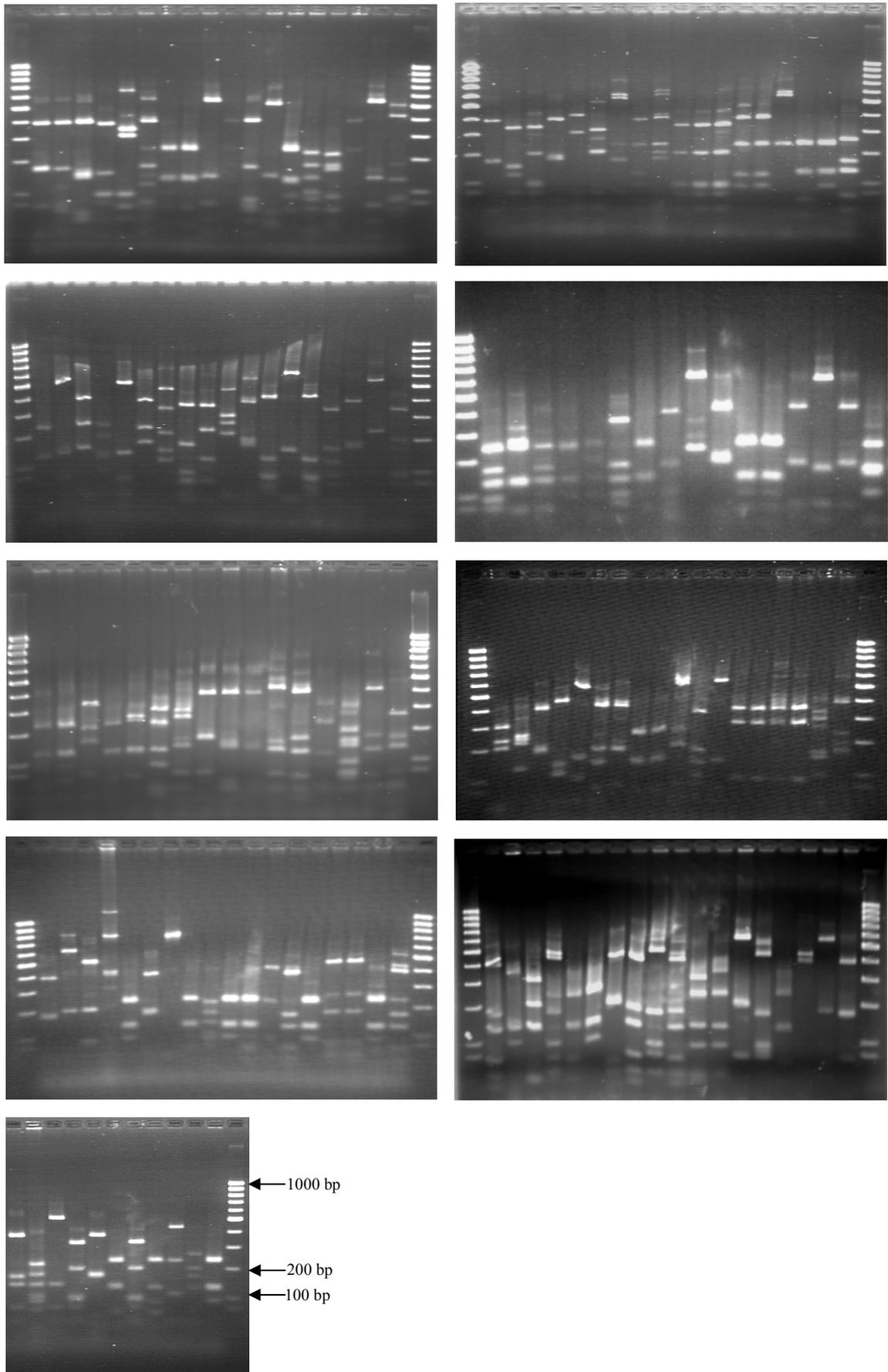


Abb. C.11: RFLP-Muster positiver HNPKR-Transformanten nach Gelelektrophorese (3,5%-Agarose)
DNA-Längenstandard: *GeneRulerTM 100 bp DNA-Ladder*.

C.1.5.4. Berechnung von Diversitätsindices für die ‚red-like‘ *cbbL*-Genbanken

Ein zentraler Aspekt der mikrobiellen Ökologie befasst sich mit der Frage, wie die tatsächliche Diversität bakterieller Lebensgemeinschaften in einer Umweltprobe erfasst werden kann. Um die bakterielle Diversität einer Umweltprobe abzuschätzen und zu vergleichen, hat eine Vielzahl an statistischen Berechnungen ihre Anwendung in der Mikrobienökologie gefunden.

Diese Berechnungen erfordern die Bildung von sog. „operational taxonomic units (OTU)“. In vorliegender Arbeit werden OTUs durch die unterschiedlichen RFLP-Muster repräsentiert, die verschiedenen *cbbL*-Sequenzen entsprechen.

Eine dieser statistischen Methoden ist die „Rarefaction“-Analyse (<http://www.uga.edu/~strata/software/AnRareReadme.html>). Diese Analyse resultiert in einem Graph, wobei die Gesamtzahl an Individuen gegen die Gesamtzahl an identifizierten Spezies aufgetragen wird; es wird damit aufgezeigt, ob ein Habitat ausreichend beprobt wurde, um die tatsächliche Diversität widerzuspiegeln. In Abbildung C.12 ist die „Rarefaction“-Kurve für die ‚red-like‘ *cbbL*-Genbanken aus den Bodenproben HKO, HSM und HNPk dargestellt. Dabei ist die Anzahl der untersuchten *cbbL*-Sequenzen gegen die Anzahl an verschiedenen Sequenztypen (OTUs), repräsentiert durch verschiedene RFLP-Muster, aufgetragen.

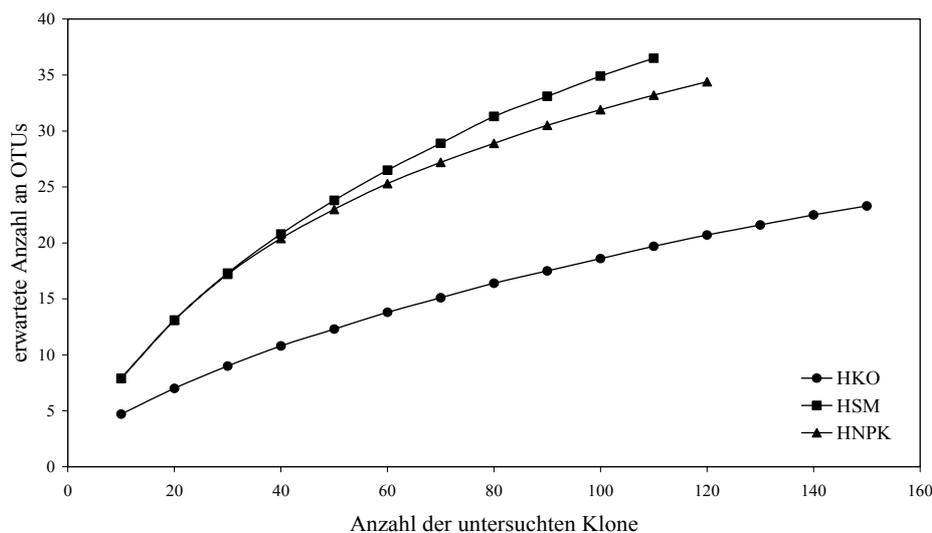


Abb. C.12: „Rarefaction“-Analyse der ‚red-like‘ *cbbL*-Genbanken.

Die Kurve der *cbbL*-Genbank aus HKO zeigt eine flache Steigung an. Damit wird angezeigt, dass die erfasste Diversität dieser Genbank die tatsächliche, terrestrische Diversität relativ gut wiedergibt. Weitere Untersuchungen von *cbbL*-Sequenzen aus HKO würden das Gesamtbild nicht drastisch verändern, da dieses Habitat anscheinend ausreichend beprobt wurde. Vergleichend zur HKO-Kurve sind die Kurven aus HSM und HNPk durch eine größere Steigung gekennzeichnet.

Weitere statistische Auswertungen, wie die Berechnung von Diversitätsindices oder der „Homologous Coverage“, liefern weitere Daten, um die bakterielle Diversität und Abundanz einer Umweltprobe abzuschätzen, aber auch um erstellte Genbanken miteinander zu vergleichen und um signifikante Unterschiede zueinander zu erfassen.

In Tabelle C.4 sind die Ergebnisse dieser statistischen Berechnungen für die ‚red-like‘ *cbbL*-Genbanken HKO, HSM und HNPk aufgelistet. Da für die ‚green-like‘ *cbbL*-Genbanken keine RFLP-Analyse durchgeführt wurde, entfällt hier die Berechnung der Diversitätsindices. Die Werte der Diversitätsindices für die verschiedenen *cbbL*-Genbanken zeigen, dass sich HSMR und HNPkR stark von HKOR absetzen. Vergleicht man die Daten für H, D, E und C, so erkennt man, dass HSMR und HNPkR relativ gleiche Werte aufzeigen. So liegen deren Werte für den Simpson’s Index (D) weit über den von HKOR. Gleiches gilt für die Indices H (Shannon-Weaver Index) und E („Evenness“), die in HKOR bei weitem nicht den hohen Wert von HSMR und HNPkR erreichen. Vergleicht man aber die C-Werte („Library Coverage“) so erkennt man, dass dieser für HKOR mit 92% am höchsten ist. Dieser hohe C-Wert deutet darauf hin, dass die meisten in der Probe vorhandenen Sequenzen detektiert wurden. Die Werte der Diversitätsindices bestätigen die Resultate der „Rarefaction“-Analyse, denn die Diversität der HKO-Genbank ist relativ zu HSM und HPNK niedrig und die erfasste Diversität in HKOR spiegelt gut die tatsächliche Diversität in der Umwelt wider.

Tabelle C.4: Diversitätsindices für die ‚red-like‘ *cbbL*-Genbanken HKOR, HSMR und HNPkR.

Diversitäts-indices	Bodenvariante		
	HKO	HSM	HNPk
H ^a	1,89	3,18	3,06
D ^b	3,86	14,08	14,29
E ^c	0,59	0,87	0,86
C ^d (%)	92	86	89

^a Shannon-Weaver diversity index (Shannon *et al.*, 1963).

^b Simpson’s diversity index (Simpson *et al.*, 1949).

^c „Evenness“ einer Population (Margalef, 1958).

^d „Library coverage“ (Good, 1953).

C.1.6. Phylogenetische Analyse der erhaltenen *cbbL*-Sequenzen

Die erhaltenen Sequenzen wurden zunächst einem Vergleich mit bekannten Sequenzen aus der öffentlichen Datenbank NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) unterzogen. Sequenzen, die keine Ähnlichkeit zu bereits bekannten *cbbL*-Sequenzen aufzeigten, wurden von den weiteren Analysen ausgeschlossen. Anschließend wurden die *cbbL*-Sequenzen in das Softwarepaket ARB importiert und dort einer phylogenetischen Auswertung unterzogen. Dafür wurden die *cbbL*-Nukleinsäuren in ihre entsprechenden Aminosäuren translatiert und im Sequenzeditor GDE entsprechend ihrer Sequenzähnlichkeiten basierend auf Aminosäuren bzw. Nukleinsäuren in das erstellte *cbbL*-Alignment eingeordnet. Das Alignment dient als Grundlage zur Berechnung von phylogenetischen Stammbäumen. Die Berechnung der Bäume erfolgte nach der Distanz-Matrix (Neighbour Joining) und Maximum Likelihood-Methode unter Einsatz verschiedener Sequenzfilter, um die Stabilität der Baumtopologie zu ermitteln. Die erstellten Bäume wurden visuell verglichen und es wurde die Baumtopologie ausgewählt, die durch die unterschiedlichen Baumberechnungsverfahren am häufigsten unterstützt wurde. Dieser finale Baum wird als „Konsensusbaum“ bezeichnet, denn in diesem erscheinen Verzweigungen, die mit möglichst vielen Verfahren reproduzierbar waren und somit als größtmögliche Annäherung an die phylogenetischen Verwandtschaften der *cbbL*-Sequenzen angesehen werden.

C.1.6.1. Phylogenetische Analyse der ‘green-like’ *cbbL*-Sequenzen aus Boden

Aus den erstellten ‘green-like’-Genbanken HKOG und HNPKG wurden insgesamt 24 *cbbL*-Klone einer vergleichenden Sequenzanalyse unterzogen (Abb. C.13). Die erhaltenen *cbbL*-Sequenzen wurden mit dem Namen der Genbank gefolgt von einer Klonnummer der Genbank bezeichnet. Die Berechnung des ‘green-like’ *cbbL*-Stammbaums erfolgte mit unterschiedlichen Baumberechnungsverfahren sowie mit verschiedenen Sequenzfiltern. Dabei war festzustellen, dass die Baumtopologien sehr stabil waren, denn unabhängig von der verwendeten Methode wurden die Baumverzweigungen beibehalten. Die einzelnen Werte der Distanzmatrix sind im Anhang G. 6 aufgeführt. Die detektierten, terrestrischen ‘green-like’ *cbbL*-Sequenzen wiesen basierend auf ihren Nukleinsäuren Sequenzähnlichkeiten von 90,7 bis 100% auf, dabei lagen diese Werte beruhend auf den Aminosäuren mit 97-100% deutlich höher. Unter den 24 sequenzierten ‘green-like’ *cbbL*-Sequenzen wurden 10 mit einer 100%-Sequenzähnlichkeit zu anderen Klonsequenzen identifiziert. Mit Ausnahme der Sequenz

HNPKG75 bilden die erfassten Umweltsequenzen innerhalb des 'green-like'-Baums zwei verwandtschaftlich enge Cluster. Das Cluster GI enthält ausschließlich Sequenzen aus der Bodenprobe HKO, während das Cluster GII nur Sequenzen aus der Probe HNPK aufweist. Beide Cluster weisen hierbei größte Sequenzähnlichkeiten zu den *cbbL*-Sequenzen der α -Proteobakterien *Nitrobacter vulgaris* T3 und *Nitrobacter winogradskyi* ATCC 14123 und IFO 14297 auf. Die Sequenz HNPKG75 ist unter den Bodensequenzen die verwandtschaftlich Entfernteste. Schließt man diese aus den Berechnungen der Distanzwerte aus, so ergibt sich aus den restlichen Sequenzen eine wesentlich höhere Nukleinsäureähnlichkeit von 95,8-100% (98,5-100% für CbbL-Protein). HNPKG75 zeigt mit einem Wert von 91,4% (97,3%) seine höchsten Sequenzähnlichkeiten zu HKOG13. Sequenzvergleiche von HNPKG75 mit *cbbL*-Sequenzen von *N. vulgaris* T3 und *N. winogradskyi* ATCC 14123 weisen Ähnlichkeitswerte von 90,6% (96,7%) bzw. 90,3% (97,3) auf. Die nahe Verwandtschaft der erhaltenen *cbbL*-Sequenzen aus Boden zu den Sequenzen von *N. vulgaris* T3 und *N. winogradskyi* ATCC 14123 wird vor allem durch ihre Sequenzähnlichkeiten deutlich. So zeigt *N. vulgaris* T3 zu den Sequenzen aus den Clustern GI und GII Werte von 96,1-97,7% (98,2-99,1%) auf, wobei der niedrigste Wert durch die Sequenzvergleiche mit HNPKG128 und 13 und der höchste mit HKOG49, 38, 37 und 21 zustande kommt. Diese Werte liegen für die beiden bakteriellen Stämme von *N. winogradskyi* mit Ähnlichkeiten von 92,1-94,1% (98,2-99,1%) deutlich niedriger.

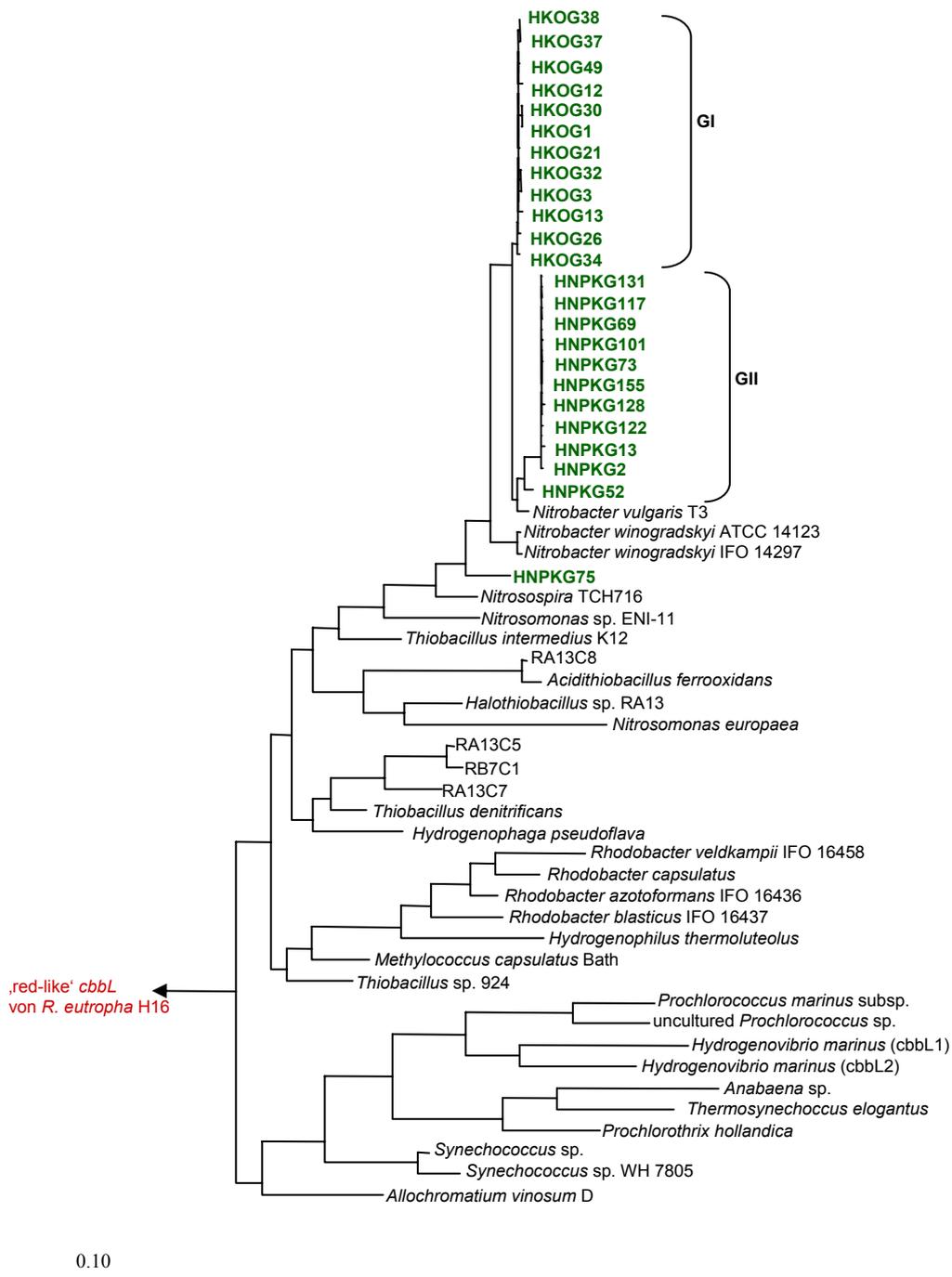


Abb. C.13: Phylogenetischer „Konsensusbaum“, der die Verwandtschaftsverhältnisse der bakteriellen ‚green-like‘ *cbbL*-Sequenzen aus den Bodenproben HKO und HNPK zu ausgewählten *cbbL*-Sequenzen kultivierter und unkultivierter *Bacteria* darstellt. Der Baum wurde nach der Maximum Likelihood-Methode berechnet, wobei die Berechnung ohne Einsatz von Sequenzfiltern vorgenommen wurde. Als Außengruppe diente die ‚red-like‘ *cbbL*-Sequenz von *R. eutropha* H16. Bakterielle kultivierte Vertreter wurden mit Namen und unkultivierte mit Ziffern und Buchstaben bezeichnet. Grün hervorgehoben sind die ‚green-like‘ *cbbL*-Sequenzen aus HKO und HNPK. GI und GII bezeichnen die Cluster innerhalb des ‚green-like‘-Baums, die *cbbL*-Sequenzen aus HNPK und HKO enthalten. Der Balken repräsentiert einen Sequenzunterschied von 10%.

C.1.6.2. Phylogenetische Analyse der ‚red-like‘ *cbbL*-Sequenzen aus Boden

Es wurden insgesamt 46 ‚red-like‘ *cbbL*-Klone aus den erstellten Genbanken HKOR, HSMR und HNPKR einer Sequenzanalyse unterzogen (Abb. C.14). Diese Sequenzen wurden mit dem Namen der Genbank, sowie einer Ziffer, die der Klonnummer innerhalb der jeweiligen Genbank entspricht, bezeichnet. Die erfassten *cbbL*-Sequenzen waren hoch divers und über die gesamte phylogenetische Gruppe der ‚red-like‘ *cbbL*-Sequenzen verteilt. Zudem konnte die Bildung von zwei monophyletischen Clustern (RI-A und RII) beobachtet werden, die ausschließlich *cbbL*-Sequenzen der drei untersuchten Bodenproben beinhalteten. Es konnte kein Einfluss der Bodenbehandlung auf die Verteilung der *cbbL*-Sequenzen festgestellt werden. Die Sequenzen waren unabhängig von der Bodenprobe über die gesamte ‚red-like‘-Gruppe verteilt. Die Nukleinsäureähnlichkeiten der *cbbL*-Bodensequenzen variierten von 57,8% bis 100%. Bodenklone, die das gleiche RFLP-Muster aufwiesen, zeigten bei der vergleichenden Sequenzanalyse identische Distanzwerte (100%) auf. Alle erhaltenen ‚red-like‘ *cbbL*-Sequenzen sind von bisher bekannten *cbbL*-Sequenzen verwandtschaftlich weit entfernt. So konnte kein *cbbL*-Klon identifiziert werden, der identisch zu bisher veröffentlichten Sequenzen ist. Die Werte der Distanzmatrizes einzelner ‚red-like‘-Cluster sind im Anhang aufgeführt (G. 1. bis G. 5).

In das Cluster RI gruppieren sich 17 *cbbL*-Umweltsequenzen, die aus den drei untersuchten Bodenvarianten identifiziert wurden. Das Cluster RI unterteilt sich in das Subcluster RI-A, welches ausschließlich Umweltsequenzen enthält und in das Cluster RI-B, welches neben Klonsequenzen drei *cbbL*-Sequenzen verschiedener *Ralstonia eutropha*-Stämme beinhaltet. Die Ähnlichkeit der *cbbL*-Sequenzen des Clusters RI-A, welches ausschließlich die detektierten Umweltsequenzen enthält, beträgt durchschnittlich 90,1% (93,4%). Dabei ist mit einem Distanzwert von 81,3% (86,3%) die geringste Ähnlichkeit zwischen den beiden *cbbL*-Sequenzen HNPR87 und HNPKR20 zu beobachten. Die größte phylogenetische Beziehung tritt zwischen den Sequenzen HKOR1 und HKOR22 auf. Die Ähnlichkeit dieser beiden Bodensequenzen zueinander beträgt 99,3% (98,1%). Die größte Ähnlichkeit zu einer Sequenz aus dem Subcluster RI-B weist HNPKR97 zu HKOR11 auf (88,1% für *cbbL*, 88,7% für CbbL). Die Sequenzähnlichkeiten innerhalb des gesamten Clusters RI liegen zwischen 79,4% (84,4%) und 100%. Die geringste Ähnlichkeit tritt dabei zwischen den Klonsequenzen HNPKR97 und HKOR41b auf. Das Cluster RI ist zudem durch das Auftreten von Sequenzen gekennzeichnet, die Sequenzähnlichkeiten von 100% aufweisen. Dabei handelt es sich einmal um die *cbbL*-Sequenzen HSM15 und HKOR11, die ebenfalls durch den gleichen RFLP-Typ (Muster 12) gekennzeichnet sind, sowie um HKOR41b, HKOR49b und HKOR5, die alle das

Restriktionsmuster 52 aufweisen. Die *cbbL*-Sequenzen der *R. eutropha* Organismen weisen untereinander Sequenzähnlichkeiten von 94,7-96,8% (97,4-98,9%) auf. HNPKR17 zeigt zu diesen *R. eutropha*-Sequenzen die engste phylogenetische Verwandtschaft auf, wobei die größte Sequenzähnlichkeit von 96% (97%) zu *R. eutropha* H16 zu vermerken ist.

Ein weiteres Cluster, das ausschließlich *cbbL*-Sequenzen der untersuchten Bodenproben enthält, ist das Cluster RII. Diese Gruppe beinhaltet 9 Klonsequenzen, wobei die geringste Sequenzähnlichkeit zwischen HNPKR7 und HSMR29 (86,4% für *cbbL*, 92% für CbbL) besteht. Die größten verwandtschaftlichen Beziehungen innerhalb dieses Clusters sind mit einem Distanzwert von 99,6% (99,6%) zwischen HSMR14 und HKOR20 sowie HSMR14 und HKOR2 anzutreffen. Auf Nukleinsäureebene weisen die Sequenzen HKOR20 und HSMR1 ebenso eine Ähnlichkeit von 99,6%, aber basierend auf Aminosäuren beträgt dieser Wert nur 98,9%. Die Sequenzähnlichkeit von HKOR20 und HSMR14 zu der Sequenz von *Rhodopseudomonas palustris*, welche zum Cluster RIII gehört, beträgt nur 85% (88,5%). Dieser Wert lässt deutlich die Distanzen der Sequenzen des Clusters RII zu anderen Gruppen des ‚red-like‘ *cbbL*-Baums erkennen.

Das Cluster RIII enthält neben 9 Bodensequenzen ebenfalls bereits öffentlich bekannte *cbbL*-Sequenzen. Die durchschnittlichen Nukleinsäureähnlichkeiten dieses Clusters betragen 84,9%. Die größte Ähnlichkeit mit einem Distanzwert von 99,4% (99,2%) ist zwischen den *cbbL*-Sequenzen HKOR30 und HKOR36D vorzufinden. Der Distanzwert dieser Bodensequenzen zu der Sequenz des Umweltklons „clone F24“, die gemeinsam eine monophyletische Gruppe bilden, beträgt 82,4% (85,5%). Ebenfalls eine Sequenzähnlichkeit von 99,6% basierend auf Nukleinsäuren besteht zwischen HSMR139 und HSMR20, wobei aber die Distanzwerte für die Aminosäuren mit 98,2% deutlich niedriger sind. Die größte Sequenzähnlichkeit dieser beiden Klonsequenzen zu einer bereits bekannten *cbbL*-Sequenz eines kultivierten Vertreters ist mit einem Wert von 87% (93,8%) zu der Sequenz von *Bradyrhizobium* sp. CPP anzutreffen.

Ein weitere Gruppe innerhalb des ‚red-like‘ *cbbL*-Stammbaums ist das Cluster RIV. Dieses beinhaltet 4 *cbbL*-Sequenzen aus den untersuchten Böden, wobei die Sequenzen HKOR3D, HKOR32D und HNPKR100 100%-Sequenzähnlichkeit aufweisen. Diese Sequenzen sind zudem durch das identische RFLP-Muster 52 gekennzeichnet. Zwei weitere Umweltsequenzen, dessen Sequenzähnlichkeiten ebenfalls 100% betragen, sind HKOR7 und HKOR1, die dem Cluster RVI zugeordnet sind. Das von ihnen gebildete Restriktionsmuster ist ebenfalls identisch (Muster2).

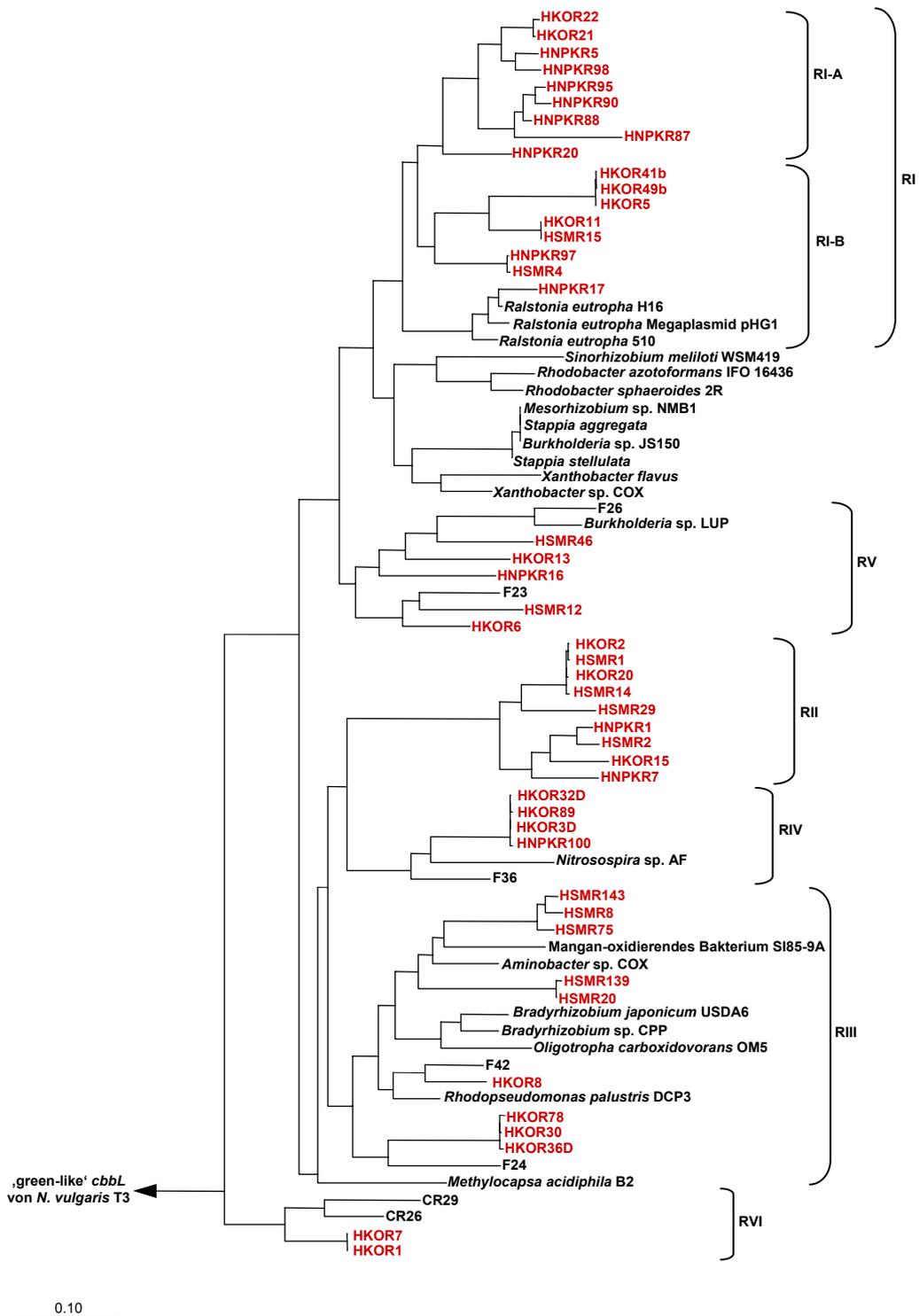


Abb. C.14: Phylogenetischer Baum, der die Verwandtschaftsverhältnisse der bakteriellen ‚red-like‘ *cbbL*-Sequenzen aus den Bodenproben HKO, HSM und HNPK zu ausgewählten *cbbL*-Sequenzen kultivierter und unkultivierter *Bacteria* darstellt. Der Baum wurde nach der Maximum Likelihood-Methode berechnet, wobei keine Einschränkungen, die die Positionen betreffen, vorgenommen wurden. Als Außengruppe diente die ‚green-like‘ *cbbL*-Sequenz von *N. vulgaris* T3. Bakterielle kultivierte Vertreter wurden mit Namen und unkultivierte mit Ziffern und Buchstaben bezeichnet. Rot hervorgehoben sind die ‚red-like‘ *cbbL*-Sequenzen aus HKO, HSM und HNPK. Die Buchstaben R in Kombination mit römischen Zahlen bezeichnen die Cluster innerhalb des ‚red-like‘-Baums, die *cbbL*-Sequenzen aus HKO, HSM und HNPK enthalten. Der Balken repräsentiert einen Sequenzunterschied von 10%.

