

**Molekularbiologische Charakterisierung von
sulfatreduzierenden Bakterien in Umweltproben
unter den Aspekten Diversität und Aktivität**

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

dem Fachbereich Biologie/Chemie der
Universität Bremen
vorgelegt von

Cathrin Wawer

August 1996

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 1993 bis Juni 1996 am Max-Planck-Institut für Marine Mikrobiologie in Bremen angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. F. Widdel
2. Gutachter: Prof. Dr. A. Hildebrandt

Tag des Promotionskolloquiums: 22.10.1996

Berichte aus der Biologie

Cathrin Wawer

**Molekularbiologische Charakterisierung von
sulfatreduzierenden Bakterien in Umweltproben
unter den Aspekten Diversität und Aktivität**

D 46 (Diss. Universität Bremen)

Shaker Verlag
Aachen 1997

Die Deutsche Bibliothek - CIP-Einheitsaufnahme

Wawer, Cathrin:

Molekularbiologische Charakterisierung von sulfatreduzierenden Bakterien in
Umweltproben unter den Aspekten Diversität und Aktivität/Cathrin Wawer.

- Als Ms. gedr. -

Aachen : Shaker, 1997

(Berichte aus der Biologie)

Zugl.: Bremen, Univ., Diss., 1996

ISBN 3-8265-2328-8

Copyright Shaker Verlag 1997

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen
oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungs-
anlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Als Manuskript gedruckt. Printed in Germany.

ISBN 3-8265-2328-8

ISSN 0945-0688

Shaker Verlag GmbH • Postfach 1290 • 52013 Aachen

Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9

Internet: www.shaker.de • eMail: info@shaker.de

Summary

So far, most attention in molecular microbial ecological studies has focused on the exploration of microbial diversity. Knowledge concerning the activities of members in a microbial community is, however, of equal importance. This study presents a molecular approach to determine the genetic diversity and activity of different *Desulfovibrio* strains in microbial communities by separation of PCR-amplified [NiFe] hydrogenase nucleotide sequences using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) or agarose gel electrophoresis with DNA ligands. Sulfate-reducing bacteria of the genus *Desulfovibrio* are essential members of microbial communities in a variety of anaerobic environments. All species so far studied contain the [NiFe] hydrogenase gene which plays an important but not yet completely understood role in their energy metabolism.

As a first step a specific PCR-based detection system was established. After comparative analysis of [NiFe] hydrogenase gene sequences from three *Desulfovibrio* species five different PCR primers were designed. The specificity of these primers were tested using genomic DNA of a great variety of hydrogenase-containing and hydrogenase-lacking bacteria. One primer pair, flanking a region of 440 bp within the gene encoding the large subunit of the [NiFe] hydrogenase, was found to be specific for *Desulfovibrio* species only and was subsequently used to amplify *Desulfovibrio* hydrogenase gene sequences from environmental samples, such as anaerobic bioreactors and microbial mats. After DGGE analysis the number of different *Desulfovibrio* strains within the sample could be determined. DNA sequencing and comparative sequence analysis was used to identify the *Desulfovibrio* species based on their [NiFe] hydrogenase sequences. The genes of known *Desulfovibrio* spp. showed a considerable extent of divergence (ca. 30%), whereas sequences obtained from bacterial populations of anaerobic bioreactors showed a low level of variation. Thus, indicating the coexistence of closely related *Desulfovibrio* strains. DGGE patterns and sequences of PCR products obtained from microbial mats indicate a greater genetic diversity of the *Desulfovibrio* population.

Metabolically active species in natural populations were shown using DGGE analysis of RT-PCR-amplified [NiFe] hydrogenase mRNA sequences. Experiments were first carried out with *Desulfovibrio* cultures to follow the expression of this gene during growth. Transcripts were detectable in exponentially growing bacterial cells, but not in cultures of the stationary growth phase. The expression of the [NiFe] hydrogenase gene from *Desulfovibrio* species was examined in bacterial populations of different anaerobic bioreactors which contained similar *Desulfovibrio* strains. Under methanogenic conditions all detected populations were active; under denitrifying conditions no [NiFe] hydrogenase mRNA was visible. Changes in activity and composition of *Desulfovibrio* populations caused by changes of the environmental conditions were monitored using the approach described in this study.

The molecular genetic characterization of complex microbial communities was extended to the analysis of additional bacterial populations. The vertical distribution of sulfate-reducing bacteria were investigated in a stratified fjord (Mariager Fjord, Denmark) by DGGE of PCR-amplified eubacterial 16S rRNA sequences with prior synthesis of cDNA and DNA sequences encoding 16S rRNA (rDNA). The electrophoresis pattern

indicated specific bacterial populations in different water column layers and revealed a highly differentiated pattern of rRNA- and rDNA-derived PCR products, probably reflecting the active and resting bacterial populations. Hybridization of DGGE patterns with 16S rRNA-targeted probes indicated the increased presence and activity of sulfate-reducing bacteria within and below the chemocline. [NiFe] hydrogenase gene sequences of *Desulfovibrio* spp. were only detected in the anoxic bottom water; [NiFe] hydrogenase mRNA was not detectable.

Molecular approaches are useful tools to examine microbial diversity and activity in natural populations. Investigating the presence and expression of genes in parallel, as described in this study, will help to define the role of specific genes in complex biological processes and to understand the function of the corresponding bacteria in nature.

Zusammenfassung

Bisher nutzte man molekularbiologische Methoden in der mikrobiellen Ökologie überwiegend, um die mikrobielle Diversität aufzuzeigen. Ebenso bedeutend ist jedoch auch eine Kenntnis über die Stoffwechselaktivitäten der Mitglieder natürlicher mikrobieller Gemeinschaften. In der vorliegenden Arbeit wird eine molekularbiologische Herangehensweise vorgestellt, mit der sowohl die genetische Diversität als auch die Aktivität der verschiedenen *Desulfovibrio*-Stämme in Umweltproben ohne vorherige Kultivierung der Organismen bestimmt werden kann. Sie basiert auf der sequenzabhängigen Auftrennung PCR-amplifizierter [NiFe] Hydrogenase-Sequenzen mittels denaturierender Gradientengelelektrophorese (DGGE) oder Agarosegelelektrophorese mit DNA-Liganden. Sulfatreduzierende Bakterien der Gattung *Desulfovibrio* sind wichtige Mitglieder mikrobieller Gemeinschaften in vielen anaeroben Biotopen. Alle bisher untersuchten Stämme codieren eine [NiFe] Hydrogenase, die eine bedeutende, aber noch nicht vollständig verstandene Rolle in deren Energiestoffwechsel spielt.

Ein PCR-Test, mit dem spezifisch die Genfragmente von *Desulfovibrio* spp. amplifiziert werden konnten, wurde zum Nachweis dieser Bakteriengruppe entwickelt. Fünf verschiedene PCR-Primer wurden anhand der vergleichenden Analyse der [NiFe] Hydrogenase-Gene von drei *Desulfovibrio* spp. ermittelt. Die Spezifität dieser Primer wurde mit der genomischen DNA einer großen Vielfalt von Bakterienstämmen getestet. Ein Primerpaar, das eine Region von etwa 440 bp innerhalb des Gens für die große Untereinheit der [NiFe] Hydrogenase flankiert, erwies sich als spezifisch für die Gattung *Desulfovibrio*. Es wurde verwendet, um *Desulfovibrio* [NiFe] Hydrogenase-Gensequenzen in Umweltproben, wie anaeroben Bioreaktoren und mikrobiellen Matten, zu amplifizieren. Die anschließende DGGE Analyse der PCR-Produkte visualisierte die einzelnen Stämme der nachgewiesenen *Desulfovibrio*-Populationen. Diese wurden anhand des [NiFe] Hydrogenase-Gens mittels DNA-Sequenzierung und vergleichender Sequenzanalysen identifiziert. Dabei zeigte sich, daß die partiellen Gensequenzen charakterisierter *Desulfovibrio* spp. beträchtlich divergierten, und Unterschiede von durchschnittlich ca. 30% aufwiesen, während die Sequenzen, die aus anaeroben Bioreaktoren gewonnen wurden, nur geringe Variationen zeigten; ein Hinweis auf die Coexistenz eng verwandter *Desulfovibrio*-Stämme in diesen Habitaten. In mikrobiellen Matten deuten die DGGE-Muster und bisher ermittelten Sequenzen von PCR-Produkten auf eine größere genetische Diversität der *Desulfovibrio*-Population hin.

Metabolisch aktive Bakterienstämme wurden in natürlichen Populationen über die DGGE Analyse RT-PCR-amplifizierter [NiFe] Hydrogenase-mRNA-Sequenzen aufgezeigt. Experimente wurden zunächst mit *Desulfovibrio*-Reinkulturen durchgeführt, um die Expression des Gens während des Wachstums unter sulfatreduzierenden Bedingungen zu verfolgen. In exponentiell wachsenden Bakterienzellen war das Transkript nachweisbar, in Kulturen der stationären Wachstumsphase jedoch nicht. Die Expression des [NiFe] Hydrogenase-Gens wurde in Bakterienpopulationen verschiedener anaerober Bioreaktoren, die ähnliche *Desulfovibrio*-Stämme enthielten, untersucht. Unter methanogenen Bedingungen waren die nachweisbaren *Desulfovibrio*-Stämme metabolisch aktiv; unter denitrifizierenden Bedingungen konnte keine [NiFe] Hydrogenase-

mRNA aufgezeigt werden. Veränderungen der Aktivität und Zusammensetzung der *Desulfovibrio*-Populationen, die durch Änderungen der Umweltbedingungen hervorgerufen wurden, konnten mit der beschriebenen Herangehensweise verfolgt werden.

Die molekulargenetische Charakterisierung von komplexen mikrobiellen Lebensgemeinschaften erstreckte sich auf die Analyse weiterer Bakterienpopulationen. So wurde die vertikale Verteilung sulfatreduzierender Bakterien in einer stratifizierten Wassersäule (Mariager Fjord, Dänemark) über die DGGE Analyse PCR-amplifizierter, eubakterieller 16S rRNA-Sequenzen, die zuvor in cDNA umgeschrieben wurden, und 16S rRNA codierender DNA (rDNA)-Sequenzen untersucht. Die erhaltenen Elektrophoresemuster weisen darauf hin, daß spezifische bakterielle Populationen in verschiedenen Wasserschichten auftraten. Sie zeigten recht unterschiedliche Muster der PCR-Produkte ausgehend von rRNA bzw. rDNA, die wahrscheinlich die aktiven bzw. die ruhenden Bakterienpopulationen repräsentieren. Die Hybridisierung der DGGE-Muster mit 16S rRNA-gerichteten Sonden zeigte eine zunehmende Präsenz und Aktivität sulfatreduzierender Bakterien innerhalb und unterhalb der Chemokline an. *Desulfovibrio* spp. wurden ausschließlich im anoxischen Tiefenwasser anhand ihrer [NiFe] Hydrogenase-Gene detektiert; [NiFe] Hydrogenase-mRNA war nicht nachweisbar.

Molekularbiologische Herangehensweisen sind nützlich, um die mikrobielle Diversität und Aktivität in natürlichen Populationen zu studieren. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Herangehensweise, parallel sowohl die vorhandenen Gene als auch deren Expression zu untersuchen, kann dazu beitragen, die Rolle spezifischer Gene und damit die Funktion der zugehörigen Bakterienpopulationen in komplexen biologischen Lebensgemeinschaften zu definieren.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Mikrobielle Diversität	2
1.2	Mikrobielle Aktivität	3
1.3	Sulfatreduzierende Bakterien	5
1.3.1	Physiologie	5
1.3.2	Ökologie	6
1.3.3	Klassifizierung	8
1.3.4	Nachweis und Identifizierung	10
1.4	Hydrogenasen	13
1.5	Strategie	18
2	Material und Methoden	23
2.1	Chemikalien und Gase	23
2.2	Mikrobiologische Methoden	23
2.2.1	Bakterienstämme und Kulturbedingungen	23
2.2.2	Wachstumsversuche	27
2.2.3	Anreicherung und Isolierung von Bakterien	28
2.3	Molekularbiologische Methoden	28
2.3.1	Isolierung von Nukleinsäuren	28
2.3.1.1	Präparation bakterieller Gesamt-DNA	28
2.3.1.2	Präparation bakterieller Gesamt-RNA	29
2.3.1.3	Präparation von DNA aus Agarosegelen	30
2.3.1.4	Präparation von DNA aus Acrylamidgelen	31

2.3.1.5	Quantifizierung von Nukleinsäuren	31
2.3.2	Enzymatische Amplifikation von Nukleinsäuren	32
2.3.2.1	DNA: Polymerase Chain Reaction (PCR)	32
2.3.2.2	RNA: cDNA-Synthese und PCR (RT-PCR)	33
2.3.3	Transfer von Nukleinsäuren auf feste Träger	34
2.3.3.1	Southern Blot	34
2.3.3.2	Dot Blot	35
2.3.4	Hybridisierungen	35
2.3.4.1	Markierung von Oligonukleotiden	36
2.3.4.2	Markierung von Polynukleotiden	36
2.3.4.3	Hybridisierung mit Oligonukleotidsonden	37
2.3.4.4	Hybridisierung mit Polynukleotidsonden	39
2.3.5	Sequenzierung von DNA-Fragmenten	39
2.4	Immunologische Methoden	40
2.4.1	Herstellung von Proteinextrakten	40
2.4.2	Transfer von Proteinen auf feste Träger	41
2.4.2.1	Western Blot	41
2.4.2.2	Immuno Dot Blot	41
2.4.3	Immunreaktion	42
2.5	Elektrophoresetechniken	43
2.5.1	Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	43
2.5.1.1	Agarosegelelektrophorese	43
2.5.1.2	Denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE)	44
2.5.1.3	Gelelektrophorese mit DNA-Liganden	45
2.5.1.4	Gelelektrophorese von Sequenzierungsprodukten	46
2.5.2	Gelelektrophorese von Proteinen	46
2.6	Chemische Methoden	48
2.6.1	Sulfidbestimmung	48
2.6.2	DNA-Bestimmung	49

2.6.3	RNA-Bestimmung	49
2.6.4	Proteinbestimmung	50
2.7	Bearbeitung von Umweltproben	50
2.7.1	Bioreaktoren	51
2.7.1.1	Probennahme	51
2.7.1.2	Extraktion und Analyse von Nukleinsäuren	51
2.7.2	Mariager Fjord, Dänemark	52
2.7.2.1	Probennahme	52
2.7.2.2	Extraktion und Analyse von Nukleinsäuren	52
2.7.3	Golfo Dulce, Costa Rica	54
2.7.3.1	Probennahme	54
2.7.3.2	Extraktion und Analyse von Nukleinsäuren	54
2.7.4	Solar Lake, Sinai	54
2.7.4.1	Probennahme	54
2.7.4.2	Extraktion und Analyse von Nukleinsäuren	55
2.8	Computerunterstützte Sequenzanalyse	57
2.9	Dokumentation	57
3	Ergebnisse	59
3.1	Nachweis von <i>Desulfovibrio</i> spp.	59
3.1.1	Design von PCR-Primern	59
3.1.2	Amplifikation des [NiFe] Hydrogenase-Gens von Reinkulturen	60
3.1.3	Hybridisierungen	63
3.1.4	Immunreaktionen	65
3.1.5	Amplifikation des [NiFe] Hydrogenase-Gens aus Umweltproben	66
3.1.6	DGGE Analyse von [NiFe] Hydrogenase-Genfragmenten	68
3.1.7	Gelelektrophorese mit DNA-Liganden	72
3.2	Nachweis von Genexpression in <i>Desulfovibrio</i> spp.	76
3.2.1	Expression des [NiFe] Hydrogenase-Gens in Reinkulturen	76
3.2.2	Sensitivität der Amplifikation von [NiFe] Hydrogenase-Sequenzen	83

3.2.3	Expression des [NiFe] Hydrogenase-Gens in Umweltproben	84
3.2.3.1	Denitrifizierender Bioreaktor	84
3.2.3.2	Methanogener Bioreaktor	87
3.3	Identifizierung von <i>Desulfovibrio</i> spp.	90
3.3.1	Sequenzierung der [NiFe] Hydrogenase-Genfragmente	91
3.3.2	Analyse der [NiFe] Hydrogenase-Sequenzen	92
3.3.3	[NiFe] Hydrogenase-Sequenzen eines denitrifizierenden Bioreaktors	95
3.3.4	[NiFe] Hydrogenase-Sequenzen eines methanogenen Bioreaktors	96
3.3.5	[NiFe] Hydrogenase-Sequenzen einer mikrobiellen Matte	98
3.4	Untersuchung komplexer natürlicher Populationen	99
3.4.1	Mariager Fjord, Dänemark	99
3.4.1.1	Extraktion von Nukleinsäuren	101
3.4.1.2	Charakterisierung von sulfatreduzierenden Bakterien	101
3.4.1.3	Charakterisierung von <i>Desulfovibrio</i> spp.	106
3.4.2	Golfo Dulce, Costa Rica	108
3.4.2.1	Extraktion von Nukleinsäuren	109
3.4.2.2	Charakterisierung von sulfatreduzierenden Bakterien	109
3.4.2.3	Charakterisierung von <i>Desulfovibrio</i> spp.	112
3.4.3	Solar Lake, Sinai	113
3.4.3.1	Extraktion von Nukleinsäuren	114
3.4.3.2	Charakterisierung von <i>Desulfovibrio</i> spp.	116
4	Diskussion	119
4.1	Nachweis von <i>Desulfovibrio</i> spp.	120
4.1.1	Unterscheidung verschiedener <i>Desulfovibrio</i> -Stämme	122
4.1.2	Genetische Diversität und Identifizierung	127
4.2	Genexpression in <i>Desulfovibrio</i> spp.	131
4.3	Diversität und Aktivität von <i>Desulfovibrio</i> spp.	136
4.3.1	<i>Desulfovibrio</i> spp. in einem denitrifizierenden Bioreaktor	136
4.3.2	<i>Desulfovibrio</i> spp. in einem methanogenen Bioreaktor	139

4.4	Komplexe natürliche Mikrobengemeinschaften	145
4.4.1	Marine Wassersäulen	145
4.4.2	Marine Sedimente	148
4.4.3	Mikrobielle Matten	149
4.5	Schlußfolgerungen und Ausblick	153
Literaturverzeichnis		157
A Anhang		179
A.1	Abkürzungen	179
A.2	Aminosäurecode	181
A.3	Nukleinsäurecode	182
A.4	Sequenzdaten	182
A.4.1	Nukleotidsequenzen des [NiFe] Hydrogenase-Genfragments	182
A.4.2	Abgeleitete Aminosäuresequenzen des [NiFe] Hydrogenase-Gen- fragments	186

Kapitel 1

Einleitung

Mikroorganismen beeinflussen wesentlich die Biosphäre: Sie bilden die Grundlage für das makroskopische Leben, wie wir es kennen, und spielen eine entscheidende Rolle in den globalen Stoffkreisläufen. Der Mensch greift zunehmend in die Ökosysteme auf der Erde ein: durch die Produktion von Abwässern, Abfällen sowie Abgasen und sogar durch die Freisetzung genetisch veränderter Organismen, um nur wenige Beispiele zu nennen. Wie verändert dies die Biosphäre, die Grundlage des Menschen? Was bedeutet dies für die Mikroorganismen? Helfen Mikroorganismen bei der Korrektur der Störungen der Ökosysteme? Verstärken sie etwa den zerstörerischen Prozeß? Führen die Eingriffe gar zu gänzlich Neuem? Eine Kenntnis über die allen Lebensprozessen zugrundeliegenden Mikroorganismen ist von zentraler Bedeutung, um die notwendigen mikrobiellen Lebensgemeinschaften zu verstehen, zu bewahren und nutzbar zu machen.

Die klassische Mikrobiologie hat in mehr als 100 Jahren dazu beigetragen, die Biochemie, Genetik, Feinstruktur und Physiologie von Mikroorganismen, im besonderen Bakterien, in Reinkulturen weitgehend zu verstehen. Reinkulturen bestehen aus genetisch homogenen Organismen. In der Natur kommen Bakterien, die sich durch eine enorme Vielfalt physiologischer Leistungen auszeichnen, jedoch äußerst selten als Reinkulturen vor. Genetisch und damit auch physiologisch unterschiedliche Organismen treten zusammen auf und bilden komplexe mikrobielle Lebensgemeinschaften. In den natürlichen mikrobiellen Lebensgemeinschaften stehen die Organismen in Wechselwirkung zueinander und können dadurch weitere physiologische Fähigkeiten erlangen. Die mikrobielle Ökologie befaßt sich mit der Untersuchung dieser Lebensgemeinschaften und ihrer einzelnen Mitglieder in ihrer natürlichen Umgebung. Grundlegende Fragen der mikrobiellen Ökologie sind: Welche Organismen sind vorhanden? Was tun sie gerade? Was könnten sie tun? Wie wird die Zusammensetzung der Organismen und die mikrobielle Aktivität beeinflusst?

Die Beantwortung dieser Fragen ist angesichts der Winzigkeit und Vielfalt von Mikroorganismen ein schwieriges Unterfangen. Sie erfordert Methoden, die zum einen den Nachweis und die Identifizierung von Mikroorganismen und zum anderen die Bestimmung der mikrobiellen Aktivität erlauben. Traditionelle Herangehensweisen erfassen

zwar das Vorhandensein bestimmter Mikroorganismen und ebenso beschreiben sie eine spezifische mikrobielle Aktivität, doch die direkte Zuordnung der vorhandenen Populationen zur mikrobiellen Aktivität ist nicht möglich. Gegenstand der vorliegenden Arbeit war es aufzuzeigen, daß mit der Anwendung molekularbiologischer Methoden die mikrobielle Diversität, wie man sie in der Natur vorfindet, beschrieben werden kann, und daß mit dieser Herangehensweise die mikrobielle Aktivität direkt mit einer Bakterienpopulation in Verbindung gebracht werden kann. Diese Herangehensweise ergänzt die bisher zur Verfügung stehenden Methoden und erweitert die Kenntnis über Mikroorganismen in natürlichen Lebensgemeinschaften.

1.1 Mikrobielle Diversität

Mikrobielle Diversität kann definiert werden als die Vielfalt verschiedener Typen von Mikroorganismen, die zusammen in einer Gemeinschaft vorkommen [9]. Als Synonym wird in diesem Zusammenhang auch von der Struktur einer mikrobiellen Lebensgemeinschaft gesprochen. Die Identifizierung und Klassifizierung von Mikroorganismen ist eine Voraussetzung, um die mikrobielle Diversität beschreiben zu können. Für die Identifizierung von Mikroorganismen können morphologische, physiologische, biochemische und phylogenetische Kriterien herangezogen werden. Idealerweise sollten so wenig Merkmale wie möglich und so viele Merkmale wie notwendig bestimmt werden.

Die mikroskopische Betrachtung von Bakterienzellen bietet für eine Identifizierung in der Regel zu wenig Unterscheidungsmerkmale. Zudem kann sich die Zellform in Abhängigkeit der Umweltbedingungen oder des Alters der Zellen ändern. Die Identifizierung von Bakterien erfolgte daher traditionell anhand biochemischer und physiologischer Merkmale. Dies erforderte zuvor die Anreicherung und Isolierung der Bakterien, bevor diese charakterisiert und identifiziert werden konnten. Probleme, die sich aus dieser Herangehensweise ergeben, waren offensichtlich: Viele Mikroorganismen konnten nicht kultiviert werden [79, 243, 247], die Identifizierung von Mikroorganismen anhand biochemischer und physiologischer Eigenschaften ist sehr zeitintensiv, und die Frage, ob die kultivierten Mikroorganismen tatsächlich eine bedeutende Rolle in der Lebensgemeinschaft ausüben, aus der sie isoliert wurden, blieb unbeantwortet, da die Zellen vor der Kultivierung, d. h. Veränderung der Wachstumsbedingungen, sowohl hochaktiv als auch ruhend gewesen sein könnten. Aufgrund dieser methodischen Einschränkungen mangelte es lange an Wissen über die natürliche mikrobielle Diversität. Man schätzt, daß nur ein Bruchteil der in der Natur vorkommenden Mikroorganismen derzeit als Reinkulturen vorliegen, denn typischerweise können 90–99% der Bakterien in Umweltproben nicht kultiviert werden [14, 79].

Eine kultivierungsunabhängige Identifizierung von Mikroorganismen könnte diese Probleme lösen: Alle Organismen enthalten charakteristische Nukleotidsequenzen (DNA und RNA), die mit molekularbiologischen Methoden auch in einem Gemisch verschiedenster Nukleinsäuren spezifisch nachgewiesen und analysiert werden können. Wesentlich wurde die Einführung molekularbiologischer Methoden in die mikrobielle Öko-

logie durch die Arbeiten von Woese [253, 254] begründet, der einen phylogenetischen Stammbaum der Prokaryoten basierend auf dem Vergleich von Nukleotidsequenzen der ribosomalen RNA (rRNA) als universellem molekularem Marker erarbeitete. Diese Analysen ließen sogenannte Signatursequenzen erkennen, die für bestimmte Gruppen von Organismen auf verschiedenen taxonomischen Ebenen charakteristisch sind. Das 16S rRNA-Molekül der Prokaryoten enthält hochkonservierte Bereiche, die soweit bekannt in allen lebenden Organismen vorhanden sind, aber auch variable Regionen. Variationen in der Nukleotidsequenz weisen auf unterschiedliche Organismen hin, Ähnlichkeiten auf verwandte Organismen [121]. Giovannoni und andere [65, 190, 243] nutzten diese Kenntnisse zur Charakterisierung von natürlichen mikrobiellen Populationen ohne vorherige Kultivierung der Organismen, indem sie die Nukleinsäuren einer Mikrobengemeinschaft isolierten, die 16S rRNA bzw. 16S rRNA-codierenden Gene sequenzierten und durch vergleichende Sequenzanalysen charakterisierten. So gewannen sie Rückschlüsse auf die phylogenetische Diversität der Mikroorganismen. Eine überwältigende Vielfalt der 16S rRNA-Sequenzen ließ auf eine ebenso große Vielfalt der zugehörigen Organismen schließen. Keine der gefundenen 16S rRNA-Sequenzen war identisch mit derzeit bekannten 16S rRNA-Sequenzen.

Für die Untersuchung der Nukleinsäuren steht die gesamte Bandbreite molekularbiologischer Methoden zur Verfügung, u. a. die Hybridisierung mit spezifischen Gensonden [75, 188, 202], die Amplifikation bestimmter Gensequenzen mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion [205] sowie die Sequenzierung von DNA-Fragmenten, und so wurden seitdem verschiedene molekularbiologische Strategien zur Charakterisierung von Mikrobengemeinschaften entwickelt. Die meisten basieren auf der molekularen Analyse von rRNA bzw. rRNA-codierenden Genen [6, 7, 73, 137, 244].

Zunehmend werden auch andere Gene als molekulare Marker zum Nachweis und zur Identifizierung von Bakterien in natürlichen Mikrobengemeinschaften verwendet, da zum einen durch die Analyse von 16S rRNA-Sequenzen sehr nahe verwandte Bakterienstämme nicht unterschieden werden können [257] und zum anderen ökophysiologische Gruppen von Mikroorganismen untersucht werden sollen, deren Einordnung mit einem phylogenetischen Stammbaum basierend auf 16S rRNA-Sequenzen nicht korreliert, wie acetogene Bakterien [115], N₂-fixierende Bakterien [220], denitrifizierende Bakterien [113, 198], Ammonium-oxidierende (nitrifizierende) Bakterien [197], aerobe Wasserstoff-oxidierende Bakterien [95, 108] und Quecksilber-resistente Bakterien [17].

Der Begriff genetische Diversität wird in dieser Arbeit als Maß für die Unterschiede in der Nukleotidsequenz eines homologen Gens und der zugehörigen Bakterienstämme verwendet.

1.2 Mikrobielle Aktivität

Neben der natürlichen Diversität spielt ein zweiter Aspekt in der mikrobiellen Ökologie eine große Rolle, die mikrobielle Aktivität: Mikrobielle Aktivität oder auch metabolische Aktivität (Stoffwechselaktivität) bedeutet, daß Organismen bestimmte Stoffe (Sub-

strate) zur Energiekonservierung in andere Stoffe überführen. Sie kann, muß aber nicht mit dem Wachstum der Bakterien einhergehen. Oft wird gleichbedeutend auch von der Funktion der Mikroorganismen gesprochen. Die Tatsache, daß ein bestimmter Organismus an einem Standort vorhanden ist, bedeutet nicht zwangsläufig, daß dieser Organismus auch aktiv ist und so Einfluß auf das Ökosystem ausübt. Weist man bestimmte Organismen in einer Umweltprobe nach, erlaubt dies Rückschlüsse auf das mögliche physiologische Potential der Mikrobengemeinschaft, abgeleitet von Experimenten mit ähnlichen oder identischen Reinkulturen, nicht aber über die Art und das Ausmaß der tatsächlich stattfindenden Aktivität.

Traditionell wird mikrobielle Aktivität in Umweltproben durch verschiedene physikalische und chemische Verfahren gemessen [15]: Die Aufnahme und der Einbau radioaktiv markierter Substrate können verfolgt werden, und Mikroelektroden können eingesetzt werden, um Substrate bzw. Stoffwechselprodukte zu messen, z. B. Sauerstoff, Schwefelwasserstoff oder Nitrat [170]. Obwohl diese *in situ* Messungen der Stoffwechselaktivität die gewünschte quantitative Information über einen spezifischen chemischen Prozeß liefern, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, welche Organismen innerhalb der Mikrobengemeinschaft diesen Prozeß durchführen. Aussagen über die mikrobielle Aktivität sind nur für die gesamte Gemeinschaft möglich.

Die Anwendung molekularbiologischer Methoden bietet die Möglichkeit, mikrobielle Aktivität bestimmter Organismen in einer Gemeinschaft aufzuzeigen: Als Maß für die mikrobielle Aktivität kann der rRNA-Gehalt der Zellen herangezogen werden, denn er ist korreliert mit der Wachstumsrate [179]. Metabolisch aktive Zellen haben einen höheren rRNA-Gehalt als inaktive Zellen. Diese seit langem bekannte Beziehung wurde kürzlich über die *in situ* Hybridisierung ganzer Bakterienzellen mit Fluoreszenzmarkierten rRNA-gerichteten Oligonukleotidsonden demonstriert. Der rRNA-Gehalt wurde anhand der gemessenen Färbeintensität bestimmt und erlaubte Rückschlüsse auf den metabolischen Zustand der Zellen [59, 109, 159, 184]. Extrahiert man die RNA einer mikrobiellen Lebensgemeinschaft, so ist anzunehmen, daß die Analyse der rRNA-Sequenzen die schnell wachsenden, metabolisch aktiven Organismen aufzeigt, da diese einen hohen rRNA-Gehalt besitzen. Indes geben Untersuchungen der rRNA-codierenden Gene aus extrahierter DNA eher Aufschluß über die Gesamtheit der vorhandenen, möglicherweise aber nicht aktiven Organismen, da die Anzahl der Gene pro Genom konstant ist. Dieser Ansatz wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit anhand der Bakterienpopulationen in einem Fjord in Dänemark bearbeitet [212].

Einen direkteren Weg, die metabolische Aktivität bestimmter Populationen aufzuzeigen, bietet die Untersuchung der Expression Protein-codierender Gene: Die Funktion von Mikroorganismen wird direkt über ihre Enzymaktivitäten bestimmt. Da die meisten bakteriellen Gene auf Transkriptionsebene reguliert werden [15], kann man über die Bestimmung spezifischer mRNA die mikrobielle Aktivität verfolgen. Je nachdem welches Gen untersucht wird, erlaubt diese Herangehensweise Rückschlüsse auf die Art der mikrobiellen Aktivität und die Identität der zugehörigen Bakterienpopulation. Bisher wurde gezeigt, daß die labile mRNA aus Umweltproben extrahiert und die Genexpression in natürlichen Populationen durch Hybridisierungen mit spezifischen

Sonden aufgezeigt werden kann. Folgende Gene wurden untersucht: das Ribulose-1,5-Bisphosphatcarboxylase-Gen [154], welches das zentrale Enzym zur CO₂-Fixierung codiert, ein Nitrogenase-Gen Stickstoff-fixierender Cyanobakterien [256], sowie bakterielle Gene, die den Abbau von Toluol und Trichloroethylen betreffen [144] und die für die Quecksilber-Resistenz von Bakterien codieren [80]. Eine weitergehende Charakterisierung der Bakteriengruppen, die das Gen exprimierten, fand nicht statt.

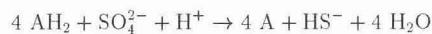
Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte am Beispiel der sulfatreduzierenden Bakterien gezeigt werden, ob diese Bakteriengruppe ohne vorherige Kultivierung der Organismen anhand von Untersuchungen des [NiFe] Hydrogenase-Gens in Umweltproben nachgewiesen und einzelne Bakterienstämme unterschieden sowie identifiziert werden können. Weiterhin sollte überprüft werden, ob Untersuchungen der mRNA dieses Gens zum Nachweis der Stoffwechselaktivität einzelner Bakterienstämme in natürlichen Populationen verwendet werden können. Im folgenden wird die Gruppe der sulfatreduzierenden Bakterien sowie das für den Nachweis dieser Gruppe gewählte Gen vorgestellt. Im Anschluß daran erfolgt eine Erläuterung der durchgeführten molekularbiologischen Herangehensweise.

1.3 Sulfatreduzierende Bakterien

Aufgrund der zahlreichen ökologisch signifikanten physiologischen Eigenschaften der sulfatreduzierenden Bakterien, kann dieses Kapitel nur einen kurzen Überblick über die Physiologie und Ökologie dieser Bakteriengruppe geben. Detaillierte Beschreibungen finden sich in Übersichtsartikeln von Widdel et al. [70, 199, 249, 250, 251, 252].

1.3.1 Physiologie

Die sulfatreduzierenden Bakterien bilden eine physiologische Gruppe, deren gemeinsame Eigenschaft die Verwendung von Sulfat als terminalem Elektronenakzeptor ist. Die chemische Reaktion kann folgendermaßen beschrieben werden:



Sie werden als strikt anaerobe Bakterien bezeichnet, die unter oxischen Bedingungen nicht wachsen und früher oder später sterben [33], obwohl über metabolische Aktivität in Gegenwart von Sauerstoff berichtet wurde [37, 45, 55, 126]. Sulfat kann in der Regel auch durch Thiosulfat, Sulfit oder seltener durch Schwefel ersetzt werden. Dienen Schwefelverbindungen als terminale Elektronenakzeptoren, entsteht als Endprodukt Schwefelwasserstoff (Sulfid). Als Elektronendonatoren (AH₂) können neben molekularem Wasserstoff eine Vielzahl organischer Verbindungen verwertet werden, so z. B. Laktat, Pyruvat, Acetat, Propionat, Butyrat und höhere Fettsäuren, Ethanol und andere Alkohole, Malat sowie Succinat. Ebenso können aromatische Verbindungen wie Benzoeat, Brenzkatechin, Phenol und Indol, Aminosäuren wie z. B. Glycin und Alanin

oder Zucker abgebaut werden. Sogar reaktionsträge Substrate, die keine funktionale Gruppe enthalten, wie Toluol [163] oder Alkane [2, 183] werden von sulfatreduzierenden Bakterien unter anaeroben Bedingungen abgebaut. Manche der sulfatreduzierenden Bakterien oxidieren Kohlenstoffverbindungen vollständig zu Kohlendioxid, andere nur unvollständig, hauptsächlich zu Acetat. Die organischen Substrate dienen zusätzlich als Kohlenstoffquelle; einige sulfatreduzierende Bakterien sind zu autotrophem Wachstum mit Kohlendioxid als einziger Kohlenstoffquelle befähigt.

Sulfatreduzierende Bakterien sind in der Lage, neben oxidierten Schwefelverbindungen auch eine Reihe anderer anorganischer Elektronenakzeptoren zu reduzieren. Diese sind u. a. Nitrat, Nitrit, O_2 , Eisen(III), Uran(VI), Mangan(IV) und Chrom(VI). Wachstum sulfatreduzierender Bakterien konnte bisher jedoch nur durch die Reduktion von Nitrat oder Nitrit zu Ammonium demonstriert werden [35, 191]. Keiner der untersuchten Stämme wuchs durch die Reduktion von Metallen [29, 116, 117, 118, 119] oder Sauerstoff [37, 45]. Stehen sulfatreduzierenden Bakterien die oben genannten Elektronenakzeptoren und Sulfat gleichzeitig zur Verfügung, kann die Reduktion von Sulfat bevorzugt, unterdrückt oder simultan erfolgen, in Abhängigkeit des Bakterienstammes und der Umweltbedingungen.

In Abwesenheit von Sulfat oder anderen anorganischen Elektronenakzeptoren können einige sulfatreduzierende Bakterien durch Fermentation bestimmter organischer Substrate, z. B. Pyruvat oder Malat, wachsen. Die Fähigkeit, organische Substrate zu fermentieren, kann erweitert werden, wenn sulfatreduzierende Bakterien in Cokultur mit Wasserstoff-verbrauchenden Bakterien leben [18].

Stickstoff-Fixierung ist eine verbreitete Eigenschaft sulfatreduzierender Bakterien [158, 174].

1.3.2 Ökologie

Bei der Betrachtung der Ökologie dieser Bakteriengruppe spielen zwei Aspekte eine wichtige Rolle: ihre Bedeutung bei der mikrobiellen Zersetzung von Biomasse sowie ihre Rolle als "Verschmutzer" der Ökosysteme durch die Produktion von Schwefelwasserstoff.

Bakterielle Sulfatreduktion ist ein wichtiger Prozeß bei der Mineralisierung von organischen Substraten in anoxischen, aquatischen Standorten, z. B. Sedimenten oder Tiefenwasser. Der Hauptanteil des in der Natur gebildeten Schwefelwasserstoffs entsteht durch diesen Prozeß. Unter anaeroben Bedingungen werden Polymere, z. B. aus toter Zellmasse, zunächst von fermentativen Bakterien zu niedermolekularen Produkten abgebaut, die dann von sulfatreduzierenden Bakterien und methanogenen Bakterien zu CO_2 bzw. Methan umgesetzt werden. Sulfatreduzierende und methanogene Bakterien bilden das letzte Glied der Nahrungskette bei der anaeroben Zersetzung von Biomasse. Das Ausmaß der Aktivität sulfatreduzierender Bakterien (Sulfatreduktionsrate) hängt u. a. von der Konzentration an Sulfat und geeigneten Elektronendonatoren ab.