C.1.6.3. Phylogenetische Analyse von ‚red-like‘ *cbbL*-Sequenzen aus isolierten Stämmen

Um den Datensatz an vorhandenen ‚red-like‘ *cbbL*-Sequenzen zu erweitern und damit möglichst die Lücken innerhalb dieses phylogenetischen Baumes zu füllen, wurden Anstrengungen unternommen, die ‚red-like‘ *cbbL*-Fragmente von bakteriellen Referenzstämmen, sowie aus Bakterienisolaten der Bodenprobe HNPK mittels des entwickelten PCR-Systems zu amplifizieren und eine phylogenetische Sequenzanalyse durchzuführen. Die einzelnen Werte der Distanzmatrizen sind im Anhang (G. 1 bis G. 5) aufgeführt.

C.1.6.3.1 Phylogenetische Analyse der ‚red-like‘ *cbbL*-Sequenzen aus Referenzstämmen

Es wurden insgesamt 17 bakterielle Stämme mit dem entwickelten ‚red-like‘ *cbbL*-spezifischen PCR-System auf das Vorhandensein von *cbbL* untersucht. Aus 10 der getesteten Stämme konnte das *cbbL*-Fragment von 850 bp Größe amplifiziert werden; es wurde nachfolgend eine phylogenetische Analyse durchgeführt (Abb. C.15). Die neuen *cbbL*-Fragmente konnten aus folgenden Bakterien amplifiziert werden: *Alcaligenes faecalis*, *Alcaligenes sp. 30128*, *Azospirillum lipoferum*, *Ochrobactrum anthropi*, *Rhizobium leguminosarum* *bv. trifolii*, *Rhizobium radiobacter*, *Sinorhizobium fredii*, *Sinorhizobium teranga*, *Xanthobacter agilis*, *Xanthobacter autotrophicus* (Tabelle C.1).

Die *cbbL*-Sequenzen dieser Referenzstämmen gruppieren sich innerhalb des ‚red-like‘ *cbbL*-Baums zu verschiedenen Clustern. So ergänzt die Sequenz von *A. faecalis* das Cluster RI-A, welches ausschließlich durch Umweltsequenzen repräsentiert war. Die *cbbL*-Sequenz von *A. faecalis* weist die größte Sequenzähnlichkeit von 97,3% (99,3%) zu der Klonsequenz HNPKR5 auf. Ein weiteres Cluster, das nur Umweltsequenzen enthielt, ist das Cluster RII. Dieses wird nun durch die *cbbL*-Sequenzen von *R. leguminosarum* *bv. trifolii* und *A. lipoferum* ergänzt. Die Sequenz von *R. leguminosarum* *bv. trifolii* weist eine Sequenzähnlichkeit von 100% zu HNPKR7 auf. Die höchste Sequenzähnlichkeit der *cbbL*-Sequenz von *A. lipoferum* beträgt 86,3% (92,2%) und ist zu der Sequenz von *Bradyrhizobium* *sp. CPP* zu beobachten.

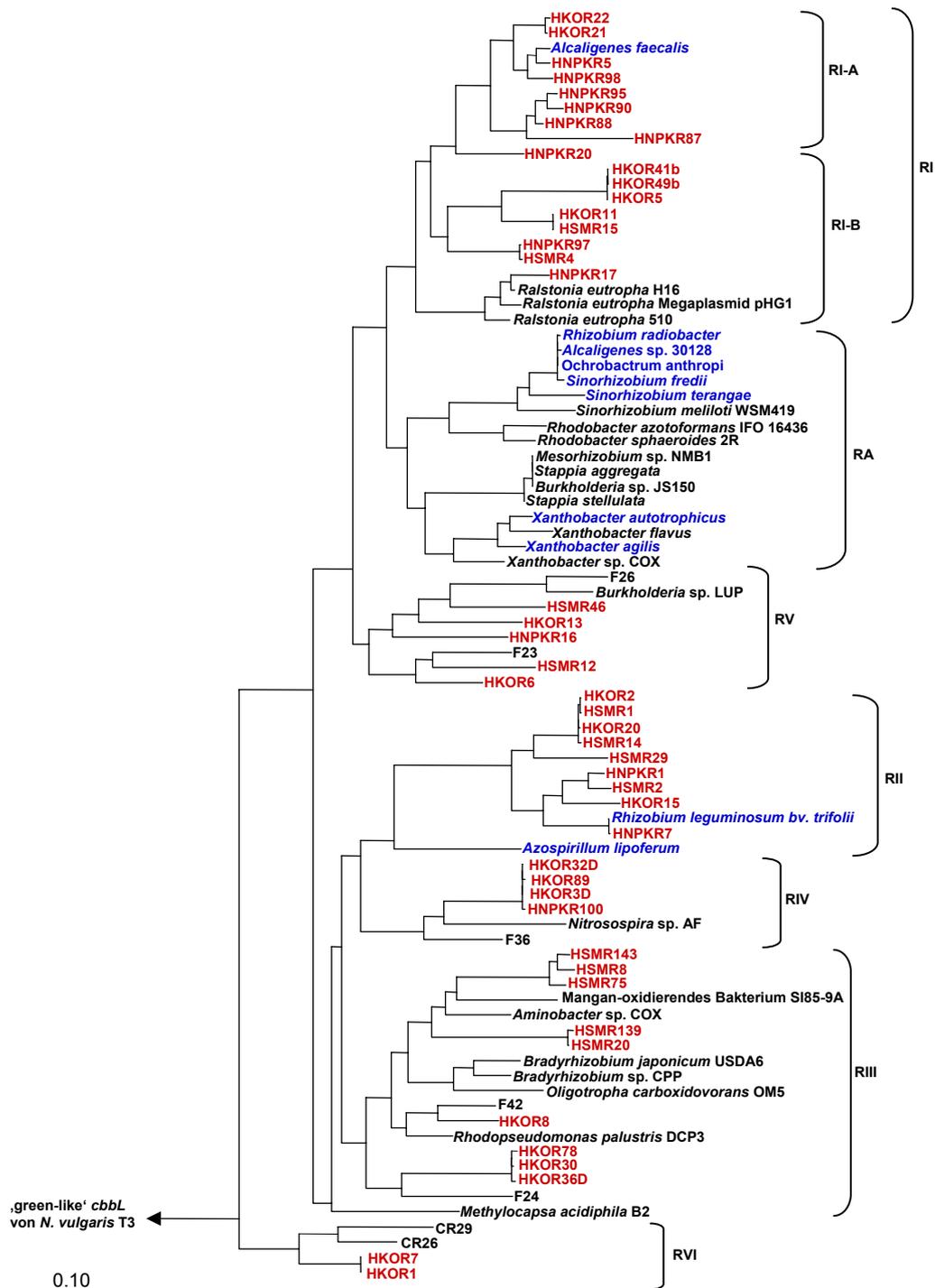


Abb. C.15: Phylogenetischer Baum, der die Verwandtschaftsverhältnisse der neuen ‚red-like‘ *cbbL*-Sequenzen aus den untersuchten, bakteriellen Referenzstämmen und den Bodenproben HKO, HSM und HNPK zu ausgewählten *cbbL*-Sequenzen kultivierter und unkultivierter *Bacteria* darstellt. Der Baum wurde nach der Maximum Likelihood-Methode berechnet, wobei keine Einschränkungen, die die Positionen betreffen, vorgenommen wurden. Als Außengruppe diente die ‚green-like‘ *cbbL*-Sequenz von *N. vulgaris* T3. Bakterielle kultivierte Vertreter wurden mit Namen und unkultivierte mit Ziffern und Buchstaben bezeichnet. Blau hervorgehoben sind die ‚red-like‘ *cbbL*-Sequenzen aus den Referenzstämmen und rot die ‚red-like‘ *cbbL*-Sequenzen aus HKO, HSM und HNPK. Der Buchstabe R in Kombination mit römischen Zahlen bezeichnet die Cluster innerhalb des ‚red-like‘-Baums, die *cbbL*-Sequenzen aus HKO, HSM und HNPK enthalten. RA bezeichnet das Cluster, das keine *cbbL*-Bodensequenzen enthält. Der Balken repräsentiert einen Sequenzunterschied von 10%.

Die restlichen neuen *cbbL*-Sequenzen gruppieren sich in das Cluster RA, das keine Umweltsequenzen, sondern nur *cbbL*-Sequenzen kultivierter Bakterien enthält. Dabei ordnen sich die Sequenzen von *X. agilis* und *X. autotrophicus* zu den bereits bekannten *cbbL*-Sequenzen von *Xanthobacter flavus* und *Xanthobacter* COX und weisen zu diesen Sequenzähnlichkeiten von >90% (92,2%) auf. Die hohe Stabilität dieser *Xanthobacter*-Gruppe konnte durch weitere Baumberechnungsmethoden und Sequenzfilter bestätigt werden. Diese hohe Stabilität der Baumtopologie war ebenfalls für die weiteren neuen *cbbL*-Sequenzen dieses Clusters zu vermerken. Wobei die Sequenzen von *R. radiobacter*, *Alcaligenes* sp. 30128, *O. anthropi*, *S. fredii* und *S. terangae* mit der *cbbL*-Sequenz von *Sinorhizobium meliloti* eine monophyletische Gruppe bilden, die durch sehr hohe Sequenzähnlichkeiten gekennzeichnet ist. Die Distanzwerte der *cbbL*-Sequenzen der bakteriellen Stämme *R. radiobacter*, *A.* sp. 30128 und *O. anthropi* betragen >99,4% (99,2%) und zeigen eine Sequenzähnlichkeit von 98,9% (97,8%) zu *S. fredii*. Die Sequenz von *S. terangae* setzt sich mit einem Distanzwert von 91,9% (96,8%) deutlich von diesen Sequenzen ab.

C.1.6.3.2 Phylogenetische Analyse der ‚red-like‘ *cbbL*-Sequenzen aus bakteriellen Isolaten aus Boden

Um weitere ‚red-like‘ *cbbL*-Sequenzen, insbesondere neue *cbbL*-Sequenzen terrestrischer Bakterien zu erhalten, wurden Isolierungen von Bakterien aus der Bodenprobe HNPK vorgenommen. Es wurden von den auf *Rhizobium*-Medium gewachsenen Kolonien, 64 mit möglichst unterschiedlicher Koloniemorphologie ausgewählt und auf das Vorhandensein von ‚red-like‘ *cbbL*-Genfragmenten mit dem entwickelten PCR-System untersucht. Aus diesen Bakterienisolaten wurden 13 Reinkulturen identifiziert, die nach *cbbL*-Amplifikation und Sequenzierung als *cbbL*-positive Bakterien identifiziert wurden. Die *cbbL*-Sequenzen der Bakterienisolate wurden mit R gefolgt von der Nummer des Isolats und dem Buchstaben c (z. B. R33c) bezeichnet. Die *cbbL*-Sequenzen dieser Isolate gruppieren sich innerhalb des ‚red-like‘ *cbbL*-Baums zu den verschiedenen Clustern (Abb. C.16). Die Sequenzähnlichkeiten dieser *cbbL*-Sequenzen untereinander variieren zwischen 73% (73,3%) und 99,6% (99,6%) (s. Anhang G.1 bis G.5). Die Sequenzen R36c und R47c gruppieren sich in das Cluster RI und ihre *cbbL*-Sequenzen weisen zueinander eine Ähnlichkeit von 97,3% (98,9%) auf. Die verwandtschaftlich nächste Sequenz eines kultivierten Bakteriums ist die von *A. faecalis*,

wobei die Sequenzähnlichkeit zu R36c 92,6% (97,7%) und die zu R47c 92,1% (96,6%) beträgt.

Ein weiteres Cluster, das durch zwei *cbbL*-Sequenzen der Isolate ergänzt wird, ist das Cluster RV. R33c weist eine Sequenzähnlichkeit von 100% zu der Klonsequenz HNPKR16 auf. Die Sequenz R32c steht R33c und HNPKR16 phylogenetisch sehr nahe und weist zu beiden eine Sequenzähnlichkeit von 93,6% (97%) auf.

Das ‚red-like‘ *cbbL*-Cluster RII wird von den zwei Sequenzen R37c und R39c ergänzt. Auf Nukleinsäureebene ist mit einer Sequenzähnlichkeit von 89,3% die nächste verwandte Sequenz von R37c die *cbbL*-Klonsequenz HNPKR1. Basierend auf Aminosäuren beträgt dieser Distanzwert 93,3%. R39c weist die größte Sequenzähnlichkeit zu HSMR29 auf (90,3% (96,6%)).

Ein weiteres Cluster, das durch *cbbL*-Sequenzen der Isolate ergänzt wird, ist das Cluster RIV. Die Sequenzen R46c, R43c und R40c stehen sich phylogenetisch sehr nahe, denn ihre Sequenzähnlichkeiten zueinander sind >99,5% (98,5%). Zudem weisen sie sehr hohe Sequenzähnlichkeiten zu den Klonsequenzen HKOR32D, HKOR89, HKOR3D und HNPKR100 auf (>99,4% (98,5%)). Dabei ist R46c 100% identisch zu HKOR3D. Die Sequenz R45c ist die verwandtschaftlich entfernteste Sequenz, denn sie weist zu den restlichen Sequenzen dieses Clusters RIV Sequenzähnlichkeiten von 80,5% (90,4%)-85,3% (94,7%) auf.

In das Cluster RIII gruppieren sich drei weitere *cbbL*-Sequenzen, die aus Bakterienisolaten detektiert wurden. R42c und R21c sind nahe verwandt und sind durch eine Sequenzähnlichkeit von 95,8% (99,6%) gekennzeichnet. Die größte Sequenzähnlichkeit zu einer bereits bekannten Sequenz zeigen beide Isolate zu der *cbbL*-Sequenz von *Rhodopseudomonas palustris* DCP3. Dabei weist R42c einen Distanzwert von 85,3% (93,8%) und R21c einen Wert von 86,5% (93,4%) auf. Die *cbbL*-Sequenz des Isolats R25 hingegen ist phylogenetisch zu den Bodenklonen HKOR78, HKOR30 und HKOR36D sehr nahe verwandt, wobei die Sequenzähnlichkeiten >96,7% (98,7%) betragen.

Ergebnisse

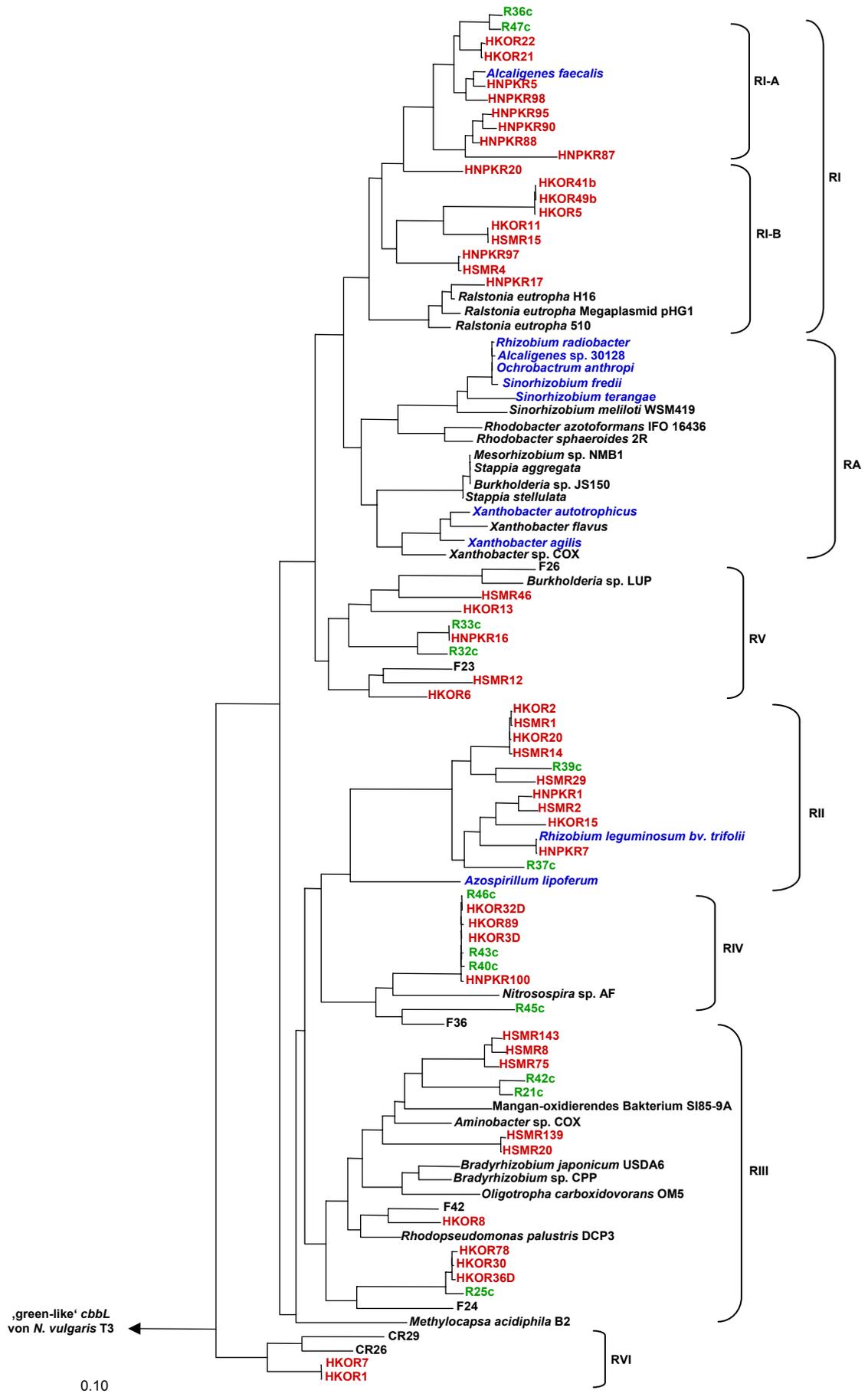


Abb. C.16: Phylogenetischer Baum, der die Verwandtschaftsverhältnisse der neuen ‚red-like‘ *cbbL*-Sequenzen aus den Bakterienisolaten, Referenzstämmen und Bodenproben HKO, HSM und HNPK zu ausgewählten *cbbL*-Sequenzen kultivierter und unkultivierter *Bacteria* darstellt. Der Baum wurde nach der Maximum Likelihood-Methode berechnet, wobei keine Einschränkungen, die die Positionen betreffen, vorgenommen wurden. Als Außengruppe diente die ‚green-like‘ *cbbL*-Sequenz von *N. vulgaris* T3. Bakterielle kultivierte Vertreter wurden mit Namen und unkultivierte mit Ziffern und Buchstaben bezeichnet. Grün hervorgehoben sind die ‚red-like‘ *cbbL*-Sequenzen der Bakterienisolate, blau *cbbL*-Sequenzen aus Referenzstämmen und rot sind die ‚red-like‘ *cbbL*-Sequenzen aus HKO, HSM und HNPK. Die Buchstaben R in Kombination mit römischen Zahlen bezeichnen die Cluster innerhalb des ‚red-like‘-Baums, die *cbbL*-Sequenzen aus HKO, HSM und HNPK enthalten. RA bezeichnet das Cluster, das keine *cbbL*-Bodensequenzen enthält. Der Balken repräsentiert einen Sequenzunterschied von 10%.

C.1.7. Molekulare Charakterisierung der Bodenisolat

C.1.7.1. Phylogenetische Analyse der 16S rRNA-Sequenzen aus den Bakterienisolaten

Zusätzlich zu der Analyse des *cbbL*-Gens wurde ebenfalls eine phylogenetische Positionierung der 13 Bakterienisolate basierend auf dem für die 16S rRNA-kodierenden Gen vorgenommen. Die erhaltenen 16S rDNA-Sequenzen wurden mit R gefolgt von der Nummer des Isolats und dem Buchstaben S (z. B. R33S) bezeichnet. Zur Positionierung dieser Sequenzen in einen phylogenetischen Baum wurden ebenfalls unterschiedliche Baumberechnungsverfahren sowie verschiedene Sequenzfilter eingesetzt. Die erhaltenen Baumtopologien erwiesen sich als sehr stabil, da es bei der phylogenetischen Zuordnung dieser 16S rDNA-Sequenzen keine Unterschiede bezüglich der angewendeten Methode gab (Abb. C.17).

Die 16S rDNA-Sequenzen der Isolate weisen erstaunlich hohe Sequenzähnlichkeiten (98%-99,7%) zu bereits bekannten 16S rDNA-Sequenzen auf und sind phylogenetisch den Gram-positiven Bakterien zuzuordnen (s. Anhang G. 7 und G.8). Dabei gehören sieben dieser Sequenzen zu der Gattung *Bacillus*, die der Hauptentwicklungslinie Gram-positive Bakterien mit niedrigem G+C-Gehalt zuzuordnen sind. Die 16S rDNA-Sequenzen R37S, R42S, R39S und R32S bilden mit den Sequenzen von *B. thuringiensis*, *B. cereus* und *B. weihenstephanensis* eine enge, monophyletische Gruppe, wobei die Sequenzähnlichkeiten >99,5% sind. R42S zeigt seine größte Ähnlichkeit zu *B. megaterium* mit einem Distanzwert von 99,7%. R21S und R25S gruppieren sich zu den 16S rDNA-Sequenzen von *B. simplex* und *B. macroides*; die Sequenzähnlichkeiten betragen 99,7% bzw. 99,5%.

Die restlichen sechs 16S rDNA-Sequenzen gruppieren sich zu den Gattungen *Streptomyces* und *Arthrobacter*, die der Hauptentwicklungslinie Gram-positive Bakterien mit hohem G+C-Gehalt zuzuordnen sind. Dabei weist die Sequenz R46S eine Sequenzähnlichkeit von 99,5%

zu *Streptomyces pseudovenezuelae* auf. Die Sequenzen R40S, R47S und R45S zeigen zueinander sehr hohe Sequenzähnlichkeiten (>99,9%), wobei sie alle die größte verwandtschaftliche Beziehung zu der 16S rDNA-Sequenz von *Arthrobacter globiformis* als Vertreter einer bereits bekannten Sequenz aufzeigen (>99,1%). Die Sequenzähnlichkeit von R33S und R36S zueinander beträgt 98% und beide weisen ihre größten Sequenzähnlichkeiten zu *Arthrobacter globiformis* und *Arthrobacter ramosus* auf. Der Distanzwert von R33S beträgt dabei 98% und der von R36S ist mit 98,3% gering höher.

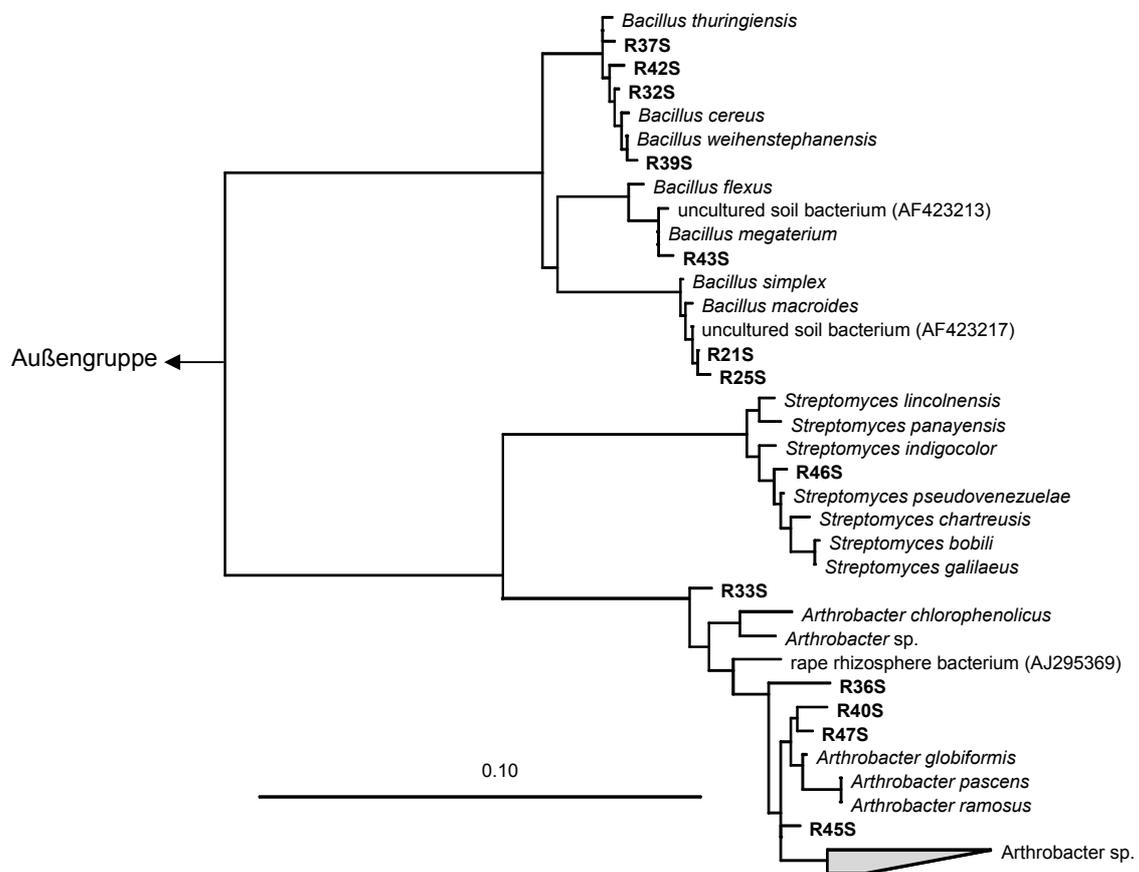


Abb. C.17: Phylogenetischer Baum, der die Verwandtschaftsverhältnisse der 16S rDNA-Sequenzen aus den *cbbL*-positiven Bakterienisolaten zu ausgewählten 16S rDNA-Sequenzen unkultivierter und kultivierter *Bacteria* darstellt. Die ausgewählten Sequenzen sind bereits bekannte 16S rDNA-Sequenzen, die als nächste Verwandte der 16S rDNA-Sequenzen aus den Isolaten bestimmt wurden. Der Baum wurde nach der Neighbour Joining-Methode unter Verwendung eines 50%-Konservierungsfilters berechnet. Als Außengruppe dienen verschiedene Referenzsequenzen aus den Phyla *Bacteria* und *Archaea*. Fett hervorgehoben sind die 16S rDNA-Sequenzen der Isolate. Der Balken repräsentiert einen Sequenzunterschied von 10%.

C.1.7.2. Identifikation der Bakterienisolate mittels FISH

Um die Reinheit der aus der Bodenvariante HNPk isolierten *cbbL*-positiven Bakterienstämme zu überprüfen und ihre phylogenetische Zuordnung zu bestätigen, wurde eine Analyse mit fluoreszenzmarkierten phylogenetischen Oligonukleotidsonden durchgeführt. Dabei erfolgte der Nachweis unter Einsatz Fluos-markierter *Bacteria*-spezifischer Sonden (EUB338-Mix) sowie mit Cy3-markierten Sonden, die spezifisch für Gram-positive Bakterien mit niedrigem G+C-Gehalt (LGC354-Mix) bzw. mit hohem G+C-Gehalt (HGC69a) sind. Als Negativ-Kontrolle für die Gram-positiven Bakterien-spezifischen Sonden wurden mit 4%-PFA-fixierte *Herbaspirillum lusitanum*-Zellen eingesetzt, die phylogenetisch der Gram-negativen β -Untergruppe der *Proteobacteria* zugeordnet sind.

In Tabelle C.5 sind die Ergebnisse zusammengefasst. Alle untersuchten Isolate konnten nach morphologischen Kriterien als Reinkulturen identifiziert werden. Zusätzlich konnte für alle Reinkulturen ein positives Signal mit der EUB338-Mix-Sonde festgestellt werden. Die nähere Unterteilung mit den Gruppen-spezifischen Sonden HGC69a und LGC354-Mix führte für alle Bakterienisolate ebenfalls zu dem erwarteten Ergebnis. Für *Herbaspirillum lusitanum* konnte ausschließlich mit der EUBMix-Sonde ein Fluoreszenzsignal ermittelt werden.

Tabelle C.5: Mikroskopische Charakterisierung und FISH-Analyse der Bakterienisolate aus Boden

Isolat	Gattung ¹	FISH: EUB-Mix ²	FISH: postiv mit	Morphologie
R37	<i>Bacillus</i>	+	LGC354-Mix	Stäbchen; bilden lange Ketten (6-9 Zellen)
R42	<i>Bacillus</i>	+	LGC354-Mix	breite Stäbchen; bilden kurze Ketten (3-6 Zellen)
R32	<i>Bacillus</i>	+	LGC354-Mix	breite Stäbchen; bilden kurze Ketten (3-6 Zellen)
R39	<i>Bacillus</i>	+	LGC354-Mix	schmale, lange Stäbchen; bilden Ketten
R43	<i>Bacillus</i>	+	LGC354-Mix	sehr kurze, breite Stäbchen; bilden Ketten
R21	<i>Bacillus</i>	+	LGC354-Mix	kurze Stäbchen
R25	<i>Bacillus</i>	+	LGC354-Mix	kurze Stäbchen
R46	<i>Streptomyces</i>	+	HGC69a	sehr kurze, dünne Stäbchen
R33	<i>Arthrobacter</i>	+	HGC69a	sehr kurze, dünne Stäbchen
R36	<i>Arthrobacter</i>	+	HGC69a	sehr kurze, dünne Stäbchen
R40	<i>Arthrobacter</i>	+	HGC69a	kurze, dünne Stäbchen
R47	<i>Arthrobacter</i>	+	HGC69a	sehr kurze, dünne Stäbchen
R45	<i>Arthrobacter</i>	+	HGC69a	sehr kurze, dünne Stäbchen

¹ Die Gattungszugehörigkeit wurde durch 16S rDNA-Sequenzierung ermittelt (s.C.17.1).

² +: Isolate zeigen ein positives Signal nach Hybridisierung mit der *Bacteria*-spezifischen Sode EUB338-Mix.

C.2. Quantifizierung von ‘red-like’ *cbbL*-Genen mit der „real-time“ PCR (TaqMan)

C.2.1. Entwicklung von spezifischen Primern und Sonde zur Detektion von ‚red-like‘ *cbbL*-Sequenzen

Für die Quantifizierung von *cbbL*-Genen mittels der TaqMan-PCR sind PCR-Primer erforderlich, die zur Bildung möglichst kurzer Amplifikate (< 300 bp) führen und einer 5'-FAM- und 3'-TAMRA-markierten Sonde, die an den Sequenzbereich zwischen den beiden Primern bindet. Die Konstruktion dieser Oligonukleotide wurde mit dem in ARB erstellten, auf *cbbL*-Sequenzen basierenden Datensatz durchgeführt.