In marinen Sedimenten, wo die Sulfatkonzentration mit durchschnittlich 28 mM im Meerwasser kein limitierender Faktor ist, kann die Mineralisierung von Kohlenstoff hauptsächlich durch Sulfatreduktion erfolgen [84, 86]. In Süßwasserhabitaten, wo Sulfat nur in geringen Konzentrationen zur Verfügung steht (0,01-0,2 mM), überwiegt in der Regel der Prozeß der Methanogenese bei der anaeroben Zersetzung [199, 250]. Sulfatreduktion kann hier jedoch durch den Eintrag von Sulfat sowie großer Mengen an organischem Material stimuliert werden.

Das Endprodukt der Sulfatreduktion, Schwefelwasserstoff, ist für die meisten höheren Lebewesen toxisch. Daher kann sich eine erhöhte Aktivität sulfatreduzierender Bakterien in aquatischen Ökosystemen negativ auf die Makroflora und -fauna auswirken und z. B. zu plötzlichem Fischsterben führen [157]. Gleichzeitig dient Schwefelwasserstoff einer Reihe von Mikroorganismen als Elektronendonator und wird über diese Prozesse reoxidiert: Farblose Schwefelbakterien, z. B. der Gattungen *Thiobacillus* und *Beggiatoa*, oxidieren Sulfid mit Sauerstoff oder unter anaeroben Bedingungen mit Nitrat als Elektronenakzeptor. Phototrophe Grüne Schwefelbakterien und Schwefelpurpurbakterien verwenden Schwefelwasserstoff im Rahmen der anoxygenen Photosynthese, z. B. *Chlorobium* und *Chromatium*. Das Endprodukt dieser Prozesse ist hauptsächlich Sulfat.

Schwefelwasserstoff reagiert auch chemisch mit Sauerstoff. Diese Reaktion erfolgt jedoch wesentlich langsamer verglichen mit der biologischen Oxidation, kann aber bei der plötzlichen Vermischung von O₂-reichem Oberflächenwasser mit H₂S-haltigem Tiefenwasser zu einer starken Sauerstoffzehrung führen [172]. Metallionen reagieren ebenfalls chemisch mit Schwefelwasserstoff, was zur Bildung fast unlöslicher Metallsulfide führt. Wichtige Metallionen, wie z. B. Eisen für die Synthese von Cytochromen und anderen Elektronencarriern, werden so dem Zugriff von Mikroorganismen entzogen. Kürzlich wurde gezeigt, daß sulfatreduzierende Bakterien nicht nur indirekt durch die Produktion von Sulfid am Kreislauf der Metalle beteiligt sind, sondern auch direkt durch die dissimilatorische Reduktion von Metallen [29, 118].

Lange wurde angenommen, daß Sulfatreduktion ausschließlich in anoxischen Biotopen stattfindet. Neuere Untersuchungen widersprechen dieser Annahme: Beachtlich hohe Sulfatreduktionsraten und Zelldichten sulfatreduzierender Bakterien wurden in der oxischen Zone von mikrobiellen Matten gemessen [22, 23, 55, 91, 227]. Mikrobielle Matten werden überwiegend von photoautotrophen Cyanobakterien gebildet, deren Stoffwechselprodukte, z. B. niedermolekulare Kohlenhydrate, Wasserstoff, Acetat, Laktat und Ethanol, anderen Mikroorganismen wie sulfatreduzierenden Bakterien als Energiequellen dienen [203]. Im Gegensatz dazu zeigten Ramsing et al. [166], daß in einem Photosynthese-betreibenden Biofilm einer Abwasseranlage die sulfatreduzierenden Bakterien auf die anoxischen Bereiche beschränkt waren.

Neben der ökologischen Bedeutung der sulfatreduzierenden Bakterien für die Kreisläufe von Kohlenstoff und Schwefel haben sie auch eine ökonomische Bedeutung. Sulfatreduzierende Bakterien und der von ihnen produzierte Schwefelwasserstoff richten u. a. in der Öl- und Gasindustrie große Schäden an [142]. Ein zentrales Problem ist die anaerobe Korrosion von Eisen und Stahl. An diesem Prozeß sind sulfatreduzierende Bakterien maßgeblich beteiligt [32, 69]. Der genaue Mechanismus der anaeroben

Korrosion ist noch nicht vollständig verstanden. Vereinfacht besagt ein Modell, daß sulfatreduzierende Bakterien den Wasserstoffschutzfilm, der sich in feuchtem Milieu auf Metalloberflächen bildet, als Elektronendonator aufzehren. Dies beschleunigt die kathodische Depolarisierung und führt zur Auflösung des Eisens. Auch der produzierte Schwefelwasserstoff selbst zeigt nach Präzipitation als FeS eine korrosive Wirkung [32]. Der dadurch entstehende Schaden z. B. an Gas- und Ölpipelines auf dem Meeresboden ist beträchtlich. Schwefelwasserstoff führt in Erdöllagerstätten und -förderanlagen noch zu einer Reihe weiterer ökonomisch relevanter Probleme: Im Rohöl gelöstes Sulfid führt zu einer Wertminderung des Öls, die Bildung von unlöslichen Sulfiden führt zu einer Verringerung der Permeabilität des erdöltragenden Gesteins und erniedrigt dadurch die Förderausbeute. Zudem ist der toxische Schwefelwasserstoff eine Gesundheitsgefahr für das an der Ölförderung beteiligte Personal.

Andererseits kann die Fähigkeit sulfatreduzierender Bakterien, Schwermetalle zu binden, zur Behandlung von Abwässern genutzt werden, um diese Bestandteile aus dem Abwasser zu entfernen [148]. Schwermetalle präzipitieren durch die chemische Reaktion mit dem von sulfatreduzierenden Bakterien produzierten Schwefelwasserstoff, können aber auch direkt von sulfatreduzierenden Bakterien in unlösliche Produkte umgewandelt werden [116, 117].

1.3.3 Klassifizierung

Bis vor kurzem wurden die sulfatreduzierenden Bakterien aufgrund ihrer Morphologie und biochemischer Eigenschaften sowie ihrem Substratspektrum in verschiedene Gruppen eingeordnet [76, 249]. Neuere Klassifizierungen basieren auf dem Vergleich von 16S rRNA-Sequenzen und spiegeln die phylogenetische Verwandtschaft wider [40, 43, 54, 201]. Die phylogenetische Einordnung der sulfatreduzierenden Bakterien steht im allgemeinen im Einklang mit der Klassifizierung, basierend auf physiologischen und biochemischen Merkmalen [40, 41, 43, 251].

Die meisten bisher kultivierten sulfatreduzierenden Bakterien sind Gram-negativ und mesophil und befinden sich in der Gruppe der δ -Proteobakterien zusammen mit den Bodenorganismen der Gattungen *Bdellovibrio* und *Myxococcus* sowie den Schwefelreduzierern der Gattung *Desulfuromonas* und den Eisenreduzierern der Gattung *Geobacter*. Für diese Gruppe von Sulfatreduzierern wurde eine Einteilung in zwei Familien vorgeschlagen [41, 251]: die *Desulfovibrionaceae* mit den Gattungen *Desulfovibrio* und *Desulfomicrobium* (vorher *Desulfovibrio*) und die *Desulfobacteriaceae* mit den Gattungen *Desulfobulbus*, *Desulfobacter*, *Desulfobacterium* sowie *Desulfosarcina variabilis*, *Desulfococcus multivorans*, *Desulfobotulus saporans* (vorher *Desulfovibrio saporans*) und *Desulfoarculus baarsii* (vorher *Desulfovibrio baarsii*) (Abbildung 1.1). Die Gattung *Desulfonema* gehört in die letztere Gruppe [60], ebenso wie *Desulfomonile tiedjei* [201]. Weitere Gattungen sulfatreduzierender Bakterien finden sich in der Gruppe der Gram-positiven Bakterien (*Desulfotomaculum*) und im Reich der Archaea (*Archaeoglobus*). Die Gram-negativen, thermophilen Sulfatreduzierer der Gattungen *Thermodesulfobacterium* und *Thermodesulfovibrio* sind weder eng verwandt mit den

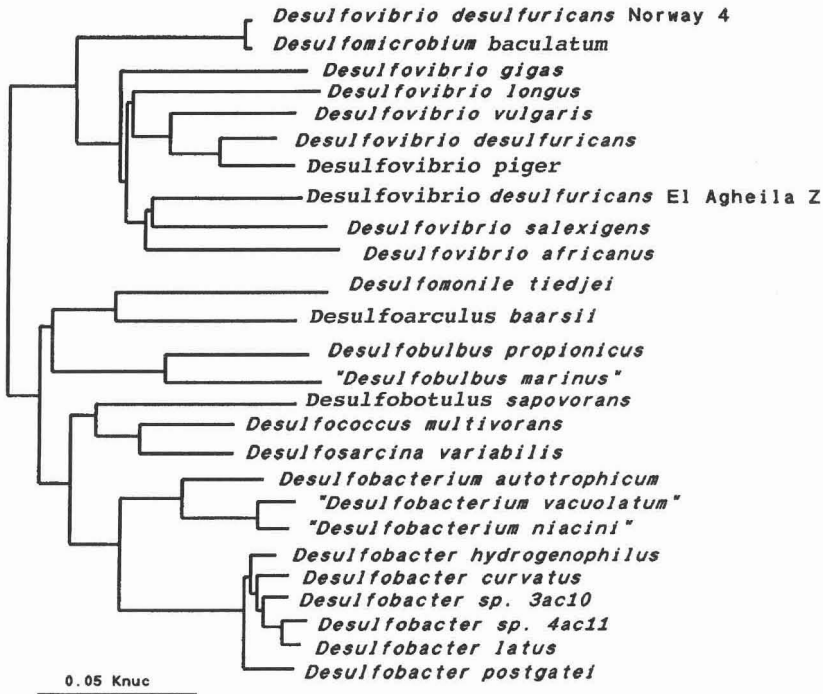


Abbildung 1.1: Phylogenetische Verwandtschaft zwischen Gram-negativen, mesophilen sulfatreduzierenden Bakterien basierend auf 16S rRNA-Sequenzvergleichen (aus Stackebrandt et al. [201], modifiziert)

mesophilen Sulfatreduzierern der δ -Proteobakterien noch mit den Gram-positiven Bakterien, gehören aber in das Reich der Eubakterien [201].

Da einige erst kürzlich isolierte sulfatreduzierende Bakterien mit neuen physiologischen Eigenschaften anhand ihrer 16S rRNA nicht eindeutig einer der bereits bestehenden Gattungen zugeordnet werden konnten [78, 164, 183], ist anzunehmen, daß die phylogenetische Vielfalt ebenso wie die physiologische Vielfalt innerhalb der Gruppe der Sulfatreduzierer noch wachsen wird. Neue, bereits validierte Gattungen sulfatreduzierender Bakterien sind beispielsweise *Desulfohalobium* [146] und *Desulfacinum* [169].

1.3.4 Nachweis und Identifizierung

Der Prozeß der Sulfatreduktion kann in Umweltproben über das Verschwinden von Sulfat und die Produktion von Sulfid [150] oder durch Radiotracer-Techniken verfolgt werden [53, 85]: Einer Umweltprobe wird $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ zugegeben, die Probe wird unter kontrollierten Bedingungen inkubiert, die Reaktion gestoppt, unter anaeroben Bedingungen wird Sulfid entfernt und eingefangen, und die Radioaktivität gemessen. Das Ergebnis reflektiert die Gesamt-Sulfatreduktionsrate und kann nicht einzelnen Gattungen oder Spezies sulfatreduzierender Bakterien zugeordnet werden.

Populationen sulfatreduzierender Bakterien wurden bisher mit verschiedenen Methoden untersucht: Die klassische Herangehensweise ist die Anreicherung und Isolierung mit Hilfe anaerober Kultivierungstechniken [251]. Zählungen sulfatreduzierender Bakterien wurden in Flüssigmedien über Verdünnungsreihen, den sogenannten Most-Probable-Number (MPN)-Bestimmungen [8], oder über Agarverdünnungsreihen [251], in denen durch Zugabe von Eisen Kolonien sulfatreduzierender Bakterien schwarz erscheinen, auf selektiven Kulturmedien durchgeführt. Die allgemeinen Probleme, die sich durch einen kultivierungsabhängigen Nachweis von Bakterien ergeben, wurden bereits zu Beginn des Kapitels erläutert. Obwohl die Medien für sulfatreduzierende Bakterien und die anaeroben Kultivierungstechniken ständig verbessert wurden, ist davon auszugehen, daß diese Herangehensweise die Anzahl der vorhandenen sulfatreduzierenden Bakterien unterschätzt [90]. Die Anzahl kultivierbarer sulfatreduzierender Bakterien weist oft eine große Diskrepanz zu der gemessenen Sulfatreduktionsrate auf, wie beispielsweise Teske et al. [214] zeigten. Sulfatreduzierende Bakterien stellen eine extrem diverse Gruppe von Organismen dar, deren gemeinsame Eigenschaft nur die Energiekonservierung mit Sulfat als terminalem Elektronenakzeptor ist. Die Verwendung eines Standardmediums ist daher nicht möglich, und das Testen einer Vielzahl verschiedener Medien, um das breite Substratspektrum der sulfatreduzierenden Bakterien abzudecken, ist praktisch kaum durchführbar. Oft werden für Zählungen sulfatreduzierender Bakterien Acetat, Laktat und Wasserstoff als Elektronendonatoren angeboten. Diese Kulturmedien unterscheiden nicht zwischen verschiedenen sulfatreduzierenden Bakterien, die dasselbe Substrat benutzen, und sulfatreduzierenden Bakterien, die verschiedene Substrate benutzen, werden mehrfach gezählt. Ohne eine weitere Identifizierung der Kulturen zeigen solche Zählungen nur bestimmte physiologische Gruppen von sulfatreduzierenden Bakterien auf, z. B. die, die Acetat als Elektronendonator verwenden oder die, die Wasserstoff nehmen.

Neben den beschriebenen kultivierungsabhängigen Methoden wurden alternative Verfahrensweisen entwickelt, um die Häufigkeit und die Typen sulfatreduzierender Bakterien in Umweltproben zu erfassen. Sie basieren auf dem Nachweis bestimmter Zellbestandteile, die spezifisch für sulfatreduzierende Bakterien sind. Solche Nachweissysteme sind auch von großem Nutzen für eine schnelle taxonomische Identifizierung neuer Isolate. Mittels Phospholipidfettsäureanalyse (PFLA) wurden beispielsweise Populationen sulfatreduzierender Bakterien in verschiedenen Sedimenten charakterisiert [150, 210]. Phospholipide sind wichtige Bestandteile aller Zellmembranen, und Bakterien enthalten eine charakteristische Zusammensetzung der mit den Phospholipiden assoziierten

langkettigen Fettsäuren, die sie von Eukaryoten und oft auch untereinander unterscheidet. PFLA kann daher zur Charakterisierung komplexer Mikrobengemeinschaften verwendet werden. Dies wurde z. B. von Rajendran et al. [165] demonstriert. Viele sulfatreduzierende Bakterien enthalten spezifische Fettsäuren, z. B. die Gattungen *Desulfobacter*, *Desulfovibrio* und *Desulfobulbus* [150, 210]. Diese Gattungen verwenden charakteristische Elektronendonatoren für die Reduktion von Sulfat: *Desulfobacter* spp. oxidieren Acetat, *Desulfovibrio* spp. Wasserstoff und Laktat, *Desulfobulbus* spp. Propionat [250]. Parkes et al. [150] zeigten, daß durch Zugabe der entsprechenden Elektronendonatoren zu Sedimentproben die Genus-spezifischen Fettsäureprofile stimuliert wurden. Dies erlaubte Rückschlüsse auf die metabolische Aktivität der zugehörigen Bakterienpopulation, da zusätzlich die Umsetzung der zugefügten Substrate und die Sulfatreduktionsraten verfolgt wurden. Desweiteren kann PFLA auch zur phylogenetischen und taxonomischen Klassifizierung von sulfatreduzierenden Bakterien beitragen. Kohring et al. [96] untersuchten die PFLA-Muster einer Reihe sulfatreduzierender Bakterien. Die numerische Clusteranalyse dieser Fettsäureprofile steht im Einklang mit der phylogenetischen Verwandtschaft basierend auf der vergleichenden 16S rRNA-Analyse; nur 3 von 25 untersuchten Stämmen zeigten nicht die erwartete Verwandtschaft [96].

Lillebæk [111] untersuchte die Häufigkeit und Verteilung von sulfatreduzierenden Bakterien in einem Sediment der Ostsee mit immunologischen Methoden. Antiseren gegen verschiedene Stämme mariner sulfatreduzierender Bakterien wurden hergestellt. Der Nachweis der Kreuzreaktion mit Bakterienzellen erfolgte durch einen zweiten Fluoreszenz-markierten Antikörper. Diese Herangehensweise ermöglicht die Analyse von ganzen Zellen im Epifluoreszenzmikroskop. Versuche mit Reinkulturen hatten gezeigt, daß die verwendeten Antiseren Stamm-spezifisch waren. Trotzdem konnten verschiedene Populationen sulfatreduzierender Bakterien in Sedimentproben detektiert werden. Zählungen immunoreaktiver Zellen lagen dabei um bis zu zwei Größenordnungen höher als MPN-Bestimmungen. Das Vorhandensein immunoreaktiver Bakterien ist zwar ein Hinweis auf das Vorhandensein von sulfatreduzierenden Bakterien, garantiert aber nicht, daß die nachgewiesenen Zellen auch leben und aktiv sind.

Sulfatreduzierende Bakterien wurden auch mit molekulargenetischen Techniken in Umweltproben nachgewiesen und identifiziert. Dazu ist die spezifische Hybridisierung von charakteristischen DNA-Sequenzen sulfatreduzierender Bakterien erforderlich. Die folgenden Beispiele zeigen, daß solche charakteristischen DNA-Sequenzen (Gensonden) sowohl das gesamte Genom umfassen können als auch Gene, die für die 16S rRNA oder Proteine codieren. Zum Nachweis von sulfatreduzierenden Bakterien in Ölfeldern sowie in Böden und Abwässern aus dem Bergbau wurde eine DNA-Hybridisierungstechnik verwendet, die "reverse sample genome probing" genannt wird [211, 234, 235, 237]. Hierzu wird ein Masterfilter angelegt, der genomische DNA von verschiedenen Bakterienstämmen enthält, z. B. von verschiedenen sulfatreduzierenden Bakterien, die von dem zu untersuchenden Standort isoliert wurden [237]. Aus der zu untersuchenden Umweltprobe wird die DNA extrahiert, markiert und als Sonde für die anschließende Hybridisierung des Masterfilters verwendet. So können die Bakteriengenome identifiziert und quantifiziert werden, die in der Umweltprobe vorhanden waren. Der hybridisierte Masterfilter kann als Fingerabdruck der untersuchten Mikrobengemeinschaft

betrachtet werden. Vergleiche solcher Fingerabdrücke mit 35 verschiedenen Genomen sulfatreduzierender Bakterien auf dem Masterfilter zeigten, daß in sieben kanadischen Ölfeldern zwei verschiedene Gemeinschaften sulfatreduzierender Bakterien vorhanden waren, adaptiert an Salzwasser bzw. Süßwasser [235]. Ein Vorteil dieser Herangehensweise ist, daß sie nicht auf eine bestimmte Gruppe von Organismen beschränkt ist, sondern den Nachweis jedes Bakterienstammes erlaubt, der aus einer Umweltprobe isoliert werden kann. Schwierigkeiten ergeben sich, wenn eine erfolgreiche Isolierung der ökologisch wichtigen Bakterienstämme nicht möglich ist und die DNA-Sonde mit keinem für den Masterfilter verwendeten Bakterienstamm hybridisiert [211].