Oligonukleotide	<i>cbbLR1-F</i>			REDpro			<i>cbbLR1int-R</i>	
	AAGGAYG	ACGAGAACAT	C	CATGC	AYTGGCGCGA	CCG	TGCAGSATCA	TGTCRTT
R36c	AAGGACG	ACGAGAACAT	CAACTCGCAG	CCGTTTCATGC	ACTGGCGCGA	CCGC...CGC	CAACGACATG	ATCCTGCA
R47c	AAGGACG	ACGAGAACAT	CAACTCGCGG	CCGTTTCATGC	ACTGGCGCGA	CCGC...CGC	CAACGACATG	ATCCTGCA
HKOR22	AAGGACG	ACGAGAACAT	CAACTCGCGG	CCGTTTCATGC	ACTGGCGCGA	CCGC...CGC	CAACGACATG	ATCCTGCA
HKOR21	AAGGACG	ACGAGAACAT	CAACTCGCAG	CCGTTTCATGC	ACTGGCGCGA	CCGC...CGC	CAACGACATG	ATCCTGCA
<i>A. faecalis</i>	AAGGACG	ACGAGAACAT	CAACTCGCAG	CCGTTTCATGC	ACTGGCGCGA	CCGC...CGC	CAACGACATG	ATCCTGCA
HNPKR5	AAGGATG	ACGAGAACAT	CAACTCGCAG	CCGTTTCATGC	ACTGGCGCGA	CCGC...CGC	CAACGACATG	ATCCTGCA
HNPKR17	AAGGATG	ACGAGAACAT	CAACTCGCAG	CCGTTTCATGC	ACTGGCGCGA	CCGC...CCA	GAACGACATG	ATCCTGCA
<i>R. eutropha</i> H16	AAGGATG	ACGAGAACAT	CAACTCGCAG	CCGTTTCATGC	ACTGGCGCGA	CCGC...CCA	GAACGACATG	ATCCTGCA
<i>R. eutropha</i> pGH1	AAGGACG	ACGAGAACAT	CAACTCGCAG	CCGTTTCATGC	ACTGGCGCGA	CCGC...CCA	GAACGACATG	ATCCTGCA
<i>R. eutropha</i> 510	AAGGATG	ACGAGAACAT	CAACTCGCAG	CCGTTTCATGC	ACTGGCGCGA	CCGC...CCA	GAACGACATG	ATCCTGCA
<i>R. radiobacter</i>	AAGGACG	ACGAGAACAT	CAATTTCGCAG	CCGTTTCATGC	ATTGGCGCGA	CCGC...GCA	GAACGACATG	ATCCTGCA
<i>O. anthropi</i>	AAGGACG	ACGAGAACAT	CAATTTCGCAG	CCGTTTCATGC	ATTGGCGCGA	CCGC...GCA	GAACGACATG	ATCCTGCA
<i>S. fredii</i>	AAGGACG	ACGAGAACAT	CAATTTCGCAG	CCGTTTCATGC	ATTGGCGCGA	CCGC...GCA	GAACGACATG	ATCCTGCA
<i>S. teranga</i>	AAGGACG	ACGAGAACAT	CAATTTCGCAG	CCGTTTCATGC	ACTGGCGCGA	CCGC...GCA	GAATGACATG	ATCCTGCA
<i>S. meliloti</i>	AAGGACG	ACGAGAACAT	CAATTTCGCAG	CCGTTTCATGC	ATTGGCGCGA	CCGC...GCA	GAATGACATG	ATCCTGCA
<i>R. azotoformans</i>	AAGGACG	ACGAGAACAT	CAACTCGCAG	CCGTTTCATGC	ATTGGCGCGA	CCGC...GCA	GAACGACATG	ATCCTGCA
<i>R. sphaeroides</i>	AAGGACG	ACGAGAACAT	CAACTCGCAG	CCGTTTCATGC	ACTGGCGCGA	CCGC...GCA	GAACGACATG	ATCCTGCA
<i>Burkholderia</i> sp. LUP	AAGGACG	ACGAGAACAT	CAATTTCGCAG	CCGTTTCATGC	ACTGGCGCGA	CCGT...CAG	GAACGACATG	ATCCTGCA
F23	AAGGACG	ACGAGAACAT	CAATTTCGCAG	CCGTTTCATGC	ACTGGCGCGA	CCGA...CAA	AAACGACATG	ATCCTGCA
HKOR6	AAGGACG	ACGAGAACAT	CAACTCGCAA	CCGTTTCATGC	ACTGGCGCGA	CCGC...CCG	CAACGACATG	ATCCTGCA
HNPKR1	AAGGACG	ACGAGAACAT	CAACTCGCAA	CCGTTTCATGC	ACTGGCGCGA	CCGC...TGC	GAACGACATG	ATCCTGCA
HSMR2	AAGGATG	ACGAGAACAT	CAACTCGCAG	CCGTTTCATGC	ACTGGCGCGA	CCGC...TGC	GAACGACATG	ATCCTGCA
<i>R. leguminosarum</i>	AAGGACG	ACGAGAACAT	CAACTCGCAG	CCGTTTCATGC	ACTGGCGCGA	CCGC...TGC	GAACGACATG	ATCCTGCA
HNPKR7	AAGGACG	ACGAGAACAT	CAACTCGCAG	CCGTTTCATGC	ACTGGCGCGA	CCGC...TGC	GAACGACATG	ATCCTGCA
<i>A. lipofFerum</i>	AAGGATG	ACGAGAACAT	CAACTCCAG	CCGTTTCATGC	ACTGGCGCGA	CCGT...GCG	CAACGACATG	ATCCTGCA
R46c	AAGGACG	ACGAGAACAT	CAACTCGCAG	CCGTTTCATGC	ACTGGCGCGA	CCGC...CAA	GAACGACATG	ATCCTGCA
HKOR89	AAGGATG	ACGAGAACAT	CAACTCGCAG	CCGTTTCATGC	ACTGGCGCGA	CCGC...CAA	GAACGACATG	ATCCTGCA
HKOR3D	AAGGACG	ACGAGAACAT	CAACTCGCAG	CCGTTTCATGC	ACTGGCGCGA	CCGC...CAA	GAACGACATG	ATCCTGCA
R43c	AAGGACG	ACGAGAACAT	CAACTCGCAG	CCGTTTCATGC	ACTGGCGCGA	CCGC...CAA	GAACGACATG	ATCCTGCA
HNPKR100	AAGGACG	ACGAGAACAT	CAACTCGCAG	CCGTTTCATGC	ACTGGCGCGA	CCGC...CAA	GAACGACATG	ATCCTGCA
<i>Aminobacter</i> sp. COX	AAGGACG	ACGAGAACAT	CAACTCGCAG	CCGTTTCATGC	ATTGGCGCGA	CCGC...CAA	GAACGACATG	ATCCTGCA
HSMR139	AAGGACG	ACGAGAACAT	CAACAGCCAA	CCGTTTCATGC	ACTGGCGCGA	CCGC...CCG	CAACGACATG	ATCCTGCA
HSMR20	AAGGACG	ACGAGAACAT	CAACAGCCAA	CCGTTTCATGC	ACTGGCGCGA	CCGC...CCG	CAACGACATG	ATCCTGCA
<i>B. japonicum</i>	AAGGACG	ACGAGAACAT	CAACTCGCAG	CCGTTTCATGC	ATTGGCGCGA	CCGC...GCG	CAATGACATG	ATCCTGCA
<i>Bradyrhizobium</i> sp. CPP	AAGGACG	ACGAGAACAT	CAACTCGCAA	CCGTTTCATGC	ACTGGCGCGA	CCGT...GCG	CAACGACATG	ATCCTGCA
F24	AAGGACG	ATGAGAACAT	CAACAGCCAG	CCGTTTCATGC	ATTGGCGCGA	CCGC...CCG	CAACGACATG	ATCCTGCA

Abb. C.18: Primer- und Sondensequenz sowie die Primer- und Sondenbindungsstellen der ‚red-like‘ *cbbL*-Zielsequenzen. Oligonukleotide und *cbbL*-Zielsequenzen sind in 5'-3'-Richtung angegeben. Rot hervorgehoben sind die Bindungsbereiche des Vorwärts-Primers *cbbLR1-F*, blau der Bindungsbereich des Rückwärts-Primers *cbbLR1int-R* und in grün der Bindungsbereich der Sonde REDpro. Die Zahlen unter den Sequenzen geben die Sequenzpositionen bezogen auf die *cbbL*-Sequenz von *R. eutropha* H16 an.

Dieser Datensatz enthält alle bisher in öffentlichen Datenbanken publizierten, bakteriellen *cbbL*-Sequenzen, sowie die in dieser Arbeit ermittelten *cbbL*-Sequenzen. Bei der Konstruktion von Primern und Sonde wurde darauf geachtet, dass die Oligonukleotide vor allem die *cbbL*-Sequenzen erfassen, die in vorliegender Arbeit in den untersuchten Bodenvarianten detektiert wurden. Die Amplifikation der ‚red-like‘ *cbbL*-Genfragmente erfolgte mit dem Primerpaar *cbbLR1-F* und *cbbLRint-R*. Der Vorwärts-Primer *cbbLR1-F* wurde bereits zur Erstellung der *cbbL*-Genbanken aus Boden verwendet und bindet an die Positionen 634-651 (bezogen auf die *cbbL*-Sequenz von *R. eutropha* H16) (Abb. C.18). Da der Primer *cbbLR1-F* spezifisch für alle in dieser Arbeit ermittelten *cbbL*-Sequenzen ist und seine angrenzenden Sequenzbereiche durch eine hohe Konservierung gekennzeichnet sind, wurde dieser Primer ebenfalls zur quantitativen Analyse herangezogen und als Ausgangspunkt zur Konstruktion eines neuen Rückwärts-Primers und der Sonde ausgewählt. Der Rückwärtsprimer *cbbLRint-R* bindet an die Positionen 892-908 und ist spezifisch für eine Vielzahl an *cbbL*-Sequenzen (Abb. C.18). Das Primerpaar *cbbLR1-F* und *cbbLRint-R* führt zur Bildung eines Amplifikats von 270 bp Größe. Die 2-fach markierte Sonde REDpro bindet 15 bp weiter in Richtung 3'-Ende von dem Vorwärtsprimer *cbbLR1-F* an die Positionen 666-683 (Abb. C.18). In Abbildung C.18 sind die *cbbL*-Sequenzbereiche aufgeführt, die von allen drei Oligonukleotiden erfasst werden. Die von allen drei Oligonukleotiden erfassten *cbbL*-Sequenzen sind über die gesamte Gruppe der ‚red-like‘ *cbbL*-Sequenzen verteilt. Auffallend ist dabei, dass die entwickelten Primer und die Sonde für eine große Anzahl an *cbbL*-Bodensequenzen spezifisch ist.

Das entwickelte Primerpaar *cbbLR-F/cbbLRint-R* wurde im weiteren Verlauf zur Herstellung der Standard-DNA und im Zusammenspiel mit der Sonde zur Quantifizierung von ‚red-like‘ *cbbL*-Sequenzen im Boden herangezogen.

C.2.2. Herstellung der Standard-DNA und Berechnung der Kopienzahl

Für die Generierung einer Eichgeraden zur Quantifizierung von ‚red-like‘ *cbbL*-Genen wurde genomische DNA aus *Sinorhizobium meliloti* mit den PCR-Primern *cbbLR-F* und *cbbLRint-R* amplifiziert. Die Amplifikation führte zum erwarteten Produkt von 270 bp Länge. Dieses wurde aus dem Gel eluiert und einer Klonierung unterzogen. Fünf ausgewählte Transformanten zeigten nach *EcoRI*-Restriktion der Plasmid-DNA ein Fragment von 290 bp Länge (270 bp Insert + 20 bp Vektorsequenz). Um sicherzustellen, dass es sich bei den Inserts tatsächlich um die korrekte Sequenz handelt, wurden zwei Klone einer Sequenzanalyse

unterzogen. Die erhaltenen Sequenzen wurden anschließend einem Vergleich mit bekannten Sequenzen aus der öffentlichen Datenbank unterzogen. Dabei konnten die untersuchten Plasmid-Inserts mit einer Sequenzähnlichkeit von 100% als *cbbL*-Sequenz identifiziert werden. Im Anschluss erfolgte die Linearisierung und die photometrische Konzentrationsbestimmung der Plasmid-DNA (Standard-DNA). Die Konzentration der ‚red-like‘ *cbbL*-Standard-DNA betrug 75 µg/ml.

Um die Startkopienzahl einer unbekanntes Probe zu ermitteln, ist es erforderlich die Kopienzahl für den ‚red-like‘ *cbbL*-Standard zu berechnen. Das ‚red-like‘ *cbbL*-Fragment, das eine Größe von 270 bp aufweist, wurde in den Vektor mit einer Größe von 3931 bp inseriert. Daraus ergibt sich eine Gesamtlänge von 4201 bp. Das durchschnittliche Molekulargewicht eines Basenpaars beträgt 660 g/mol. Durch Multiplikation der Gesamtlänge des Plasmids mit diesem Faktor kann das Molekulargewicht ermittelt werden und damit die Kopienzahl:

$$(4201 \times 660 \text{ g/mol}) = 2,77 \times 10^6 \text{ g/mol}$$

Die photometrisch ermittelte Konzentration der Standard-DNA beträgt 75 µg/ml.

$$75 \times 10^{-6} \text{ g/ml} / 2,77 \times 10^6 \text{ g/mol} = 2,71 \times 10^{-11} \text{ mol/ml}$$

Wenn 1 mol einer Anzahl von $6,022 \times 10^{23}$ Molekülen entspricht, dann sind in $2,71 \times 10^{-11}$ mol $1,63 \times 10^{13}$ Moleküle vorhanden.

In 1 ml dieser Standard-DNA-Lösung liegen somit $1,63 \times 10^{13}$ Moleküle, also auch die gleiche Anzahl an zu amplifizierenden DNA-Kopien vor.

C.2.3. Optimierung der TaqMan-PCR

Um eine möglichst starke und spezifische Amplifikation zu erhalten, wurden die Parameter MgCl₂-, Primer- und Sonden-Konzentration variiert und optimiert. Konstant blieb der Einsatz von Puffer A, dNTP-Mix und *AmpliTaqGold* Polymerase. Die Optimierung der ‚red-like‘ *cbbL*-Gene erfolgte mit genomischer DNA von *R. eutropha*. Dabei wurde eine unterschiedliche Menge an Template-DNA eingesetzt (von 100 ng bis 0,1 ng *R. eutropha*-DNA).

Zunächst wurde eine Groboptimierung der MgCl₂-Konzentration (3 mM, 4 mM, 4,5 mM, 5 mM) durchgeführt. Dazu wurden 300 nM je Primer und 150 nM je Sonde, so wie 100 ng, 10 ng und 1 ng *R. eutropha*-DNA eingesetzt. Aus dem Kurvenverlauf dieser TaqMan-Reaktion ging hervor, dass die Konzentration von 4 mM MgCl₂ das beste Verhältnis von niedrigstem C_T-Wert zu höchstem Rn-Wert aufwies.

Im weiteren Verlauf wurde nun die Sonden-Konzentration variiert. Es wurden folgende Konzentrationen an REDpro eingesetzt: 50 nM, 100 nM, 200 nM, 300 nM und 400 nM. Dabei betrug die MgCl₂-Konzentration 4 mM und die Primer-Konzentration 300 nM. Das beste Ergebnis dieser Reaktionen war bei einer Sonden-Konzentration von 200 nM festzustellen.

Als letzter Parameter wurde die Primer-Konzentration optimiert. Es wurden Reaktionen mit 200 nM, 300 nM, 400 nM, 500 nM und 600 nM der jeweiligen Primer durchgeführt. Die MgCl₂-Konzentration betrug 4 mM und die Sonden-Konzentration 200 nM. Die besten C_T- und Rn-Werte waren dabei bei den Reaktionen mit 300 nM und 400 nM Sonde zu beobachten.

Weitere Feinoptimierungen der drei verschiedenen Parameter zeigten, dass die aussagekräftigsten Ergebnisse bei folgenden Konzentrationen erbracht wurden:

3,5 mM MgCl₂

200 nM Sonde REDpro

400 nM je Primer *cbbLR1-F* und *cbbLRint-R*

C.2.4. Quantifizierung der ‚red-like‘ *cbbL*-Gene

C.2.4.1. Quantifizierung der ‚red-like‘ *cbbL*-Gene aus *R. eutropha*

Um die Effizienz der TaqMan-PCR abschätzen zu können, wurden TaqMan-Reaktionsansätze mit 10 ng, 1 ng und 0,1 ng DNA aus *R. eutropha* durchgeführt. Von jedem Reaktionsansatz wurden zur Absicherung der Resultate Triplikate durchgeführt. Bei starker Abweichung eines Triplikat-Wertes wurde dieser von der Mittelwertberechnung ausgeschlossen. Die Standard-DNA (Konzentration der Stammlösung = $1,6 \times 10^{11}$ Kopien/μl) wurde durch serielle Verdünnung auf die gewünschten Konzentrationen von $1,6 \times 10^3$ Kopien/μl, $1,6 \times 10^4$ Kopien/μl, $1,6 \times 10^5$ Kopien/μl und $1,6 \times 10^6$ Kopien/μl eingestellt.

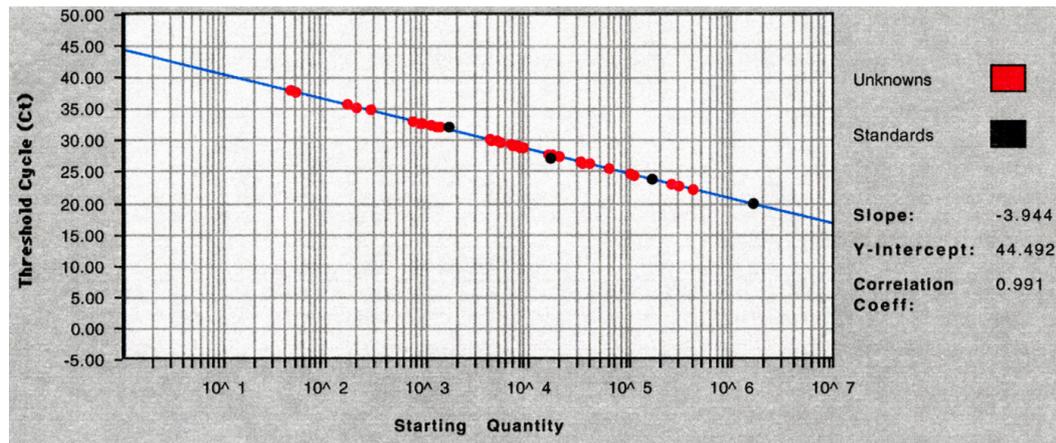


Abb. C.19: Standardkurve zur Quantifizierung von ‚red-like‘ *cbbL*-Genen in den Reaktionsansätzen mit Boden-DNA. Die Standardkurve wird über (LogN) der Startkopienzahl erstellt und durch Interpolation wird die Startkopienzahl der untersuchten Proben ermittelt. Schwarze Punkte stellen die Reaktionsansätze mit Standard-DNA bekannter Kopienzahl dar. Rote Werte sind die Reaktionsansätze aus *R. eutropha*- und Boden-DNA mit unbekannter Kopienzahl.

In Abbildung C.19 ist die Standardkurve zur Quantifizierung von ‚red-like‘ *cbbL*-Genen in Boden dargestellt. Dabei sind die Kopienzahlen der Standard-DNAs gegen ihren C_T -Wert aufgetragen. Die C_T -Werte der Standard-DNA sind in Tabelle C.6 aufgeführt. Deutlich ist der lineare Anstieg der C_T -Werte, in Abhängigkeit vom Logarithmus der jeweilig eingesetzten Menge an Standard-DNA zu sehen. So wurde z. B. bei einer Kopienzahl von $1,6 \times 10^6$ ein C_T -Wert von 20,22 erreicht, der unter Einsatz einer 10-fach niedrigeren Kopienzahl um 3,8 stieg. Diese Werte lassen erkennen, dass die Kopienzahl mit dem C_T -Wert korreliert ist, denn eine 10-fache Verringerung der eingesetzten Kopienzahl, verursachte einen Anstieg des C_T -Wertes um etwa 3,5. Abweichend hiervon ist der C_T -Wert der Standard-DNA mit der niedrigsten Kopienzahl ($1,6 \times 10^3$), denn die C_T -Differenz zur nächst höheren Kopienzahl betrug 5. Mehrfache Wiederholungen dieses Reaktionsansatzes bestätigten das Ergebnis. In Abbildung C.20 sind die gemessenen Fluoreszenzsignale für die Standard-DNA graphisch dargestellt. Zusätzlich ist der Schwellenwert angegeben. Höhere Ausgangskonzentrationen der zu quantifizierenden Zielsequenz zu Beginn der PCR führten dazu, dass der Schwellenwert eher erreicht wurde und somit der C_T -Wert niedriger war.

Tabelle C.6: C_T -Werte der ‚red-like‘ *cbbL*-Standard-DNA mit bekannter Kopienzahl

Kopienzahl der Standard-DNA	C_T -Wert
$1,6 \times 10^3$	32,29
$1,6 \times 10^4$	27,24
$1,6 \times 10^5$	24,02
$1,6 \times 10^6$	20,22

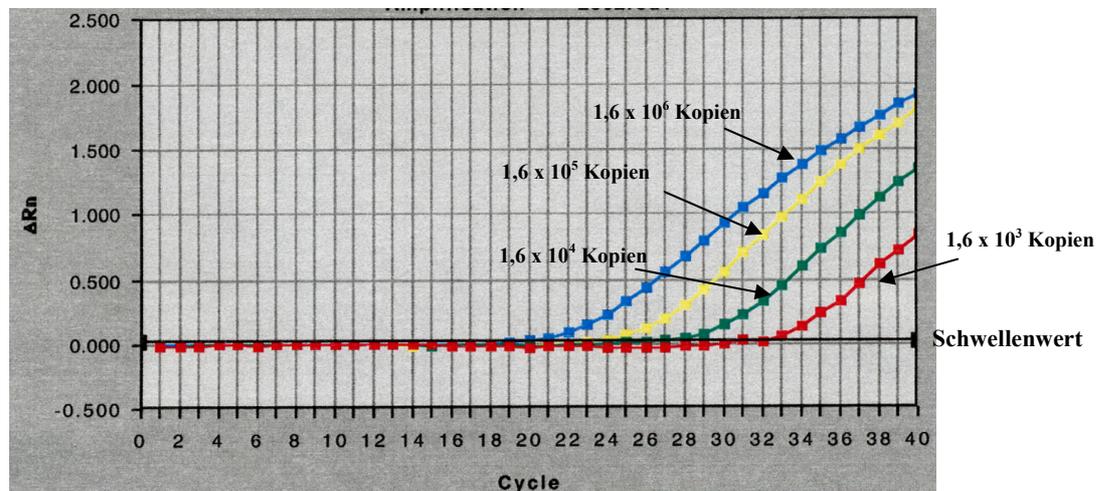


Abb. C.20: Gemessene Fluoreszenzintensität der Reaktionsansätze mit Standard-DNA. Aufgetragen sind die ΔR_n -Werte gegen die Zyklenzahl in linearer Darstellung.

Aus dieser Standard-Kurve lassen sich nun die ‚red-like‘ *cbbL*-Kopienzahlen unbekannter Proben bestimmen. Für die Quantifizierung der *cbbL*-Gene aus *R. eutropha* wurden 10 ng, 1 ng und 0,1 ng der extrahierten DNA eingesetzt. Die C_T -Werte und die daraus resultierenden *cbbL*-Kopienzahlen sind in Tabelle C. 7 aufgeführt. Die Quantifizierung verschiedener DNA-Mengen aus *R. eutropha* lässt erkennen, dass der Einsatz einer 10-fach größeren Menge an DNA zu einem Anstieg der Kopienzahl um eine 10er Potenz führte. In Abbildung C.21 sind die gemessenen Fluoreszenzintensitäten für die DNA aus *R. eutropha* graphisch dargestellt.

Tabelle C.7.: Quantifizierung von ‚red-like‘ *cbbL*-Genen in *R. eutropha*

<i>R. eutropha</i> -DNA	C_T -Werte ¹			MW ² C_T ± Standabw. ⁵	Kopienzahlen ³			MW ⁴ Kopien ± Standabw. ⁵
10 ng	24,68	24,81	-	24,75 ± 0,08	1,1x10 ⁵	9,8x10 ⁴	-	1,04x10 ⁵ ± 0,07x10 ⁵
1 ng	27,84	27,98	27,57	27,80 ± 0,24	1,7x10 ⁴	1,6x10 ⁴	2,0x10 ⁴	1,8x10 ⁴ ± 0,18x10 ⁴
0,1 ng	29,99	30,21	30,20	30,13 ± 0,14	4,8x10 ³	4,2x10 ³	4,2x10 ³	4,4x10 ³ ± 0,4x10 ³

¹ Der C_T -Wert drückt die Zyklenzahl aus, an dem die „Reporter“-Fluoreszenz erstmals einen Schwellenbereich erreicht. Es wurden von jedem Reaktionsansatz Triplikate angesetzt. Daraus resultieren drei C_T -Werte.

² MW C_T : Mittelwert aus allen drei bzw. zwei C_T -Werten.

-: Stark abweichender Triplikat-Wert, der von der Mittelwertberechnung ausgeschlossen wurde.

³ Aus der Standardkurve lässt sich aus den ermittelten C_T -Werten die Startkopiezahl pro Reaktionsansatz ableiten.

⁴ MW Kopienzahl: Mittelwert der drei bzw. zwei ermittelten Kopienzahlen.

⁵ Standardabweichung vom arithmetischen Mittelwert für drei bzw. zwei parallele Messungen.

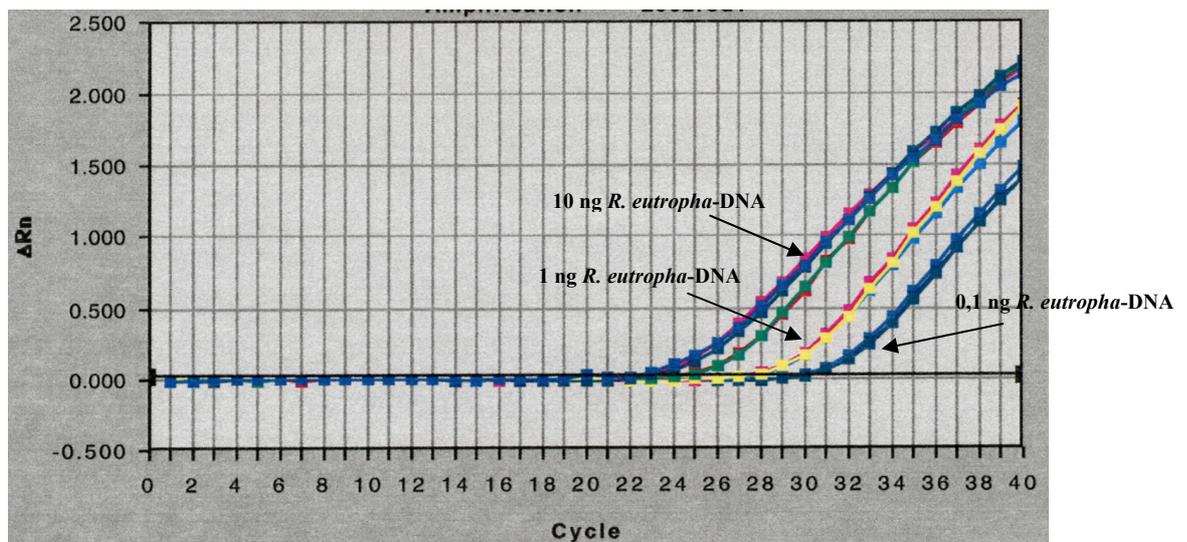


Abb. C.21: Gemessene Fluoreszenzintensität der Reaktionsansätze zur Quantifizierung von ‚red-like‘ *cbbL*-Genen in *R. eutropha*. Aufgetragen sind die ΔR_n -Werte gegen die Zyklenzahl in linearer Darstellung.

C.2.4.2. Quantifizierung der ‚red-like‘ *cbbL*-Gene in Böden

Die Quantifizierung der ‚red-like‘ *cbbL*-Gene in Böden erfolgte mit genomischer DNA aus den Bodenproben HKO, HSM und HNPk (s. C.1.1) unter den optimierten Bedingungen. Die eingesetzte Menge an DNA betrug 10 ng, 1 ng und 0,1 ng. Vorversuche zeigten, dass der Einsatz von 100 ng Boden-DNA zu keiner Bildung eines Fluoreszenzsignals führte.

Tabelle C.8: Quantifizierung der ‚red-like‘ *cbbL*-Gene aus den Bodenproben HKO, HSM und HNPK

HKO-DNA	C_T-Werte¹	MW² C_T ± Standabw.⁵	Kopienzahlen³	MW⁴-Kopien ± Standabw.⁵
10 ng	26,62 26,74 26,40	26,59 ± 0,19	3,4x10 ⁴ 3,2x10 ⁴ 3,9x10 ⁴	3,5x10 ⁴ ± 0,42x10 ⁴
1 ng	29,09 29,19 29,11	29,13 ± 0,06	8,0x10 ³ 7,6x10 ³ 8,5x10 ³	8,0x10 ³ ± 0,58x10 ³
0,1 ng	32,15 32,51 32,83	32,50 ± 0,39	1,4x10 ³ 1,1x10 ³ 9,1x10 ²	1,1x10 ³ ± 0,29x10 ³
HSM-DNA	C_T-Werte¹	MW² C_T	Kopienzahlen³	MW⁴-Kopien ± Standabw.⁵
10 ng	29,37 29,31 28,91	29,20 ± 0,29	6,8x10 ³ 7,1x10 ³ 9,0x10 ³	7,6x10 ³ ± 1,4x10 ³
1 ng	32,21 32,30 32,51	32,34 ± 0,18	1,3x10 ³ 1,2x10 ³ 1,1x10 ³	1,2x10 ³ ± 0,12x10 ³
0,1 ng	34,89 35,40 -	35,14 ± 0,29	2,7x10 ² 2,0x10 ² -	2,4x10 ² ± 0,41x10 ²
HNPK-DNA	C_T-Werte¹	MW² C_T	Kopienzahlen³	MW⁴-Kopien ± Standabw.⁵
10 ng	29,41 29,80 29,38	29,53 ± 0,27	6,7x10 ³ 5,3x10 ³ 6,8x10 ³	6,3x10 ³ ± 0,97x10 ³
1 ng	32,91 33,22 32,94	33,02 ± 0,20	8,6x10 ² 7,2x10 ² 8,5x10 ²	8,1x10 ² ± 0,90x10 ²
0,1 ng	38,00 37,74 -	37,87 ± 0,15	4,4x10 ¹ 5,2x10 ¹ -	4,8x10 ¹ ± 1,2x10 ¹

¹⁻⁵ s. Tabelle C.7

Der Einsatz von 10 ng HKO-DNA pro Reaktionsansatz führte zu einem C_T-MW von 26,59, was einer mittleren Anzahl von 3,5 x 10⁴ Gen-Kopien entsprach (Tabelle C.8). Eine Verringerung der DNA-Menge aus HKO führte zu einem linearen Anstieg der C_T-MW und somit der *cbbL*-Kopienzahlen. In Abbildung C.22 sind die gemessenen Fluoreszenzintensitäten der Reaktionsansätze mit DNA aus HKO dargestellt.

Die Reaktionsansätze mit DNA aus der Bodenprobe HSM führten unter Verwendung gleicher DNA-Mengen zu höheren C_T-Werten (Tabelle C.8). So ergab sich z. B. für die Reaktionsansätze mit 10 ng HSM-DNA ein C_T-MW von 29,2. Dieser war um 2,61 Zyklen höher als bei den 10 ng-Ansätzen mit DNA aus HKO und resultierte in einer niedrigeren Startkopienzahl (7,6 x 10³). In Abbildung C.23 sind die gemessenen Fluoreszenzintensitäten der Ansätze mit DNA aus der Bodenprobe HSM dargestellt.

Die Reaktionsansätze mit DNA aus der Bodenprobe HNPK (Tabelle C.8) führten zu Kopienzahlen, die alle um eine 10er Potenz geringer waren als bei HKO. So erbrachte die Quantifizierung von 10 ng HNPK-DNA einen C_T-MW von 29,53 und damit eine Kopienzahl von 6,3 x 10³. Dieser Wert lag bei HKO mit 3,5 x 10⁴ deutlich höher. Die Fluoreszenzintensitäten der Ansätze mit HNPK-DNA sind in Abbildung C.24 aufgeführt.

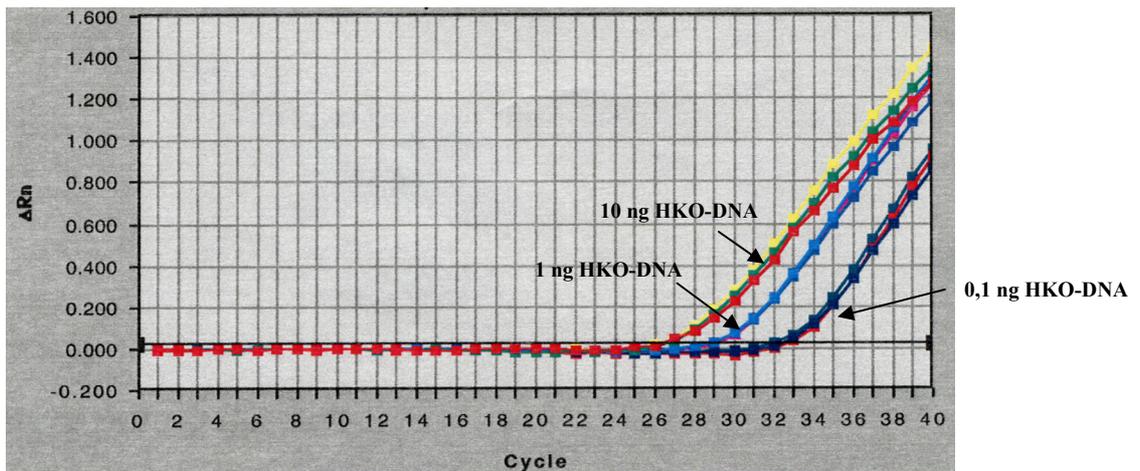


Abb. C.22: Gemessene Fluoreszenzintensität für die ‚red-like‘ *cbbL*-Reaktionsansätze mit DNA aus der Bodenprobe HKO. Aufgetragen sind die ΔR_n -Werte gegen die Zyklenzahl in linearer Darstellung.