Der Vergleich der 16S rRNA-Sequenzen der sulfatreduzierenden Bakterien ließ verschiedene für bestimmte Gruppen charakteristische Sequenzen erkennen, sodaß eine Reihe von 16S rRNA-gerichteten Oligonukleotidsonden zum Nachweis sulfatreduzierender Bakterien zur Verfügung stehen [4, 42]. Devereux et al. [42] entwickelten sechs Oligonukleotidsonden, von denen vier Genus-spezifisch sind und mit 16S rRNA-Sequenzen von *Desulfobacterium* spp., *Desulfobacter* spp., *Desulfobulbus* spp. und *Desulfovibrio* spp. hybridisieren; die anderen zwei Sonden umfassen größere Gruppen der Gram-negativen mesophilen sulfatreduzierenden Bakterien. 16S rRNA-gerichtete Sonden sind sowohl für die *in situ* Hybridisierung ganzer Zellen als auch für die Hybridisierung mit extrahierten Nucleinsäuren aus einer Umweltprobe geeignet. Sie wurden z. B. eingesetzt, um sulfatreduzierende Bakterien in Sedimenten [42] und anaeroben Biofilmen [5, 159] nachzuweisen und die Verteilung der verschiedenen Gruppen in Photosynthese-betreibenden Biofilmen [166] sowie einer mikrobiellen Matte [175] aufzuzeigen.

Im Prinzip können diese Oligonukleotide auch als Primer in der Polymerasekettenreaktion (PCR) zur spezifischen Amplifikation der rRNA-Sequenzen definierter Populationen sulfatreduzierender Bakterien eingesetzt werden. Dies erlaubt einen sehr sensitiven Nachweis von Bakterien und bietet zudem die Möglichkeit, die amplifizierten DNA-Fragmente zu sequenzieren. Durch eine vergleichende Sequenzanalyse kann die phylogenetische Einordnung der zugehörigen Bakterien ermittelt und diese identifiziert werden. Eine allgemeine Sonde für sulfatreduzierende Bakterien der δ -Proteobakterien wurde verwendet, um selektiv 16S rRNA-codierende Genfragmente von sulfatreduzierenden Bakterien aus Nucleinsäuren eines marinen Sediments zu amplifizieren [44]. Die erhaltenen DNA-Fragmente wurden durch Klonierung vereinzelt, sequenziert, und die Sequenzen mittels vergleichender Sequenzanalysen untersucht. Die meisten Sequenzen fielen in die Gruppe der δ -Proteobakterien; doch keine der Sequenzen war identisch mit bekannten Sequenzen sulfatreduzierender Bakterien. Ebenso wie andere Untersuchungen [65, 243] zeigt auch diese, daß die natürliche (phylo)genetische Vielfalt von Bakterien vermutlich wesentlich größer ist, als erwartet, und nicht durch die bisher kultivierten Bakterienstämme reflektiert wird. Anhand der aus Umweltproben erhaltenen Sequenzen können zum einen die Sequenzen von Sonden, die in der Regel durch Sequenzvergleiche von kultivierten Bakterien entwickelt wurden, überprüft werden [44]. Zum anderen können neue Sonden entwickelt werden, um eine gezielte Anreicherung und Isolierung von bisher nicht kultivierten Bakterienpopulationen aus diesen Standorten zu verfolgen und dadurch zu ermöglichen [92].

Neben den 16S rRNA-gerichteten Oligonukleotidsonden wurden auch Polynukleotidsonden für Protein-codierende Gene zur Detektion und Identifikation sulfatreduzierender Bakterien verwendet. Voordouw und Mitarbeiter [211, 237] benutzten Hydrogenase-Gensonden, um *Desulfovibrio* spp. in Anreicherungen von sulfatreduzierenden Bakterien nachzuweisen. Eine Identifizierung verschiedener *Desulfovibrio* spp. erfolgte über die Hybridisierung mit verschiedenen Hydrogenase-Gensonden. Dazu wurde GesamtdNA aus den Anreicherungen extrahiert, mit Restriktionsenzymen geschnitten und gelelektrophoretisch aufgetrennt [237]. Die Southern Blot Analyse zeigte charakteristische Hybridisierungsmuster, da die hybridisierenden Hydrogenase-Gene verschiedener *Desulfovibrio* spp. auf unterschiedlich großen Restriktionsfragmenten lagen. Auf diese Weise konnten in Anreicherungen sulfatreduzierender Bakterien von Öfeldern bis zu drei verschiedene Bakterienstämme nachgewiesen werden. Einige Bakterienisolate aus diesen Öfeldern zeigten identische Hybridisierungsmuster zu verschiedenen Stämmen von *Desulfovibrio vulgaris*.

Obwohl Hydrogenase-Gensonden für den Nachweis von sulfatreduzierenden Bakterien zur Verfügung stehen, wurde bisher nicht die Expression der Hydrogenase-Gene und der Nachweis spezifischer mRNA als Maß für die mikrobielle Aktivität in Umweltproben bestimmt.

1.4 Hydrogenasen

Hydrogenasen sind Enzyme, die die reversible Aktivierung von molekularem Wasserstoff katalysieren:



Hydrogenase-Aktivität findet man in einer Vielzahl aerober und anaerober Prokaryoten [1] sowie in einigen Eukaryoten, z. B. in Algen [61], höheren Pflanzen [216] und Protozoen [112]. Prokaryotische Hydrogenasen erfüllen im wesentlichen zwei physiologische Funktionen [1]:

- die Oxidation von molekularem Wasserstoff, um Elektronen in die Elektronentransportkette zur Reduktion von Elektronenakzeptoren, wie z. B. O_2 , Sulfat, Nitrat, einzuschleusen, oder
- die Produktion von Wasserstoff, um überschüssige Elektronen zu entfernen, wenn außer Protonen keine anderen Elektronenakzeptoren zur Verfügung stehen, z. B. in einigen Fermentationsreaktionen oder in syntrophen Mischkulturen.

Je nach Einbindung in den Elektronentransport katalysieren Hydrogenasen einen Nettoverbrauch oder eine Nettoproduktion von Wasserstoff [1]; sie werden daher als Aufnahme- oder als Produktionshydrogenasen bezeichnet. Da Bakterien mehrere Hydrogenasen besitzen können, ist eine eindeutige Zuordnung physiologischer Funktionen oft schwierig.

Obwohl Hydrogenase-Aktivitäten in verschiedenen sulfatreduzierenden Bakterien aufgezeigt werden konnten [34, 101, 189], beschränken sich detaillierte Untersuchungen auf die Enzyme von *Desulfovibrio* spp. Verschiedene Hydrogenasen wurden von Stämmen dieser Gattung sulfatreduzierender Bakterien isoliert, charakterisiert und sequenziert [49, 233, 238, 239]. Diese Enzyme sind Eisen-Schwefelproteine, die aufgrund ihres Metallgehaltes grob in zwei Klassen eingeteilt werden: die [Fe] und die [NiFe] Hydrogenasen; letztere enthalten zusätzlich zu den Eisen-Schwefel-Zentren Nickel. In einer dritten Klasse von Hydrogenasen, den [NiFeSe] Hydrogenasen, ist ein Cystein durch Selenocystein ersetzt.

Während man die [Fe] Hydrogenasen bisher nur bei strikt anaeroben Bakterien (*Desulfovibrio* und *Clostridium*) gefunden hat und die [NiFeSe] ausschließlich in sulfatreduzierenden Bakterien, kommen die [NiFe] Hydrogenasen in taxonomisch unterschiedlichen Bakteriengruppen vor, z. B. Knallgasbakterien (*Alcaligenes*, *Nocordia*), phototrophen Organismen (*Chromatium*, *Rhodobacter* und *Thiocapsa*), methanogenen Bakterien (*Methanobacterium*, *Methanosarcina*, *Methanospirillum*), aeroben Stickstoff-fixierenden Bakterien (*Azotobacter*, *Rhizobium*) und anderen [161, 255]. Kürzlich wurden die Sequenzen von 30 mikrobiellen Hydrogenasen miteinander verglichen und anhand ihrer Homologie in sechs Gruppen eingeteilt [255]. Eine dieser Gruppen beinhaltet die [NiFe] und [NiFeSe] Hydrogenasen der sulfatreduzierenden Bakterien, eine weitere Gruppe enthält die [Fe] Hydrogenasen anaerober Bakterien. Drei Ursprungsformen wurden für die verschiedenen Hydrogenasen postuliert [236, 255]: Alle Ni-haltigen Hydrogenasen sind homolog und teilen vermutlich einen gemeinsamen evolutionären Ursprung, während die [Fe] Hydrogenasen und Hydrogenasen von Cyanobakterien keinerlei Homologie untereinander oder zu den anderen Gruppen von Hydrogenasen aufweisen.

Die verschiedenen Klassen von Hydrogenasen sind nicht einheitlich in Stämmen der Gattung *Desulfovibrio* verbreitet. Dies wurde durch die Aufreinigung, Isolierung und Charakterisierung der Enzyme von unterschiedlichen Stämmen deutlich [49, 141] und konnte durch genetische Untersuchungen von Voordouw et al. [232] bestätigt werden. In der letzteren Studie wurde eine Vielzahl sulfatreduzierender Bakterien mit Gensonden untersucht, die spezifisch für die drei Klassen von Hydrogenasen sind. Die verwendeten Gensonden hybridisierten mit DNA aus Stämmen der Gattung *Desulfovibrio*; Hydrogenase-Gene in anderen sulfatreduzierenden Bakterien wurden damit nicht erfaßt. Einige *Desulfovibrio*-Stämme besaßen Gene für [Fe], [NiFe] und [NiFeSe] Hydrogenasen, andere nur Gene für je zwei bzw. eine Klasse von Hydrogenasen. Das Gen für eine [NiFe] Hydrogenase wurde in allen 22 untersuchten *Desulfovibrio*-Stämmen nachgewiesen.

Die [Fe], [NiFe] und [NiFeSe] Hydrogenasen der Gattung *Desulfovibrio* unterscheiden sich nicht nur in ihrem Metallgehalt, sondern auch in der Genstruktur, Aminosäuresequenz, Lokalisation innerhalb der Zelle und ihren katalytischen Eigenschaften [49, 141, 161]. Biochemische Untersuchungen mit künstlichen Elektronenakzeptoren und -donatoren zeigten folgende Unterschiede in den katalytischen Eigenschaften: [Fe] Hydrogenasen weisen eine höhere spezifische Aktivität auf als die Ni-enthaltenden Enzyme. [Fe] und [NiFe] Hydrogenasen zeigen eine höhere Aktivität bei der Wasserstoff-

Tabelle 1.1: Sequenzierte Hydrogenase-Gene der Gattung *Desulfovibrio*

Genprodukt	Bakterienstamm	Referenz
[Fe] Hydrogenase	<i>Desulfovibrio vulgaris</i> Monticello	Voordouw et al. [230]
	<i>Desulfovibrio vulgaris</i> Hildenborough	Voordouw et al. [228, 229]
<i>hydC</i>	<i>Desulfovibrio vulgaris</i> Hildenborough	Stokkermans et al. [206]
NADP-reduzierende Hydrogenase	<i>Desulfovibrio fructosovorans</i>	Malki et al. [123]
[NiFe] Hydrogenase	<i>Desulfovibrio vulgaris</i> Miyazaki F	Deckers et al. [38]
	<i>Desulfovibrio fructosovorans</i>	Rousset et al. [180]
	<i>Desulfovibrio gigas</i>	Li et al. [110]
		Voordouw et al. [231]
[NiFeSe] Hydrogenase	<i>Desulfovibrio baculatus</i>	Menon et al. [127]
		Voordouw et al. [231]

aufnahme als bei der Produktion. Dies ist umgekehrt bei den [NiFeSe] Hydrogenasen. [Fe] Hydrogenasen haben eine geringe Affinität zu Wasserstoff, [NiFe] Hydrogenasen eine hohe.

[Fe] Hydrogenasen von *Desulfovibrio* spp. bestehen aus zwei Untereinheiten, die große α -Untereinheit (46 kDa) und die kleine β -Untereinheit (13,5 kDa). Sie werden durch ein Operon codiert, indem das Gen für die große Untereinheit vor dem Gen für die kleine Untereinheit angeordnet ist [224, 228, 229, 230]. [NiFe] und [NiFeSe] Hydrogenasen [38, 110, 127, 180, 231] bestehen zwar ebenfalls aus zwei Untereinheiten, deren Molekulargewichte sind mit ca. 60 kDa und 30 kDa jedoch wesentlich größer als die der [Fe] Hydrogenasen. Diese Untereinheiten werden durch ein Operon codiert, in dem das Gen für die kleine Untereinheit dem Gen für die große Untereinheit vorangestellt ist.

Während die bisher charakterisierten [Fe] Hydrogenasen ausschließlich im periplasmatischen Raum lokalisiert sind, findet man die Ni-enhaltenden Enzyme in fast allen cellulären Kompartimenten [49, 72, 142]. Die [NiFe] und [NiFeSe] Hydrogenasen der Gattung *Desulfovibrio*, deren Gene bisher sequenziert wurden (Tabelle 1.1), sind vermutlich im periplasmatischen Raum oder in der Cytoplasmamembran lokalisiert, denn eine gemeinsame Eigenschaft bezüglich der Genstruktur ist, daß die kleinen Untereinheiten der Hydrogenasen eine Signalpeptidsequenz enthalten [161]. Diese ist möglicherweise für den Export des gesamten Enzyms aus dem Cytoplasma verantwortlich, da die großen Untereinheiten keine solche Sequenz besitzen. Wie der Export der Hydrogenasen aus dem Cytoplasma stattfindet, ist zur Zeit nicht geklärt [225]. Die [NiFeSe] Hydrogenase von *Desulfovibrio vulgaris* wird nicht exportiert: Immunologische Untersuchungen zeigten, daß das Enzym an der inneren Seite der Cytoplasmamembran lokalisiert ist; die [NiFe] Hydrogenase ist mit der periplasmatischen Seite der Membran assoziiert [176].

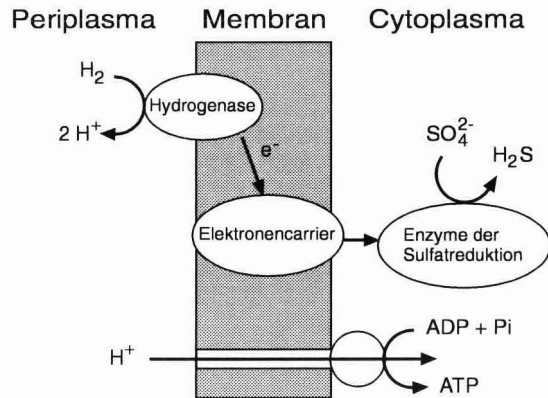


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des Elektronentransports bei der bakteriellen Oxidation von Wasserstoff mit Sulfat

Eine eindeutige Zuordnung der physiologischen Funktionen von [Fe], [NiFe] und [NiFeSe] Hydrogenasen ist schwierig: Das Hydrogenase-System einzelner *Desulfovibrio* spp. kann aus mindestens drei verschiedenen Enzymen bestehen, z. B. in *Desulfovibrio vulgaris* [114]; die verschiedenen Enzyme sind nicht einheitlich innerhalb der Gattung verteilt [232]; Aktivitäten verschiedener Hydrogenasen können *in vivo* nicht getrennt gemessen werden. Erschwert wird die Klärung dieser Frage zudem durch die Komplexität des Wasserstoffmetabolismus von *Desulfovibrio* spp.

Molekularer Wasserstoff spielt eine zentrale Rolle für die Energiekonservierung der sulfatreduzierenden Bakterien [153]: *Desulfovibrio* spp. können alternativ Wasserstoff als einzigen Elektronendonator in Gegenwart von Sulfat oder anderen Elektronenakzeptoren verwerten oder Wasserstoff produzieren, wenn sie ohne terminalen Elektronenakzeptor mit Pyruvat wachsen. Laktat wird fermentiert, wenn *Desulfovibrio* spp. in Mischkulturen mit Wasserstoff-verbrauchenden Bakterien wie methanogenen Bakterien wachsen [18]. Dies geschieht durch Wasserstoffübertragung von Zelle zu Zelle (interspecies hydrogen transfer). Dieser Prozeß ermöglicht thermodynamisch ungünstige Fermentationsreaktionen, wie z. B. die Fermentation von Laktat, da der gebildete und ausgeschiedene Wasserstoff laufend entfernt wird. In Gegenwart von Sulfat fungieren *Desulfovibrio* spp. als Wasserstoff-verbrauchende Bakterien in Mischkulturen mit fermentativen Bakterien. *Desulfovibrio* spp. verfügen über die einzigartige Fähigkeit, sowohl die Rolle der Wasserstoff-verbrauchenden als auch der Wasserstoff-produzierenden Bakterien in syntrophen Bakteriengemeinschaften zu übernehmen [72].

Man nimmt an, daß die Oxidation von Wasserstoff auf der periplasmatischen Seite der inneren Membran stattfindet und durch eine periplasmatische oder in der Membran lokalisierte Hydrogenase katalysiert wird. Die Elektronen werden über eine Elektronentransportkette für die Reduktion von Sulfat oder anderen Elektronenakzeptoren im

Cytoplasma verwendet. Dadurch wird ein Protonengradient aufgebaut, der die ATP-Synthese antreibt [10]. Diese Hypothese ist in Abbildung 1.2 schematisch dargestellt. Bakterien, die nur eine Hydrogenase besitzen, müssen Elektronen für jede der Reduktasen, die für die Sulfatreduktion notwendig sind, bereitstellen. Für Bakterien, die mehrere Hydrogenasen haben, gibt es Hinweise, daß die Hydrogenasen die Elektronen spezifisch auf die verschiedenen Reduktasen verteilen: In Zellen von *Desulfovibrio vulgaris* liefert die periplasmatische [Fe] Hydrogenase vermutlich Elektronen für die Reduktion von APS (aktiviertes Sulfat¹) zu Sulfid (APS Reduktase) und die membrangebundene [NiFe] Hydrogenase Elektronen für die Reduktion von Bisulfid zu Sulfid (Bisulfidreduktase) [153]. Dies scheint für den Stamm *Desulfovibrio fructosovorans*, der eine [NiFe] und vermutlich eine [Fe] Hydrogenase besitzt [123, 232], nicht zuzutreffen: Eine Mutante dieses Stammes, in der das [NiFe] Hydrogenase-Gen eliminiert wurde, wuchs ebenso gut mit Wasserstoff und Sulfat wie der Wildtyp [181]. Voordouw [238] postulierte, daß Bakterien, die eine [Fe] und eine [NiFe] Hydrogenase exprimieren, einen ökologischen Vorteil haben: Die [NiFe] Hydrogenase zeigt eine hohe Affinität zu Wasserstoff, aber eine geringe Aktivität und erlaubt *Desulfovibrio* spp. in Umgebungen mit geringen H₂-Konzentrationen miteinander und mit anderen [NiFe] Hydrogenase-enhaltenden Bakterien um H₂ zu konkurrieren. Die [Fe] Hydrogenase hat eine geringe Affinität zu Wasserstoff, zeigt aber eine hohe Aktivität und erlaubt *Desulfovibrio* spp. in Umgebungen mit hohen Wasserstoffkonzentrationen, H₂ effektiv zu verwerten. Stämme, die keine [Fe] Hydrogenase enthalten, können den Vorteil Wasserstoff-reicher Umgebungen nicht optimal nutzen.

Die Produktion von Wasserstoff findet vermutlich im Cytoplasma statt und wird durch eine dort lokalisierte Hydrogenase katalysiert [122, 140]. Diese Funktion könnte die [NiFeSe] Hydrogenase erfüllen. Hinweise darauf geben die *in vitro* bestimmten katalytischen Eigenschaften der [NiFeSe] Hydrogenasen [49] und deren Lokalisation auf der cytoplasmatischen Seite der Cytoplasmembran in *Desulfovibrio vulgaris* [176]. Dieses Enzym ist allerdings nicht in allen *Desulfovibrio* spp. vorhanden. Einigen Wasserstoffproduzierenden Stämmen, wie *Desulfovibrio fructosovorans* [72, 145], fehlt dieses Enzym. Die Wasserstoffproduktion erfolgt möglicherweise durch eine bisher noch nicht charakterisierte Hydrogenase oder wird von der [Fe] oder [NiFe] Hydrogenase durchgeführt [238]. Van den Berg et al. [223] postulierten, daß die [Fe] Hydrogenase eine Produktionshydrogenase ist. Diese Annahme stützt sich auf Experimente mit genetisch manipulierten *Desulfovibrio vulgaris*-Zellen, in denen der [Fe] Hydrogenase-Gehalt durch Expression von "antisense" mRNA reduziert wurde.

Wasserstoffmetabolismus wird auch beobachtet, wenn *Desulfovibrio* spp. mit organischen Energiequellen und Sulfat als terminalem Elektronenakzeptor wachsen. Einige Stämme produzieren und verbrauchen Wasserstoff unter diesen Bedingungen [72, 122, 140, 217]. Physiologisch werden diese Phänomene durch zwei Modelle beschrieben, die kontrovers diskutiert werden [72]: Das "hydrogen cycling" [140] geht davon aus, daß Wasserstoff ein obligates Intermediat ist, das die Substratoxidation und Sulfatreduktion verbindet: Die Produktion von Wasserstoff aus organischen Substraten erfolgt im Cy-

¹Adenosin-5'-phosphosulfat

toplasma, Wasserstoff diffundiert über die cytoplasmatische Membran und wird durch eine periplasmatische Hydrogenase oxidiert. Die Elektronen werden über die Membran transferiert und im Cytoplasma für die Reduktion von Sulfat verbraucht. In einem zweites Modell, "trace H₂ formation" [122], wird davon ausgegangen, daß Wasserstoff nur ein Nebenprodukt bei der Oxidation von organischen Elektronenquellen mit Sulfat ist. Die Wasserstoffverwertung und -produktion ist nur notwendig, um einen geeigneten Redoxzustand der Elektronentransferproteine zu erhalten. Möglicherweise werden organische Substrate im Verlauf des Wachstums zunächst fermentiert, um ATP zu produzieren, das für die Aktivierung des Sulfates vor der Reduktion erforderlich ist. Der produzierte Wasserstoff wird anschließend verbraucht, um einen Energieverlust zu vermeiden. Diese Modelle setzen voraus, daß zwei verschiedene im Cytoplasma und im Periplasma lokalisierte Hydrogenasen vorhanden und für den Wasserstoffmetabolismus verantwortlich sind. Wie oben bereits erläutert, ist eine universelle periplasmatische Hydrogenase, eine [NiFe] Hydrogenase, in allen *Desulfovibrio* spp. vorhanden, eine universelle cytoplasmatische Hydrogenase wurde bis jetzt noch nicht gefunden [232, 238].

Untersuchungen des Hydrogenase-Systems von *Desulfovibrio gigas* deuten an, daß auch andere Modelle zur Erklärung des Wasserstoffmetabolismus und der Energiekonservierung denkbar sind. Dieser Stamm besitzt vermutlich ausschließlich eine periplasmatische [NiFe] Hydrogenase, die für alle Aspekte des Wasserstoffmetabolismus verantwortlich sein muß [138]. *Desulfovibrio gigas* unterscheidet sich von anderen Stämmen, die mehrere Hydrogenasen besitzen, durch die Unfähigkeit, Laktat über den "interspecies hydrogen transfer" oder Pyruvat in Abwesenheit von Sulfat zu fermentieren [138]. Wächst dieser Stamm in Laktat-Sulfat-Medium, zeigt er keine Produktion von Wasserstoff im Gegensatz zu anderen *Desulfovibrio*-Stämmen, wie z. B. *Desulfovibrio vulgaris* oder *Desulfovibrio fructosovorans* [72]. Daraus wurde gefolgert, daß die [NiFe] Hydrogenase für die Wasserstoffoxidation verantwortlich ist und die Produktion von Wasserstoff aus organischen Substraten nicht katalysiert [138].

1.5 Strategie

Bislang wurde mit molekularbiologischen Methoden im wesentlichen die Diversität von Bakterien in ihren natürlichen Lebensgemeinschaften untersucht. Der Aspekt der mikrobiellen Aktivität wurde dabei wenig berücksichtigt. Die zentrale Frage der vorliegenden Arbeit war: Welche der vorhandenen Bakterienpopulationen sind in einer mikrobiellen Lebensgemeinschaft aktiv? Ist eine Beantwortung dieser Frage mit molekularbiologischen Methoden möglich? Und können so Rückschlüsse auf die Besetzung ökologischer Nischen durch bestimmte Bakterienpopulationen gezogen werden? Diese Fragen sollten am Beispiel der sulfatreduzierenden Bakterien untersucht werden. Basierend auf dem [NiFe] Hydrogenase-Gen sollte ein Nachweissystem für *Desulfovibrio* spp. entwickelt werden, das eine Unterscheidung und im Idealfall sogar die Identifizierung der Bakterienstämme dieser Gattung erlaubt. Als Maß für die Aktivität einzelner Bakterienstämme sollte die Expression des Gens in natürlichen Populationen über den Nachweis der [NiFe] Hydrogenase-mRNA bestimmt werden. Aus folgenden Gründen

wurde das [NiFe] Hydrogenase-Gen als Markergen ausgewählt:

- [NiFe] Hydrogenasen sind Schlüsselenzyme für den Stoffwechsel von sulfatreduzierenden Bakterien und deren ökologische Bedeutung.
- [NiFe] Hydrogenasen sind in allen bisher untersuchten *Desulfovibrio* spp. vorhanden.
- [NiFe] Hydrogenase-Gene von drei verschiedenen *Desulfovibrio* spp. waren bereits sequenziert.

Sulfatreduzierende Bakterien haben eine große ökologische Bedeutung in anaeroben Habitaten und sind durch vielfältige physiologische Leistungen gekennzeichnet, die sich auch innerhalb der Gattung *Desulfovibrio* wiederfinden. Es sollte untersucht werden, ob eine spezielle Anpassung der Stämme dieser Gattung an bestimmte Umweltbedingungen durch den Vergleich der vorhandenen mit den aktiven Bakterienpopulationen in einer mikrobiellen Gemeinschaft ablesbar ist.

In Abbildung 1.3 ist die generelle molekularbiologische Herangehensweise als Fließschema dargestellt. Sie stimmt im wesentlichen überein mit anderen molekularbiologischen Herangehensweisen, die zur Untersuchung mikrobieller Lebensgemeinschaften basierend auf 16S rRNA-Sequenzen vorgeschlagen und durchgeführt wurden [51, 133, 134, 135, 136, 137, 177, 212, 214]. Neu ist die Einbeziehung der mRNA-Ebene in Kombination mit der Aufschlüsselung unterschiedlicher mRNA-Sequenzen. Dies hat den Zweck, die metabolische Aktivität einzelner Organismen typen aufzuzeigen (RNA-Ebene) und diese im Zusammenhang mit den vorhandenen Organismen typen zu betrachten (DNA-Ebene). Der Nachweis der vorhandenen Bakterienpopulationen zeigt dabei auf, welches Potential die mikrobielle Lebensgemeinschaft besitzt, die Bestimmung der aktiven Mitglieder dieser Population zeigt an, wie dieses Potential zu einem bestimmten Zeitpunkt genutzt wird.

Im einzelnen werden die folgenden Schritte durchgeführt: Aus einer Umweltprobe werden die Nukleinsäuren extrahiert. Durch den enzymatischen Abbau mit RNase oder DNase wird daraus DNA bzw. RNA präpariert. DNA wird als Ausgangsmaterial verwendet, um die vorhandenen Bakterien aufzuzeigen; RNA, um die metabolisch aktiven Bakterien zu ermitteln. Aus DNA-Präparationen werden spezifische DNA-Fragmente mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert, z. B. eubakterielle 16S rRNA-codierende Genfragmente oder [NiFe] Hydrogenase-Genfragmente sulfatreduzierender Bakterien. Das daraus resultierende Gemisch von PCR-Produkten ist dadurch gekennzeichnet, daß die DNA-Fragmente in der Regel gleich lang sind, da sie von homologen Genen stammen. Sie variieren aber in der Sequenz, da sie von verschiedenen Organismen typen stammen. Die Identität der PCR-Produkte kann an dieser Stelle durch Hybridisierungen mit spezifischen Gensonden festgestellt werden. Eine weitergehende Charakterisierung der amplifizierten DNA-Fragmente setzt eine Vereinzelung der unterschiedlichen DNA-Fragmente voraus. Dies kann durch Klonierung erfolgen oder durch spezielle Gelelektrophoresen, die die Auftrennung gleichlanger, aber

Mikrobengemeinschaft

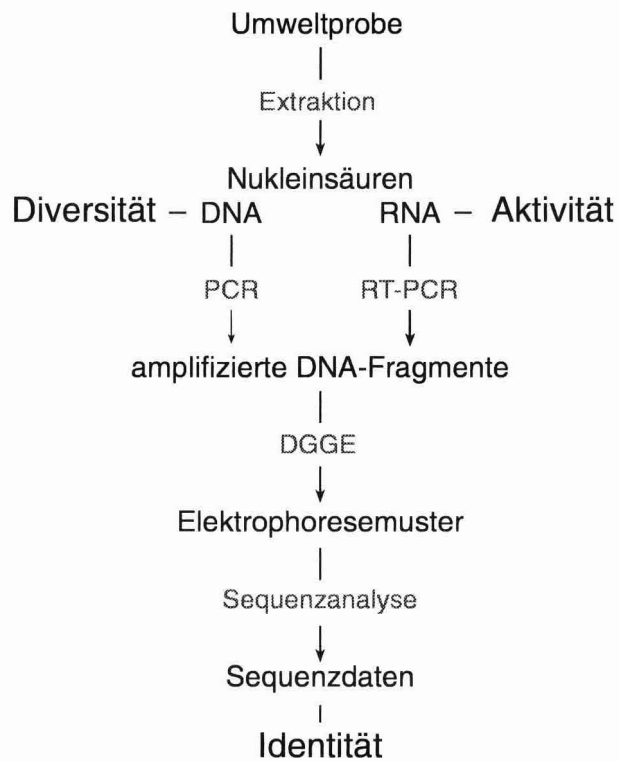


Abbildung 1.3: Fließschema zur Untersuchung mikrobieller Lebensgemeinschaften in Umweltproben mit molekularbiologischen Methoden (Erklärung im Text)

in der Nukleotidsequenz variierender DNA-Fragmente erlauben, z. B. die denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE) [52]. In der Nukleotidsequenz variierende DNA-Fragmente besitzen unterschiedliche Schmelzverhalten, was dazu führt, daß sie unterschiedlich in einem Acrylamidgel wandern, das einen linearen Gradienten an denaturierenden Agentien enthält. Muyzer et al. [133, 134] führten diese Methode in die mikrobielle Ökologie ein. Die DGGE Analyse der PCR-Produkte einer mikrobiellen Lebensgemeinschaft resultiert in einem Bandenmuster, das die genetische Diversität des untersuchten Gens und damit der zugehörigen Organismen visualisiert. Hybridisierungen mit spezifischen Gensonden können bestimmte Organismen in dem Bandenmuster aufzeigen. Distinkte Banden können aus dem Gel ausgeschnitten, die DNA eluiert, reamplifiziert und anschließend direkt sequenziert werden. Die so erhaltenen Nukleotidsequenzen werden mit den bekannten Sequenzen, die in Datenbanken hinterlegt sind, verglichen. Dadurch ist im Idealfall eine Identifizierung der Nukleotidsequenzen und des zugehörigen Organismenstyps möglich. Finden sich keine identischen Sequenzen, können die Verwandtschaftsbeziehungen der Organismen durch Ähnlichkeiten ihrer Sequenzen zu homologen Sequenzen anderer Organismen ermittelt werden. Eine nahezu identische Abfolge von verschiedenen molekularbiologischen Methoden ist für die Analyse von RNA-Sequenzen erforderlich. Die Amplifikation von RNA-Sequenzen kann allerdings nicht direkt erfolgen: In einem enzymatischen Schritt wird mittels Reverser Transkriptase die RNA zunächst in cDNA umgeschrieben; spezifische Nukleotidsequenzen werden dann aus der cDNA mit Hilfe der PCR amplifiziert (RT-PCR) und wie oben beschrieben analysiert.

Der Vergleich der DGGE-Muster von PCR-Produkten aus DNA und (m)RNA einer Bakteriengemeinschaft visualisiert die vorhandenen bzw. die aktiven Mitglieder der Gemeinschaft. Die anschließende Sequenzanalyse ermöglicht die Identifizierung und Klassifizierung der jeweiligen Organismen. Diese Herangehensweise verbindet die Untersuchungen zur Diversität (Struktur) und Aktivität (Funktion) natürlicher Bakterienpopulationen.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Gase

Handelsübliche Chemikalien mit dem Reinheitsgrad "zur Analyse" bzw. "reinst" wurden von den Firmen Aldrich (Steinheim), Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt), Riedel de Haën (Seelze), Serva (Heidelberg) und Sigma (München) bezogen. Spezielle Chemikalien für molekularbiologische Arbeiten stammten von Bio-Rad (München), Biozym (Hameln), Boehringer (Mannheim), FMC (über Biozym, Hameln), Pharmacia (Freiburg), Quiagen (Hilden), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma (München). Oligonukleotide wurden bei der Firma Biometra (Göttingen) im Auftrag synthetisiert. Die Taq DNA-Polymerase *Super Taq* lieferte die Firma HT Biotechnology LTD (Cambridge, UK), die Reverse Transkriptase *M-MLV RNase H Minus Reverse Transkriptase* die Firma Promega (über Serva, Heidelberg). DNase, RNasefrei und RNase, DNasefrei stammten von Boehringer (Mannheim), die zur Sequenzierung verwendeten Reagentien von USB (Bad Homburg), das Chemilumineszenzsubstrat CSPD von Tropix (über Serva, Heidelberg) und der DNA-Ligand Bisbenzimid-PEG von Hanse Analytik (Bremen). Radioaktives dCTP wurde von der Firma Amersham (Braunschweig) bezogen, ebenso wie die Röntgenfilme. Spezielle Filter stammten von der Firma Millipore (Eschborn). Die verwendeten Gase wurden von der Firma Messer-Griesheim (Osterholz-Scharmbeck) bezogen. In der Regel wurden alle Lösungen mit MilliQ-Wasser hergestellt.

2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.1 Bakterienstämme und Kulturbedingungen

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienreinkulturen sind in Tabelle 2.1 aufgeführt. Sie wurden falls nicht anders angegeben von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig (DSMZ) bezogen.

Tabelle 2.1: Verwendete Bakterienstämme

Bakterienstamm	Quelle
<i>Desulfovibrio baculatus</i>	DSM 2555 ^a
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	DSM 1926 ^a
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	DSM 1924 ^b
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	Vosjan
<i>Desulfovibrio gigas</i>	DSM 1382 ^b
<i>Desulfovibrio longus</i>	DSM 6739 ^a
<i>Desulfovibrio salexigens</i>	DSM 2638 ^a
<i>Desulfovibrio sulfodismutans</i>	DSM 3696
<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	DSM 1744 ^a
<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	DSM 644 ^b
<i>Desulfoarculus baarsii</i>	DSM 2075 ^c
<i>Desulfobacter curvatus</i>	DSM 3379 ^d
<i>Desulfobacter latus</i>	DSM 3381 ^d
<i>Desulfobacter postgatei</i>	DSM 2553 ^d
<i>Desulfobacterium autotrophicum</i>	DSM 3382 ^e
<i>Desulfobacterium vacuolatum</i>	DSM 3385 ^e
<i>Desulfobotulus sapovorans</i>	DSM 2055 ^c
<i>Desulfobulbus</i> sp.	DSM 2058 ^f
<i>Desulfococcus multivorans</i>	DSM 2059
<i>Desulfosarcina variabilis</i>	DSM 2060
<i>Desulfotomaculum orientis</i>	DSM 765
LTK4	Isaksen
PIB2	Cohen
<i>Alcaligenes eutrophus</i> H16	Friedrich
<i>Bacillus cereus</i>	Thauer
<i>Bacillus</i> sp.	de Vrind
<i>Escherichia coli</i>	Goosens
<i>Leptothrix discophora</i>	Ghiorzi
<i>Paracoccus denitrificans</i>	DSM 1404
<i>Pseudomonas facilis</i>	DSM 649
<i>Pseudomonas stutzeri</i> ZoBell	Zumft
<i>Rhodocyclus gelatinosus</i>	DSM 1709
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	DSM 1710
<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	DSM 123
<i>Xanthobacter autotrophicus</i>	DSM 432

Anzuchtbedingungen:

^aSalzwassermedium, 20 mM Laktat

^bSüßwassermedium, 20 mM Laktat

^cSüßwassermedium, 5 mM Buttersäure, 2,5 mM Capronat, 2,5 mM Caprylat

^dSalzwassermedium, 20 mM Acetat

^eSalzwassermedium, 20 mM Malat

^fSalzwassermedium, 20 mM Propionat

Die Anzucht von sulfatreduzierenden Bakterien erfolgte unter anaeroben Bedingungen wie bei Widdel und Bak [251] beschrieben.

a) Grundmedien für sulfatreduzierende Bakterien

	Süßwassermedium	Salzwassermedium
	[g/l]	[g/l]
NaCl	1,0	20,0
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	0,4	3,0
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,1	0,15
Na ₂ SO ₄	4,0	4,0
NH ₄ Cl	0,25	0,25
KH ₂ PO ₄	0,2	0,2
KCl	0,5	0,5

b) Zusammensetzung der Stammlösungen

Spurenelementlösung [g/l]:

Na ₂ -EDTA	5,2
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	2,1
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,19
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0,144
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	0,1
H ₃ BO ₃	0,03
NiCl ₂ · 6 H ₂ O	0,024
CuCl ₂ · 2 H ₂ O	0,002

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf pH 6 eingestellt. Die Lösung wurde autoklaviert und aliquotiert.