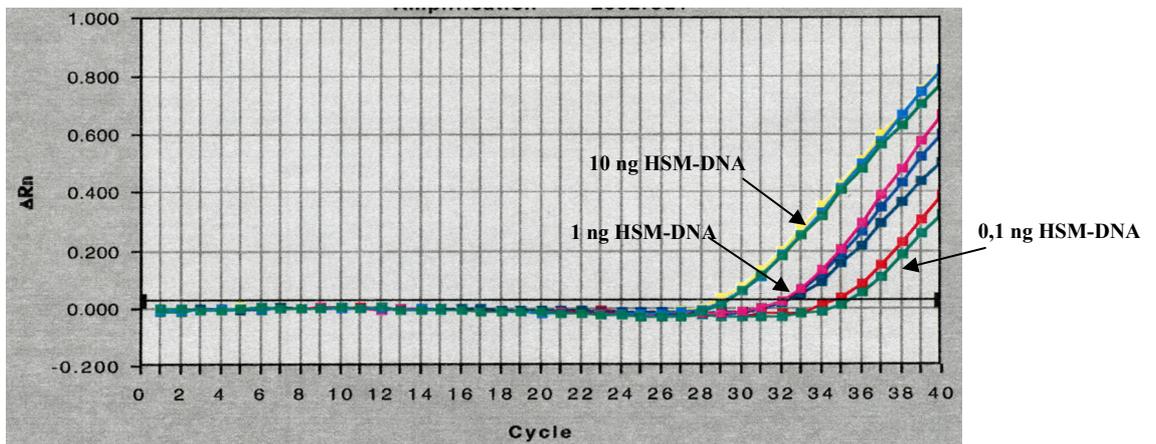


Abb. C.23: Gemessene Fluoreszenzintensität für die ‚red-like‘ *cbbL*-Reaktionsansätze mit DNA aus der Bodenprobe HSM. Aufgetragen sind die ΔR_n -Werte gegen die Zyklenzahl in linearer Darstellung.

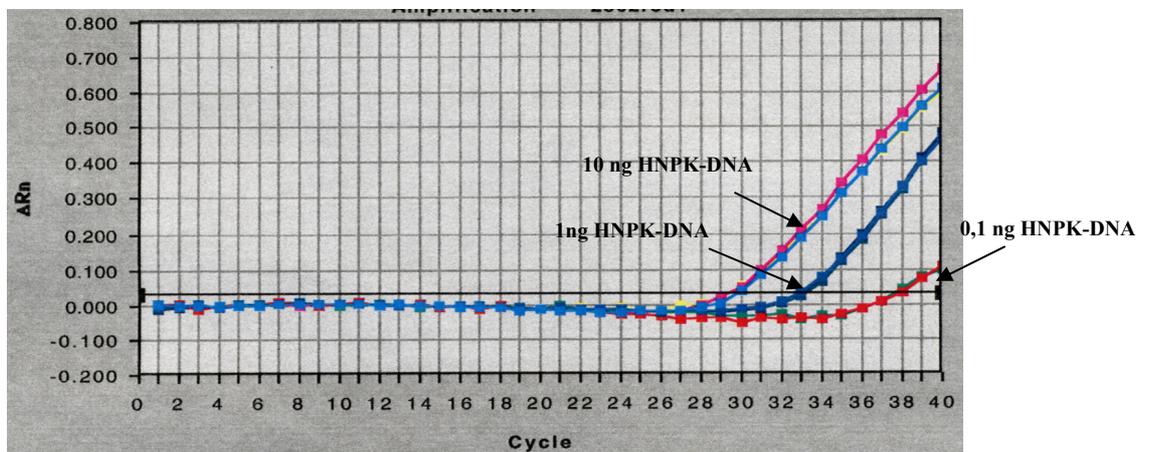


Abb. C.24: Gemessene Fluoreszenzintensität für die ‚red-like‘ *cbbL*-Reaktionsansätze mit DNA aus der Bodenprobe HNPk. Aufgetragen sind die ΔR_n -Werte gegen die Zyklenzahl in linearer Darstellung.

Mit der Annahme, dass die DNA-Extraktion mit einer 100%-Effizienz erfolgte, lassen sich die erhaltenen Kopienzahlen pro Gramm Boden hochrechnen (s. B.2.16.5). Die ‚red-like‘ *cbbL*-Genkopienzahlen aus den Bodenvarianten HKO, HSM und HNPk sind in Tabelle C.9 aufgeführt. Die Anzahl an *cbbL*-Genkopien/g Boden in den untersuchten Bodenproben lag im Bereich von 10^6 bis 10^7 . Auffallend war, dass der Einsatz niedrigerer DNA-Mengen aus den Bodenvarianten HKO und HSM zu einem Anstieg der MW-Genkopien/g Boden führte.

Tabelle C.9: Anzahl an ‚red-like‘ *cbbL*-Genkopien/g Boden aus den Bodenvarianten HKO, HSM und HNPk

HKO-DNA	<i>cbbL</i>-Genkopien/g Boden¹			MW-Genkopien/g Boden² ± Standabw.³
10 ng	1,0x10 ⁷	9,6x10 ⁶	1,2x10 ⁷	1,0x10 ⁷ ± 1,5x10 ⁶
1 ng	2,4x10 ⁷	2,3x10 ⁷	2,6x10 ⁷	2,4x10 ⁷ ± 1,8x10 ⁶
0,1 ng	4,2x10 ⁷	3,3x10 ⁷	2,7x10 ⁷	3,4x10 ⁷ ± 8,7x10 ⁶
HSM-DNA	<i>cbbL</i>-Genkopien/g Boden¹			MW-Genkopien/g Boden² ± Standabw.³
10 ng	6,0x10 ⁶	6,4x10 ⁶	8,0x10 ⁶	6,8x10 ⁶ ± 1,2x10 ⁶
1 ng	1,2x10 ⁷	1,1x10 ⁷	9,9x10 ⁶	1,1x10 ⁷ ± 1,2x10 ⁶
0,1 ng	2,4x10 ⁷	1,8x10 ⁷	-	2,1x10 ⁷ ± 3,5x10 ⁶
HNPk-DNA	<i>cbbL</i>-Genkopien/g Boden¹			MW-Genkopien/g Boden² ± Standabw.³
10 ng	8,7x10 ⁶	6,9x10 ⁶	8,8x10 ⁶	8,1x10 ⁶ ± 1,2x10 ⁶
1 ng	1,1x10 ⁷	9,4x10 ⁶	1,1x10 ⁷	1,0x10 ⁷ ± 1,2x10 ⁶
0,1 ng	5,7x10 ⁶	6,8x10 ⁶	-	6,3x10 ⁶ ± 6,5x10 ⁵

¹ Aus den Werten für die Kopienzahlen pro Reaktionsansatz aus Tabelle C.8 und den photometrisch bestimmten Konzentrationen der jeweils gewonnenen Boden-DNA lassen sich unter Annahme einer 100%-Effizienz der DNA-Extraktion die *cbbL*-Genkopien pro Gramm Boden hochrechnen.

² MW-Genkopien/g Boden: Mittelwert aus allen drei bzw. zwei Werte für *cbbL*-Genkopien/g Boden.

³ Standardabweichung vom arithmetischen Mittelwert für drei bzw. zwei parallele Messungen.

C.2.4.3. Quantifizierung der ‚red-like‘ *cbbL*-Gene in Partikelgrößenfraktionen der Bodenprobe HKO

Um die Lokalisation von *cbbL*-tragenden Bodenbakterien in der Bodenfeinstruktur zu bestimmen, wurde eine Quantifizierung der ‚red-like‘ *cbbL*-Gene in den verschiedenen Partikelgrößenfraktionen der Bodenprobe HKO durchgeführt. Die Bodenprobe wurde bei der Partikelgrößenfraktionierung mittels Ultraschallbehandlung und wiederholende Sieb- und Zentrifugationsschritte in ihre verschiedenen Partikelgrößenfraktionen aufgetrennt (Stemmer *et al.*, 1998). Die Fraktion Sand 1 enthält Bodenpartikel mit einer Größe von > 250 µm. Sand 2 ist durch eine 250-63 µm große Fraktion gekennzeichnet. Schluff und Ton sind die kleinsten Fraktionen. Schluff weist eine Partikelgröße von 63-2 µm und Ton von 2-0,1 µm auf. Die Bodenfraktionen aus HKO wurden von der Arbeitsgruppe E. Kandler (Uni Hohenheim) erstellt.

Die Quantifizierung der ‚red-like‘ *cbbL*-Gene in den verschiedenen HKO-Fraktionen erfolgte mit 10 ng und 0,1 ng DNA. Von jedem Reaktionsansatz wurden zur Absicherung der Resultate Triplikate durchgeführt. Bei starker Abweichung eines Triplikat-Wertes wurde dieser von der Mittelwertberechnung ausgeschlossen. Die Ermittlung der Kopienzahlen erfolgte mit der Standardkurve aus C.2.4.1.

Tabelle C.10: Quantifizierung der ‚red-like‘ *cbbL*-Gene in Fraktionen Schluff und Ton der Bodenprobe HKO

Schluff-DNA	C_T -Werte ¹			$MW^2 C_T$ ± Standabw. ⁵	Kopienzahlen ³			MW^4 -Kopien ± Standabw. ⁵
10 ng	27,86	27,69	28,48	28,01 ± 0,48	2,2x10 ⁴	2,4x10 ⁴	1,5x10 ⁴	2,0x10 ⁴ ± 0,55x10 ⁴
0,1 ng	35,50	35,24	34,57	35,10 ± 0,55	2,9x10 ²	3,3x10 ²	4,8x10 ²	3,7x10 ² ± 1,1x10 ²
Ton-DNA	C_T -Werte ¹			$MW^2 C_T$ ± Standabw. ⁵	Kopienzahlen ³			MW^4 -Kopien ± Standabw. ⁵
10 ng	30,66	30,59	30,68	30,64 ± 0,05	4,4x10 ³	4,6x10 ³	4,4x10 ³	4,5x10 ³ ± 0,14x10 ³
0,1 ng	37,54	37,18	-	37,36 ± 0,25	9,0x10 ¹	1,1x10 ²	-	1,0x10 ² ± 0,12x10 ²

¹⁻⁵ s. Tabelle C.7

Für die Reaktionsansätze mit 10 ng bzw. 0,1 ng Boden-DNA aus Sand 1 und Sand 2 konnte nach 40 Zyklen keine „Reporter“-Fluoreszenz detektiert werden. Um mögliche Inhibitoren als Ursache für diese Nicht-Amplifizierbarkeit auszuschließen, wurden Reaktionen durchgeführt, die neben der Sand 1- bzw. Sand 2-DNA zusätzlich 1 µl *R. eutropha*-DNA enthielten. Unter diesen Bedingungen konnte eine „Reporter“-Fluoreszenz

aufgenommen werden, womit der Einfluss von Inhibitoren auszuschließen war und das Ausbleiben des Fluoreszenzsignals auf das Fehlen von *cbbL*-Genen in den Sand 1- und Sand 2-Fractionen zurückzuführen war. Demgegenüber konnten in den beiden kleinsten Fractionen Schluff und Ton Fluoreszenzsignale erfasst werden (Tabelle C.10).

Der Reaktionsansatz mit 10 ng Boden-DNA der Schluff-Fraktion führte zur Bildung eines C_T -MW (28,01) der um etwa 2 Zyklen niedriger war als in den Ansätzen mit DNA aus der Ton-Fraktion. Der Einsatz von 0.1 ng DNA resultierte für beide Boden-Fractionen in einem C_T -Anstieg von etwa 7. Die mittleren Kopienzahlen, die sich somit aus der Standardkuve ergaben, variierten in Abhängigkeit von der eingesetzten DNA-Menge zwischen 10^2 und 10^4 . Die graphischen Darstellungen der gemessenen Fluoreszenzintensitäten der DNA aus der Schluff-Fraktion sowie der Ton-Fraktion sind in Abbildung C.25 und C.26 aufgeführt. Die *cbbL*-Kopienzahlen der HKO-Fractionen Schluff und Ton lassen sich auf *cbbL*-Genkopien pro Gramm Boden hochrechnen (s. B.2.16.5, Tabelle C.11). Aus der DNA der Fractionen Schluff und Ton konnten *cbbL*-Genkopien/g Boden im Bereich von 10^6 bis 10^7 quantifiziert werden.

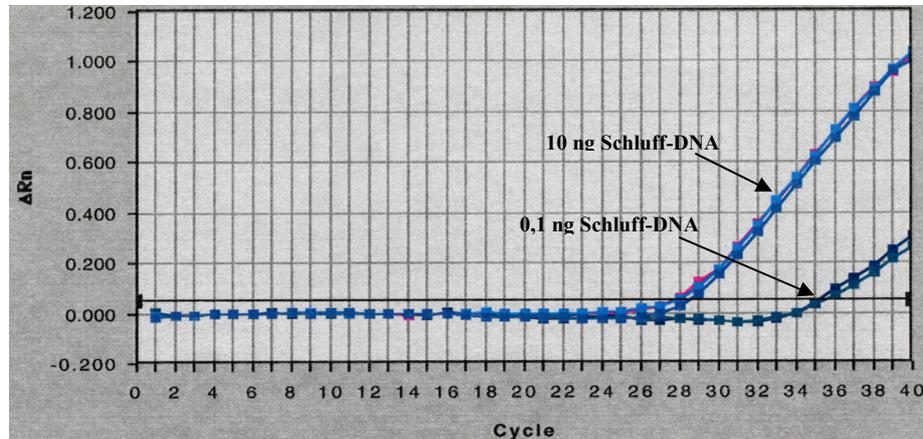


Abb. C.25: Gemessene Fluoreszenzintensität der Reaktionsansätze mit DNA aus der Bodenfraktion Schluff. Aufgetragen sind die ΔR_n -Werte gegen die Zyklenzahl in linearer Darstellung.

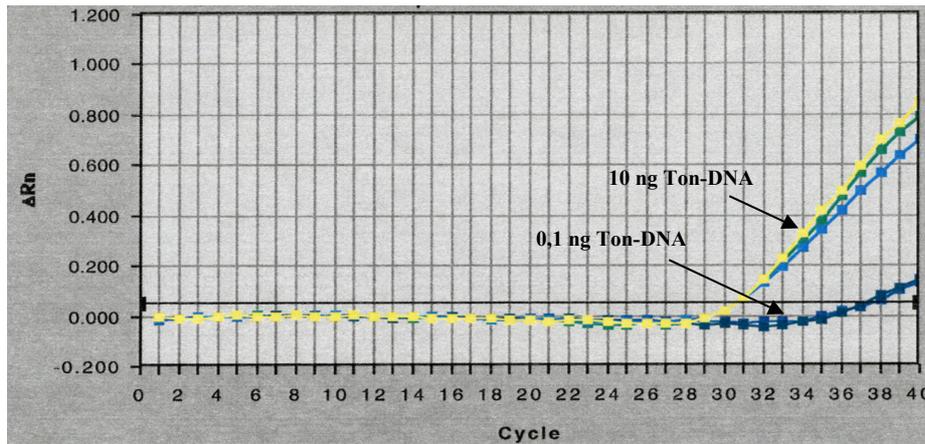


Abb. C.26: Gemessene Fluoreszenzintensität der Reaktionsansätze mit DNA aus der Bodenfraktion Ton. Aufgetragen sind die ΔR_n -Werte gegen die Zyklenzahl in linearer Darstellung.

Tabelle C.11: Anzahl an ‚red-like‘ *cbbL*-Genkopien/g Boden aus den Bodenfraktionen Schluff und Ton der Bodenvariante HKO

Schluff-DNA	<i>cbbL</i> -Genkopien/g Boden ¹			MW Genkopien/g Boden ² ± Standabw. ³
10 ng	6,6x10 ⁶	7,2x10 ⁶	4,5x10 ⁶	6,1x10 ⁶ ± 1,6x10 ⁶
0,1 ng	8,7x10 ⁶	9,9x10 ⁶	1,4x10 ⁷	1,1x10 ⁷ ± 3,2x10 ⁶
Ton-DNA	<i>cbbL</i> -Genkopien/g Boden ¹			MW Genkopien/g Boden ² ± Standabw. ³
10 ng	2,4x10 ⁶	2,5x10 ⁶	2,4x10 ⁶	2,4x10 ⁶ ± 8,2x10 ⁴
0,1 ng	4,9x10 ⁶	6,1x10 ⁶	-	5,5x10 ⁶ ± 7,0x10 ⁵

¹ Aus den Werten für die Kopienzahlen pro Reaktionsansatz aus Tabelle C.8 und den photometrisch bestimmten Konzentrationen der Boden-DNA lassen sich unter Annahme einer 100%-Effizienz der DNA-Extraktion die *cbbL*-Genkopien pro Gramm Boden hochrechnen.

² MW-Genkopien/g Boden: Mittelwert aus allen drei bzw. zwei Werte für *cbbL*-Genkopien/g Boden.

³ Standardabweichung vom arithmetischen Mittelwert für drei bzw. zwei parallele Messungen.

D. Diskussion

D.1. Entwicklung von ‚red-like‘ und ‚green-like‘ *cbbL*-spezifischen Oligonukleotiden

Die meisten Veröffentlichungen zur phylogenetischen Erfassung des RubisCO-kodierenden Gens *cbbL* in Umweltproben befassen sich mit der Untersuchung aquatischer Habitate. Die erste phylogenetische *cbbL*-Umweltanalyse von Paul *et al.* (1990) hatte die Planktongemeinschaften in Gewässern von Florida als Untersuchungsobjekt. Paul *et al.* (1990) entwickelten in ihrer Arbeit PCR-Primer, die spezifisch ausgewählte *cbbL*-Sequenzen der ‚green-like‘-Linie amplifizieren und ein Produkt von etwa 500 bp Größe erzeugen. Ein weiteres Primerpaar, welches ebenfalls zur Bildung eines PCR-Produkts von 500 bp Größe führt, wurde von Xu und Tabita (1996) entwickelt und zur Erfassung der ‚green-like‘ *cbbL*-Sequenzen des nordamerikanischen Gewässers ‚Lake Erie‘ angewendet. Eine weitere auf ‚green-like‘ *cbbL*-Sequenzen beruhende molekulare Umweltanalyse wurde von Elsaied und Naganuma (2001) durchgeführt, wobei sie PCR-Primer zur Amplifikation von 800 bp großen ‚green-like‘ *cbbL*-Genfragmenten entwickelten. In der Arbeit von Alfreider *et al.* (2003) wurden zur Detektion von Bakterien mit *cbbL*-Genen im Grundwasser PCR-Primer entwickelt, die spezifisch zur Bildung von 600 bp ‚green-like‘ *cbbL*-Sequenzen führten. Kürzlich wurden erstmals für terrestrische Habitate von Nanba *et al.* (2004) neben ‚green-like‘ *cbbL*-Sequenzen ebenfalls etwa 490 bp lange ‚red-like‘-Sequenzen in vulkanischen Ablagerungen sowie am Vulkankraterrand erfasst.

In der vorliegenden Arbeit sollte die bakterielle *cbbL*-Phylogenie in Böden untersucht werden. Die Mehrheit der veröffentlichten *cbbL*-spezifischen Primer amplifiziert nur ein Drittel der Sequenz des etwa 1450 bp langen *cbbL*-Gens. Um aber eine aussagekräftige Diversitätsanalyse und vor allem eine stabile Phylogenie erhalten zu können, ist es wichtig, einen möglichst großen Teil der Gen-Sequenzinformation zu erhalten. Deshalb lag das Bestreben darin, PCR-Primer zu entwickeln, die einen möglichst großen *cbbL*-Sequenzbereich amplifizieren. Auf Grund der hohen Variabilität bisher bekannter bakterieller *cbbL*-Sequenzen (22% bis 100%) war es nicht möglich ein Primerpaar zu entwickeln, welches *cbbL*-Sequenzen der ‚green-like‘- und ‚red-like‘-Entwicklungslinien gleichzeitig detektiert.

Deshalb wurden zwei separate Primerpaare konstruiert, die spezifisch ausgewählte ‚red-like‘ bzw. ‚green-like‘ *cbbL*-Sequenzen amplifizieren (s. C.1.2).

Das entwickelte ‚red-like‘ *cbbL*-Primerpaar *cbbLR1-R/cbbLR1-F* ist spezifisch für die *cbbL*-Sequenzen von *R. eutropha* H16, *R. eutropha* Megaplasmid pHG1, *R. eutropha* 510 und *Sinorhizobium meliloti* WSM 419 und amplifiziert ein Genfragment von 820 bp Länge. Betrachtet man die Spezifität der ‚red-like‘-Primer einzeln, so fällt auf, dass der Vorwärts-Primer *cbbLR1-F* eine größere Anzahl an *cbbL*-Sequenzen erfasst. Eine *in silico* Sequenzanalyse ergab, dass *cbbLR1-F* insgesamt mit 30 bekannten bakteriellen *cbbL*-Sequenzen hybridisiert (Abb. D.1), die aus kultivierten und unkultivierten Bakterien stammen. Hingegen ist der Rückwärts-Primer *cbbLR1-R* auf die vier oben aufgeführten Sequenzen beschränkt, die alle ausschließlich aus kultivierten Mikroorganismen stammen. Der Grund für die geringe Anzahl an Sequenzen, für die ebenfalls der Rückwärts-Primer spezifisch ist, liegt in der Länge der bisher publizierten *cbbL*-Sequenzen. Dabei sind 22 von dem Vorwärts-Primer erfassten Sequenzen zu kurz, um ebenfalls eine Hybridisierung des Rückwärts-Primers an die Zielsequenz vorherzusagen. In Abbildung D.1 sind die vom Vorwärts-Primer *cbbLR1-F* erfassten *cbbL*-Sequenzen aufgeführt, wobei die vom Rückwärts-Primer *cbbLR1-R* nicht erfassten Sequenzen farbig hervorgehoben sind.

Unter den kurzen Sequenzen sind 18 aus der Studie von Nanba *et al.* (2004) enthalten. Diese Sequenzen weisen eine Länge von etwa 490 bp auf und stammen aus Umweltproben sowie bakteriellen Reinkulturen. Die ‚red-like‘ *cbbL*-Sequenz von *Rhodobacter azotoformans* IFO 16436 weist eine Größe von 980 bp auf (Uchino und Yukota, 2003). Der amplifizierte Sequenzbereich, bezogen auf die *cbbL*-Sequenz von *R. eutropha* H16, liegt dabei zwischen den Positionen 229-1230. Damit ist diese Sequenz zu kurz, um noch von dem Rückwärts-Primer *cbbLR1-R* erfasst zu werden, der an die Sequenzpositionen 1435-1454 bindet. Weitere verfügbare *cbbL*-Sequenzen, die auf Grund ihrer geringen Länge nicht vom Rückwärts-Primer erfasst werden, stammen aus *Rhodopseudomonas palsutris* DCP3 (480 bp) (Oda *et al.*, 2001), *Methylocapsa acidiphila* B2 (740 bp) (Spiridonova *et al.*, 2004) und *Nitrosospira* sp. A4 (800 bp) (Utaker *et al.*, 2002).

Der Grund für die geringe Anzahl an *cbbL*-Sequenzen, für die der Rückwärts-Primer *cbbLR1-R* spezifisch ist, ist nicht nur in der Länge der Sequenzen zu suchen, sondern auch in deren Basenabfolge. So weisen die *cbbL*-Sequenzen von *Xanthobacter flavus* H4-14 (Meijer *et al.*, 1991), *Rhodobacter sphaeroides* 2R (Gibson *et al.*, 1991), *Bradyrhizobium japonicum* USDA6 (Horken und Tabita, 1999) und des Mangan-oxidierenden Bakteriums SI85-9A (Caspi *et al.*, 1996) mit Längen von etwa 1450 bp eine ausreichende Größe auf, jedoch weicht

ihre Sequenz an den Bindungspositionen des Rückwärts-Primers durch 2 bis 5 Basenaustausche ab. Die Einführung weiterer Degenerierungen in die Sequenz von *cbbLR1-R*, der bereits durch eine Mischbase gekennzeichnet ist, würde nicht zu ausschließlich ‚red-like‘ *cbbL*-spezifischen Amplifikaten führen, was ein Vergleich („BLAST“) dieser mehrfach degenerierten Primer-Sequenz mit Sequenzen aus der öffentlichen Datenbank GenBank (NCBI) ergab.

<u>Primer <i>cbbLR1-F</i></u>	5' -AAGGAYGACGAGAACATC ^b -3'
<i>Ralstonia eutropha</i> H16	-----T-----
<i>Ralstonia eutropha</i> megapl.pHG1	-----C-----
<i>Ralstonia eutropha</i> 510	-----T-----
<i>Mesorhizobium</i> sp. NMB1	-----C-----
<i>Stappia aggregate</i>	-----C-----
<i>Stappia</i> sp. CV812-530	-----C-----
<i>Burkholderia</i> sp. JS150	-----C-----
<i>Stappia stellulata</i>	-----C-----
<i>Xanthobacter flavus</i> H4-14	-----T-----
<i>Xanthobacter</i> sp. COX	-----C-----
<i>Sinorhizobium meliloti</i> WSM419	-----C-----
<i>Rhodobacter azotoformans</i> IFO 16436	-----C-----
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> 2R	-----C-----
<i>Burkholderia</i> sp. LUP	-----C-----
Mangan-oxidierendes Bakterium SI85-9A	-----C-----
<i>Aminobacter</i> sp. COX	-----C-----
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA6	-----C-----
<i>Bradyrhizobium</i> sp. CPP	-----C-----
<i>Oligotropha carboxidovorans</i> OM5	-----C-----
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> DCP3	-----C-----
<i>Methylocapsa acidiphila</i> B2	-----C-----
<i>Nitrospira</i> sp. A4	-----C-----
clone CR29	-----C-----
clone CR36	-----C-----
clone F26	-----C-----
clone F23	-----C-----
clone F42	-----C-----
clone F30	-----C-----
clone F38	-----C-----
clone F36	-----C-----

Abb. D.1: Sequenz des Vorwärts-Primers *cbbLR1-F* zur Amplifikation von ‚red-like‘ *cbbL*-Sequenzen und die erfassten Zielorganismen. Farblich hervorgehoben sind *cbbL*-Sequenzen, die vom Rückwärts-Primer *cbbLR1-R* nicht erfasst werden. Blau hervorgehoben sind die für den Rückwärts-Primer zu kurzen *cbbL*-Sequenzen und rot *cbbL*-Sequenzen, deren Basenabfolgen zu sehr abweichen, um ebenfalls von dem Rückwärts-Primer erfasst zu werden.

^a Basensymbol: Y = C oder T.

Das in dieser Arbeit entwickelte ‚green-like‘ *cbbL*-PCR-Primerpaar *cbbLG1-F/cbbLG1-R* ist spezifisch für die *cbbL*-Sequenzen von *N. vulgaris* T3, *N. winogradskyi* ATCC 14123, *N. winogradskyi* IFO 14297, *Nitrospira* sp. TCH716 und *Thiobacillus denitrificans* der ‚green-like‘-Linie und bildet ein PCR-Produkt von 1030 bp Größe. Überdies ist der Vorwärts-Primer *cbbLG1-F* noch für vier weitere bakterielle *cbbL*-Sequenzen spezifisch (s. Abb. D.2), wohingegen der Rückwärts-Primer ausschließlich für die fünf oben

aufgeführten Sequenzen spezifisch ist. Wie bereits für das ‚red-like‘ *cbbL*-Primerpaar diskutiert, sind die Gründe für die unterschiedliche Spezifität der Primer in der Länge der bekannten *cbbL*-Sequenzen, sowie in ihrer Basenabfolge im Sequenzbereich der Primerbindungsstellen zu suchen.

In Abbildung D.2 sind die vom Vorwärts-Primer *cbbLG1-F* erfassten *cbbL*-Sequenzen aufgeführt. Der Vorwärts-Primer hybridisiert an die *cbbL*-Sequenz von *Rhodobacter veldkampii* IFO 16458 (Uchino und Yukota, 2003), die zu kurz ist, um ebenfalls vom Rückwärts-Primer *cbbLG1-R* erfasst zu werden. Diese *cbbL*-Sequenz weist eine Größe von 960 bp auf und liegt, basierend auf der *cbbL*-Sequenz von *N. vulgaris* T3, zwischen den Sequenzpositionen 229 und 1207. Da der Rückwärts-Primer an die Positionen 1413-1433 hybridisiert, ist eine Vorhersage über die Spezifität dieses Primers für die *cbbL*-Sequenz von *Rhodobacter veldkampii* IFO 16458 nicht möglich.

Die *cbbL*-Sequenzen von *Methylococcus capsulatus* Bath (Baxter *et al.*, 2002), *Thiobacillus* sp. 924 (Stein *et al.*, 1990) und *Allochromatium vinosum* D (Kobayashi *et al.*, 1991) sind durch fast komplette Gensequenzen (1420 bp) gekennzeichnet. Trotz ihrer ausreichenden Länge unterscheiden sich ihre *cbbL*-Gene an den Positionen 1413 bis 1433 sehr stark von der Sequenz des Rückwärts-Primers. So ist die *cbbL*-Sequenz von *Allochromatium vinosum* D durch drei Basenaustausche und die der zwei weiteren Sequenzen durch vier Austausche gekennzeichnet. Diese hohe Anzahl an Basenaustauschen ermöglicht es nicht, den Rückwärts-Primer *cbbLG1-R* so zu konstruieren, dass er ebenfalls spezifisch diese *cbbL*-Sequenzen amplifiziert. Auch die Auswahl eines anderen *cbbL*-Sequenzbereiches als Zielsequenz für den Rückwärts-Primer konnte nicht zu einer Erhöhung der erfassten *cbbL*-Sequenzen führen. Deshalb ist eine Amplifikation des 1030 bp Fragments nur aus den 5 oben aufgeführten Bakterien sicher zu erwarten.

<u>Primer <i>cbbLG1-F</i></u>	5' -GGCAACGTGTTCGGSTTCAA ^a -3'
<i>Nitrobacter vulgaris</i> T3	=====G=====
<i>Nitrobacter winogradskyi</i> IFO 14297	=====G=====
<i>Nitrobacter winogradskyi</i> ATCC 14123	=====G=====
<i>Nitrosospora</i> sp. TCH716	=====G=====
<i>Thiobacillus denitrificans</i>	=====C=====
<i>Allochromatium vinosum</i> D	=====C=====
<i>Rhodobacter veldkampii</i> IFO 16458	=====C=====
<i>Thiobacillus</i> sp. 924	=====C=====
<i>Methylococcus capsulatus</i> Bath	=====C=====

Abb. D.2: Sequenz des Vorwärts-Primers *cbbLG1-F* zur Amplifikation von ‚green-like‘ *cbbL*-Sequenzen und die erfassten Zielorganismen. Fett hervorgehoben sind Bakterien, deren *cbbL*-Sequenzen vom Rückwärts-Primer *cbbLG1-R* nicht erfasst werden.

^a Basensymbol: S = C oder G.

D.2. Diversität von ‚green-like‘ *cbbL*-Genen in Böden

Um die Diversität der ‚green-like‘ *cbbL*-Sequenzen in den unterschiedlich gedüngten Bodenvarianten HKO, HSM und HNPK zu erfassen, erfolgte die Amplifikation der ‚green-like‘ *cbbL*-Sequenzen aus der Boden-DNA mit dem Primerpaar *cbbLG1-F/cbbLG1-R*. Dabei führte die Amplifikation mit DNA aus den Bodenvarianten HKO und HNPK zu dem erwarteten Amplifikat mit 1030 bp Größe. Die Amplifikation mit Boden-DNA aus der Variante HSM, welche mit Stallmist gedüngt wurde, erbrachte kein Amplifikationsprodukt (s. C.1.4.2). Zudem erwies sich die Amplifikation der ‚green-like‘ *cbbL*-Sequenzen aus Boden sehr schwierig und die Ausbeute an PCR-Produkt war gering. Im Gegensatz dazu ergaben sich keine Schwierigkeiten bei der Durchführung der ‚green-like‘-PCR mit DNA aus *Nitrobacter vulgaris*. Da der Zusatz von DNA aus *N. vulgaris* im Reaktionsansatz mit HSM-DNA das erwartete Produkt ergab, konnten aus dem Boden HSM stammende Hemmsubstanzen als mögliche Ursache für die Nicht-Amplifizierbarkeit ausgeschlossen werden. Gegen den Einfluss von Inhibitoren in der Bodenprobe HSM sprechen zusätzlich die Resultate der PCR mit dem ‚red-like‘ *cbbL*-spezifischen Primerpaar, da bei der Konstruktion der Klonbanken die Amplifikation der ‚red-like‘ *cbbL*-Gene aus HSM-DNA zu dem erwarteten PCR-Produkt führte. Die Düngung der Bodenprobe HSM mit $12 \text{ t ha}^{-1} \text{ a}^{-1}$ Stallmist seit Versuchsbeginn (1878) resultierte in einem Anstieg des Gehalts an organischen Kohlenstoffverbindungen um 30%, wohingegen der organische Kohlenstoffgehalt (C_{org}) durch mineralische Düngung im Boden HNPK nicht beeinflusst wurde (Merker *et al.*, 1956). Die ungedüngte Bodenvariante HKO ist hingegen durch eine Senkung des organischen Kohlenstoffgehalts um 10% charakterisiert (Merker *et al.*, 1956). Die Zufuhr von organischem Kohlenstoff in der Bodenvariante HSM beeinflusst deutlich die mikrobielle Biomasse, denn die Behandlung des Bodens mit Stallmist bewirkt eine Verdopplung des in der heterotrophen, mikrobiellen Biomasse gebundenen Stickstoffs (Schliephake *et al.*, 1997). Die Zunahme der heterotrophen Bodenmikroflora bewirkt letztlich, dass die nitrifizierenden Bakterien mit ‚green-like‘ *cbbL*-Genen in der gesamten mikrobiellen Gemeinschaft stark unterrepräsentiert und deshalb nicht mehr detektierbar waren.