Vitamingemisch:

4-Aminobenzoesäure	4 mg
D(+)-Biotin	1 mg
Nicotinsäure	10 mg
Ca-D(+)-Panthotenat	5 mg
Pyridoxin · 2 HCl	15 mg
10 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 7,1	100 ml

Thiaminlösung:

Thiamin · 2 HCl	10 mg
25 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 3,4	100 ml

Vitamin-B₁₂-Lösung:

Cyanocobalamin	5 mg
H ₂ O	100 ml

Die Vitaminlösungen wurden sterilfiltriert (0,2 µm Porengröße) und aliquotiert.

Natriumbicarbonatlösung:

NaHCO_3 84 g/l

Die Natriumbicarbonatlösung wurde mit CO_2 gesättigt, in Portionen zu 30 ml auf Serumflaschen verteilt und unter CO_2 -Atmosphäre autoklaviert.

Natriumsulfidlösung:

$\text{Na}_2\text{S} \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$ 24 g/l

Vor der Herstellung der Natriumsulfidlösung wurden die Natriumsulfidkristalle mit H_2O gewaschen, um Oxidationsprodukte zu entfernen. Die Kristalle wurden unter N_2 -Atmosphäre in Wasser gelöst, in Portionen zu 15 ml auf Serumflaschen verteilt und unter N_2 -Atmosphäre autoklaviert.

Organische Substrate:

50% (5,7 M) Natriumlaktatlösung

2 M Natriumacetat, pH 7,2

2 M Malat, pH 7,5

2 M Propionat, pH 8

2 M Buttersäure, pH 7,5

1 M Capronat, pH 7,5

0,5 M Caprylat, pH 7,5

Salze der Carbonsäuren wurden als Stammlösungen aus den freien Säuren und NaOH hergestellt und der pH-Wert eingestellt. Die Lösungen wurden autoklaviert.

Die hitzestabilen Salze der Grundmedien wurden in Wasser gelöst und in einem Spezialkolben mit Begasungsaufsatz [248] autoklaviert. Als Redoxindikator wurde dem Medium 0,25 ml Resazurin [1 mg/ml] pro Liter vor dem Autoklavieren zugegeben. Nach dem Abkühlen des Mediums unter N_2/CO_2 -Atmosphäre [90/10 (v/v)] wurden folgende Zusätze pro Liter Medium aus sterilen Aliquots zugesetzt.

Spurenelementlösung	1 ml
Vitamingemisch	1 ml
Thiaminlösung	1 ml
Vitamin-B ₁₂ -Lösung	1 ml
Natriumbicarbonatlösung	30 ml
Natriumsulfidlösung	15 ml

Der pH-Wert des Mediums sollte bei 7,0 bis 7,3 liegen und wurde gegebenenfalls mit 1 M H_2SO_4 oder 1 M Na_2CO_3 eingestellt. Mit schwachem Überdruck an N_2/CO_2 [90/10 (v/v)] wurde das fertige Medium in der Regel luftblasenfrei auf 50 ml-Schraubverschlußflaschen verteilt. Kulturgefäße mit Gasraum wurden mit N_2/CO_2 [90/10 (v/v)] nach der Hungate-Technik [18] begast und mit Gummistopfen oder Septen verschlossen. Organische Substrate wurden als Stammlösungen angesetzt und dem Grundmedium in entsprechender Konzentration (Tabelle 2.1) zugegeben. Unmittelbar vor Gebrauch wurde dem Medium etwas steriles Natriumdithionit zugesetzt.

Die Anzucht von *Desulfovibrio*-Stämmen mit Wasserstoff erfolgte in Grundmedium, dem als Kohlenstoffquelle Acetat in einer Endkonzentration von 2 mM zugesetzt und das mit H_2/CO_2 [80/20 (v/v)] nach der Hungate-Technik steril begast wurde. Der Gasraum entsprach dabei mindestens einem Drittel des Volumens des Kulturgefäßes.

Die sulfatreduzierenden Bakterien wurden bei 28–30 °C im Dunkeln angezogen. Stammkulturen wurden in 50 ml-Fläschchen ohne Gasraum im Kühlschrank bei 4 °C gehalten. Zur Reinheitskontrolle wurden die Kulturen im Phasenkontrastmikroskop bei 400-facher Vergrößerung auf einheitliche Zellmorphologie überprüft.

Die verwendeten phototrophen Organismen *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodocyclus gelatinosus* und *Rhodopseudomonas palustris* wurden freundlicherweise von Dr. Armin Ehrenreich zur Verfügung gestellt, die aeroben Bakterienstämme *Alcaligenes eutrophus*, *Pseudomonas facilis*, *Xanthobacter autotrophicus*, *Paracoccus denitrificans*, *Pseudomonas stutzeri* und *Bacillus cereus* von Dr. Sabine Lechner (Max-Planck-Institut für Terrestrische Mikrobiologie, Marburg), die Stämme *Escherichia coli*, *Bacillus* sp. und *Leptothrix discophora* von Dr. Gerard Muyzer und die sulfatreduzierenden Bakterienstämme PIB2 und LTK4 von Dr. Andreas Teske, *Desulfotomaculum orientis*, *Desulfosarcina variabilis* und *Desulfococcus multivorans* von Dr. Rolf Lillebæk, *Desulfovibrio sulfodismutans* von Kirsten Habicht.

2.2.2 Wachstumsversuche

Für Wachstumsversuche mit sulfatreduzierenden Bakterien wurde ein großes Volumen Medium mit 1–5% (v/v) einer Vorkultur beimpft. 10 bzw. 50 ml davon wurden auf Kulturgefäße verteilt, um die Probennahme zu verschiedenen Zeitpunkten zu erleichtern. Die Kulturen wurden bei 28 °C inkubiert.

Das Wachstum der Bakterien wurde als Zunahme der Absorption gegen unbeimpftes Nährmedium bestimmt. Die Messung wurde entweder direkt in Hungate-Röhrchen oder in Kunststoffküvetten bei 660 nm durchgeführt.

PBS:

1,44 g Na₂HPO₄

0,24 g KH₂PO₄

0,8 g NaCl

0,2 g KCl ad 1000 ml H₂O

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 7,4 eingestellt.

Die Zellzahl von Bakterienkulturen wurde mittels DAPI-Färbung [156] entsprechend dem folgenden Protokoll bestimmt. Die Zellen wurden mit 0,3 Vol. 4% (w/v) Paraformaldehyd in PBS fixiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert. 50–300 µl der fixierten Zellen wurden in 5 ml PBS, 0,1% (v/v) Triton X-100 verdünnt und 3 x 5 Sekunden mit Ultraschall behandelt. Eine definierte Menge der Probe wurde mit 600 µl DAPI-Lösung [1 mg/100 ml SSC] für 5 Minuten inkubiert. Durch Anlegen eines schwachen Vakuums wurde die Lösung auf schwarze Isopore Filter (Millipore GTBP 02500, 0,2 µm Porengröße) abfiltriert. Der Filter wurde auf einen Objektträger übertragen, mit einem Tropfen Immersionsöl versehen, und das Deckgläschen aufgelegt. Innerhalb von 24 Stunden wurden die Zellen auf dem Filter im Fluoreszenzmikroskop bei 100-facher Vergrößerung ausgezählt.

2.2.3 Anreicherung und Isolierung von Bakterien

Anreicherungen von sulfatreduzierenden Bakterien wurden in 50 ml Süßwassermedium mit verschiedenen Kohlenstoffquellen und Elektronendonatoren (ohne, 20 mM Propionat, 20 mM Acetat, 20 mM Laktat, 10 mM Formiat/2 mM Acetat, Wasserstoff/2 mM Acetat) angesetzt. Als Inokulum diente ca. 5% (v/v) Schlamm aus einem methanogenen Bioreaktor (TU Delft, Holland). Nachdem Sulfidproduktion stattfand, wurde 2–10% (v/v) der Anreicherung in frisches Medium übertragen. Nach 4 Passagen wurde die Isolierung von Reinkulturen in Agarverdünnungsreihen [251] durchgeführt.

Der Agar wurde zunächst folgendermaßen vorbereitet: 3,3 g Agar wurden in etwa 300 ml Wasser 15 Minuten gerührt und der Überstand nach anschließender Sedimentation verworfen. Dieser Vorgang wurde fünfmal wiederholt und der Agarbodensatz in 100 ml Wasser aufgenommen. Der Agar wurde in einem siedenden Wasserbad geschmolzen und in Portionen zu 3 ml auf Reagenzgläser verteilt, die verschlossen mit Aluminiumkappen autoklaviert wurden. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

Zur Herstellung von Agarverdünnungsreihen wurde der Agar erneut im siedenden Wasserbad geschmolzen und in einem 40 °C Wasserbad flüssig gehalten. Nach Zugabe von 6 ml vorgewärmtem Medium wurden die Aluminiumkappen der Reagenzgläser durch Butylstopfen ersetzt. Das erste Agarröhrchen wurde mit etwa 100 µl Anreicherungskultur beimpft, mit dem Stopfen verschlossen und einmal umgeschwenkt. Ein kleines Volumen dieses Ansatzes wurde in das nächste Röhrchen gegeben, umgeschwenkt und ein kleines Volumen in das folgende Röhrchen überführt. In dieser Weise wurde fortgefahren bis eine Reihe von 6 Röhrchen komplett war. Die beimpften Agarröhrchen wurden in einem Eiswasserbad abgekühlt, mit N₂/CO₂ [90/10 (v/v)] bzw. mit H₂/CO₂ [80/20 (v/v)] begast und umgedreht bei 28 °C inkubiert. Einzelne Bakterienkolonien wurden dann mit einer ausgezogenen Pasteurpipette, mit der etwas Medium aufgenommen wurde, aus dem Agar angesaugt und in 10 ml frisches Medium überführt.

2.3 Molekularbiologische Methoden

Puffer, Lösungen und unsterile Gefäße wurden für das Arbeiten mit Nukleinsäuren vor der Verwendung 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert, um eventuell vorhandene Nukleasen zu inhibieren. Bei Lösungsmitteln oder Lösungen, die mit organischen Lösungsmitteln angesetzt wurden, war eine Vorbehandlung nicht notwendig.

2.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren

2.3.1.1 Präparation bakterieller Gesamt-DNA

Die Präparation bakterieller Gesamt-DNA erfolgte nach Marmur [125] mit einigen Modifikationen.

TE-Puffer:

10 mM Tris-HCl, pH 8
1 mM EDTA

10–50 ml einer Bakterienkultur wurde in einer Tischzentrifuge 15 Minuten bei 5000 rpm pelletiert, kurz in 15–25 ml 10 mM Tris-HCl, pH 8 gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml TE, pH 8 resuspendiert. Die Zellyse erfolgte durch Zugabe von 2 μ l 0,5 M EDTA, pH 8 und 50 μ l Lysozym [10 mg/ml in 10 mM Tris-HCl, pH 8] und 30 Minuten Inkubation bei 37°C. Dann wurden 25 μ l 10% (w/v) SDS und 50 μ l Proteinase K [20 mg/ml in TE, pH 8] hinzugefügt und die Lösung 2 Stunden bei 55°C inkubiert. Nach Zugabe von 1 Vol. Phenol (Roth) wurden die Phasen 5 Minuten gemischt und anschließend 5 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Dieser Extraktionsschritt wurde mit der wäßrigen Oberphase und 1 Vol. Phenol-Chlorform-Isoamylalkohol (25:24:1) zweimal wiederholt. Die Nukleinsäuren wurden mit 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat, pH 5,5 und 2,5 Vol. eiskaltem Ethanol bei –20°C über Nacht oder bei –80°C für mindestens 30 Minuten aus der wäßrigen Phase gefällt, 30 Minuten bei 13000 rpm abzentrifugiert, mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, erneut 15 Minuten zentrifugiert und 15 Minuten unter Vakuum getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in einem kleinen Volumen TE, pH 8 aufgenommen. RNA wurde gegebenenfalls durch 30 Minuten Inkubation mit 0,5 μ g RNase pro μ g RNA entfernt.

Eine andere, sehr schnelle DNA-Extraktionsmethode ist das sogenannte “freeze-thawing”. Die Zellen wurden geerntet, mit 10 mM Tris-HCl, pH 8 gewaschen und in 100 μ l Wasser resuspendiert. Dann folgten 5 Zyklen mit jeweils 1 Minute Inkubation bei 40°C und 1 Minute Inkubation in flüssigem Stickstoff. Das Zellysat wurde 10 Minuten bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Überstand, der die DNA enthält, wurde in der PCR verwendet.

2.3.1.2 Präparation bakterieller Gesamt-RNA

Die Präparation bakterieller Gesamt-RNA erfolgte im wesentlichen nach Oelmüller et al. [143], wobei die Volumina der verwendeten Lösungen auf Kulturen von sulfatreduzierenden Bakterien angepaßt wurden.

20 x SSC:

3 M NaCl
0,3 M Natriumcitrat, pH 7

AE-Puffer:

20 mM Natriumacetat, pH 5,5
1 mM EDTA

10 x DNase-Puffer:

400 mM Tris-HCl, pH 7,5
60 mM MgCl₂
20 mM CaCl₂

Bakterien einer 50 ml (10 ml) Kultur wurden durch 15 Minuten Zentrifugation bei 4 °C und 4500 rpm gerettet und in 4 ml (1ml) SSC resuspendiert. Je 1 ml wurde auf Eppendorfgefäße verteilt und 5 Minuten bei 4 °C und 13000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20 °C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert. Die eingefrorenen Zellen wurden dann in 500 µl AE-Puffer aufgenommen. Nach Zugabe von 1 ml 60 °C heißem Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) und 10 µl 25% (w/v) SDS erfolgte die Inkubation unter Schütteln für 10 Minuten bei 60 °C. Die Lösung wurde im Eisbad abgekühlt und 5 Minuten bei 4 °C und 13000 rpm zentrifugiert. Die wäßrige Oberphase wurde abgenommen, 62,5 µl 2 M Natriumacetat, pH 5,2 und 1 ml Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol zugegeben. Die Lösung wurde 5 Minuten gemischt und zur Phasentrennung 5 Minuten bei 4 °C und 13000 rpm zentrifugiert. Die wäßrige Phase wurde noch einmal mit 1 ml Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol extrahiert und anschließend mit 1250 µl Ethanol bei -80 °C 30 Minuten gefällt. Die RNA wurde durch 30 Minuten Zentrifugation bei 13000 rpm sedimentiert, das Pellet mit 500 µl 70% (v/v) Ethanol gewaschen, 10 Minuten zentrifugiert und 15 Minuten unter Vakuum getrocknet. Nun wurde die RNA entweder in einem kleinen Volumen Wasser oder zur Entfernung der DNA direkt in 100 µl DNase-Puffer aufgenommen. Nach Zugabe von 4 µl DNase [10 U/µl] wurde der Ansatz bei 37 °C etwa 40 Minuten inkubiert. Um das Enzym zu inaktivieren, wurden 250 µl Wasser, 50 µl 2 M Natriumacetat, pH 5,2 und 400 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol hinzugefügt, 5 Minuten gemischt und 5 Minuten zentrifugiert. Die RNA wurde aus der wäßrigen Phase mit 1 ml eiskaltem Ethanol bei -20 °C über Nacht gefällt, 30 Minuten zentrifugiert, das Pellet mit 500 µl 70% (v/v) Ethanol gewaschen, zentrifugiert, getrocknet und in 20–40 µl Wasser aufgenommen. RNA-Präparationen wurden bei -20 °C gelagert.

2.3.1.3 Präparation von DNA aus Agarosegelen

Für die Präparation von DNA aus Agarosegelen sind verschiedene Methoden beschrieben worden. In dieser Arbeit wurden DNA Purification Kits bzw. Gel Extraction Kits verschiedener Hersteller verwendet (Gelase-System, Biozym; Spinbind Units, FMC; Qiaex II, Quiagen; Qiaquick, Quiagen). Die DNA wurde in einem horizontalen TBE-Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Unter UV-Licht wurde die zu isolierende DNA-Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten. Im Prinzip wurde das Agarosestückchen dann aufgelöst, und die DNA entweder durch Filtration auf eine Membran oder direkt an Partikel gebunden. Entsprechend den Anweisungen der Hersteller wurde die DNA mit einer Ethanollösung gewaschen und mit einem kleinen Volumen Wasser oder TE-Puffer, pH 8 eluiert.

Als schnellste Methode sei hier nur der *Qiaquick Kit* beschrieben. Das Gelstückchen wurde gewogen, mit 3 Vol. *Puffer QX1* vermischt und 10 Minuten bei 50 °C inkubiert. Die Lösung wurde in eine *Qiaquick spin column* gegeben, die in einem 2 ml-Reaktionsgefäß placiert wurde, und 60 Sekunden bei maximaler Umdrehungszahl zentrifugiert. Die Lösung wurde verworfen, und die *Qiaquick spin column* mit 750 µl *Puffer PE* beladen, 5 Minuten stehen gelassen und 60 Sekunden zentrifugiert. Der Puffer wurde verworfen und die *spin column* nochmals 60 Sekunden zentrifugiert. Das 2 ml-

Reaktionsgefäß wurde durch ein sauberes 1,5 ml-Reaktionsgefäß ersetzt, und die DNA durch Zugabe von 30–50 μ l Wasser und 60 Sekunden Zentrifugation eluiert.

Eine weitere Möglichkeit bietet die Verwendung der Biometra E91 Elektrophoreseeinheit wie bei Muzer et al. [137] beschrieben. Dabei kann die Auftrennung von DNA während des Gellaufs beobachtet werden. Es wurden horizontale 2% (w/v) TBE-Agarosegele gegossen, die Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,5 μ g/ml enthielten, wobei etwa 3 cm unterhalb der Probenauftragstasche eine weitere Geltasche lag. Der Lauffuffer enthielt ebenfalls Ethidiumbromid. Befand sich die DNA in der zweiten Geltasche, wurde sie mit einer Pipette abgesogen, mit 0,1 Vol. 5 M NaCl und 2,5 Vol. Ethanol gefällt, mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, und in einem kleinen Volumen Wasser aufgenommen.

2.3.1.4 Präparation von DNA aus Acrylamidgelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Acrylamidgelen erfolgte wie bei Muzer et al. [137] beschrieben. N,N'-bis-Acrylylcystamin (BAC) wurde verwendet, um "lösbare" Acrylamidgele herzustellen. Unter UV-Licht wurden die zu isolierenden DNA-Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten oder mit Hilfe einer abgeschnittenen Pasteurpipette Teile der Bande aus dem Gel gestanzt, falls dieses noch für Hybridisierungsexperimente verwendet werden sollte. Die DNA wurde durch Inkubation bei 37 °C über Nacht in 50–100 μ l 2-Mercaptoethanol aus dem Gelstück eluiert, mit 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat, pH 5,5 oder 5 M NaCl und 2,5 Vol. Ethanol gefällt, mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen und in 50–100 μ l Wasser aufgenommen. 1–2 μ l dieser DNA-Lösung wurden für die enzymatische Reamplifikation in der PCR (Endvolumen 50 μ l) eingesetzt.

2.3.1.5 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Eine verdünnte Probe der isolierten Nukleinsäuren wurde in Quarzküvetten von 1 cm Schichtdicke gegen einen Blindwert photometrisch vermessen. Aus dem Spektrum (220–340 nm) konnte sowohl die Konzentration als auch die Reinheit der Nukleinsäuren abgeleitet werden [186].

Eine Absorption von 1 bei 260 nm entspricht einer DNA-Konzentration von 50 μ g/ml und einer RNA-Konzentration von 40 μ g/ml. Aus dem Quotienten von Absorptionswerten bestimmter Wellenlängen kann die Reinheit der Nukleinsäuren bestimmt werden. Die Werte für relativ reine Nukleinsäurepräparationen sind: $A_{260}/A_{280} = 1,8\text{--}2$ und $A_{260}/A_{230} \approx 2,25$.

Die Quantifizierung von geringen Mengen an Nukleinsäuren, z. B. aus Gelen eluierte DNA, erfolgte über die Auftrennung in Agarosegelen und anschließende Ethidiumbromidfärbung. Dabei wurde die Konzentration anhand der Farbintensität durch den Vergleich mit einem DNA-Standard bekannter Konzentration abgeschätzt.

2.3.2 Enzymatische Amplifikation von Nucleinsäuren

2.3.2.1 DNA: Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die Polymerase Chain Reaction (PCR) ermöglicht, spezifische DNA-Fragmente aus einem Nucleinsäuregemisch zu amplifizieren; das Fragment wird dabei durch zwei sogenannte Primer (Oligonucleotide) definiert [185]. Die Reaktion wurde in einem Techné PHC-3 Temperature Cycler durchgeführt.

10 x PCR-Puffer:
100 mM Tris-HCl, pH 9
15 mM MgCl₂
500 mM KCl
0,1% (w/v) Gelatine
1% (v/v) Triton X-100

dNTP-Lösung:
2,5 mM dATP
2,5 mM dTTP
2,5 mM dCTP
2,5 mM dGTP

Primer:
50 pmol/ μ l in Wasser

Taq Polymerase:
0,5 U/ μ l

Die Amplifikation von DNA fand in folgendem Reaktionsgemisch statt, wobei das Reaktionsvolumen in der Regel 50 μ l betrug:

1 x PCR-Puffer
200 μ M jedes dNTPs
25 pmol "forward"-Primer
25 pmol "reverse"-Primer
0,5 U Super Taq DNA-Polymerase
DNA

10–100 ng DNA (bei Umweltproben bis zu 1 μ g DNA) oder 1–5 μ l Zellysate wurden mit den PCR-Reagentien vermischt und mit 1–2 Tropfen Mineralöl überschichtet. Dann wurde das jeweilige PCR-Programm gestartet. Ein PCR-Zyklus besteht grundsätzlich aus 3 Schritten: Denaturierung (1 Minute bei 94–95 °C), Annealing (1 Minute bei der entsprechenden Temperatur, abhängig vom Primerpaar) und Elongation (3 Minuten bei 72 °C). In der Regel wurden 30 PCR-Zyklen durchgeführt. Um die Bildung von unspezifischen Nebenprodukten zu minimieren, wurde die Taq Polymerase nach dem ersten Denaturierungsschritt (5 Minuten, 94–95 °C) bei einer Temperatur von 80 °C zugegeben (Hot start). Eine sogenannte "touchdown"-PCR [46] wurde durchgeführt, um gegebenenfalls die Spezifität der Reaktion zu erhöhen. Dabei wurde die Annealingtemperatur

zunächst 10 °C höher als die erwartete mittlere Schmelztemperatur (T_m -Wert, siehe Abschnitt 2.3.4.3) gesetzt und in jedem zweiten folgenden Zyklus um 1 °C verringert. Bei der Endtemperatur wurden dann 10 weitere Zyklen durchgeführt. Der letzte Zyklus jedes PCR-Programms endete mit 10 Minuten bei 72 °C. Danach wurden die Proben auf 15 °C abgekühlt. Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte durch Auftrennung von 1/10 Vol. des Reaktionsansatzes in 2% (w/v) Agarosegelen. Als negative Kontrolle diente stets ein PCR-Ansatz ohne DNA.

Die folgende Tabelle enthält die in dieser Arbeit zur Amplifikation von eubakteriellen 16S rRNA-Sequenzen verwendeten Primer. Primerpaar GM3f und GM4r wurde in einem PCR-Programm mit 30 Zyklen bei einer Annealingtemperatur von 40 °C verwendet [78]. Für Primerpaar GM5f und DS907r wurde eine "touchdown"-PCR von 65–55 °C durchgeführt [135]. Sollten diese PCR-Fragmente anschließend in einem denaturierenden Gradientengel aufgetrennt werden, wurde der Primer GM5f mit GC-Klammer (GM5fGC) verwendet.

Primer ^a	Position ^b	Sequenz
GM3f	8–24	5'-AGAGTTTGATC(A/C)TGGC-3'
GM4r	1492–1507	5'-TACCTTGTTACGACTT-3'
GM5f	341–357	5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'
DS907r	907–928	5'-CCCCGTCAATTCCTTTGAGTTT-3'
GC-Klammer ^c		5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGG CGGGGCGGGGGCACGGGGGG-3'

^af ist der "forward"-Primer; r ist der "reverse"-Primer

^bPosition im 16S rRNA-Gen von *Escherichia coli* [16]

^cDie GC-Klammer wird an das 5'-Ende des Primers GM5f angehängt.

Die zur Amplifikation von [NiFe] Hydrogenase-Genfragmenten verwendeten Primer und PCR-Bedingungen sind im Kapitel Ergebnisse unter Abschnitt 3.1.1 und 3.1.2 aufgeführt.

2.3.2.2 RNA: cDNA-Synthese und PCR (RT-PCR)

Die Kombination von cDNA-Synthese und PCR ermöglicht die Amplifikation von RNA-Sequenzen [226] und wurde im wesentlichen nach einem Protokoll von Kawasaki [94] durchgeführt.

5 x RT-Puffer:
250 mM Tris-HCl, pH 8,3
375 mM KCl
15 mM MgCl₂
50 mM DTT

Die Reverse Transkription fand in einem Volumen von 20 μ l in folgendem Reaktionsgemisch statt:

1 x PCR-Puffer, 10 mM DTT oder 1 x RT-Puffer
 1 mM jedes dNTPs
 10 pmol Hexanukleotide
 200 U M-MLV H⁻ Reverse Transkriptase
 RNA

Zunächst wurden 0,1–1 µg RNA in einem Volumen von 10 µl zusammen mit 1 µl Hexanukleotidgemisch (Boehringer, 1:50 verdünnt) 5 Minuten auf 70 °C erhitzt und sofort im Eisbad abgekühlt, um Aggregate und Sekundärstrukturen aufzubrechen. Nach Zugabe aller Reagentien bis auf das Enzym wurde die Probe 2 Minuten auf 37 °C erwärmt, die Reverse Transkriptase zugegeben und 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Um das RNA-cDNA-Hybrid zu denaturieren und das Enzym zu inaktivieren, wurde das Reaktionsgemisch (RT-Mix) anschließend 5 Minuten auf 95 °C erhitzt und sofort auf Eis gestellt. Es konnte nun direkt für die PCR verwendet oder bei -20 °C gelagert werden. Die PCR wurde mit 1–5 µl des RT-Mixes wie in Abschnitt 2.3.2.1 beschrieben durchgeführt. Als negative Kontrollen wurden die RNA-Präparationen, ohne vorherige Synthese der cDNA, und/oder RT-Mixe, ohne Zugabe der Reversen Transkriptase, in einer PCR eingesetzt, um sicherzustellen, daß amplifizierte DNA-Fragmente nicht aus kontaminierender DNA in den RNA-Präparationen resultieren.

2.3.3 Transfer von Nukleinsäuren auf feste Träger

Für anschließende Hybridisierungen mit spezifischen Sonden wurden Nukleinsäuren auf feste Träger (Nylonmembranen) übertragen.

2.3.3.1 Southern Blot

Den Transfer von gelelektrophoretisch aufgetrennter DNA bezeichnet man als Southern Blot [200]. In dieser Arbeit wurde jedoch nicht die von Southern ursprünglich beschriebene Methode verwendet. Es wurde ein elektrophoretischer Transfer unter semitrockenen Bedingungen mit der Trans-Blot SD semi-dry Transfer Cell (Bio-Rad) nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Diese Methode gewährleistet eine effiziente und sehr schnelle Übertragung von kleinen DNA-Fragmenten.

10 x TBE:
 108 g Tris
 55 g Borsäure
 40 ml 0,5 M EDTA, pH 8
 ad 1000 ml Wasser

Das zu blottende Gel wurde 30 Minuten in 0,5 x TBE äquilibriert, nachdem die Positionen von Markern und Banden durch das Einstanzen kleiner Löcher markiert waren. Eine Nylonmembran (Hybond N+, Amersham) wurde entsprechend der Größe des Gels zugeschnitten und erst in Wasser und dann in 0,5 x TBE geschwenkt. 12 Stücke Whatman 3MM-Filterpapier in Gelgröße wurden in 0,5 x TBE getränkt. Nacheinander

wurden 6 Lagen Filterpapier, die Membran, das Gel und nochmal 6 Lagen Filterpapier luftblasenfrei auf die Platinanode gelegt. Auf dem Stapel wurde dann die Kathode placiert und der Deckel geschlossen. Der Elektrotransfer erfolgte für Agarosegele bei einem konstanten Strom von $3,55 \text{ mA/cm}^2$ für 10 Minuten und für denaturierende Gradientengele bei 400 mA für 1 Stunde. Danach wurden die Markierungslöcher mit einer Nadel auf die Membran übertragen. Die Membran wurde 15 Minuten in 0,4 M NaOH, 0,6 M NaCl denaturiert und durch zweimaliges Waschen für 5–10 Minuten in $2,5 \times \text{SSC}$ neutralisiert. Zur Fixierung der DNA wurde die feuchte Membran in einem DNA-Crosslinker (Bio-Rad) 45 Sekunden mit 302 nm UV-Licht bestrahlt. Bis zur weiteren Verarbeitung kann die getrocknete Membran zwischen Filterpapier, eingewickelt in Alufolie, bei -20°C gelagert werden. Die Effizienz des Transfers wurde durch das erneute Anfärben des geblotteten Gels mit Ethidiumbromid überprüft.

2.3.3.2 Dot Blot

Nukleinsäuren können auch direkt auf feste Träger aufgetragen werden. Waschlösungen und Proben werden dabei durch Anlegen eines Vakuums auf die Membran aufgebracht. Hierfür wurde die Dot Blot Apparatur von Bio-Rad verwendet.

Eine Nylonmembran wurde für mindestens 10 Minuten in Wasser geschwenkt und in der Apparatur placiert, wobei unbenutzte Vertiefungen mit Parafilm bedeckt wurden. Die Membran wurde mit $500 \mu\text{l TE}$, pH 8 pro Vertiefung gewaschen. Nach Zugabe von 1 M NaOH und 200 mM EDTA, pH 8 bis zu einer Endkonzentration von 0,4 M NaOH und 10 mM EDTA in einem Endvolumen von mindestens $200 \mu\text{l}$ wurden die DNA-Proben für 10 Minuten bei 95°C denaturiert und auf die Membran aufgetragen. Anschließend wurde die Membran mit $500 \mu\text{l}$ 0,4 M NaOH pro Vertiefung gespült. Die Membran wurde aus der Apparatur genommen, kurz in $2 \times \text{SSC}$ gewaschen und die DNA durch UV-Bestrahlung wie oben beschrieben fixiert.

2.3.4 Hybridisierungen

Die Markierung der DNA-Sonden sowie die Hybridisierungen wurden mit den DIG Oligo Labeling und DNA Detection Kits von Boehringer nach den Standardprotokollen des Herstellers durchgeführt. Bei dieser nicht-radioaktiven Methode werden DNA-Sonden durch den Einbau von Desoxyuridintriphosphaten markiert, die über einen Spacer mit dem Steroidhaptan Digoxigenin (DIG) verbunden sind. Der Nachweis des Hybrids erfolgt über eine Enzym-gekoppelte Immunreaktion. Das Antikörperkonjugat, Anti-Digoxigenin-Alkalische Phosphatase-Konjugat, bindet an das Digoxigenin der markierten Sonde. Die Hybridmoleküle werden sichtbar gemacht durch eine nachfolgende Enzym-katalysierte Farbreaktion mit 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat (X-Phosphat) und Nitroblau-Tetrazoliumsalz (NBT). Hybridmoleküle können auch durch die Reaktion mit dem Chemilumineszenzsubstrat CSPD (Serva Tropix) auf Röntgenfilmen detektiert werden. Dies hat u. a. den Vorteil, daß die Nachweisreagenzien von der Membran entfernt werden können, um Rehybridisierungen mit anderen Sonden

durchzuführen.

2.3.4.1 Markierung von Oligonukleotiden

Oligonukleotidsonden wurden mit Hilfe des Enzyms Terminale Transferase durch den Einbau eines DIG-ddUTP am 3'-Ende markiert.

Tailing-Puffer:
1 M Kaliumcacodylat
125 mM Tris-HCl, pH 6,6
1,25 mg/ml BSA

Folgende Reagentien wurden auf Eis zusammengegeben und 15 Minuten bei 37 °C inkubiert:

4 μ l Tailing-Puffer
4 μ l 25 mM CoCl₂-Lösung
1 μ l Oligonukleotid (100 pmol)
1 μ l Terminale Transferase
1 μ l 1 mM DIG-ddUTP
9 μ l H₂O

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 μ l einer Glycogenlösung (1 μ l Glycogenlösung [20 mg/ml] in 200 μ l 200 mM EDTA, pH 8 verdünnt) gestoppt, und die DNA mit 2,5 μ l 4 M LiCl und 75 μ l eiskaltem Ethanol 30 Minuten bei -80 °C gefällt. Nach der Zentrifugation (30 Minuten, 13000 rpm) wurde das Pellet mit 50 μ l eiskaltem 70% (v/v) Ethanol gewaschen, 15 Minuten zentrifugiert, kurz unter Vakuum getrocknet und in 50 μ l TE, pH 8 aufgenommen. Markierte DNA-Sonden können bei -20 °C gelagert werden. Die Effizienz der Markierung wurde nach dem Standardprotokoll von Boehringer überprüft.

2.3.4.2 Markierung von Polynukleotiden

Längere DNA-Sonden wurden mit Hilfe der PCR hergestellt und während der Reaktion direkt durch den Einbau mehrerer DIG-Desoxyuridintriphosphate markiert [107].

Folgende Reagentien wurden in einem Endvolumen von 50 μ l zusammengegeben und das entsprechende PCR-Programm ausgeführt:

1 x PCR-Puffer
100 μ M dATP, dCTP und dGTP
70 μ M dTTP
30 μ M DIG-dUTP
25 pmol "forward"-Primer
25 pmol "reverse"-Primer
0,5 U Taq DNA-Polymerase
20–100 ng DNA

Eine erfolgreiche Markierung konnte durch die gelelektrophoretische Auftrennung der so markierten DNA-Fragmente überprüft werden. In einem Agarosegel wandern sie langsamer als unmarkierte PCR-Produkte, die mit demselben Primerpaar amplifiziert wurden. DIG-markierte PCR-Produkte wurden wie unter Abschnitt 2.3.1.3 beschrieben aufgereinigt, bevor sie als Sonden für Hybridisierungen verwendet wurden.

2.3.4.3 Hybridisierung mit Oligonukleotidsonden

Die Hybridisierung mit Oligonukleotidsonden erfordert Hybridisierungsbedingungen, die auf die Länge und Sequenz der Sonde abgestimmt sind. Der T_m -Wert (mittlere Schmelztemperatur) kann durch folgende Formel [186] berechnet werden:

$$T_m = 81,5 + 16,6(\log_{10}M) + 0,41(\%G + C) - (600/N)$$

N ist die Länge des Oligonukleotides (Anzahl der Nukleotide) und M ist die molare Konzentration an monovalenten Kationen in der Hybridisierungslösung. Für kurze Oligonukleotide (< 18 Nukleotide) entspricht der T_m -Wert der Summe, die sich ergibt, wenn man die Anzahl von G und C mit 4°C und die Anzahl von A und T mit 2°C multipliziert [186]. Die Hybridisierung wird bei einer Temperatur, die 5–10°C unterhalb des T_m -Wertes liegt, durchgeführt. Dies ist jedoch nur ein Richtwert. Die optimale Hybridisierungs- bzw. Waschtemperatur muß empirisch bestimmt werden. Die folgende Tabelle enthält die Hybridisierungsbedingungen für die verwendeten Oligonukleotidsonden.

DNA-Sonde	Position ^a	Sequenz	Hybridisierungs-/ Waschtemperatur
16S rRNA:			
Db804	804–821	5'-CAACGTTTACTGCGTGGA-3'	40/45°C [42]
Dv687	671–687	5'-TACGGATTTCACTCCT-3'	40/45°C [42]
SRB385	385–402	5'-CGGCGTTGCTGCGTCAGG-3'	50/50°C [4, 133]
[NiFe] Hydrogenase:			
Hyd4	1786–1815	5'-TTCACCAA(C/T)GCCTAC TTCT(G/C)GGCGCCAC-3'	50/50°C

^aPosition im 16S rRNA-Gen von *Escherichia coli* [16] bzw. im [NiFe] Hydrogenase-Gen von *Desulfovibrio vulgaris* [38]

Hybridisierungen wurden in rotierenden Glasröhrchen in Hybridisierungsöfen (Hybaid) durchgeführt. Mengenangaben beziehen sich auf eine Membrangröße von 15 cm x 17 cm (DGGE).

Blocking-Stammlösung:

10% (w/v) Blocking-Reagenz in Puffer 1

Hybridisierungslösung:

5 x SSC

2% (w/v) Blocking-Reagenz

0,1% (w/v) N-Lauroylsarkosin

0,02% (w/v) SDS

Puffer 1:

0,1 M Maleinsäure

0,15 M NaCl, pH 7,5

Der pH wurde mit fester NaOH eingestellt.

Waschpuffer:

0,3% (v/v) Tween 20 in Puffer 1

Puffer 2:

Blocking-Stammlösung 1:10 verdünnt in Puffer 1

Puffer 3:

0,1 M Tris-HCl

0,1 M NaCl

50 mM MgCl₂, pH 9,5

Farblösung:

45 μ l NBT und 35 μ l X-Phosphat in 10 ml Puffer 3

Die Lösung wurde unmittelbar vor Gebrauch angesetzt.

CSPD-Lösung:

0,25 mM CSPD in Puffer 3

Bei 4 °C lichtgeschützt lagern. Diese Lösung kann bis zu 10 mal benutzt werden.

Die Membran wurde kurz mit 2 x SSC gewaschen, und mit 25 ml Hybridisierungslösung für 1–4 Stunden bei der entsprechenden Hybridisierungstemperatur prähybridisiert. Die Lösung wurde durch 6 ml Hybridisierungslösung mit 100 pmol frisch denaturierter DNA-Sonde ausgetauscht. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht. Die Stringenzwäsche wurde bei der entsprechenden Temperatur folgendermaßen durchgeführt: 2 x 15 Minuten Waschen mit 50 ml 2 x SSC, 0,1% (w/v) SDS und 2 x 15 Minuten Waschen mit 50 ml 0,1 x SSC, 0,1% (w/v) SDS. Alle folgenden Inkubationen wurden bei Raumtemperatur unter Schütteln durchgeführt (mit Ausnahme der Farbreaktion). Die Membran wurde kurz mit Waschpuffer gewaschen, 30 Minuten mit Puffer 2 und 30 Minuten in 40 ml Puffer 2 mit 4 μ l Antikörperkonjugat inkubiert. Ungebundenes Antikörperkonjugat wurde durch 2 x 15 Minuten Waschen mit Waschpuffer entfernt. Die Membran wurde 2–5 Minuten in Puffer 3 äquilibriert, und Hybridmoleküle anschließend entweder mit der Farb- oder der Chemilumineszenzreaktion detektiert. Der Farbnachweis fand in 10 ml Farblösung ohne Erschütterung im Dunkeln statt und wurde durch 5 Minuten Inkubation in TE, pH 8 gestoppt. Für den Chemilumineszenznachweis wurde die Membran 5 Minuten in 50 ml CSPD-Lösung inkubiert, nach dem Abtropfen der Lösung in eine Folie eingeschweißt und nach 5 Minuten (im Dunkeln) auf einem Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, Kodak) exponiert.