Die Schwierigkeiten, die sich aus der Amplifikation der ‚green-like‘ *cbbL*-Gene aus Boden ergaben, lassen darauf schließen, dass die untersuchten Böden nur eine geringe Anzahl an *cbbL*-Sequenzen enthalten, die von dem entwickelten ‚green-like‘ *cbbL*-spezifischen Primerpaar erfasst werden. Wie bereits die phylogenetische Sequenzanalyse aufzeigte, weisen die detektierten 24 ‚green-like‘ *cbbL*-Sequenzen eine sehr eingeschränkte Diversität und einen

sehr hohen Verwandtschaftsgrad ausschließlich zu den *cbbL*-Sequenzen der nitrifizierenden Bakterien *N. vulgaris* T3, *N. winogradskyi* ATCC 14123 und *N. winogradskyi* IFO 14297 auf (s. C.1.6.1). Die Sequenzähnlichkeiten der erhaltenen *cbbL*-Bodensequenzen zu den *cbbL*-Sequenzen der Nitrifizierer variieren dabei in einem sehr engen Bereich (90,3% bis 97,7%). Es wurde keine *cbbL*-Sequenz identifiziert, die eine 100%-Sequenzähnlichkeit zu den *cbbL*-Sequenzen der *Nitrobacter*-Stämme aus der GenBank-Datenbank aufzeigt.

Obwohl das Primerpaar *cbbLG1-F/cbbLG1-R* auch für die *cbbL*-Sequenzen von *Nitrosospira* sp. TCH716 (Takahashi *et al.*, 2001) und *Thiobacillus denitrificans* (Hernandez *et al.*, 1996) spezifisch ist, wurden keine *cbbL*-Sequenzen dieser Mikroorganismen identifiziert. Überraschend war vor allem, dass keine *cbbL*-Sequenzen aus Ammonium-oxidierenden Bakterien detektiert wurden, da der mikrobielle Prozess der Nitrifikation nur im Zusammenspiel von Ammoniumoxidierer und Nitritoxidierer erfolgt. Jedoch wurden mit den ‚red-like‘ *cbbL*-spezifischen Primern Sequenzen amplifiziert, die eine nahe Verwandtschaft zu der ‚red-like‘ *cbbL*-Sequenz von *Nitrosospira* sp. AF (Utaker *et al.*, 2002) aufweisen und möglicherweise aus Ammoniumoxidierern stammen. Dabei handelt es sich um die *cbbL*-Bodensequenzen des Clusters IV (s. Abb. C.16), die das RFLP-Muster 2 bilden, welches mit 54 Mustern sehr häufig in der Genbank HKOR vertreten ist. Neben autotrophen Ammoniumoxidierern könnten aber ebenso heterotrophe Mikroorganismen an der Umsetzung von Ammonium zu Nitrit mitwirken. Dabei kommt u. a. *Arthrobacter* sp. eine wesentliche Rolle zu Teil, da sie aus stickstoffhaltigen Substanzen Nitrit bilden können. Die in vorliegender Arbeit durchgeführte Isolierung von Bakterienstämmen aus der Bodenprobe HNPK führte zur Identifizierung von *cbbL*-positiven *Arthrobacter*-Spezies (s. C.1.7). Diese könnten maßgeblich am Prozess der Nitrifikation beteiligt sein und die Position der Ammonium-oxidierenden Bakterien einnehmen. Andererseits könnten NH_4^+ -oxidierende Bakterien in den untersuchten Böden vorhanden, jedoch durch das gewählte Primersystem nicht nachweisbar gewesen sein.

Obwohl das konstruierte ‚green-like‘ *cbbL*-Primerpaar auch spezifisch für die *cbbL*-Sequenz des terrestrischen Bakteriums *Thiobacillus denitrificans* (Hernandez *et al.*, 1996) ist, konnten keine *cbbL*-Sequenzen aus diesem Bakterium identifiziert werden. Damit wird nochmals die geringe Präsenz von ‚green-like‘ *cbbL*-Sequenzen in den untersuchten Agrarböden bestätigt und deren eingeschränkte Diversität unterstrichen. Im Rahmen einer Diplomarbeit, die sich ebenfalls mit der Diversität von *cbbL*-Sequenzen in einem Braunerde-Agrarboden aus Scheyern/Pfaffenhofen (Oberbayern) beschäftigte, wurde eine ähnlich geringe Diversität an ‚green-like‘ *cbbL*-Sequenzen identifiziert (Pattis, 2002).

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die geringe Diversität der ‚green-like‘ *cbbL*-Sequenzen in Böden könnte in den Habitaten der Bakterien mit ‚green-like‘ *cbbL*-Sequenzen zu finden sein. So enthält der auf ‚green-like‘-Sequenzen basierende phylogenetische Baum vorwiegend *cbbL*-Sequenzen aus Bakterien, die in aquatischen Habitaten leben. Zu diesen zählen beispielsweise die Cyanobakterien und *Rhodobacter*-Stämme. Alfreider *et al.* (2003) konnten bei Untersuchungen von Grundwasser bezüglich ihrer Diversität an ‚green-like‘ *cbbL*-Sequenzen feststellen, dass in diesem Habitat tatsächlich eine hohe Diversität an *cbbL*-Sequenzen der ‚green-like‘-Linie vorherrscht. Diese hohe ‚green-like‘ *cbbL*-Diversität unterstützt die Hypothese, dass die Diversität der bakteriellen ‚green-like‘ *cbbL*-Sequenzen vor allem in aquatischen Habitaten groß ist und in Böden eher weniger ausgeprägt ist. Anscheinend dominiert unter den Mikroorganismen der ‚green-like‘-Linie eine Licht-abhängige CO₂-Fixierung, wie sie vor allem von Cyanobakterien und Algen durchgeführt wird. Dies müsste jedoch durch eine Diversitätsanalyse mit einem anderen ‚green-like‘-Primerpaar bestätigt werden.

D.3. Diversität von ‚red-like‘ *cbbL*-Gene in Böden

Um die Diversität der bakteriellen ‚red-like‘ *cbbL*-Sequenzen in den Behandlungsvarianten HKO, HSM und HNPK des *Ewigen Roggenbaus* in Halle zu untersuchen, wurde die jeweilige Boden-DNA mit dem ‚red-like‘ *cbbL*-spezifischen Primerpaar *cbbLR1-F/cbbLR1-R* amplifiziert und das Amplifikat von 820 bp Größe zur Herstellung von *cbbL*-Genbanken herangezogen (s. C.1.4.3). Die erstellten Genbanken wurden zunächst mittels der RFLP-Analyse untersucht (s. C.1.5.3) und durch Berechnung von Diversitätsindices verglichen (s. C.1.5.4). Ausgewählte ‚red-like‘ *cbbL*-Klone wurden einer Sequenzanalyse unterzogen.

Im Vergleich zu den ‚green-like‘ *cbbL*-Sequenzen ergab sich bei der phylogenetischen Analyse der ‚red-like‘ *cbbL*-Sequenzen aus den verschiedenen Boden-DNAs eine hohe Diversität (s. C.1.6.2). Ebenso erwies sich die Erstellung der ‚red-like‘ *cbbL*-Genbanken als sehr effizient. So konnte für die *cbbL*-Genbanken HKOR, HSMR und HNPKR eine repräsentative Anzahl an *cbbL*-Klonen (HKOR 196 Klone, HSMR 192 Klone, HNPKR 236 Klone) mittels RFLP analysiert und als Grundlage zur Berechnung von Diversitätsindices herangezogen werden.

Die RFLP-Analyse eröffnet einen ersten Einblick in die Diversität der erstellten ‚red-like‘ Genbanken und ermöglichte somit eine Vorsortierung der *cbbL*-Sequenzen. Das „Screening“ erstellter Genbanken mittels der RFLP-Analyse ist in bisherigen, publizierten *cbbL*-Diversitätsanalysen nur in der Untersuchung von Alfreider *et al.* (2003) angewandt worden. Sie führten die RFLP-Analyse ihrer ‚green-like‘ *cbbL*-Genbanken aus Grundwasser mit dem Restriktionsenzym *HaeIII* durch. Die Auswahl eines geeigneten Restriktionsenzym für die RFLP-Analyse der ‚red-like‘-Genbanken, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstellt wurden, erfolgte mit dem Programm „NEBcutter“ (<http://tools.neb.com>). Dieses Programm ermöglicht es, eine Gensequenz mit allen kommerziell erhältlichen Restriktionsenzymen imaginär zu schneiden und sich die Größe der gebildeten Fragmente anzeigen zu lassen. Die theoretische und praktische Restriktion einiger ‚red-like‘ *cbbL*-Klone mit dem Enzym *BbvI* erwies sich als besonders geeignet für die RFLP-Analyse, da verschieden große Subfragmente gebildet wurden. Im Vergleich dazu konnten für das von Alfreider *et al.* (2003) eingesetzte Enzym *HaeIII* keine Schnittstellen in den untersuchten *cbbL*-Sequenzen identifiziert werden. Die Anzahl unterschiedlicher RFLP-Muster innerhalb der drei ‚red-like‘ *cbbL*-Genbanken variierte sehr stark und lässt auf eine hohe Diversität in den untersuchten Böden schließen. Dafür spricht auch das Vorkommen zahlreicher RFLP-Muster, die nur durch einen *cbbL*-Klon repräsentiert wurden. Das Vorkommen verschiedener RFLP-Muster in der Genbank HKOR war geringer als in HNPKR und HSMR. Die limitierte Anzahl an Restriktionsmustern in HKOR lässt auf eine vergleichsweise geringere Diversität in der Bodenprobe HKO schließen. Diese Annahme wird durch die berechneten Diversitätsindices bestätigt (s. Tabelle C.4). Die Diversitätsindices werden zum Vergleich von Genbanken herangezogen, wobei sog. „operational taxonomic units (OTU)“ definiert werden müssen. In der vorliegenden Arbeit werden die OTUs durch die verschiedenen RFLP-Muster beschrieben. Voraussetzung dafür ist, dass jedes RFLP-Muster eine einzigartige *cbbL*-Sequenz repräsentiert. Um dies zu gewährleisten, wurden die ‚red-like‘ *cbbL*-Sequenzen mit dem von ihnen gebildeten Restriktionsmuster verglichen (Tabelle D.1). Dafür wurden ausgewählte *cbbL*-Klone einer Sequenzanalyse unterzogen, womit nicht jedes RFLP-Muster durch eine ermittelte *cbbL*-Sequenz repräsentiert wurde. Der Grund liegt in der enormen Diversität der erhaltenen ‚red-like‘ *cbbL*-Sequenzen. Wie die „Rarefaction“-Analyse vermuten lässt, scheint die Sequenzierung weiterer *cbbL*-Klone nicht zu wesentlichen Veränderungen des Informationsgehalts von ‚red-like‘ *cbbL*-Sequenzen im Boden beizutragen (s. Abb. C.12). Deshalb wurden nicht alle RFLP-Muster, repräsentiert durch einen *cbbL*-Klon, einer

Tabelle D.1: Sequenzierte RFLP-Muster und die erhaltenen *cbbL*-Sequenzen sowie die Häufigkeit der RFLP-Muster in den ‚red-like‘ *cbbL*-Genbanken HKOR, HSMR und HNPKR

RFLP-Muster	<i>cbbL</i> -Sequenzen	Häufigkeit in HKOR	Häufigkeit in HSMR	Häufigkeit in HNPKR
1	HKOR2 HKOR20 HSMR1 HSMR14	7	11	8
2	HKOR3D HKOR32D HKOR89 HNPKR100	54	4	5
3	HKOR78	3	11	-
4	HSMR4 HNPKR97	-	2	5
5	HNPKR88	-	-	1
6	HNPKR1	-	-	6
7	HNPKR90	3	2	5
8	HSMR2	-	1	1
9	HKOR13	1	2	3
10	HKOR7	3	2	4
11	HSMR12	3	6	-
12	HKOR11 HSMR15	3	6	-
13	HNPKR98		1	2
14	HSMR75	-	7	5
15	HSMR20	2	23	5
16	HSMR8	-	2	1
17	HNPKR87	1	1	1
18	HSMR29	-	8	1
20	HNPKR20	-	1	4
21	HSMR46	-	1	2
23	HKOR6	1	1	1
26	HNPKR17	2	1	2
30	HKOR15	1	1	-
34	HNPKR16	1	1	1
36	HSMR139	-	3	-
38	HSMR143	-	2	-
44	HKOR8	1	-	-
45	HKOR21	1	-	-
46	HKOR22	1	-	-
48	HKOR36D HKOR30	58	-	2
51	HNPKR1 HNPKR7	1	-	13
52	HKOR5 HKOR41b HKOR49b	8	-	-
54	HNPKR5	-	-	1
55	HNPKR95	-	-	24

Sequenzanalyse unterzogen. Stattdessen wurden ausgewählte Muster mehrfach sequenziert, um die Effizienz der RFLP-Analyse zu überprüfen. So ist beispielsweise das RFLP-Muster 52, welches nur in der Genbank HKOR identifiziert wurde, durch die drei *cbbL*-Klone HKOR41b, HKOR49b und HKOR5 vertreten. Diese Sequenzen gruppieren sich in das ‚red-like‘ *cbbL*-Cluster RI und weisen 100%-Sequenzähnlichkeit zueinander auf. Damit ist auch die Eignung von *BbvI* als Restriktionsenzym für die RFLP-Analyse von *cbbL*-Sequenzen bestätigt worden.

Die Berechnung der Diversitätsindices führt zu dem Resultat, dass die Genbank HKO das Gesamtbild der terrestrischen *cbbL*-Diversität relativ gut wiedergibt, wohingegen die erfasste Diversität der Genbanken HSMR und HNPKR die tatsächliche *cbbL*-Diversität weniger gut repräsentiert (s. C.1.5.4). Aus diesem Grund ist es durchaus möglich, dass z. B. die *cbbL*-Sequenz mit dem RFLP-Muster 52 nicht nur im Boden HKO vorkommt. Da die Diversitäts-Berechnungen darauf schließen lassen, dass die tatsächliche Diversität durch die Genbank HKOR gut repräsentiert wird, kann mittels der Häufigkeit bestimmter RFLP-Muster in der Genbank auf die vorherrschenden *cbbL*-Sequenzen in der Bodenprobe HKO geschlossen werden. Neben dem Muster 52, das 8-mal in HKOR vorkommt, sind zwei weitere RFLP-Muster in der Genbank HKOR sehr häufig vertreten. Dabei handelt es sich um das Muster 2, welches von 54 ‚red-like‘ *cbbL*-Klonen gebildet wird, so wie um das Muster 48, das in HKOR 58-mal vertreten ist. Diese Sequenzen gruppieren sich in die phylogenetischen ‚red-like‘-Cluster RII und RIII.

Das RFLP-Muster 15 wird in der Genbank HSMR von 23 *cbbL*-Klonen gebildet, wohingegen es nur 2-mal in HKOR und 5-mal in HNPKR vorkommt. Es ist anzunehmen, dass die Mikroorganismen, deren *cbbL*-Sequenzen den Restriktionstyp 15 bilden, im HKO-Boden präsent sind, aber nicht zu der dominierenden *cbbL*-tragenden Population zählen. Im Gegensatz dazu tragen die Bakterien mit diesem *cbbL*-Typ vermutlich im HSM-Boden zum autotrophen Potential maßgeblich bei. Da die *cbbL*-Genbank aus HSM die tatsächliche *cbbL*-Diversität in der Bodenprobe HSM weniger gut wiedergibt (s. Abb. C.12), kann keine verlässliche Aussage darüber getroffen werden, ob es sich dabei tatsächlich um die dominierende CO₂-fixierende Population in HSM handelt. Ähnliches gilt für die *cbbL*-Sequenzen des RFLP-Typs 55, welches das häufigste Restriktionsmuster der Genbank HNPKR ist.

Die *cbbL*-Sequenzen der untersuchten Böden HKO, HSM und HNPK verteilen sich über den gesamten phylogenetischen Baum der ‚red-like‘ *cbbL*-Sequenzen. Während

basierend auf der RFLP-Analyse von 405 *cbbL*-Klonen Bodenbehandlungs-spezifische RFLP-Muster gefunden wurden, ist bei der phylogenetischen Sequenzanalyse ausgewählter *cbbL*-Klone keine Behandlungs-spezifische Cluster-Bildung zu erkennen. Die *cbbL*-Sequenzen gruppieren sich unabhängig vom Boden-Management zu verschiedenen Clustern des ‚red-like‘ *cbbL*-Baums. Auffallend dabei ist, dass die identifizierten Bodensequenzen häufig, neue und zu bekannten *cbbL*-Sequenzen nur entfernt verwandte Cluster bilden. Die *cbbL*-Sequenz HNPKR7 zeigt als einzige eine 100%-Sequenzähnlichkeit zu einer *cbbL*-Sequenz eines kultivierten Bakterienstamms. Dabei handelt es sich um die *cbbL*-Sequenz aus *Rhizobium leguminosarum* *bv. trifolii*, die im Rahmen dieser Arbeit bestimmt wurde. Die Gattung *Rhizobium* ist durch aerob Wasserstoff (H₂)-oxidierende Bakterien vertreten, die fähig sind, CO₂ über den CBB-Zyklus zu fixieren, aber ebenso organische Substrate verwerten können, und daher als fakultativ chemolithoautotrophe Organismen zu bezeichnen sind. H₂-oxidierende Bakterien sind im Boden relativ weit verbreitet, da Böden als Quelle für H₂ gelten. Zum einen entsteht H₂ während des Abbaus von organischer Substanz an anaeroben Mikrohabitaten im Boden und zum anderen in Böden, die von Leguminosen bewachsen sind. Wasserstoff wird bei der Nitrogenase-Reaktion gebildet und er gelangt aus den Bacteroiden der Wurzelknöllchen in die Umgebung, falls er nicht bereits durch H₂-Aufnahmeaktivität der H₂-Produzenten wieder verwertet wird.

Neben *Rhizobium leguminosarum* *bv. trifolii* sind im ‚red-like‘ *cbbL*-Baum weitere *cbbL*-Sequenzen H₂-oxidierender Bakterien vorhanden, die ebenfalls in Böden weitverbreitet sind. Aus dieser physiologischen Bakteriengruppe sind *cbbL*-Sequenzen der Gattungen *Alcaligenes*, *Ralstonia* sowie *Xanthobacter* bekannt.

Im Gegensatz zum ‚green-like‘ *cbbL*-Baum beinhaltet der phylogenetische ‚red-like‘ *cbbL*-Baum zahlreiche *cbbL*-Sequenzen, die aus Bodenbakterien stammen. So sind neben den oben aufgeführten H₂-oxidierenden Bakterien, auch zahlreiche *cbbL*-Sequenzen Wurzel-assoziiierter, an Leguminosen Knöllchen bildender Bakterien vertreten. Vertreter dieser Bakterien sind beispielsweise *Rhizobium radiobacter* und *Sinorhizobium meliloti* WSM419, die sich in das Cluster RA gruppieren. Da der in der vorliegenden Arbeit untersuchte Boden nicht von Leguminosen, sondern von Roggen bewachsen ist, wurden eigentlich keine *cbbL*-Sequenzen erwartet, die dieser Gruppe von Organismen zuzuordnen wären. Jedoch sind Rhizobien Bodenbakterien die ubiquitär vorkommen können, wobei sie zum Teil auch mit Wurzeln von Nicht-Leguminosen assoziiert sein können.

Die enorme Diversität an Bakterien mit ‚red-like‘ *cbbL*-Sequenzen in den untersuchten Böden lässt sich somit mit der metabolischen Vielfalt und der Besiedlung verschiedener

Umwelthabitate erklären. Die Einschätzung der Physiologie und ökologischen Rolle von RubisCO in diversen Bodenbakterien wird jedoch dadurch erschwert, dass die meisten detektierten *cbbL*-Sequenzen nicht einer bekannten RubisCO-Sequenz zuzuordnen sind. Da eine entsprechende Analyse der ‚red-like‘ *cbbL*-Diversität in einem Ackerboden mit Weizenkleebewuchs (Braunerde auf Löß in Scheyern/Pfaffenhofen, Oberbayern) ein ganz ähnliches Diversitätsbild ergab (Pattis, 2002), kann abgeleitet werden, dass Bakterien mit ‚red-like‘ *cbbL*-Sequenzen im Habitat Boden eine hohe Diversität haben. Miltner *et al.* (2004) untersuchten mit radioaktiv markierten $^{14}\text{CO}_2$ die nicht-photosynthetische CO_2 -Fixierung in der Bodenvariante HSM. Dabei konnten Miltner *et al.* (2004) zeigen, dass die CO_2 -Fixierung ein relevanter Prozess im Boden ist und 3-5% der Netto-Atmung ausmacht. Dabei ist aber zu beachten, dass neben dem CBB-Zyklus weitere alternative Mechanismen der CO_2 -Fixierung in Bakterien existieren und deren Beitrag zur Gesamt- CO_2 -Fixierung im Boden nicht aufgeklärt ist. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen aber vermuten, dass RubisCO eine zurzeit weit unterschätzte Funktion in terrestrischen Habitaten hat. Dies kann jedoch erst die Aktivitäts-Analyse von RubisCO (*cbbL*-mRNA) im Boden bestätigen.

D.4. 16S rDNA-Phylogenie versus *cbbL*-Phylogenie

Die phylogenetische Stammbaumberechnung der bakteriellen *cbbL*-Gene führt zur Bildung einer ‚red-like‘ und ‚green-like‘ *cbbL*-Gruppe (Watson und Tabita, 1997). Die *cbbL*-Sequenzen der beiden Gruppen enthalten Sequenzen verschiedenster bakterieller Taxa. So ist zu erkennen, dass im Baum enthaltene *cbbL*-Sequenzen der α -, β - und γ - *Proteobacteria* sowohl in der ‚red-like‘ als auch in der ‚green-like‘-Gruppe vertreten sind. Die α -, β - und γ - *Proteobacteria* bilden auf der Basis ihrer 16S rDNA eine monophyletische Gruppe, wohingegen ihre *cbbL*-Sequenzen auf die ‚red-like‘- und ‚green-like‘- Gruppe verteilt sind. Die *cbbL*-Sequenz des α -*Proteobacterium* *N. vulgaris* T3 wird phylogenetisch der ‚green-like‘-Gruppe zugeordnet. Demgegenüber werden die α -proteobakteriellen *cbbL*-Sequenzen aus *Xanthobacter flavus* H4-14 oder *Bradyrhizobium japonicum* USDA6 phylogenetisch der ‚red-like‘-Gruppe zugeteilt. Ein weiteres Beispiel für die Unstimmigkeit zwischen der *cbbL*- und der 16S rDNA-Phylogenie ist unter *cbbL*-Sequenzen der β -*Proteobacteria* zu finden, da die *cbbL*-Sequenz von *Ralstonia eutropha* H16 phylogenetisch der ‚red-like‘-Gruppe angehört, wohingegen die *cbbL*-Sequenz des β -*Proteobacterium* *Thiobacillus denitrificans* der ‚green-like‘-Linie zugeordnet ist. Aber diese Unstimmigkeit der *cbbL*-Phylogenie ist nicht

nur zwischen den beiden *cbbL*-Gruppen zu finden, sondern auch innerhalb der einzelnen Gruppen. Innerhalb der ‚red-like‘-Linie sind die *cbbL*-Sequenzen der α - und der β -*Proteobacteria* über die gesamte Gruppe verteilt. Es kommt zu keiner Taxon-spezifischen Gruppen-Bildung. So wird beispielsweise das ‚red-like‘-Cluster RA sowohl durch *cbbL*-Sequenzen der α - als auch β -*Proteobacteria* gebildet. Innerhalb des ‚green-like‘ Baums sind *cbbL*-Sequenzen von Cyanobakterien und γ -*Proteobacteria* durchmischt.

Der Konflikt der *cbbL*- und der 16S rDNA- Phylogenie ist nicht auf methodische Fehler zurückzuführen, da die phylogenetischen *cbbL*-Bäume mittels unterschiedlicher Berechnungsmethoden und Sequenzfiltern mit hoher Stabilität erhalten wurden.

Nach Delwiche und Palmer (1996) sind die Ursachen für die Unstimmigkeit zwischen der Phylogenie von Organismen und bestimmter funktioneller Gene auf Ereignisse des horizontalen Gentransfers und der Genduplikation mit differentiellem Genverlust zurückzuführen. Delwiche und Palmer postulieren, dass für die Aufspaltung der proteobakteriellen *cbbL*-Sequenzen in eine ‚red-like‘ und eine ‚green-like‘ Gruppe drei unabhängige Gentransfers nötig sind. Dabei soll der Transfer eines cyanobakteriellen ‚green-like‘ *cbbL*-Gens auf einen Vorläufer der γ -*Proteobacteria* erfolgt sein, von dem aus ein Transfer auf bakterielle Vorläufer der α - und β -*Proteobacteria* geschehen sein soll. Die zweite Hypothese, die den ‚green-like‘/‚red-like‘-Split zu versuchen erklärt, ist die Genduplikation gekoppelt mit dem Genverlust. Dabei nimmt man an, dass eine Duplikation des *cbb*-Operons vor der evolutionären Trennung der Cyanobakterien und *Proteobacteria* aufgetreten ist und im Laufe der Evolution die eine oder andere Kopie des Gens verloren gegangen ist. Unter dieser Annahme würde die Verteilung der verschiedenen Bakteriengruppen innerhalb der beiden *cbbL*-Linien reflektieren, welche Genkopie beibehalten wurde. Diese Hypothese wird durch die Entdeckung von Uchino und Yukota (2003) bekräftigt, die an dem α -*Proteobacterium Rhodobacter azotoformans* IFO 16436 zeigten, dass ein Organismus zwei verschiedene *cbbL*-Gene für die Form I-RubisCO enthalten kann. Dabei ist das eine Gen phylogenetisch der ‚red-like‘-Linie und das zweite der ‚green-like‘-Linie zugeordnet. Überdies spricht für die Hypothese der Genduplikation mit differentiellem Genverlust der Befund, dass aus der Gattung *Rhodobacter cbbL*-Sequenzen bekannt sind, die phylogenetisch sowohl der ‚red-like‘- als auch ‚green-like‘-Gruppe zugeteilt sind. So besitzen *R. sphaeroides* 2R und *R. azotoformans* IFO 16436 (*cbbL1*) ein ‚red-like‘ *cbbL*-Gen und *R. capsulatus*, *R. azotoformans* IFO 16436 (*cbbL2*), *R. veldkampii* IFO 16458 und *R. blasticus* IFO 16437 ein ‚green-like‘ *cbbL*-Gen.

Die Diskrepanz zwischen der *cbbL*- und 16S rDNA-Phylogenie wird innerhalb des *cbbL*-Clusters RA besonders deutlich, in dem *cbbL*-Sequenzen von *Rhizobium radiobacter*, *Alcaligenes* sp. 30128 und *Ochrobactrum anthropi* vorkommen (s. Abb. D.3). Basierend auf ihrer *cbbL*-Nukleinsäuresequenzen weisen sie Ähnlichkeiten von >99,4% auf, wohingegen sie mittels der 16S rDNA-Phylogenie zu den α - und β -*Proteobacteria* zugeordnet sind. Noch deutlicher ist die phylogenetische Diskrepanz zwischen *Mesorhizobium* sp. NMB1, *Stappia aggregata* und *Burkholderia* sp. JS150 (Nanba *et al.*, 2004) zu erkennen. Die *cbbL*-Sequenzen dieser Bakterien zeichnen sich sogar durch eine 100%-Sequenzähnlichkeit aus, obwohl *Mesorhizobium* sp. NMB1 und *Stappia aggregata* zu den α -*Proteobacteria* und *Burkholderia* sp. JS150 zu den β -*Proteobacteria* gehören. Auf Grund dieser Tatsache ist es nicht möglich, *cbbL*-Sequenzen, die in vorliegender Arbeit in den untersuchten Böden identifiziert wurden und die 100%-Sequenzähnlichkeiten zueinander aufzeigen, als Sequenzen desselben Bakteriums zu charakterisieren. Diese Befunde erlauben es somit auch nicht, die *cbbL*-Bodensequenz HNPKR7, die 100%-Nukleinsäureähnlichkeit zu der *cbbL*-Sequenz von *Rhizobium leguminosarum* *bv.* *trifolii* aufweist, als *cbbL*-Sequenzen dieses Bakteriums zu beschreiben.

Die *cbbL*-Sequenzen der Bodenisolate gruppieren sich zu diversen Clustern innerhalb des ‚red-like‘ *cbbL*-Baums, die teilweise keine enge Verwandtschaft zu *cbbL*-Genen aus kultivierten Referenzorganismen aufweisen. Die korrespondierenden 16S rDNA-Sequenzen hingegen ordnen diese Isolate zu den Gattungen *Bacillus*, *Streptomyces* und *Arthrobacter* zu. Dieses Ergebnis unterstreicht nochmals die Unstimmigkeit der vorliegenden Gen- und Organismen-Phylogenie und legt einen sehr häufigen Gentransfer über phylogenetische Grenzen von Entwicklungslinien hinweg nahe.

In Bakterien findet man weitere Proteine, wie z. B. GAPDH (Martin *et al.*, 1993), HSP60 (Viale *et al.*, 1994) und ATPase (Hilaro and Gogarten, 1993), deren Phylogenie durch ähnliche Ereignisse bestimmt ist. Trotz der chaotischen bakteriellen *cbbL*-Phylogenie ist das *cbbL*-Gen, das am häufigsten sequenzierte Gen. Dies ist aber darin begründet, dass es vor allem zur phylogenetischen Zuordnung von Algen und Pflanzen herangezogen wird und dass in diesen Fällen die Gen- mit der Organismen-Phylogenie übereinstimmt.

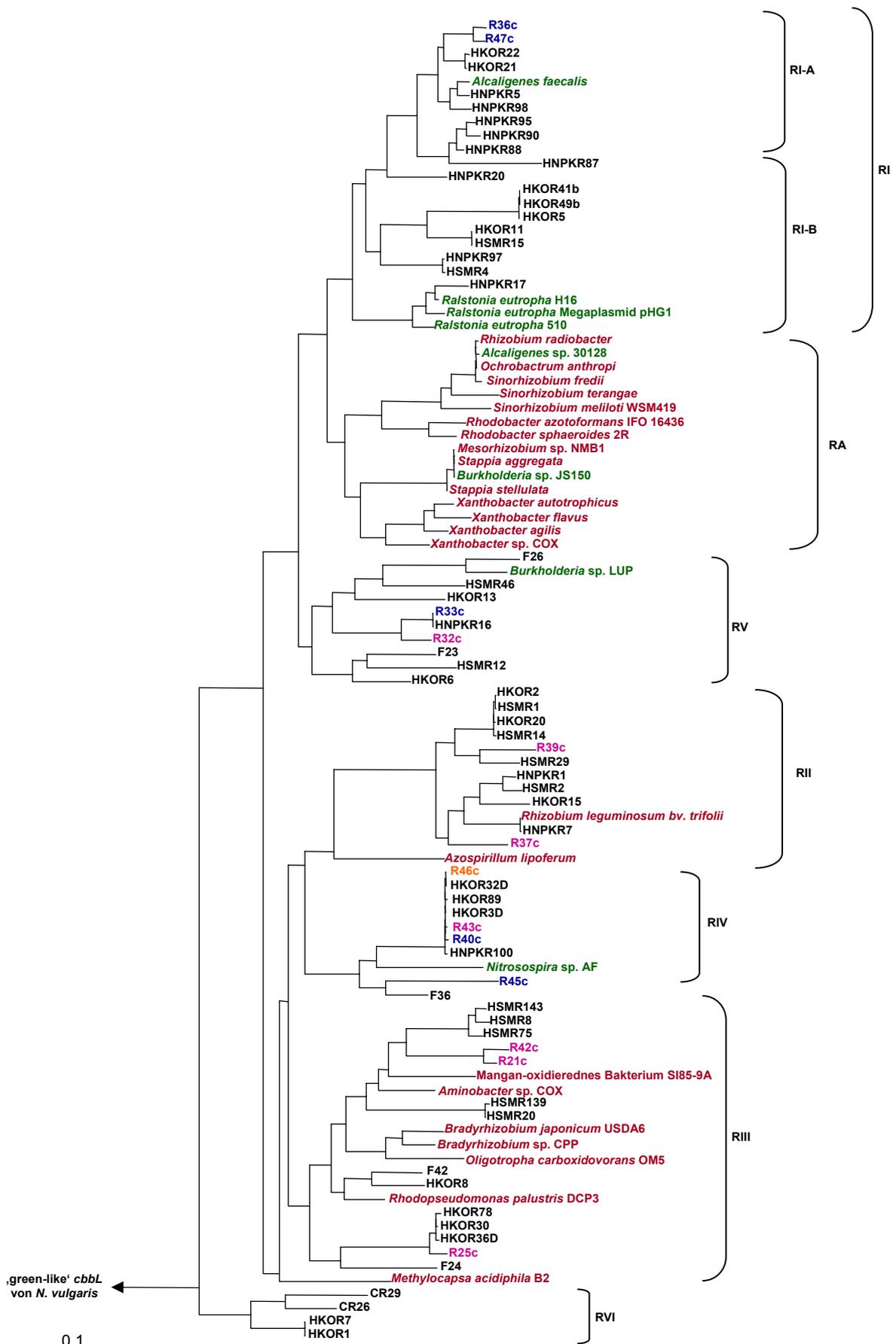


Abb. D.3: Phylogenetischer Baum aus Abb. C.16, der die Verwandtschaftsverhältnisse der ‚red-like‘ *cbbL*-Sequenzen aufzeigt. Die auf 16S rDNA-basierende phylogenetische Zuordnung der im Baum enthaltenen kultivierten Mikroorganismen ist farblich zugeteilt. Dabei gilt: **grün:** β -Proteobacteria, **rot:** α -Proteobacteria, **pink:** *Bacillus*, **blau:** *Arthrobacter*, **orange:** *Streptomyces*.

D.5. Neue *cbbL*-Sequenzen aus bakteriellen Reinkulturen

Neben der Detektion von *cbbL*-Genen aus Böden wurden mit dem entwickelten ‚red-like‘ *cbbL*-spezifischem Primerpaar zusätzlich *cbbL*-Sequenzen aus bakteriellen Reinkulturen amplifiziert und sequenziert. Damit sollte der Datensatz bekannter ‚red-like‘ *cbbL*-Sequenzen erweitert und der auf diesen Sequenzen basierende phylogenetische Baum durch *cbbL*-Sequenzen kultivierter Bakterien ergänzt werden. Dafür wurden diverse Bakterienstämme aus öffentlichen Stammsammlungen herangezogen (s. Tabelle C.1), sowie Isolierungen aus der Bodenprobe HNPK vorgenommen (s. C.1.6.3.2). Insgesamt konnten somit 23 neue ‚red-like‘ *cbbL*-Sequenzen aus kultivierten Bakterien identifiziert werden.

Einige der identifizierten *cbbL*-positiven Referenzstämme sind als H₂-oxidierende Bakterien charakterisiert. *Xanthobacter flavus* und *Xanthobacter autotrophicus* weisen sich durch einen besonderen Metabolismus aus, denn sie sind fähig N₂ zu fixieren, während sie chemolithoautotroph wachsen (Malik und Schlegel, 1981). Diese besondere Fähigkeit zeichnet auch das Wurzel-assoziierte Bakterium *Azospirillum lipoferum* aus, das ebenfalls als *cbbL*-positiv identifiziert wurde. Demgegenüber konnte aus den nahe verwandten Bakterienarten *Azospirillum brasiliense* Sp7 und *Azospirillum doebereinae* (Stoffels *et al.*, 2001) kein ‚red-like‘ *cbbL*-Gen amplifiziert werden.

Alcaligenes faecalis und *Alcaligenes* sp. 30128 zählen ebenfalls zu den H₂-oxidierenden Bakterien, die durch einen fakultativ chemolithotrophen Metabolismus beschrieben sind. Dieser Stoffwechselweg ist auch bei dem wurzelsymbiontischen, diazotrophen *Rhizobium leguminosarum* *bv. trifolii* vorhanden. Ebenso wie *Sinorhizobium meliloti* sind *Sinorhizobium teranga* und *Sinorhizobium fredii* fähig, CO₂ über den CBB-Zyklus zu fixieren. Die aus diesen Organismen amplifizierten ‚red-like‘ *cbbL*-Gene gruppieren sich in der phylogenetischen Analyse zu der *cbbL*-Sequenz von *Sinorhizobium meliloti* (s. Abb. D.3).

Insgesamt konnten aus den 64 untersuchten Bodenisolaten 10 Isolate mit *cbbL*-Genen identifiziert werden. Bei den Bakterienisolaten handelt es sich ausschließlich um Gram-positive Bakterien der Gattungen *Bacillus*, *Streptomyces* und *Arthrobacter* (s. Abb. D.3). Dieses Resultat war sehr überraschend, da Vertreter dieser Gattungen bisher nicht als CO₂-Fixierer beschrieben wurden. Zudem enthält der ‚red-like‘ *cbbL*-Baum keine Sequenzen aus Gram-positiven Bakterien. Der Nachweis von *cbbL*-Genen aus diesen Mikroorganismen ist allerdings nicht als Beweis für eine tatsächlich durchgeführte CO₂-Fixierung über den CBB-Zyklus anzusehen. Erst der Nachweis über die Aktivität dieser *cbbL*-Gene könnte die

Bakterien als autotroph charakterisieren. Ein möglicher aktiver Metabolismus der CO₂-Fixierung mittels des Enzyms RubisCO in den Bakterienisolaten wird durch das Vorhandensein der katalytisch aktiven Aminosäuren unterstützt. In Abbildung D.4 sind die katalytisch aktiven Aminosäuren der CbbL-Proteine aus den Bakterienisolaten und *R. eutropha* H16 aufgeführt. Die für die Katalyse relevanten Aminosäuren der ‚red-like‘-Linie sind hoch konserviert. Unterschiede in der Abfolge der Aminosäuren treten vereinzelt auf. So ist z. B. an der Position 301 der Sequenz von R33c die Aminosäure Isoleucin durch ein Valin oder an der Position 309 der Sequenzen R40c, R43c, R45c und R46c ein Histidin durch ein Asparagin ersetzt. In wie weit nun die Aminosäurenaustausche die katalytische Aktivität von RubisCO beeinflussen, ist nicht vorauszusagen.

<i>R. eutropha</i> H16	KDDE.....DMILHLHRAGH.....GKLE
R36c	KDDE.....DMILHLHRAGH.....GKLE
R47c	KDDE.....DMILHLHRAGH.....GKLE
R33c	KDDE.....DM V LHLHRAGH.....GKLE
R32c	KDDE.....DM V LHLHRAGH.....GKLE
R42c	KDDE.....DMILHLHRAGH.....GKLE
R21c	KDDE.....DMILHLHRAGH.....GKLE
R25c	KDDE..... N MILHLHRAGH.....GKLE
R46c	KDDE.....DMILHLHRAG NGKLE
R43c	KDDE.....DMILHLHRAG NGKLE
R40c	KDDE..... E MILHLHRAG NGKLE
R45c	KDDE.....DMILHLHRAG NGKLE
R39c	KDDE.....DMILHLHRAGH.....GKLE
R37c	KDDE.....DMILHLHRAGH.....GKLE
<i>B. subtilis</i>	KDEE..... PVPIMAH PA VSG SVA
	212 215 299 309 344 347

Abb. D.4: Aminosäuresequenzen der katalytisch aktiven Aminosäuren der großen RubisCO-Untereinheit (CbbL).

Dargestellt sind die relevanten CbbL-Aminosäuren aus den Bakterienisolaten dieser Arbeit, *Ralstonia eutropha* H16 (blau) und *Bacillus subtilis* FormIV-RubisCO. Die Nummerierungen entsprechen den Positionen in der Aminosäuresequenz von *Ralstonia eutropha* H16. Die zur Sequenz von *Ralstonia eutropha* H16 abweichende Aminosäuren sind rot hervorgehoben. Abkürzungen der Aminosäuren (Ein-Buchstaben-Code) entsprechen der IUPAC-Nomenklatur.

Kunst *et al.* (1997) identifizierten in dem ebenfalls Gram-positiven Bakterium *Bacillus subtilis* ein RubisCO-ähnliches Enzym, das als FormIV-RubisCO klassifiziert wurde. Im Vergleich zu den gewonnenen Gram-positiven Bakterienisolaten fehlen der FormIV-RubisCO aus *B. subtilis* einige der katalytisch aktiven Aminosäuren (Abb. D.4). Obwohl die Funktion dieser RubisCO-ähnlichen Proteine nicht ganz geklärt ist, konnten Ashida *et al.* (2003)

demonstrierten, dass sie am Methionin-Abbau beteiligt sind, wobei sie aber auf Grund des Fehlens einiger relevanter Aminosäuren im katalytischen Zentrum annehmen, dass sie keine Carboxylierungs-Reaktion katalysieren. Das Genom des *Archaeons Archaeoglobus fulgidus* (Klenk *et al.*, 1997) ist ebenfalls mit einem Gen für die FormIV-RubisCO ausgestattet. Da *Archaea* als die ursprünglichsten Mikroorganismen angesehen werden und sie bereits vor der Entstehung des CBB-Zyklus in photosynthetischen Bakterien existierten, wird angenommen, dass diese RubisCO-ähnlichen Proteine die Ur-Form der photosynthetischen RubisCO sind.

Phylogenetische Sequenzanalysen der vier RubisCO-Formen lassen eine deutliche verwandtschaftliche Abgrenzung der RubisCO-Formen I bis IV erkennen (Abb. D.5). Damit ist auszuschließen, was bereits durch das Alignment der katalytisch aktiven Aminosäuren angedeutet wurde, dass die in dieser Arbeit identifizierten *cbbL*-Sequenzen, phylogenetisch ebenfalls der Form IV-RubisCO zuzuordnen sind.

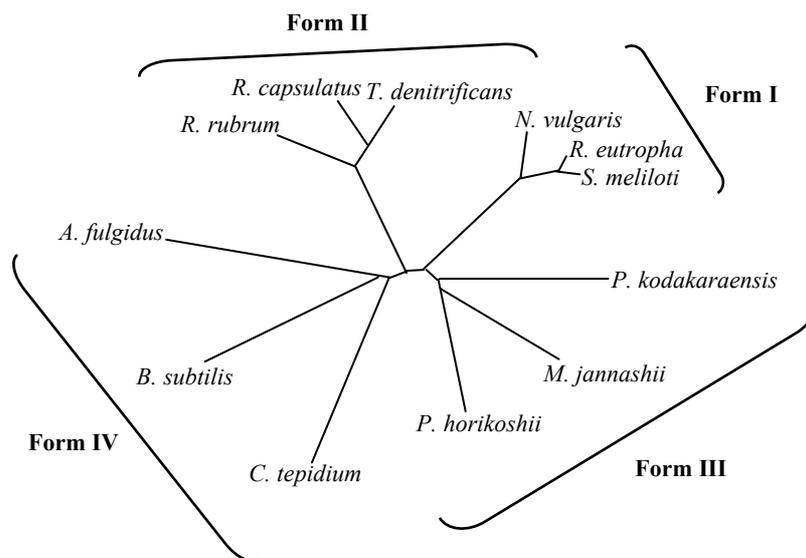


Abb. D.5: Phylogenetischer Baum der Aminosäuresequenzen der großen RubisCO-Untereinheit (Form I und II) und der RubisCO-ähnlichen Proteine (Form III und IV) (aus Ashida *et al.*, 2003, modifiziert).

D.6. Quantifizierung von *cbbL*-Genen in Böden

Die Quantifizierung von ‚red-like‘ und ‚green-like‘ *cbbL*-Genkopien in Böden erfolgte mit der „real-time“ TaqMan-PCR. Die TaqMan-PCR ist eine neue viel versprechende Methode, die ursprünglich für medizinische Anwendungen entwickelt wurde und in den

letzten Jahren vermehrt in der molekularen mikrobiellen Ökologie eingesetzt wurde (Wawrik *et al.*, 2002, Bach *et al.*, 2002, Kolb *et al.*, 2003, Okano *et al.*, 2004).

Die TaqMan-PCR-Technologie zeichnet sich durch den Einsatz einer doppelt-markierten Sonde aus, die für die hohe Sensitivität und Spezifität dieser Methode verantwortlich ist. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein PCR-System zur Quantifizierung der ‚red-like‘ *cbbL*-Gene aus Boden entwickelt. Als Grundlage zur Konstruktion der Primer und der Sonde dienten die in dieser Arbeit detektierten ‚red-like‘ *cbbL*-Sequenzen. Da die *cbbL*-Quantifizierung aus Boden-DNA erfolgen sollte, lag das Bestreben darin, Oligonukleotide für die TaqMan-PCR zu entwickeln, die spezifisch die Mehrheit der in den Bodenvarianten HKO, HSM und HNPK identifizierten *cbbL*-Sequenzen erfassen. Da der Sequenzbereich des *cbbL*-spezifischen Vorwärts-Primers *cbbLR1-F* durch einen hohen Konservierungsgrad gekennzeichnet ist, bot sich dieser als Ausgangspunkt für die Konstruktion der beiden weiteren Oligonukleotide an. Auf Grund großer Sequenzunterschiede war es nicht möglich, Oligonukleotide für alle in dieser Arbeit detektierten ‚red-like‘ *cbbL*-Bodensequenzen zu entwickeln. Dennoch sind die entwickelten ‚red-like‘-TaqMan-Oligonukleotide für 36 *cbbL*-Sequenzen der ‚red-like‘-Linie spezifisch. Unter den erfassten *cbbL*-Sequenzen sind sowohl neu erhaltene Umweltsequenzen, als auch Sequenzen kultivierter Bakterien zu finden (Abb. C.18).

Bei der Quantifizierung der ‚red-like‘ *cbbL*-Gene konnten aus den drei Bodenproben HKO, HSM und HNPK sowie aus den Partikelgrößenfraktionierungen der Bodenprobe HKO ‚red-like‘ *cbbL*-Gene quantifiziert werden. Mit der Annahme, dass die DNA-Extraktion mit einer 100%-Effizienz erfolgte, ergaben sich Werte, die in den Größenordnungen von 10^6 bis 10^7 *cbbL*-Genkopien/g Boden liegen. Bei der Quantifizierung von Genen in der „real-time“ TaqMan-PCR sind jedoch auch Limitierungen und Artefakte in Betracht zu ziehen. Ein kritischer Punkt ist die DNA-Extraktion; sie sollte so optimiert sein, dass sie zur Lyse aller im Boden enthaltenen Bakterien führt, was besonders bei Gram-positiven Bakterien problematisch sein kann. Wie die Ergebnisse der Isolierung von Bodenbakterien zeigten, scheint die im Rahmen dieser Arbeit angewendete Extraktions-Methode für die Lyse aller bakteriellen Zellen aus Boden optimiert zu sein. Eine weitere Fehlerquelle ist in der PCR-Amplifikation zu sehen. Huminsäuren, die mit den Nukleinsäuren aus Böden extrahiert werden, können zur Inhibition spezifischer DNA modifizierender Enzyme führen. So zeigte Jacobsen (1995), dass dies ebenfalls für die in der TaqMan-PCR eingesetzten *AmpliTaq* Polymerase gilt. Ferner werden verwandte Sequenzen nicht immer mit der gleichen Effizienz amplifiziert, z. B. weil die Zielsequenzen nicht gleich zugänglich sind für die PCR-Primer.

Trotz dieser methodischen Limitierungen gibt die TaqMan-PCR einen guten Einblick in die Abundanz mikrobieller Gene in der Umwelt. Da die Anzahl an *cbb*-Operonen in Bakterien der ‚red-like‘-Linie zwischen eins und zwei variiert, ist eine genaue Aussage der Zellzahlen in Boden nicht möglich (Husemann *et al.*, 1988, Hugendieck und Meyer, 1991).

Im Vergleich zu bisherigen TaqMan-Untersuchungen von bakteriellen, funktionellen Genen im Boden, ist zu erkennen, dass ‚red-like‘ *cbbL*-Gene im Boden häufig vertreten sind und deshalb ihre Bedeutung nicht unterschätzt werden sollte. Bach *et al* (2002) identifizierten 2×10^6 Genkopien/g Boden für das Gen der bakteriellen Subtilisin-Peptidase (*sub*). Höhere Werte wurden für methanotrophe Bakterien in einem Reisfeld erhalten, die über ihre *pmoA* quantifiziert wurden und mit einer Häufigkeit von 5×10^6 Kopien/g Boden beschrieben wurden (Kolb *et al.*, 2003). Weitere TaqMan-Untersuchungen liegen für Ammoniumoxidierer vor, die im Boden über ihr funktionelles Gen *amoA* quantifiziert wurden. Da die Rolle der Ammoniumoxidierer im Boden von großer Bedeutung ist, erstaunt es nicht, dass Okano *et al.* (2003) bis zu $2,2 \times 10^9$ *amoA*-Kopien/g Boden detektieren konnten.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte zudem die Quantifizierung von ‚red-like‘ *cbbL*-Genen in Partikelgrößenfraktionierungen (s. C.2.4.3). Die Bodenstruktur zeichnet sich durch die Assoziation mineralischer Bodenpartikel (Sand, Schluff, Ton) und organischer Substanz aus, wobei Aggregate verschiedener Größe und Stabilität und somit Mikrohabitate für Organismen gebildet werden. Zahlreiche Untersuchungen zeigten, dass die bakterielle Zellzahl und die mikrobielle Biomasse in den kleineren Fraktionen (Schluff, Ton) konzentriert ist (Kanazawa und Filip, 1986, van Gestel *et al.*, 1996). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Aktivität bakterieller Enzyme wie Urease, Invertase und alkaline Phosphatase in Schluff und Ton am höchsten ist, wohingegen die Aktivität der Xylanase, die als Indikator der Pilz-Aktivität gilt, in den Sand-Fractionen am größten ist. Diese Ergebnisse wurden von Kandeler *et al.* (2000) ergänzt und bestätigt. Kandeler *et al.* zeigten mittels molekularer Analysen wie Phospholipid-Fettsäure-Analyse und DGGE von 16S rRNA-Genen, dass die mikrobielle Biomasse in der Schluff- und Ton-Fraktion auf Bakterien zurückzuführen ist. Im Vergleich dazu wurde ein hoher Anteil an Pilz-Fettsäuren in den groben Sand-Fractionen gefunden. Sessitsch *et al.* (2001) untersuchten unter Anwendung der T-RFLP-Analyse die bakteriellen Gemeinschaften in den unterschiedlichen Fraktionen und dabei stellten sie fest, dass die mikrobielle Gemeinschaft durch die Partikelgröße beeinflusst wird, da in den kleinsten Fraktionen Schluff und Ton die höhere bakterielle Diversität vorliegt. Die Ergebnisse bisheriger Studien zur Untersuchung bakterieller Gemeinschaften in verschiedenen Bodenfraktionen wurden durch Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützt.

So konnten ausschließlich in den beiden kleinsten Fraktionen Schluff und Ton ‚red-like‘ *cbbL*-Gene in Kopienzahlen von 10^6 bis 10^7 detektiert und quantifiziert werden (Tabelle C.11).

Der Grund für das überwiegende Vorkommen von bakteriellen Gemeinschaften in den Boden-Fraktionen Schluff und Ton könnte auf die geringe Porengröße zurückzuführen sein, die den Bakterien einen Schutz gegen mögliche Feinde wie Protozoen geben. Überdies sind die Sand-Fraktionen durch ein niedrigeres Nährstoffangebot ausgezeichnet, um die die Bakterien mit den Pilzen konkurrieren müssen (Sessitsch *et al.*, 2001). Van Gestel *et al.* (1996) zeigten, dass die unmittelbare Nähe von Bakterien, organischer Substanz und Ton für das Überleben der Bakterien notwendig ist, wobei die organische Substanz und die Tonpartikel Substrate für die Mikroorganismen bereitstellen. Aber nicht nur das Angebot an Nährstoffen sondern auch die O_2 -Verfügbarkeit ist in den verschiedenen Bodenfraktionen unterschiedlich und beeinflusst die mikrobiellen Gemeinschaften. Die feinen Fraktionen Schluff und Ton liefern sowohl aeroben als auch strikt anaeroben Bakterien (z. B. Clostridien) Nischen, wohingegen die groben Boden-Fraktionen von aeroben Mikroorganismen dominiert sind (Sessitsch *et al.*, 2001).

D.7. Ausblick

Die in dieser Dissertation vorgelegten Arbeiten ermöglichen die Erfassung der Diversität und Abundanz *cbbL*-tragender Bakterienpopulationen im Habitat Boden. Weiterführende experimentelle Ansätze sollten vor allem zur Aufklärung der Aktivität dieser Populationen im Boden führen. Ein wichtiger Beitrag kann dabei über neue Techniken der molekularen mikrobiellen Ökologie geleistet werden. Ein zentraler Aspekt ist die Erfassung der *cbbL*-mRNA, deren Diversitäts-Analyse einen Einblick in die RubisCO-exprimierenden Bakterienpopulationen geben würde. Des weiteren ist über den Einbau von ^{13}C -markierten CO_2 in die rDNA und rRNA aktiver Populationen, der Nachweis der tatsächlich CO_2 -fixierenden Populationen möglich (Radajewski *et al.*, 2000, Lüders *et al.*, 2004 a, b). Weitere mögliche experimentelle Ansätze sollten zur näheren Charakterisierung der gewonnen Bakterienisolate führen. Dabei könnte über die Kombination von Mikroautoradiographie und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) der Umsatz von radioaktiv markierten $^{14}CO_2$ in diesen Isolaten nachgewiesen werden (Lee *at al.*, 1999) und damit ein tatsächlich aktiver CO_2 -fixierender Metabolismus in *Bacillus*, *Arthrobacter* und *Streptomyces* bewiesen werden. Es sollten auch

weiterhin Anstrengungen unternommen werden, autotrophe Bakterien mit den neuartigen *cbbL*-Sequenzen zu isolieren, denn nur mit der physiologischen Charakterisierung dieser Organismen kann eine vollständige Aufklärung ihrer Rolle im Boden erfolgen.

E. Zusammenfassung

Autotrophe *Bacteria* sind von zentraler Bedeutung für den terrestrischen Kohlenstoffkreislauf, da sie dem an verfügbaren organischen Kohlenstoffverbindungen armen Boden Biomasse zuführen und einen Beitrag zur Reduzierung des atmosphärischen CO₂ leisten könnten. Doch während die autotrophen Prozesse und die daran beteiligten Mikroorganismen in aquatischen Habitaten bereits gut untersucht und verstanden sind, besteht noch erheblicher Forschungsbedarf zur Diversität und Abundanz autotropher Bakterienpopulationen in Böden. In dieser Arbeit sollten zentrale Fragen zur Charakterisierung der autotrophen Gemeinschaften mit Werkzeugen der molekularen mikrobiellen Ökologie bearbeitet werden.

Die meisten *Prokaryota*, die mit CO₂ als einzige Kohlenstoffquelle zu wachsen vermögen, fixieren dieses über den Calvin-Benson-Bessham Zyklus. Das Schlüsselenzym dieses Zykluses ist die Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase (RubisCO). Die große Untereinheit der Form I-RubisCO wird von dem Gen *cbbL* kodiert, welches phylogenetisch in zwei Hauptentwicklungslinien unterteilt wird: ‚green-like‘ und ‚red-like‘. Um einen Einblick in die genetische Diversität CO₂-fixierender Bakterien in unterschiedlich gedüngten Agrarböden des Dauerdüngungsversuchs *Ewiger Roggenbau* in Halle/Saale zu erlangen, wurde eine auf PCR basierende Methodik entwickelt, die auf der Erfassung des Funktionsgens *cbbL* zielt. Es wurden Datenbankrecherchen durchgeführt und mittels den anschließenden vergleichenden Sequenzanalysen und phylogenetischen Untersuchungen bekannter *cbbL*-Sequenzen spezifische Oligonukleotid-Primerpaare konstruiert, die ausgewählte *cbbL*-Sequenzen terrestrischer Bakterien der ‚red-like‘ bzw. der ‚green-like‘ RubisCO-Linien amplifizieren. Mit Hilfe dieser Primer gelang es *cbbL*-Genbanken anzulegen, die mittels der Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus-(RFLP)-Analyse und Diversitätsindices untersucht und verglichen wurden; ausgewählte Sequenzen wurden einer phylogenetischen Zuordnung unterzogen.

Mit den entwickelten Primerpaaren konnten in den untersuchten Böden nur eine geringe Diversität an ‚green-like‘ *cbbL*-Sequenzen festgestellt werden, die phylogenetisch zu den *cbbL*-Sequenzen von *Nitrobacter vulgaris* und *Nitrobacter winogradskyi* nahe verwandt waren. Im Vergleich dazu zeichneten sich die ‚red-like‘ *cbbL*-Sequenzen aus den Böden durch eine hohe Diversität aus, wobei sie phylogenetisch über die gesamte ‚red-like‘-Gruppe verteilt waren und sich häufig als nur entfernt verwandt zu bekannten *cbbL*-Sequenzen

herausstellten. Während mit der RFLP-Analyse Bodenbehandlungs-spezifische Muster identifiziert wurden, war nach der phylogenetischen Sequenzanalyse keine Cluster-Bildung in Abhängigkeit von der Bodenbehandlung zu beobachten.

Um den Datensatz an vorhandenen ‚red-like‘ *cbbL*-Sequenzen zu erweitern, wurden *cbbL*-Gene aus verschiedenen kultivierten α - und β -*Proteobacteria* sowie aus Bakterienisolaten, die in dieser Arbeit aus Boden gewonnen wurden, amplifiziert. Die phylogenetische Sequenzanalyse gruppierte diese *cbbL*-Sequenzen Taxon-unabhängig zu den verschiedenen Clustern des ‚red-like‘-Baums einschließlich der neuen *cbbL*-Gencluster aus den Halle-Böden. Bakterielle Bodenisolat, die als *cbbL*-positiv identifiziert wurden, konnten basierend auf ihrer 16S rDNA-Sequenz als Organismen der Gram-positiven Gattungen *Bacillus*, *Streptomyces* und *Arthrobacter* klassifiziert werden. Vertreter dieser bakteriellen Gruppen waren bisher nicht als CO₂-Fixierer charakterisiert worden. Der physiologische Beweis eines aktiven CO₂-fixierenden Metabolismus über RubisCO steht noch aus.

Die Ergebnisse der ‚red-like‘ *cbbL*-Diversitäts-Studie dienten als Grundlage zur Konstruktion weiterer Oligonukleotide, die in der „real-time“ TaqMan-PCR zur Quantifizierung von ‚red-like‘ *cbbL*-Genen aus Boden eingesetzt wurden. Dabei wird ersichtlich, dass in den untersuchten Bodenvarianten bis zu 10⁷ *cbbL*-Genkopien/g Boden enthalten sind. Die unterschiedlichen Bodenbehandlungen scheinen keinen Einfluss auf die Abundanz von ‚red-like‘ *cbbL*-Genen in Böden zu nehmen.

Summary

Autotrophic Bacteria are of central importance in the terrestrial carbon cycle, since they could provide soil, which is poor in available organic carbon compounds, with biomass and thus may contribute to the reduction of atmospheric CO₂. While in aquatic habitats autotrophic processes and involved microorganisms were already well studied, substantial research concerning the presence and composition of autotrophic bacterial populations in soils is still in high demand. The aim of this thesis was to contribute to the characterisation of autotrophic populations in soil with molecular genetic tools.

Most of the *Procaroyota* which were able to grow with CO₂ as sole carbon source fix CO₂ via the Calvin-Benson-Bessham cycle. The key enzyme of this cycle is the ribulose-1,5-bisphosphate-carboxylase/oxygenase (RubisCO). The gene *cbbL*, which codes for the large subunit of the form I RubisCO, can be divided into two major phylogenetic groups: ‘green-

like' and 'red-like'. In order to gain insight into the genetic diversity of CO₂-fixing bacteria in differently managed agricultural soils of the long-term fertilizer field experiment *Eternal rye* in Halle/Saale a PCR-based approach for the detection of the functional gene *cbbL* was developed. On the basis of comparative sequence analysis and phylogenetic analysis of available *cbbL* sequences the developed primer systems were specific for selected terrestrial autotrophic bacteria of the 'red-like' and 'green-like' lineage, respectively. The constructed *cbbL* gene libraries were analysed and compared by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis and by diversity indices; selected *cbbL* sequences were analysed phylogenetically.

The 'green-like' *cbbL* sequences revealed a very low diversity being closely related to the *cbbL* genes of the nitrifying bacteria *Nitrobacter winogradskyi* and *Nitrobacter vulgaris*. In contrast, the 'red-like' *cbbL* gene libraries revealed a high diversity and the majority of environmental 'red-like' *cbbL* genes were only distantly related to already known *cbbL* sequences and formed even separate clusters. While the RFLP analysis revealed *cbbL* patterns which were dependent on soil treatment, no cluster formation depending on soil management could be observed with phylogenetic sequence analysis.

In order to extend the database of available 'red-like' *cbbL* sequences we amplified *cbbL* of bacterial type culture strains and of bacterial isolates obtained from the investigated soils. The phylogenetic analysis revealed that these *cbbL* sequences grouped taxon-independent to different clusters of the 'red-like' *cbbL* tree including the new *cbbL* gene clusters from the Halle soil. On the basis of their 16S rDNA sequence the *cbbL* positive bacterial isolates were classified as members of the genera *Bacillus*, *Arthrobacter* and *Streptomyces*. Members of these bacterial genera were so far not classified as CO₂-fixing bacteria. However, the proof of CO₂-fixation activity needs further in depth studies.

The results of the 'red-like' *cbbL* diversity studies served as basis for the construction of oligonucleotides (primers and probes) which were used for the quantification of 'red-like' *cbbL* genes in soil via the "real-time" TaqMan-PCR. Thus it appears that the investigated soils harbour up to 10⁷ *cbbL* gene copies/g soil and that the abundance of 'red-like' *cbbL* genes is not influenced by soil treatment.

F. Literatur

Alfreider, A., C. Vogt, D. Hoffmann, und W. Babel. 2003. Diversity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from groundwater and aquifer microorganisms. *Microbial Ecology* **45**: 317-328.

Amann, R., L. Krumholz, und D. A. Stahl. 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative and environmental studies in microbiology. *Journal of Bacteriology* **172**: 762-770.

Amann, R., W. Ludwig, und K. H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* **59**: 143-169.

Arrhenius, S. 1896. On the influence of carbonic acid in the air upon the temperature of the ground. *Philosophy Magazine* **22**: 237-276.

Ashida, H., Y. Saito, C. Kojima, K. Kobayashi, N. Ogasaware, und A. Yokota. 2003. A functional link between RuBisCO-like protein of *Bacillus* and photosynthetic RuBisCO. *Science* **302**: 286-290.

Bach, H. J., J. Tomanova, M. Schloter und J. C. Munch. 2002. Enumeration of total bacteria and bacteria with genes for proteolytic activity in pure cultures and in environmental samples by quantitative PCR mediated amplification. *Journal of Microbiological Methods* **49**: 235-245.

Barton, L. L., J. M. Shively, und J. Lascelles. 1991. Autotrophs: variations and versatilities. In: *Variations in Autotrophic Life*, S. 1-23, London.

Baxter, N. J., R. P. Hirt, L. Bodrossy, K. L. Kovacs, T. M. Embley, J. I. Prosser, und J. C. Murrell. 2002. The ribulose-1,5-bisphosphate-carboxylase/oxygenase gene cluster of *Methylococcus capsulatus* (Bath). *Archives of Microbiology* **177**: 279-289.

Bertani, G. 1951. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **62**: 293-300.

Bowien, B. 1989. Molecular biology of carbon dioxide assimilation in aerobic chemoautotrophs. In: *Autotrophic bacteria*, S. 437-460, ed. H. G. Schlegel, B. Bowien, Madison, WI.

- Brock, T. D., M. T. Madigan, J. M. Martinko, and J. Parker.** 1997. Biology of microorganisms. 8th ed., Prentice Hall.
- Brosius, J., T. L. Dull, D. D. Sleeter, and H. F. Noller.** 1981. Gene organization of primary structure of a ribosomal operon from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* **148**: 107-127.
- Bruns, A., U. Nubel, H. Cypionka, and J. Overmann.** 2003. Effect of signal compounds and incubation conditions on the culturability of freshwater bacterioplankton. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 1980-1989.
- Bult, C. J., O. White, G. J. Olsen, L. Zhou, R. D. Fleischmann, G. G. Sutton, J. A. Blake, L. M. Fitzgerald, R. A. Clayton, J. D. Gocayne, A. R. Kerlavage, B. A. Dougherty, J. F. Tomb, M. D. Adams, C. I. Reich, R. Overbeek, E. F. Kirkness, K. G. Weinstock, J. M. Merrick, A. Glodek, J. L. Scott, N. S. Geoghagen, and J. C. Venter.** 1996. Complete genome sequence of the methanogenic archaeon *Methanococcus jannaschii*. *Science* **273**: 1058-1073.
- Caspi, R., M. G. Haygood, and B. M. Tebo.** 1996. Unusual ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase genes from a marine manganese-oxidizing bacterium. *Microbiology* **142**: 2549-2559.
- Cavanaugh, C. M., and J. J. Robinson.** 1995. CO₂ fixation in chemoautotroph-invertebrate symbiosis: expression of form I and form II RuBisCO. In: *Microbial growth on C1 compounds*, S. 285-292.
- Chernykh, N. A.** 1995. Use of polymerase chain reaction for detecting the RBPC gene in natural samples. *Mikrobiologiya* **64**: 792-796.
- Clark, J. M., and R. L. Swika.** 1977. Experimental Biochemistry. 2nd Edn., W. H. Freeman and Company, San Francisco.
- Cryer, D. R., R. Eccleshall, and L. Marmur.** 1975. Isolation of yeast DNA. *Methods in Cell Biology* **12**: 39-44.
- Daims, H., A. Brühl, K. H. Schleifer, and M. Wagner.** 1999. The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all *Bacteria*: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Systematic and Applied Microbiology* **22**: 434-444.
- Dalevi, D., P. Hugenholtz, and L. L. Blackall.** 2001. A multiple-outgroup approach to resolving division-level phylogenetic relationships using 16S rDNA data. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**: 385-391.

Delwiche, C. F. und J. D. Palmer. 1996. Rampant horizontal transfer and duplication of Rubisco genes in eubacteria and plastids. *Molecular Biology and Evolution* **13**: 873-882.

Ellis, R. J. 1979. The most abundant protein in the world. *Trends in Biochemical Sciences* **4**: 241-244.

Elsaied, H., und T. Naganuma. 2001. Phylogenetic diversity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large-subunit genes from deep-sea microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 1751-1765.

Emerson, S., R. E. Cranston, und P. S. Liss. 1979. Redox species in a reducing fjord: equilibrium and kinetic considerations. *Deep Sea Research* **26**: 859-878.

Evans, M. C., B. B. Buchanan, und D. I. Arnon. 1966. A new ferredoxin-dependent carbon reduction cycle in a photosynthetic bacterium. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **55**: 928-934.

Ezaki S., N. Maeda, T. Kishimoto, H. Atomi, und T. Imanaka. 1999. Presence of a structurally novel type ribulose-bisphosphate carboxylase/oxygenase in the hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 5078-5082.

Felsenstein, J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences – a maximum-likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution* **17**: 368-376.

Fitch, W. M. 1971. Toward defining course of evolution – minimum change for a specific tree topology. *Systematic Zoology* **20**: 406-412.

Gibson, J. L., D. L. Falcone, und F. R. Tabita. 1991. Nucleotide sequence, transcriptional analysis, and expression of genes encoded within the form I CO₂ fixation operon of *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Biological Chemistry* **266**: 14646-14653.

Giovannoni, S. J., E. F. DeLong, G. J. Olsen, und N. R. Pace. 1988. Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. *Journal of Bacteriology* **170**: 720-726.

Good, I. J. 1953. The population frequency of species and the estimation of the population parameters. *Biometrics* **40**: 237-246.

Hanson, T. E., und F. R. Tabita. 2001. A ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO)-like protein from *Chlorobium tepidum* that is involved with sulfur metabolism and the response to oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **98**: 4397-4402.

- Hernandez, J. M., S. H. Baker, S. C. Lorbach, J. M. Shively, und F. R. Tabita.** 1996. Deduced amino acid sequence, functional expression, and unique enzymatic properties of the form I and form II ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase from the chemoautotrophic bacterium *Thiobacillus denitrificans*. *Journal of Bacteriology* **178**: 347-356.
- Hilaro, E., und J. P. Gogarten.** 1993. Horizontal transfer of ATPase genes – the tree of life becomes a net of life. *Bio-Systems* **31**: 111-119.
- Holo, H.** 1989. *Chloroflexus aurantiacus* secretes 3-hydroxypropionat, a possible intermediate in the assimilation of CO₂ and acetate. *Archives of Microbiology* **151**: 252-256.
- Horken, K. M., und F. R. Tabita.** 1999. Closely related form I ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase molecules that possess different CO₂/O₂ substrate specificities. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **361**: 183-194.
- Hugendieck, I., und O. Meyer.** 1991. Genes encoding ribulosebiphosphate carboxylase and phosphoribulokinase are duplicated in *Pseudomonas carboxydovorans* and conserved in carboxydotrophic bacteria. *Archives of Microbiology* **157**: 92-96.
- Hugenholtz, P., B. M. Goebel, und N. R. Pace.** 1998. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology* **180**: 4765-4774.
- Husemann, M., R. Klintworth, V. Büttcher, J. Salnikow, C. Weissenborn, und B. Bowien.** 1988. Chromosomally and plasmid-encoded gene clusters for CO₂ fixation (*cfx*) genes in *Alcaligenes eutrophus*. *Molecular Genetics and Genomics* **214**: 112-120.
- Jacobsen, C. S.** 1995. Microscale detection of specific bacterial DNA in soil with a magnetic capture-hybridization and PCR amplification assay. *Applied and Environmental Microbiology* **61**: 1102-1106.
- Jannasch, H. W., und M. J. Mottl.** 1985. Geomicrobiology of deep-sea hydrothermal vents. *Science* **229**: 717-725.
- Jukes, T. H., und C. R. Cantor.** 1969. Evolution of protein molecules. S. 21-132. In: *Mammalian protein metabolism*. Munro, H. N. (Hrsg.), Academic Press, New York, N. Y.
- Juretschko, S., G. Timmermann, M. Schmid, K. H. Schleifer, A. Pommerening-Röser, H. P. Koops, und M. Wagner.** 1998. Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrosospira*-like bacteria as dominant populations. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 3042-3051.

- Jurtshuk, R. J., M. Blick, J. Bresser, G. E. Fox, und P. Jurtshuk Jr.** 1992. Rapid in situ hybridization technique using 16S rRNA segments for detecting and differentiating the closely related gram-positive organisms *Bacillus polymyxa* and *Bacillus macerans*. *Applied and Environmental Microbiology* **58**: 2571-2578.
- Kaeberlein, T, K. Lewis, und S. S. Epstein.** 2002. Isolating „uncultivable“ microorganisms in pure culture in a stimulated natural environment. *Science* **296**: 1127-1129.
- Kalkus, J., M. Reh, und H. G. Schlegel.** 1990. Hydrogen autotrophy of *Norcadia opaca* strains is encoded by linear megaplasmids. *Journal of General Microbiology* **136**: 1145-1151.
- Kanazawa S., und Z. Filip.** 1986. Distribution of microorganisms, total biomass, and enzyme activities in different particles of brown soil. *Microbial Ecology* **12**: 205-215.
- Kandeler, E., D. Tschlerko, K. D. Bruce, M. Stemmer, P. J. Hobbs, R. D. Bardgett, und W. Amelung.** 2000. Structure and function of the soil microbial community in microhabitats of a heavy metal polluted soil. *Soil Biology and Biochemistry* **32**: 390-400.
- Kellogg, E. A., und N. D. Juliano.** 1997. The structure and function of RuBisCO and their implications for systematic studies. *American Journal of Botany* **84**: 413-428.
- Kimura, M.** 1983. The neutral theory of molecular evolution. S. 208-233. In: *Evolution of genes and proteins*. Nei, M. und R. K. Koehn (Hrsg.), Sinauer, Sunderland, MA.
- Kerr, R. A.** 2001. It's official: humans are behind most of global warming. *Science* **10**: 1-4.
- King, G. M., D. Kirchmann, A. A. Salyers, W. Schlesinger, und J. M. Tiedje.** 2001. Environmental Change: microbial contributions, microbial solutions. On world wide web URL: <http://www.asmsa.org/pasrc/reports.htm>.
- Klenk, H. P., R. A. Clayton, J. F. Tomb, O. White, K. E. Nelson, K. A. Ketchum, R. J. Dodson, M. Gwinn, E. K. Hickey, J. D. Peterson, D. L. Richardson, A. R. Kerlavage, D. E. Graham, N. C. Kyrpides, R. D. Fleischmann, J. Quackenbush, N. H. Lee, G. G. Sutton, S. Gill, E. F. Kirkness, B. A. Dougherty, K. McKenney, M. D. Adams, B. Loftus, J. C. Venter, et al.** 1997. The complete genome of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Nature* **390**: 364-370.
- Kobayashi, H., A. M. Viale, T. Takabe, T. Akazawa, K. Wada, K. Shinozaki, K. Kobayashi, und M. Sugiura.** 1991. Sequence and expression of genes encoding the large and small subunits ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from *Chromatium vinosum*. *Gene* **97**: 55-62.

Kolb S., C. Knief, S. Stubner, und R. Conrad. 2003. Quantitative detection of methanotrophs in soil by novel *pmoA*-targeted real-time PCR assays. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 2423-2429.

Kunst, F., N. Ogasawara, I. Moszer, A. M. Albertini, G. Alloni, V. Azevedo, M. G. Bertero, P. Bessieres, A. Bolotin, S. Borchert, R. Borriss, L. Boursier, A. Brans, M. Braun, S. C. Brignell, S. Bron, S. Brouillet, C. V. Bruschi, B. Caldwell, V. Capuano, N. M. Carter, S. K. Choi, J. J. Codani, I. F. Connerton, A. Danchin, et al. 1997. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**: 249-256.

Kusian, B., und B. Bowien. 1997. Organization and regulation of *cbb* CO₂ assimilation genes in autotrophic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **21**: 135-155.

Liesack, W., P. H. Janssen, F. A. Rainey, N. L. Ward-Rainey, und E. Stackebrandt. 1997. Microbial diversity in soil: the need for a combined approach using molecular and cultivation techniques. S. 375-439. In: *Modern Soil Microbiology*. van Elsas, J. D., J. T. Trevors, und E. M. H. Wellington (Hrsg.). Marcel Dekker Inc., New York, N. Y.

Lee, L. G., C. R. Connell, und W. Bloch. 1993. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Research* **21**: 3761-3766.

Lee, N., P. H. Nielsen, K. H. Andreasen, S. Juretschko, J. L. Nielsen, K. H. Schleifer und M. Wagner. 1999. Combination of fluorescent in situ hybridization and microautoradiography – a new tool for structure-function analyses in microbial ecology. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 1289-1297.

Ludwig, W., O. Strunk, S. Klugbauer, N. Klugbauer, M. Weizenegger, J. Neumaier, M. Bachleitner, und K. H. Schleifer. 1998. Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. *Electrophoresis* **19**: 554-568.

Lüders, T., M. Manefeld, und M. W. Friedrich. 2004a. Enhanced sensitivity of DNA and rRNA-based stable isotope probing by fractionation and quantitative analysis of isopycnic centrifugation gradients. *Environmental Microbiology* **6**: 73-78.

Lüders, T., B. Wagner, P. Claus, und M. W. Friedrich. 2004b. Stable isotope probing of rRNA and DNA reveals a dynamic methylotroph community and trophic interactions with fungi and protozoa in oxic rice field soil. *Environmental Microbiology* **6**: 60-72.

Malik, K. A., und H. G. Schlegel. 1981. Chemolithoautotrophic growth of bacteria able to grow under N₂-fixing conditions. *FEMS Microbiology Letters* **11**: 63-67.

Margalef, R. 1958. Information theory in ecology. *General Systems* **3**: 36-71.

- Marmur, J.** 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *Journal of Molecular Biology* **3**: 208-218.
- Martin, W. S., H. Brinkmann, C. Sayonna, und R. Cerff.** 1993. Evidence for a chimeric nature of nuclear genomes: eubacterial origin of eukaryotic glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase genes. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **90**: 8692-8696.
- McClung, C. R., und B. K. Chelm.** 1987. A genetic locus essential for formate-dependent growth of *Bradyrhizobium japonicum*. *Journal of Bacteriology* **169**: 3260-3267.
- McDonald, I. R., E. M. Kenna, und J. C. Murrell.** 1995. Detection of methanotrophic bacteria in environmental samples with the PCR. *Applied and Environmental Microbiology* **61**: 116-121.
- Meier, H, R. Amann, W. Ludwig, und K. H. Schleifer.** 1999. Specific oligonucleotide probes for in situ detection of a major group of gram-positive bacteria with low DNA G+C content. *Systematic and Applied Microbiology* **15**: 186-196.
- Meijer, W.G., A. C. Arnberg, H. G. Enequist, P. Terpstra, M. E. Lidstrom, und L. Dijkhuizen.** 1991. Identification and organization of carbon dioxide fixation genes in *Xanthobacter flavus* H4-14. *Molecular Genetics and Genomics* **225**: 320-330.
- Merker, J.** 1956. Untersuchungen an den Ernten und Böden des Versuches „Ewiger Roggenbau“ in Halle. *Kühn-Archives* **70**: 154-215.
- Miltner, A., F. D. Kopinke, R. Kindler, D. Selesi, A. Hartmann, und M. Kästner.** 2004. Non-phototrophic CO₂ fixation by soil microorganisms. *Plant and Soil*, in Druck.
- Miyajima, T.** 1992. Biological manganese oxidation in a lake: I. Occurrence and distribution of *Metallogenium* sp. and its kinetic properties. *Archives of Hydrobiology* **124**: 317-335.
- Nanba K., G. M: King, und K. E. Dunfield.** 2004. Analysis of facultative lithotroph distribution and diversity on volcanic deposits by use of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 2245-2253.
- Oda,Y., W. G. Meijer, J. C. Gottschal, und L. J. Forney.** 2001. Analysis of genetic diversity among 3-chlorobenzoate degrading *Rhodopseudomonas palustris*. Aus der GenBank-Datenbank (NCBI).
- Okano, Y., K. R. Hristova, C. M. Leutenegger, L. E. Jackson, R. F. Denison, B. Gebeyesus, D. Lebauer, und K. M. Scow.** 2004. Application of real-time PCR to study effects of ammonium on population size of ammonia-oxidizing bacteria in soil. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 1008-1016.

- Olsen, G. J., S. J. Giovannoni, and N. R. Pace.** 1986. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annual Review of Microbiology* **40**: 337-365.
- Paoli, G. C., N. S. Morgan, F. R. Tabita, and J. M. Shively.** 1995. Expression of the *cbbL*, *cbbS* and *cbbM* genes and distinct organization of the *cbb* Calvin cycle structural genes of *Rhodobacter capsulatus*. *Archives of Microbiology* **164**: 396-405.
- Pattis, I. M.** 2002. Einfluss einer H₂-behandlung auf die Bodenmikroflora und die molekulare Diversität der *cbbL*-(RubisCO) Gene. Diplomarbeit, Fakultät für Biologie, LMU München.
- Paul, J. H., L. Cazares, and J. Thurmond.** 1990. Amplification of the *rbcL* gene from dissolved and particulate DNA from aquatic environments. *Applied and Environmental Microbiology* **56**: 1963-1966.
- Pichard, S. L., L. Campell, and J. H. Paul.** 1997. Diversity of the ribulose-bisphosphate carboxylase/oxygenase form I gene (*rbcL*) in natural phytoplankton communities. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 3600-3606.
- Radajewski, S., P. Ineson, N. R. Parekh, and J. C. Murrell.** 2000. Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature* **403**: 646-649.
- Ranjard, L., and A. Richaume.** 2001. Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil. *Research in Microbiology* **152**: 707-716.
- Rappe, M. S., S. A. Connon, K. L. Vergin, and S. J. Giovannoni.** 2002. Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade. *Nature* **418**: 630-633.
- Raven, J. A.** 1996. The role of autotrophs in global CO₂ cycling. In: *Microbial growth on C1 compounds*, S. 351-358.
- Roller, C., M. Wagner, R. Amann, W. Ludwig, and K. H. Schleifer.** 1994. *In situ* probing of gram-positive bacteria with high DNA G+C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides. *Microbiology Reviews* **140**: 2849-2858.
- Rossello-Mora, R., and R. Amann.** 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* **25**: 39-67.
- Rotthauwe, J. H., K. P. Witzel und W. Liesack.** 1997. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 4704-4712.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, und T. Maniatis.** 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd Edn., New York, Cold Spring Harbor Laboratory.

- Sarbu, S. M., T. C. Kane, und B. K. Kinkle.** 1996. A chemoautotrophically based cave ecosystem. *Science* **272**: 1953-1955.
- Saitou, N., und M. Nei.** 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**: 406-425.
- Schliephake, W., J. Garz, und H. Stumpe.** 1997. Stoffumsatz im Dauerdüngungsversuch „Ewiger Roggenbau“. *VDLUFA-Schriftenreihe* **42**: 407-410.
- Sessitsch, A., A. Weilharter, M. H. Gerzabek, H. Kirchmann, und E. Kandeler.** 2001. Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 4215-4224.
- Shannon, C. E., und W. Weaver.** 1963. The mathematical theory of communication, S. 117. University of Illinois Press, Urbana.
- Shively, J. M., F. L. Ball, und B. W. Kline.** 1973. Electron microscopy of the carboxysomes (polyhedral bodies) of *Thiobacillus neapolitanus*. *Journal of Bacteriology* **166**: 1405-1411.
- Shively, J. M., van Keulen, G., und W. G. Meijer.** 1998. Somthing from almost nothing: carbon dioxide fixation in chemoautotrophs. *Annual Review of Microbiology* **52**: 191-230.
- Shively, J. M., R. S. English, S. H. Baker, und G. C. Cannon.** 2001. Carbon cycling: the prokaryotic contribution. *Current Opinion in Microbiology* **4**: 301-306.
- Simberloff, D.** 1978. Use of rarefaction and related methods. In: Biological data in water pollution assessment: quantitative and statistical analyses, S. 150-165, K. L. Dickson *et al.* (ed.), American Society for Testing and materials, Philadelphia, PA.
- Simpson, E. H.** 1949. Measurement of diversity. *Nature* **163**: 688.
- Spiridonova, E. M., I. A. Berg, T. V. Kolganova, R. N. Ivanovsky, B. B. Kuznetsov, und T. P. Tourova.** 2004. A system of oligonucleotide primers for the amplification of the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase genes of bacteria of different taxonomic groups. Aus der GenBank-Datenbank (NCBI).
- Stein, J. L., M. Haygood, und H. Felbeck.** 1990. Nucleotide sequence and expression of a deep-sea ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase gene cloned from a chemoautotrophic bacterial endosymbiont. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **87**: 8850-8854.

- Stemmer, M., M. H. Gerzabek, and E. Kandeler.** 1998. Organic matter and enzyme activity in particle size fractions of soils obtained after low-energy sonication. *Soil Biology and Biochemistry* **30**: 9-17.
- Stoffels, M., T. Castellanos, and A. Hartmann.** 2001. Design and application of new 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes for the *Azospirillum-Skermanella-Rhodocista*-cluster. *Systematic and Applied Microbiology* **24**: 83-97.
- Suggs, S. V., T. Hirose, T. Miyake, E. H. Kawashima, M. J. Johnson, K. Itakura, and R. B. Wallace.** 1981. Use of synthetic oligodeoxyribonucleotides for the isolation of cloned DNA sequences. In: *Developmental Biology Using Purified Genes*, S. 683-693, Brown, D. D., and C. F. Fox, eds., Academic Press, New York.
- Suwanto, A., and S. Kaplan.** 1989. Physical and genetic mapping of the *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 genome: presence of two unique circular chromosomes. *Journal of Bacteriology* **171**: 5778-5784.
- Tabita, F. R.** 1988. Molecular and cellular regulation of autotrophic carbon fixation in microorganisms. *Microbiological Reviews* **52**: 155-189.
- Tabita, F. R., J. L. Gibson, B. Bowien, L. Dijkhuizen, and W. G. Meijer.** 1992. Uniform designation for genes of the Calvin-Benson-Bassham reductive pentose phosphate pathway of bacteria. *FEMS Microbiology Letters* **78**: 107-110.
- Tabita, F. R.** 1999. Microbial ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase: a different perspective. *Photosynthesis Research* **60**: 1-28.
- Takahashi, R., M. Ohishi, M. Ohshima, M. Saitoh, K. Omata, and T. Tokuyama.** 2001. Characteristics of an ammonia-oxidizing bacterium with a plasmid isolated from alkaline soils and its phylogenetic relationship. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **92**: 232-236.
- Torsvik, V., J. Gogsoyr, and F. L. Daae.** 1990. High diversity of DNA of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **56**: 782-787.
- Uchino, Y., and A. Yokota.** 2003. "Green-like" and "red-like" RubisCO *cbbL* genes in *Rhodobacter azotoformans*. *Molecular Biology and Evolution* **20**: 821-830.
- Utaker, J.B., K. Andersen, A. Aakra, B. Moen, and I. F. Nes.** 2002. Phylogeny and functional expression of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from the autotrophic ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosospora* sp. isolate 40KI. *Journal of Bacteriology* **184**: 468-478.
- Valverde, A., E. Velázquez, C. Gutiérrez, E. Cervantes, A. Ventosa, and J. M. Igual.** 2003. *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with

root nodules of *Phaseolus vulgaris*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, in Druck.

van Gestel, M., R. Merckx, und K. Vlassek. 1996. Spatial distribution of microbial biomass in microaggregates of a silty-loam soil and the relation with the resistance of microorganisms to soil drying. *Soil Biology and Biochemistry* **28**: 503-510.

Viale, A. M., A. K. Arakaki, F. C. Soncini, und R. G. Ferreyra. 1994. Evolutionary relationships among eubacterial groups as inferred from GroEL (chaperonin) sequence comparisons. *International Journal of Systematic Bacteriology* **44**: 527-533.

Watson, G. M., und F. R. Tabita. 1997. Microbial ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase: a molecule for phylogenetic and enzymological investigations. *FEMS Microbiology Letters* **146**: 13-22.

Wawrik, B., J. H. Paul, und F. R. Tabita. 2002. Real-time PCR quantification of rbcL (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase) mRNA in diatoms and pelagophytes. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 3771-3779.

Winogradsky, S. 1887. Über Schwefelbakterien. *Botanische Zeitung* **45**: 489–600, 606–616.

Wood, H. G., S. W. Ragsdale, und E. Pezacka. 1986. CO₂ fixation into acetyl-CoA: a new pathway of autotrophic growth. *Trends in Biochemical Sciences* **11**: 14-18.

Xu, H. H., und F. R. Tabita. 1996. Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase gene expression and diversity of lake Erie planktonic microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 1913-1921.

G. Anhang

- G. 1** Distanzmatrix der ‘red-like’ *cbbL*¹ (CbbL²)-Sequenzen des Clusters RI aus Abb. C.16
- G. 2** Distanzmatrix der ‘red-like’ *cbbL*¹ (CbbL²)-Sequenzen des Clusters RII aus Abb. C.16
- G. 3** Distanzmatrix der ‘red-like’ *cbbL*¹ (CbbL²)-Sequenzen des Clusters RIII aus Abb. C.16
- G. 4** Distanzmatrix der ‘red-like’ *cbbL*¹ (CbbL²)-Sequenzen des Clusters RIV aus Abb. C.16
- G. 5** Distanzmatrix der ‘red-like’ *cbbL*¹ (CbbL²)-Sequenzen des Clusters RV aus Abb. C.16
- G. 6** Distanzmatrix ausgewählter ‘green-like’ *cbbL*¹ (CbbL²)-Sequenzen aus Abb. C.13
- G. 7** Distanzmatrix der 16S rDNA¹-Sequenzen aus Abb. C.17
- G. 8** Fortsetzung aus G.7

¹ Nukleinsäureähnlichkeiten in %

² Aminosäureähnlichkeiten in %

G. 1 Distanzmatrix der 'red-like' *cbbl*¹ (*CbbL*²)-Sequenzen des Clusters RI aus Abb. C.16

¹ Nukleinsäureähnlichkeiten in %

² Aminosäureähnlichkeiten in %

	<i>R.eutropha</i> 510	<i>R.eutrophap</i> HG1	<i>R.eutropha</i> H16	HSMR15	HSMR4	HNPKR5	HNPKR20	HKOR5	HKOR11	HKOR49b	HKOR21	HKOR22	HNPKR87	HKOR41b
<i>R.eutrophap</i> HG1	94.7 (97.6)													
<i>R.eutropha</i> H16	95.1 (97.4)	96.8 (98.9)												
HSMR15	86.6 (87.8)	86.6 (88.6)	86.4 (88.2)											
HSMR4	84.1 (84.5)	84.0 (84.0)	84.1 (84.5)	86.2 (87.3)										
HNPKR5	84.2 (87.0)	83.8 (85.9)	84.3 (86.3)	82.5 (84.4)	82.7 (87.3)									
HNPKR20	85.0 (86.7)	84.7 (85.6)	85.0 (86.0)	84.7 (88.3)	84.8 (87.7)	87.6 (91.3)								
HKOR5	82.1 (86.7)	81.1 (87.1)	80.7 (86.7)	86.4 (92.8)	81.2 (86.8)	80.5 (86.3)	81.7 (89.0)							
HKOR11	87.1 (87.4)	87.4 (88.3)	87.0 (87.9)	100 (100)	88.6 (89.4)	83.4 (86.0)	85.7 (90.2)	86.5 (94.2)						
HKOR49b	80.8 (85.7)	79.8 (86.1)	79.5 (85.7)	85.7 (92.0)	81.0 (86.4)	79.8 (85.7)	80.9 (88.8)	99.9 (99.6)	85.7 (93.5)					
HKOR21	85.2 (86.6)	83.8 (85.5)	84.4 (85.9)	83.6 (84.4)	83.8 (85.9)	94.4 (98.5)	87.1 (90.5)	80.6 (86.3)	84.2 (85.6)	80.6 (85.7)				
HKOR22	84.9 (85.5)	83.6 (84.4)	84.2 (84.7)	83.2 (83.2)	83.7 (85.5)	94.1 (97.3)	86.6 (89.4)	80.2 (85.1)	83.9 (84.7)	80.5 (85.2)	99.3 (98.1)			
HNPKR87	82.9 (88.7)	82.3 (86.3)	82.1 (86.3)	80.4 (83.2)	80.5 (85.0)	84.0 (89.7)	81.3 (86.3)	79.5 (84.4)	81.0 (83.8)	78.6 (83.4)	84.7 (89.4)	84.2 (88.2)		
HKOR41b	82.0 (86.3)	81.0 (86.7)	80.6 (86.3)	86.3 (92.4)	81.0 (86.4)	80.5 (86.3)	81.6 (88.6)	99.9 (99.6)	86.4 (93.8)	100 (100)	80.6 (86.3)	80.2 (85.1)	79.4 (84.4)	
HNPKR17	93.4 (94.7)	93.7 (95.5)	96.0 (97.0)	85.9 (87.5)	83.5 (85.4)	84.7 (87.4)	85.6 (87.1)	81.1 (87.5)	86.7 (87.9)	79.9 (86.5)	85.0 (87.0)	84.8 (85.9)	82.2 (86.6)	81.0 (87.1)
HNPKR90	83.9 (86.6)	82.9 (85.4)	83.6 (85.8)	82.5 (83.5)	84.8 (88.2)	89.7 (94.3)	86.9 (90.5)	80.0 (84.7)	83.5 (85.5)	79.3 (83.8)	91.0 (93.1)	90.7 (92.4)	89.0 (92.7)	79.9 (84.7)
HNPKR88	84.4 (87.4)	83.2 (86.2)	84.0 (86.6)	82.6 (84.3)	85.1 (89.1)	91.9 (95.4)	88.0 (91.6)	80.2 (85.4)	83.5 (86.0)	79.0 (84.7)	91.2 (94.3)	90.7 (93.1)	89.1 (93.5)	80.1 (85.4)
HNPKR97	85.8 (86.2)	85.6 (86.2)	85.9 (86.6)	86.1 (87.4)	99.6 (99.5)	84.7 (89.3)	86.0 (90.1)	81.8 (87.0)	88.1 (88.7)	80.9 (86.5)	85.0 (88.1)	84.8 (87.0)	81.7 (87.4)	81.7 (86.6)
HNPKR98	83.9 (86.6)	83.2 (85.5)	83.3 (85.9)	81.8 (84.0)	83.2 (86.8)	95.7 (99.6)	86.3 (90.9)	80.1 (85.9)	82.8 (85.6)	79.5 (85.2)	94.2 (98.1)	94.0 (97.0)	82.9 (89.4)	80.1 (85.9)
HNPKR95	84.9 (87.7)	83.7 (86.5)	84.2 (86.9)	82.7 (84.2)	85.6 (89.5)	89.7 (94.3)	86.9 (90.8)	80.7 (85.4)	83.5 (85.5)	79.8 (84.6)	90.8 (93.1)	90.3 (92.0)	89.2 (92.7)	80.6 (85.4)
R47c	84.3 (85.9)	83.2 (84.7)	82.9 (85.1)	82.5 (84.4)	83.2 (86.4)	92.1 (97.3)	85.0 (89.4)	80.2 (85.5)	83.5 (86.0)	79.9 (84.8)	93.0 (97.0)	93.0 (96.6)	83.9 (87.8)	80.2 (85.5)
R36c	83.7 (87.0)	83.1 (85.9)	82.7 (86.3)	81.5 (84.7)	82.7 (86.3)	92.4 (98.5)	85.2 (90.5)	79.3 (85.9)	82.3 (86.5)	78.9 (85.2)	93.0 (98.1)	92.8 (97.0)	83.3 (89.0)	79.3 (85.9)
<i>A. faecalis</i>	84.2 (86.2)	83.8 (85.1)	83.8 (85.4)	82.4 (83.5)	82.8 (86.3)	97.3 (99.2)	86.9 (90.5)	79.4 (85.4)	83.5 (85.6)	78.5 (84.7)	94.1 (97.7)	93.8 (96.6)	83.5 (88.9)	79.4 (85.4)

	HNPKR87	HKOR41b	HNPKR17	HNPKR90	HNPKR88	HNPKR97	HNPKR98	HNPKR95	R47c	R36c
HKOR41b	79.4 (84.4)									
HNPKR17	82.2 (86.6)	81.0 (87.1)								
HNPKR90	89.0 (92.7)	79.9 (84.7)	84.0 (87.0)							
HNPKR88	89.1 (93.5)	80.1 (85.4)	84.4 (87.7)	96.6 (98.9)						
HNPKR97	81.7 (87.4)	81.7 (86.6)	85.4 (87.4)	85.0 (90.0)	85.8 (90.8)					
HNPKR98	82.9 (89.4)	80.1 (85.9)	83.6 (87.0)	89.8 (93.9)	91.3 (95.0)	84.7 (88.9)				
HNPKR95	89.2 (92.7)	80.6 (85.4)	84.8 (88.1)	97.5 (98.1)	97.1 (98.5)	86.3 (91.2)	89.6 (93.9)			
R47c	83.9 (87.8)	80.2 (85.5)	83.3 (86.3)	88.7 (92.0)	89.7 (93.1)	84.2 (87.7)	92.8 (97.0)	89.4 (92.7)		
R36c	83.3 (89.0)	79.3 (85.9)	83.1 (87.4)	88.7 (93.1)	89.3 (94.3)	83.8 (88.9)	92.6 (98.1)	89.1 (93.9)	97.3 (98.9)	
<i>A. faecalis</i>	83.5 (88.9)	79.4 (85.4)	84.1 (86.6)	89.8 (93.5)	91.1 (94.6)	84.6 (88.5)	95.4 (98.9)	89.6 (93.5)	92.1 (96.6)	92.6 (97.7)

G. 2 Distanzmatrix der 'red-like' *cbbL*¹ (*CbbL*²)-Sequenzen des Clusters RII aus Abb. C.16

	HSMR14	HSMR29	HSMR1	HSMR2	HNPKR1	HKOR2	HKOR15	HKOR20	HNPKR7	R37c	R39c	<i>A.lipoferum</i>
HSMR29	89.8 (96.9)											
HSMR1	99.5 (99.2)	89.6 (96.2)										
HSMR2	88.8 (96.9)	88.7 (97.0)	88.6 (96.6)									
HNPKR1	89.1 (96.9)	88.3 (95.8)	88.8 (96.6)	96.4 (98.9)								
HKOR2	99.6 (99.6)	88.9 (96.9)	99.7 (99.6)	88.2 (97.3)	88.0 (97.3)							
HKOR15	89.6 (95.0)	88.8 (95.1)	89.3 (94.7)	90.9 (97.3)	91.5 (96.2)	88.7 (95.5)						
HKOR20	99.6 (99.6)	89.7 (96.6)	99.6 (98.9)	88.7 (96.6)	89.0 (96.6)	99.6 (99.1)	89.4 (94.7)					
HNPKR7	88.0 (92.7)	86.4 (92.0)	88.0 (92.0)	89.8 (92.8)	90.2 (92.0)	87.0 (91.9)	88.3 (91.3)	88.1 (92.4)				
R37c	88.1 (94.7)	87.2 (93.9)	88.1 (93.9)	88.8 (94.3)	89.3 (93.9)	88.2 (94.6)	88.3 (92.8)	88.2 (94.3)	88.1 (93.5)			
R39c	88.6 (95.4)	90.3 (96.6)	88.6 (94.7)	86.5 (94.7)	86.5 (94.3)	87.6 (95.1)	86.6 (93.5)	88.7 (95.0)	84.3 (91.6)	86.6 (93.9)		
<i>A.lipoferum</i>	76.6 (84.7)	75.6 (83.6)	76.7 (84.3)	77.6 (85.5)	77.3 (85.1)	76.7 (85.1)	76.9 (84.4)	76.7 (84.3)	75.5 (81.7)	76.7 (82.8)	76.2 (82.4)	
<i>R.leguminosarum</i> <i>bv. trifolii</i>	87.8 (92.7)	86.4 (92.0)	87.8 (92.0)	89.6 (92.7)	90.0 (92.0)	86.8 (91.9)	88.4 (91.2)	87.9 (92.3)	99.9 (100)	88.2 (93.5)	84.3 (91.6)	75.6 (81.7)

¹ Nukleinsäureähnlichkeiten in %

² Aminosäureähnlichkeiten in %

G.3 Distanzmatrix der 'red-like' *cbbL*¹ (*CbbL*²)-Sequenzen des Clusters RIII aus Abb. C.16

	Mangan-oxid. SI85-9A	<i>B.japonicum</i> USDA6	HSMR8	HSMR75	HSMR20	HSMR139	HSMR143	HKOR8	HKOR78	HKOR36D	HKOR30	R21c	R25c
<i>B.japonicum</i> USDA6	81.4 (84.0)												
HSMR8	83.4 (87.4)	81.8 (86.6)											
HSMR75	83.8 (88.2)	81.5 (87.0)	96.1 (98.1)										
HSMR20	80.1 (82.4)	81.7 (87.0)	81.0 (85.4)	81.5 (86.2)									
HSMR139	79.8 (81.7)	81.1 (85.8)	80.7 (84.2)	81.2 (85.1)	99.4 (98.9)								
HSMR143	84.2 (88.2)	82.1 (87.4)	97.4 (98.9)	96.6 (98.9)	81.1 (86.2)	80.9 (85.1)							
HKOR8	82.1 (84.7)	84.9 (90.4)	82.3 (87.3)	82.5 (87.7)	80.7 (87.3)	80.5 (86.2)	82.9 (88.1)						
HKOR78	78.3 (78.4)	78.7 (80.2)	77.0 (78.4)	77.1 (78.4)	77.6 (81.6)	77.3 (80.3)	77.0 (79.3)	78.8 (81.5)					
HKOR36D	79.9 (81.2)	79.6 (81.2)	79.3 (81.9)	79.4 (82.3)	78.7 (83.1)	78.4 (82.0)	79.3 (82.7)	79.8 (83.5)	99.1 (98.7)				
HKOR30	79.9 (81.2)	79.6 (81.2)	79.4 (81.9)	79.4 (82.3)	78.8 (83.1)	78.5 (82.0)	79.3 (82.7)	79.8 (83.5)	99.3 (98.2)	99.4 (99.2)			
R21c	82.2 (89.1)	81.7 (88.7)	84.1 (89.8)	84.6 (90.3)	80.5 (86.6)	80.2 (85.4)	83.9 (90.7)	82.1 (90.2)	76.6 (80.0)	77.8 (82.4)	77.9 (82.0)		
R25c	79.5 (81.5)	78.8 (81.5)	79.5 (82.2)	79.3 (82.7)	78.5 (83.5)	78.3 (82.4)	79.4 (83.1)	78.3 (83.8)	96.7 (98.7)	96.9 (99.6)	97.1 (99.6)	77.5 (82.4)	
<i>O.carboxid.</i> OM5	84.6 (90.4)	87.8 (95.2)	83.1 (90.1)	82.2 (90.1)	83.1 (93.9)	82.4 (91.6)	82.6 (90.1)	83.4 (92.4)	79.2 (82.8)	80.9 (85.5)	80.7 (85.5)	82.6 (92.7)	80.9 (86.3)
<i>Aminobacter</i> sp. COX	87.6 (90.9)	87.6 (92.9)	88.8 (92.4)	87.5 (91.6)	84.6 (92.4)	83.9 (90.1)	87.5 (93.1)	85.1 (91.6)	81.7 (82.8)	84.6 (87.0)	84.1 (87.0)	85.7 (95.1)	84.1 (87.1)
<i>Bradyrhizobium</i> sp. CPP	86.9 (90.1)	92.4 (98.0)	84.5 (90.6)	83.8 (90.6)	87.0 (93.8)	86.5 (92.2)	83.8 (90.6)	86.2 (93.8)	84.6 (83.3)	84.5 (85.2)	84.2 (85.2)	84.6 (92.5)	83.5 (85.9)
cloneF42	85.2 (91.0)	84.6 (92.3)	85.5 (93.1)	85.0 (92.4)	84.3 (91.6)	83.6 (89.3)	86.0 (93.9)	89.0 (94.7)	82.6 (83.9)	84.1 (87.0)	84.1 (87.0)	83.6 (94.3)	82.4 (87.8)
cloneF24	82.1 (90.4)	82.1 (92.4)	82.8 (91.6)	83.1 (91.6)	82.1 (93.9)	81.4 (91.6)	82.8 (91.6)	81.9 (92.4)	80.9 (81.7)	82.4 (85.5)	82.4 (85.5)	82.3 (93.5)	82.4 (86.3)
R42c	82.0 (88.5)	81.4 (87.7)	84.2 (89.6)	84.5 (90.0)	80.6 (86.6)	80.4 (85.4)	84.0 (90.4)	81.9 (89.6)	76.1 (79.6)	77.8 (82.6)	77.9 (82.2)	95.8 (99.6)	77.7 (82.6)
<i>M.acidiphila</i> B2	80.6 (82.5)	83.1 (87.2)	84.4 (88.1)	83.9 (88.1)	84.1 (91.5)	83.6 (89.8)	84.1 (88.1)	86.8 (89.8)	79.4 (82.5)	81.5 (85.6)	81.2 (84.7)	85.6 (90.9)	79.8 (85.6)
<i>R.palustris</i> DCP3	86.2 (91.6)	87.0 (91.6)	85.8 (91.5)	86.0 (91.5)	86.3 (92.3)	85.5 (90.0)	85.5 (91.5)	88.2 (93.1)	82.3 (82.6)	86.0 (86.9)	85.8 (86.9)	86.5 (93.4)	84.8 (87.7)

	<i>O.carboxid.</i> OM5	<i>Aminobacter</i> sp. COX	<i>Bradyrhizobium</i> sp. CPP	cloneF42	cloneF24	R42c	<i>M.acidiphila</i> B2
<i>Aminobacter</i> sp. COX	85.4 (93.2)						
<i>Bradyrhizobium</i> sp. CPP	88.7 (97.2)	87.2 (93.4)					
cloneF42	83.7 (93.2)	85.1 (94.1)	84.6 (93.3)				
cloneF24	81.7 (93.8)	81.2 (92.9)	82.7 (94.7)	83.5 (91.7)			
R42c	83.4 (93.1)	84.6 (95.4)	83.0 (93.0)	83.3 (93.9)	81.9 (93.9)		
<i>M.acidiphila</i> B2	83.0 (90.2)	85.7 (90.8)	84.1 (90.8)	82.7 (89.5)	81.1 (88.9)	84.1 (91.5)	
<i>R.palustris</i> DCP3	85.0 (94.5)	88.8 (94.8)	86.9 (92.0)	88.1 (96.1)	83.1 (92.2)	85.3 (93.8)	86.2 (90.8)

¹ Nukleinsäureähnlichkeiten in %

² Aminosäureähnlichkeiten in %

G.4. Distanzmatrix der 'red-like' *cbbL*¹ (CbbL²)-Sequenzen des Clusters RIV aus Abb. C.16

	<i>Nitrosospira</i> sp. AF	HKOR32D	HKOR3D	HKOR89	HKOR100	R40c	cloneF36	R46c	R45c
HKOR32D	84.9 (95.5)								
HKOR3D	83.9 (96.1)	100 (100)							
HKOR89	83.7 (96.1)	99.9 (99.6)	99.8 (99.6)						
HNPKR100	83.7 (95.3)	99.7 (99.6)	99.8 (99.6)	99.5 (99.2)					
R40c	83.4 (94.5)	99.6 (98.7)	99.6 (98.9)	99.4 (98.5)	99.4 (98.5)				
cloneF36	82.4 (94.1)	88.9 (94.6)	88.0 (95.4)	87.7 (95.4)	87.7 (94.7)	87.5 (93.9)			
R46c	83.7 (95.3)	100 (100)	99.9 (99.6)	99.6 (99.2)	99.6 (99.2)	99.5 (98.5)	87.7 (94.7)		
R45c	80.7 (92.9)	80.9 (90.6)	81.0 (91.6)	80.7 (91.2)	80.9 (90.9)	80.5 (90.4)	85.3 (94.7)	80.9 (91.2)	
R43c	83.4 (94.5)	99.7 (99.1)	99.8 (99.2)	99.5 (98.9)	99.5 (98.9)	99.4 (98.1)	87.5 (93.9)	99.6 (98.9)	80.6 (90.8)

¹ Nukleinsäureähnlichkeiten in %

² Aminosäureähnlichkeiten in %

G.5. Distanzmatrix der 'red-like' *cbbL*¹ (CbbL²)-Sequenzen des Clusters RV aus Abb. C.16

	HSMR12	HSMR46	HNPKR16	HKOR6	HKOR13	R33c	<i>Burkholderia</i> sp. LUP	R32c	cloneF23
HSMR46	80.0 (79.9)								
HNPKR16	80.1 (80.7)	80.0 (83.7)							
HKOR6	84.7 (86.3)	80.4 (79.8)	80.7 (81.7)						
HKOR13	80.1 (79.8)	81.7 (82.8)	82.1 (82.5)	79.8 (78.5)					
R33c	80.1 (80.7)	80.0 (83.7)	100 (100)	80.7 (81.7)	82.1 (82.5)				
<i>Burkholderia</i> sp. LUP	78.0 (77.3)	83.1 (87.1)	79.7 (86.5)	78.0 (83.2)	82.2 (87.1)	79.7 (86.5)			
R32c	80.9 (80.2)	80.1 (84.4)	93.6 (97.0)	82.0 (83.5)	82.6 (83.2)	93.6 (97.0)	80.4 (87.2)		
cloneF23	83.6 (85.6)	80.4 (87.9)	78.2 (84.1)	86.3 (91.6)	79.4 (83.2)	78.2 (84.1)	76.0 (83.9)	80.1 (87.1)	
cloneF26	78.9 (75.6)	81.6 (85.5)	78.9 (84.8)	76.7 (82.3)	81.4 (84.0)	78.9 (84.8)	90.3 (94.2)	80.4 (85.6)	76.6 (83.4)

G. 6 Distanzmatrix ausgewählter 'green-like' *cbbL*¹ (*CbbL*²)-Sequenzen aus Abb. C.13

¹ Nukleinsäureähnlichkeiten in %

² Aminosäureähnlichkeiten in %

	<i>N. winogr.</i> IFO14297	<i>N. winogr.</i> ATCC14123	<i>N. vulgaris</i>	HNPKG73	HNPKG13	HNPKG52	HNPKG69	HNPKG75	HNPKG101	HNPKG117	HKOG1	HKOG3	HKOG12
<i>N. winogradskyi</i> ATCC	99.2 (98.7)												
<i>N. vulgaris</i>	93.2 (98.0)	93.3 (98.5)											
HNPKG73	92.4 (98.8)	92.3 (99.1)	96.3 (99.1)										
HNPKG13	92.2 (98.2)	92.1 (98.5)	96.1 (98.5)	99.6 (99.4)									
HNPKG52	93.4 (98.5)	93.3 (98.8)	97.3 (98.8)	97.4 (99.7)	97.2 (99.1)								
HNPKG69	92.5 (98.8)	92.4 (99.1)	96.4 (99.1)	100 (100)	99.7 (99.4)	97.5 (99.7)							
HNPKG75	90.2 (97.0)	90.3 (97.3)	90.6 (96.7)	90.9 (97.6)	90.7 (97.0)	91.1 (97.3)	91.0 (97.6)						
HNPKG101	92.4 (98.5)	92.3 (98.8)	96.3 (98.8)	99.8 (99.7)	99.6 (99.1)	97.4 (99.4)	100 (99.7)	90.9 (97.3)					
HNPKG117	92.5 (98.8)	92.4 (99.1)	96.4 (99.1)	100 (100)	99.7 (99.4)	97.5 (99.7)	100 (100)	91.0 (97.6)	100 (99.7)				
HKOG1	93.8 (98.5)	93.7 (98.8)	97.5 (98.8)	96.2 (99.7)	96.0 (99.1)	96.9 (99.4)	96.3 (99.7)	91.0 (97.6)	96.2 (99.4)	96.3 (99.7)			
HKOG3	93.8 (98.2)	93.7 (98.5)	97.6 (98.5)	96.2 (99.4)	96.0 (98.8)	97.0 (99.1)	96.3 (99.4)	91.0 (97.0)	96.2 (99.1)	96.3 (99.4)	99.5 (99.1)		
HKOG12	93.7 (97.9)	93.6 (98.2)	97.4 (98.2)	96.0 (99.1)	95.8 (98.5)	96.8 (98.8)	96.1 (99.1)	90.9 (96.7)	96.0 (98.8)	96.1 (99.1)	99.3 (98.8)	99.4 (98.5)	
HKOG13	93.6 (98.5)	93.5 (98.8)	97.4 (98.8)	96.2 (99.7)	96.0 (99.1)	97.0 (99.4)	96.3 (99.7)	91.4 (97.3)	96.2 (99.4)	96.3 (99.7)	99.3 (99.4)	99.4 (99.1)	99.2 (98.8)
HNPKG122	92.4 (98.5)	92.3 (98.8)	96.3 (98.8)	99.8 (99.7)	99.6 (99.1)	97.4 (99.4)	100 (99.7)	90.9 (97.3)	99.8 (99.4)	100 (99.7)	96.2 (99.4)	96.2 (99.1)	96.0 (98.8)
HNPKG128	92.2 (97.9)	92.1 (98.2)	96.1 (98.2)	99.6 (99.1)	99.4 (98.5)	97.2 (98.8)	99.7 (99.1)	90.7 (96.7)	99.6 (98.8)	99.7 (99.1)	96.0 (98.8)	96.0 (98.5)	95.8 (98.2)
HNPKG131	92.5 (98.8)	92.4 (99.1)	96.4 (99.1)	100 (100)	99.7 (99.4)	97.5 (99.7)	100 (100)	91.0 (97.6)	100 (99.7)	100 (100)	96.3 (99.7)	96.3 (99.4)	96.1 (99.1)
HKOG21	93.9 (98.8)	93.8 (99.1)	97.7 (99.1)	96.3 (100)	96.1 (99.4)	97.1 (99.7)	96.4 (100)	91.3 (97.6)	96.3 (99.7)	96.4 (100)	99.6 (99.7)	99.7 (99.4)	99.5 (99.1)
HKOG26	93.9 (98.2)	93.8 (98.5)	97.6 (98.5)	96.2 (99.4)	96.0 (98.8)	97.0 (99.1)	96.3 (99.4)	91.0 (97.0)	96.2 (99.1)	96.3 (99.4)	99.5 (99.1)	99.6 (98.8)	99.4 (98.5)
HKOG30	93.8 (98.5)	93.7 (98.8)	97.5 (98.8)	96.2 (99.7)	96.0 (99.1)	96.9 (99.4)	96.3 (99.7)	91.0 (97.6)	96.2 (99.4)	96.3 (99.7)	100 (100)	99.5 (99.1)	99.3 (98.8)
HKOG32	93.8 (98.2)	93.7 (98.5)	97.6 (98.5)	96.2 (99.4)	96.0 (98.8)	97.0 (99.1)	96.3 (99.4)	91.0 (97.0)	96.2 (99.1)	96.3 (99.4)	99.5 (99.1)	100 (100)	99.4 (98.5)
HKOG34	94.1 (98.5)	94.0 (98.8)	97.5 (98.8)	96.3 (99.7)	96.1 (99.1)	97.1 (99.4)	96.4 (99.7)	91.1 (97.3)	96.3 (99.4)	96.4 (99.7)	99.4 (99.4)	99.5 (99.1)	99.3 (98.8)
HKOG37	94.1 (98.8)	94.0 (99.1)	97.7 (99.1)	96.3 (100)	96.1 (99.4)	97.1 (99.7)	96.4 (100)	91.1 (97.6)	96.3 (99.7)	96.4 (100)	99.6 (99.7)	99.7 (99.4)	99.5 (99.1)
HKOG38	94.1 (98.8)	94.0 (99.1)	97.7 (99.1)	96.3 (100)	96.1 (99.4)	97.1 (99.7)	96.4 (100)	91.1 (97.6)	96.3 (99.7)	96.4 (100)	99.6 (99.7)	99.7 (99.4)	99.5 (99.1)
HKOG49	93.9 (98.5)	93.8 (98.8)	97.7 (98.8)	96.3 (99.7)	96.1 (99.1)	97.1 (99.4)	96.4 (99.7)	91.1 (97.3)	96.3 (99.4)	96.4 (99.7)	99.6 (99.4)	99.7 (99.1)	99.5 (98.8)
HNPKG155	92.5 (98.8)	92.4 (99.1)	96.4 (99.1)	100 (100)	99.7 (99.4)	97.5 (99.7)	100 (100)	91.0 (97.6)	100 (99.7)	100 (100)	96.3 (99.7)	96.3 (99.4)	96.1 (99.1)
HNPKG2	92.4 (98.5)	92.3 (98.8)	96.3 (98.8)	99.8 (99.7)	99.6 (99.1)	97.4 (99.4)	100 (99.7)	90.9 (97.3)	99.8 (99.4)	100 (99.7)	96.2 (99.4)	96.2 (99.1)	96.0 (98.8)

	HKOG13	HNPKG122	HNPKG128	HNPKG131	HKOG21	HKOG30	HKOG30	HKOG32	HKOG34	HKOG37	HKOG38	HKOG49	HNPKG155
HNPKG122	96.2 (99.4)												
HNPKG128	96.0 (98.8)	99.6 (98.8)											
HNPKG131	96.3 (99.7)	100 (99.7)	99.7 (99.1)										
HKOG21	99.5 (99.7)	96.3 (99.7)	96.1 (99.1)	96.4 (100)									
HKOG26	99.4 (99.1)	96.2 (99.1)	96.0 (98.5)	96.3 (99.4)	99.7 (99.4)								
HKOG30	99.3 (99.4)	96.2 (99.4)	96.0 (98.8)	96.3 (99.7)	99.6 (99.7)	99.5 (99.1)							
HKOG32	99.4 (99.1)	96.2 (99.1)	96.0 (98.5)	96.3 (99.4)	99.7 (99.4)	99.6 (98.8)	99.5 (99.1)						
HKOG34	99.3 (99.4)	96.3 (99.4)	96.1 (98.8)	96.4 (99.7)	99.6 (99.7)	99.6 (99.1)	99.4 (99.4)	99.5 (99.1)					
HKOG37	99.5 (99.7)	96.3 (99.7)	96.1 (99.1)	96.4 (100)	99.8 (100)	99.7 (99.4)	99.6 (99.7)	99.7 (99.4)	99.6 (99.7)				
HKOG38	99.5 (99.7)	96.3 (99.7)	96.1 (99.1)	96.4 (100)	99.8 (100)	99.7 (99.4)	99.6 (99.7)	99.7 (99.4)	99.6 (99.7)	100 (100)			
HKOG49	99.5 (99.4)	96.3 (99.4)	96.1 (98.8)	96.4 (99.7)	99.8 (99.7)	99.7 (99.1)	99.6 (99.4)	99.7 (99.1)	99.6 (99.4)	99.8 (99.7)	99.8 (99.7)		
HNPKG155	96.3 (99.7)	100 (99.7)	99.7 (99.1)	100 (100)	96.4 (100)	96.3 (99.4)	96.3 (99.7)	96.3 (99.4)	96.4 (99.7)	96.4 (100)	96.4 (100)	96.4 (99.7)	
HNPKG2	96.2 (99.4)	99.8 (99.4)	99.6 (98.8)	100 (99.7)	96.3 (99.7)	96.2 (99.1)	96.2 (99.4)	96.2 (99.1)	96.3 (99.4)	96.3 (99.7)	96.3 (99.7)	96.3 (99.4)	100 (99.7)

G.7. Distanzmatrix der 16S rDNA-Sequenzen aus Abb. C.17

	<i>B.flexus</i>	<i>B.weihe</i>	<i>S.panay.</i>	<i>S.bobili</i>	<i>S.galilaeus</i>	<i>A.chloroph.</i>	<i>B.thuring.</i>	<i>B.macroides</i>	<i>A.sp</i>	RapRhi11	<i>S.indig.r</i>	<i>S.chart.</i>	<i>S.pseudov.</i>	<i>B.megat.</i>	<i>B.simplex</i>	<i>S.lincol.</i>	<i>A.globif.</i>
<i>B.weihensteph.</i>	95,																
<i>S.panayensis</i>	81,2	81,1															
<i>S.bobili</i>	81,3	81,5	98,3														
<i>S.galilaeus</i>	81,4	81,6	98,2	99,9													
<i>A.chlorophenol.</i>	79,6	80,8	90,4	90,7	90,8												
<i>B.thuringiensis</i>	94,9	99,3	80,9	81,4	81,5	81,0											
<i>B.macroides</i>	95,4	93,9	80,3	80,7	80,8	80,2	94,4										
<i>A.sp</i>	79,5	80,8	89,5	90,0	90,0	98,0	80,8	79,9									
RapRhi11	79,8	81,3	89,6	90,1	90,0	96,8	81,5	80,5	97,7								
<i>S.indigocolor</i>	81,1	81,2	99,2	98,5	98,5	90,7	81,1	80,5	89,7	89,7							
<i>S.chartreusis</i>	81,0	81,3	98,2	99,3	99,2	90,5	81,2	80,6	89,6	89,7	98,3						
<i>S.pseudov.</i>	81,4	81,4	98,7	99,2	99,3	90,5	81,3	81,0	89,7	89,7	99,2	99,1					
<i>B.megaterium</i>	99,2	95,1	81,7	81,9	82,0	80,5	95,0	95,9	80,2	80,4	81,7	81,8	81,9				
<i>B.simplex</i>	95,6	94,3	82,0	82,2	82,2	81,6	94,7	99,9	81,0	81,6	81,9	81,8	82,2	95,9			
<i>S.lincol.</i>	81,3	81,6	98,7	98,0	98,0	90,6	81,3	80,4	89,7	89,5	98,5	97,8	98,4	81,9	82,2		
<i>A.globiformis</i>	80,0	81,4	90,3	91,2	91,1	96,9	81,8	80,9	97,4	98,5	90,5	90,6	90,9	80,9	82,2	90,4	
<i>A.pascens</i>	80,3	81,5	90,5	91,3	91,2	97,0	81,8	80,8	97,6	98,3	90,6	90,7	91,0	81,2	82,3	90,5	99,3
<i>A.ramosus</i>	80,3	81,5	90,5	91,3	91,2	97,0	81,8	80,8	97,6	98,3	90,6	90,7	91,0	81,2	82,3	90,5	99,3
<i>B.cereus</i>	95,0	99,7	80,7	81,1	81,2	80,5	99,2	93,8	80,4	81,0	81,0	81,1	81,2	95,0	94,1	80,8	81,0
UncSoil4	98,6	94,3	80,3	80,6	80,7	79,4	94,2	95,2	79,4	79,7	80,2	80,5	80,5	99,6	95,5	80,3	79,7
UncSoil7	95,2	93,8	80,2	80,6	80,7	80,0	94,1	99,7	80,1	80,8	80,3	80,3	80,7	95,7	99,6	80,3	80,7
R25S	95,3	93,9	80,3	80,7	80,8	79,8	94,1	99,5	79,8	80,3	80,2	80,3	80,7	95,6	99,5	80,9	80,5
R33S	81,0	82,1	90,9	91,5	91,4	97,5	82,1	81,3	97,4	98,0	91,1	91,2	91,2	81,5	82,8	91,2	97,9
R39S	95,2	99,7	81,0	81,4	81,4	80,6	99,0	93,8	80,7	81,2	81,0	81,2	81,3	94,9	94,1	81,6	81,3
R40S	80,0	81,6	90,2	91,1	91,1	96,5	81,7	80,7	96,7	97,7	90,5	90,5	90,8	80,7	82,2	90,4	99,1
R45S	80,3	81,7	90,4	91,3	91,3	96,8	81,9	80,8	97,1	97,8	90,7	90,7	91,0	80,9	82,3	90,7	99,4
R47S	80,3	81,8	90,4	91,2	91,2	96,7	81,9	80,8	97,1	98,0	90,6	90,7	91,0	81,0	82,3	90,6	99,5
R21S	95,5	94,0	80,5	80,9	81,0	80,1	94,2	99,7	80,0	80,6	80,5	80,6	80,9	95,9	99,7	81,1	80,7
R32S	95,4	99,7	81,2	81,6	81,7	80,7	99,2	93,8	80,7	81,3	81,1	81,4	81,4	95,1	94,3	81,7	81,4
R36S	80,5	81,7	90,6	91,5	91,4	96,8	81,7	80,7	96,7	97,2	91,0	91,0	91,2	81,1	82,3	90,9	98,0
R37S	95,2	99,5	81,0	81,5	81,6	80,6	99,3	93,7	80,7	81,2	81,2	81,3	81,4	95,0	94,1	81,7	81,3
R42S	95,2	99,5	80,8	81,3	81,4	80,6	99,1	93,9	80,6	81,1	81,0	81,1	81,2	95,2	94,3	81,4	81,1
R46S	81,5	81,6	98,6	98,9	98,9	90,6	81,4	80,6	90,1	89,8	99,0	98,8	99,5	82,1	82,3	98,3	90,7
R43S	98,7	94,4	80,9	81,1	81,1	79,5	94,2	95,1	79,4	79,7	80,8	80,9	81,1	99,7	95,4	81,2	79,9

G.8. Fortsetzung von G.7

	<i>A.pascens</i>	<i>A.ramosus</i>	<i>B.cereus</i>	UncSoil4	UncSoil7	R25S	R33S	R39S	R40S	R45S	R47S	R21S	R32S	R36S	R37S	R42S	R46S
<i>A.ramosus</i>	100																
<i>B.cereus</i>	81,1	81,1															
UncSoil4	79,9	79,9	94,3														
UncSoil7	80,6	80,6	93,7	95,0													
R25S	80,6	80,6	93,5	94,9	99,5												
R33S	98,0	98,0	81,3	80,2	81,1	81,6											
R39S	81,4	81,4	99,5	94,2	93,7	93,8	82,1										
R40S	98,4	98,4	80,9	79,4	80,6	80,9	97,4	81,6									
R45S	98,8	98,8	81,0	79,6	80,6	81,1	97,7	81,8	98,9								
R47S	98,8	98,8	81,1	79,6	80,6	81,0	97,7	81,8	99,1	99,3							
R21S	80,8	80,8	93,7	95,2	99,7	99,6	81,8	94,0	81,1	81,3	81,2						
R32S	81,5	81,5	99,5	94,3	93,7	93,8	82,3	99,4	81,8	81,9	82,0	94,0					
R36S	98,3	98,3	81,0	79,7	80,5	81,0	98,0	81,8	97,4	97,8	97,8	81,2	81,9				
R37S	81,5	81,4	99,3	94,2	93,6	93,8	82,2	99,2	81,6	81,8	81,9	93,9	99,4	81,8			
R42S	81,2	81,2	99,4	94,4	93,7	93,8	82,0	99,2	81,6	81,6	81,8	94,0	99,4	81,6	99,4		
R46S	90,9	90,9	80,9	80,5	80,7	81,2	91,3	81,6	90,9	91,1	91,1	81,4	81,7	91,2	81,8	81,6	
R43S	80,2	80,2	94,2	99,5	95,0	95,0	81,1	94,4	80,2	80,4	80,4	95,3	94,5	80,7	94,4	94,5	81,4

An dieser Stelle gilt mein herzlicher Dank:

Herrn Prof. Dr. Anton Hartmann für die Bereitstellung eines sehr interessanten und spannenden Themas, die Diskussionsbereitschaft, sowie die Gewährung eines großen forschersischen Freiraums.

Herrn Prof. Dr. Jörg Overmann für die Korrektur und Erstellung des Zweitgutachtens.

Dr. Michael Schmid für die unermüdliche Unterstützung und Geduld in wissenschaftlichen und privaten Angelegenheiten, die zahlreichen aufbauenden Gespräche, sowie für die Einführung in die bayerische Redens- und Lebensart. „Außengeländer“ bedankt sich für „Maus“.

Dr. Michael Rothballer für die fabelhafte Zeit und Arbeitsatmosphäre, seine unbeirrte Ruhe und Gutmütigkeit, sowie seine stetige Geduld mit mir als Bürogenossin. Wir sind der beste Beweis dafür, dass auch zwei völlig unterschiedliche Welten eine harmonische Einheit bilden können.

Meinen „Küken“ Isabelle Pattis und Susanne Stein für die tolle Zusammenarbeit, ihr unermüdliches Engagement, sowie ihre unendliche Geduld den Gasfluss ständig unter Kontrolle habend. Ich danke Euch für die vielen netten Stunden auch außerhalb des Labors.

Dr. Stephan Gantner für seine Hilfsbereitschaft und seine unglaubliche Fähigkeit, aus einer Mücke einen Elefanten zu machen. Und man spritzt es sich immer noch nicht...

Angelika Schulz für ihre Freundlichkeit und die geleistete Hilfe, sowie ihr Durchhaltevermögen im Kampf gegen PCR-Kontaminanten.

Unseren Diplomanden Christine Dürr, Valerie Albrecht, Ilona Klein, Stefan Kutter, Brigitte Hai und Michael Rohe für das entspannte Arbeitsklima und den Spaß im Laboralltag.

Allen Mitarbeitern des IBÖs für das angenehme Arbeitsklima.

Frau Prof. Dr. Ellen Kandeler und ihrer Arbeitsgruppe für die Herstellung der Partikelgrößenfraktionierungen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für die Finanzierung dieses Projekts.

Mein aufrichtiger Dank geht an meine Eltern deren Unterstützung und Rückhalt mir erst diese Ausbildung ermöglicht hat.

Meinen Geschwistern danke ich für ihre Unterstützung und ihr Verständnis, sowie ihr unerschöpfliches Bemühen den Kontakt mit mir in der Ferne aufrecht zu erhalten.

Letztlich danke ich all meinen Freunden, die ich in letzter Zeit sehr vernachlässigt habe, die aber immer zu mir gestanden haben, für ihr Verständnis, ihre Herzlichkeit und Freundlichkeit.

Lebenslauf

Name: Draženka Selesi
geboren am 15.10.1972 in Neuss

Schulbildung

1980 – 1984 Gebrüder-Grimm Grundschule in Neuss
1984 – 1993 Theodor-Schwann Gymnasium in Neuss
Mai 1993 Abitur

Studium

1993 – 1996 Grundstudium der Biologie an der TU Darmstadt
SS 1996 Vordiplom
1996 - 2000 Hauptstudium mit Schwerpunkt Mikrobiologie,
Nebenfächer: Biochemie, Immunologie, Organische Chemie
1999-2000 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie und Genetik mit
dem Thema: „Phylogenetische Diversität nicht kultivierter
Archaea und *Bacteria* in hessischen Sandökosystemen“
Februar 2000 Diplom

Promotion

Okt. 2000 – April 2004 Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Lehrstuhl für
Mikrobiologie der LMU München, durchgeführt am GSF-
Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Institut für
Bodenökologie, Abteilung Rhizosphärenbiologie in der
Arbeitsgruppe Pflanzen-Mikroorganismen-Interaktion
Leiter: Prof. Dr. Anton Hartman