Sollten DNA-Fragmente mit einer anderen Oligonukleotidsonde rehybridisiert werden, wurde die Membran kurz in Wasser gewaschen und 2 x 15 Minuten in 0,2 M NaOH, 0,1% (w/v) SDS bei 37 °C gewaschen. (War die Entfernung der alten Oligonukleotidsonde nicht erfolgreich, wurde die Washtemperatur erhöht und die Waschzeit verlängert.)

2.3.4.4 Hybridisierung mit Polynukleotidsonden

Die Hybridisierung mit Polynukleotidsonden wurde im Prinzip wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben durchgeführt. Die Hybridisierungstemperatur betrug dabei 68 °C bzw. 42 °C, wenn der Hybridisierungslösung 50% (v/v) Formamid zugesetzt wurde. Die Sondenkonzentration betrug 10–12,5 ng pro ml Hybridisierungslösung. Die Stringenzwäsche wurde folgendermaßen durchgeführt: 2 x 15 Minuten Waschen mit 50 ml 2 x SSC, 0,1% (w/v) SDS bei Raumtemperatur und 2 x 15 Minuten Waschen mit 50 ml 0,1 x SSC, 0,1% (w/v) SDS bei 68 °C. Diese Bedingungen gelten nach den Angaben von Boehringer für die spezifische Hybridisierung mit homologen DNA-Sonden.

2.3.5 Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Die Nukleotidsequenz von PCR-Produkten wurde nach der Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. [187] unter Verwendung von T7 DNA-Polymerase (Sequenase) nach einem modifizierten Protokoll von Böttger [12] ermittelt. Die PCR-Produkte wurden zuvor wie unter Abschnitt 2.3.1.3 beschrieben aufgereinigt.

5 x USB Sequencing Puffer:
200 mM Tris-HCl, pH 7,5
100 mM MgCl₂
250 mM NaCl

Stopplösung:
96% (v/v) Formamid
20 mM EDTA
0,05% (w/v) Bromphenolblau

Folgende Reagentien wurden gründlich gemischt, kurz abzentrifugiert und 10 Minuten bei 95 °C inkubiert:

2 µl 5 x USB Sequencing Puffer
1 µl 5% (v/v) Nonidet P-40
1 µl Sequenzierprimer [10 pmol/µl]
1 µl gereinigtes PCR-Produkt [10–100 ng]
5 µl Wasser

Nach kurzer Zentrifugation erfolgte die Zugabe von

1 µl 0,1 M DTT
2 µl dNTP-Gemisch [200 nM dGTP, dATP und dTTP]
0,5 µl [α -³³P] dCTP
1 µl Sequenase 2.0 [1 U/µl]

Nach 5 Minuten Inkubation bei 37 °C wurden jeweils 3,3 µl des Sequenzieransatzes auf 2,5 µl der vier bereits vorbereiteten Terminationsansätze verteilt, die neben 80 µM aller dNTPs auch 8 µM des jeweiligen ddNTPs enthielten, und nochmal 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Sequenzierungsreaktion wurde durch Zugabe von 4 µl Stopplösung

beendet. Die Produkte der Sequenzierungsreaktionen wurden in Acrylamidgelen (siehe Abschnitt 2.5.1.4) aufgetrennt. PCR-Fragmente von verschiedenen *Desulfovibrio*-Stämmen wurden mit Primerpaar Hyd1f-Hyd5r (siehe Abschnitt 3.1.1 und 3.1.2) amplifiziert und sequenziert; als Sequenzierprimer diente sowohl Hyd1f als auch Hyd5r.

Zusätzlich wurden [NiFe] Hydrogenase-Gensequenzen an der Universität Bremen von Dr. Rolf Nimzyk durch die zyklische Sequenzierung der aufgereinigten PCR-Produkte mit Taq Polymerase mit Hilfe eines automatischen Sequenzanalysators (Applied Biosystems 373S DNA Sequencer) bestimmt. Dazu wurde der Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) entsprechend den Anweisungen des Herstellers verwendet. Als Primer dienten dabei neben Hyd1f und Hyd5f auch deren Kurzformen Hyd1-19 und Hyd5-18 (siehe Abschnitt 3.1.2). Die Anzahl der Zyklen betrug 25, die Annealingtemperatur 50–60 °C.

2.4 Immunologische Methoden

2.4.1 Herstellung von Proteinextrakten

Lysepuffer 1:
4% (w/v) SDS
10% (v/v) Glycerol
0,002% (w/v) Bromphenolblau
100 mM Tris-HCl, pH 6,8
0,4% (v/v) 2-Mercaptoethanol

Lysepuffer 2:
2% (w/v) SDS
10% (v/v) Glycerol
100 mM Tris-HCl, pH 6,8
0,4% (v/v) 2-Mercaptoethanol

Bakterien einer 50 ml (10 ml) Kultur wurden durch 15 Minuten Zentrifugation bei 4 °C und 4500 rpm geerntet, in 4 ml (1 ml) SSC oder PBS resuspendiert, je 1 ml auf Eppendorfgefäße verteilt und 5 Minuten bei 4 °C und 13000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 20–60 μ l Lysepuffer gründlich resuspendiert und 10 Minuten im siedenden Wasserbad inkubiert. Die Proteinextrakte wurden bei –20 °C gelagert.

Mit der beschriebenen Methode zur Herstellung von Proteinextrakten werden die Zellen direkt in Elektrophoreseprobenpuffer (Lysepuffer 1) aufgeschlossen. Dieser Puffer ist jedoch nicht kompatibel mit einer anschließenden Proteinbestimmung nach Bradford [13]. War eine Proteinbestimmung gewünscht, wurde eine modifizierte Version des Puffers (Lysepuffer 2) verwendet und die Probe 1:20 verdünnt.

2.4.2 Transfer von Proteinen auf feste Träger

Proteine wurden auf feste Träger (Polyvinylidendifluoridmembranen) transferiert, um Immunreaktionen mit spezifischen Antikörpern durchzuführen.

2.4.2.1 Western Blot

Den Transfer von gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteinen bezeichnet man als Western Blot. Ebenso wie für das Blotten von DNA wurde ein elektrophoretischer Transfer unter semitrockenen Bedingungen mit der Trans-Blot SD semi-dry Transfer Cell von Bio-Rad durchgeführt.

Transferpuffer:
48 mM Tris
39 mM Glycine
20% (v/v) Methanol
0,0375% (w/v) SDS

10 x TBS:
30 g Tris
80 g NaCl
2 g KCl ad 1000 ml H₂O
Der pH-Wert wurde mit HCl auf 7,4 eingestellt.

Das zu blottende Gel wurde kurz in Transferpuffer äquilibriert. Eine hydrophobe Immobilon-Membran (Millipore) wurde entsprechend der Größe des Gels zugeschnitten und erst in Methanol und dann in Transferpuffer geschwenkt. 2 Stücke dickes Filterpapier (Bio-Rad) in Gelgröße wurden in Transferpuffer getränkt. Nacheinander wurden eine Lage Filterpapier, die Membran, das Gel und nochmal eine Lage Filterpapier luftblasenfrei auf die Platinanode gelegt. Auf dem Stapel wurde dann die Kathode placiert und der Deckel geschlossen. Der Transfer erfolgte bei einem konstanten Strom von 200 mA für 1 Stunde. Danach wurde die Position der farbigen Proteingrößenmarker mit einer Nadel auf die Membran übertragen und die Membran kurz in 1 x TBS gewaschen. Die Effizienz des Transfers wurde durch die Anfärbung des geblotteten Gels mit Coomassie Blau überprüft.

2.4.2.2 Immuno Dot Blot

Proteine können auch direkt auf feste Träger aufgetragen werden. Waschlösungen und Proben werden dabei durch Anlegen eines Vakuums auf die Membran aufgebracht. Hierfür wurde die Dot Blot Apparatur von Bio-Rad verwendet.

Eine hydrophobe Immobilon-Membran (Millipore) wurde kurz in Methanol und dann 15 Minuten in 1 x TBS geschwenkt und in der Apparatur placiert, wobei unbenutzte Vertiefungen mit Parafilm abgedeckt wurden. Die Membran wurde mit 200 μ l TBS pro

Vertiefung gewaschen. Dann wurden je 200 μ l Antigen (in 1 x TBS verdünnte Protein-extrakte) auf die Membran aufgetragen, 1 Stunde inkubiert und filtriert. Anschließend wurde die Membran mit 200 μ l 1 x TBS pro Vertiefung gespült. Die Membran wurde aus der Apparatur genommen und noch einmal kurz in 1 x TBS gewaschen.

2.4.3 Immunreaktion

Nach dem Übertragen von Proteinen auf feste Träger können spezifische Proteine durch eine Doppelimmunreaktion nachgewiesen werden [242]. Mit dem ersten Antikörper werden die spezifischen Proteine markiert. Ein zweiter Antikörper, der an ein Enzym gekoppelt ist, kreuzreagiert mit dem ersten, spezifischen Antikörper. Durch eine nachfolgende Enzym-katalysierte Farbreaktion werden kreuzreagierende Proteine sichtbar gemacht. Als sekundärer Antikörper wurde in der Regel ein Konjugat mit dem Enzym Alkalische Phosphatase verwendet, und der Nachweis erfolgte über die Farbreaktion mit 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat (X-Phosphat) und Nitroblau-Tetrazoliumsalz (NBT).

Die verwendeten polyklonalen Antikörper gegen die [NiFe] Hydrogenase von *Desulfovibrio gigas* und *Desulfovibrio vulgaris* Groningen wurden freundlicherweise von Dr. C. E. Hatchikian (CNRS Marseille, Frankreich) zur Verfügung gestellt.

Puffer 1:
1 x TBS
10% (v/v) Pferdeserum
0,05% (v/v) Tween 20

Puffer 2:
1 x TBS
1% (v/v) Pferdeserum
0,05% (v/v) Tween 20

Waschlösung:
1 x TBS
0,05% (v/v) Tween 20

Puffer 3:
100 mM Tris-HCl, pH 9,5
100 mM NaCl
50 mM MgCl₂

Farblösung:
45 μ l NBT und 35 μ l X-Phosphat in 10 ml Puffer 3
Unmittelbar vor Gebrauch ansetzen.

Alle folgenden Inkubationen wurden unter Schütteln durchgeführt (mit Ausnahme der Farbreaktion). Nach dem Transfer wurde die Membran mindestens 1 Stunde (oder über Nacht) in Puffer 1 inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Dann wurde die Membran 1 Stunde mit dem ersten Antikörper, der in 25 ml Puffer

2 verdünnt wurde, inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch 5 x 10 Minuten Waschen mit Waschpuffer entfernt. Dann erfolgte für 1 Stunde die Inkubation mit dem zweiten Antikörper (Anti-Kaninchen-IgG-Alkalische Phosphatase-Konjugat, Sigma Nr. A3687), der 1:30000 in Puffer 2 verdünnt wurde. Nach 5 x 10 Minuten Waschen in Waschpuffer wurde die Membran 2–5 Minuten in Puffer 3 äquilibriert. Die Farbentwicklung fand in 10 ml Farblösung ohne Erschütterung im Dunkeln statt und wurde durch 5 Minuten Inkubation in TE, pH 8 gestoppt.

Als sekundärer Antikörper diente auch ein Konjugat mit dem Enzym Peroxidase (HPR) (Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase-Konjugat, 1:200 verdünnt). Anstelle von TBS wurde dann PBS in allen Lösungen verwendet, und der Nachweis erfolgte in einer Farblösung mit Diaminobenzidin. Dazu wurden 6 mg Diaminobenzidin in 9 ml 50 mM Tris-HCl, pH 7,6 gelöst und 1 ml 3% (w/v) CoCl₂ und 10 µl H₂O₂ zugefügt.

2.5 Elektrophoresetechniken

2.5.1 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

2.5.1.1 Agarosegelelektrophorese

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren in horizontalen Agarosegelen entsprechend ihrer Größe wurde wie bei Sambrook et al. [186] beschrieben durchgeführt. Es wurde eine Minigelapparatur (Gibco BRL) mit einem Gelvolumen von 25–30 ml bzw. eine Midigelapparatur (Gibco BRL) mit einem Gelvolumen von 60–80 ml verwendet.

10 x TBE-Puffer:
0,89 M Tris
0,89 M Borsäure
20 mM EDTA, pH 8

10 x MOPS-Puffer:
0,2 M MOPS
50 mM Natriumacetat
10 mM EDTA, pH 7
Der pH wurde mit NaOH eingestellt.

Ladepuffer:
0,05% (w/v) Bromphenolblau
40% (w/v) Sucrose
0,1 M EDTA, pH 8
0,5% (w/v) SDS

1–2% (w/v) Agarose wurden in 1 x TBE-Puffer für die Auftrennung von DNA bzw. in 1 x MOPS-Puffer für die Auftrennung von RNA erhitzt, bis sich die Agarose vollständig

gelöst hatte. Nach Abkühlung auf etwa 60 °C wurde die Lösung in die vorbereitete Gelapparatur gegossen. Die Proben wurden mit 0,2–0,4 Vol. Ladepuffer versetzt und in der Regel submers aufgetragen. Der Gellauf erfolgte mit dem jeweiligen Laufpuffer bei 50–150 V. Nach der Elektrophorese wurden die Gele in Puffer mit Ethidiumbromid [0,5 µg/ml] für 15 Minuten gefärbt und die Nukleinsäuren auf einem Transilluminator mit UV-Licht (302 nm) sichtbar gemacht.

2.5.1.2 Denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE)

Die denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE) ermöglicht die Auftrennung von gleichlangen DNA-Fragmenten, die sich in ihrer Sequenz voneinander unterscheiden [52]. Sie wurde in vertikalen 6% (w/v) Acrylamidgelen in 0,5 x TAE mit kontinuierlichem Gradienten an Harnstoff und Formamid in dem modifizierten Bio-Rad Protean II System durchgeführt wie bei Muyzer et al. [133, 137] beschrieben. Spezielle Acrylamidlösungen mit N,N'-bis-Acrylylcystamin (BAC) wurden verwendet, wenn die DNA nach dem Gellauf aus dem Gel eluiert werden sollte.

20 x TAE-Puffer:
0,8 M Tris-Acetat
20 mM EDTA, pH 8

Acrylamidstammlösungen:

38% (w/v) Acrylamid/Bis-AA:	bzw.	20% (w/v) Acrylamid/BAC:
37 g Acrylamid		18,98 g Acrylamid
1 g Bis-AA		1,02 g BAC
H ₂ O ad 100 ml		H ₂ O ad 100 ml

Lösung A (0% denaturierende Agentien):

23,7 ml 38% (w/v) AA/Bis-AA bzw. 45 ml 20% (w/v) AA/BAC
3,75 ml 20 x TAE
H₂O ad 150 ml

Lösung B (80% denaturierende Agentien):

23,7 ml 38% (w/v) AA/Bis-AA bzw. 45 ml 20% (w/v) AA/BAC
3,75 ml 20 x TAE
48 ml deionisiertes Formamid
50,4 g Harnstoff
H₂O ad 150 ml
Lösung A und B wurden filtriert.

Die Glasplatten wurden mit Seife und anschließend mit Ethanol gereinigt. Für 1,5 mm dicke und 16 cm lange Gele wurden je 16 ml Gradientenlösungen mit den gewünschten Konzentrationen an denaturierenden Agentien aus den Stammlösungen A und B hergestellt, entsprechend der folgenden Tabelle. PCR-Produkte des 16S rRNA-Gens wurden grundsätzlich in einem Gradienten von 20–70% denaturierender Agentien im Gel aufgetrennt.

	Denaturierende Agentien			
	20%	30%	60%	70%
Lösung A	12,0 ml	10,0 ml	4,0 ml	1,9 ml
Lösung B	4,0 ml	6,0 ml	12,0 ml	14,1 ml

Unmittelbar vor Gebrauch wurden 15 μl Temed sowie 64 μl 10% (w/v) APS zu den Gradientenlösungen gegeben. Nach dem Zusammensetzen der Gelapparatur wurde das Gel mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe und einem Gradientenmischer gegossen. Die Geltaschen wurden bei parallelen Gelen in 10 ml Lösung A, 15 μl Temed, 64 μl 10% (w/v) Ammoniumpersulfat (APS) eingebettet. Das Gel polymerisierte in der Regel über Nacht. Die PCR-Fragmente wurden mit 0,2–0,4 Vol. Ladepuffer versetzt und das vorbereitete Gel beschickt. Die Elektrophorese erfolgte in 0,5 x TAE bei 200 V und 60 °C. Nach dem Lauf wurden die Gele 15 Minuten in 250 ml Wasser mit Ethidiumbromid [0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$] gefärbt, 10 Minuten in 250 ml Wasser entfärbt und auf einem UV-Transilluminator (302 nm) betrachtet.

Eine empfindlichere Färbung der Acrylamidgele, die Bis-AA enthielten, konnte mit Silbernitrat erzielt werden. Dazu wurde das Gel 2 x 3 Minuten in 10% (v/v) Ethanol, 0,5% (v/v) Essigsäure gewaschen, 10 Minuten in 0,1% (w/v) AgNO_3 -Lösung inkubiert, kurz in Wasser gewaschen und etwa 20 Minuten in Färbelösung (in 500 ml 1,5% (w/v) NaOH wurden 0,05 g NaBH_4 und 2 ml 37% (v/v) Formaldehyd unmittelbar vor Gebrauch gelöst) gefärbt. Anschließend wurde das Gel 10 Minuten in 0,75% (w/v) Na_2CO_3 fixiert und auf einem Leuchttisch betrachtet.

2.5.1.3 Gelelektrophorese mit basensequenzspezifischen DNA-Liganden

Die gelelektrophoretische, sequenzabhängige Auftrennung von PCR-Produkten in horizontalen Agarosegelen wurde wie bei Wawer et al. [246] beschrieben durchgeführt. Es wurde eine Minigelapparatur (Gibco BRL) mit einem Gelvolumen von 25 ml bzw. eine Midigelapparatur (Gibco BRL) mit einem Gelvolumen von 60 ml verwendet.

Phosphatpuffer:

30 mM NaH_2PO_4

10 mM Na_2HPO_4

2 mM EDTA, pH 6,1

1,5–3,5% (w/v) Agarose wurden in 25 mM EDTA, pH 5,9 oder in Phosphatpuffer erhitzt, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Nach Abkühlung auf etwa 60 °C wurde der DNA-Ligand Bisbenzimid-PEG in einer Konzentration von 0,025 OD-Einheiten (340 nm) pro ml zugegeben und die Lösung in die vorbereitete Gelapparatur gegossen. Die Proben wurden mit 0,2–0,4 Vol. Ladepuffer versetzt und in der Regel submers aufgetragen. Der Gellauf erfolgte in 25 mM EDTA, pH 5,9 oder in Phosphatpuffer bei maximal 3 V/cm für mehrere Stunden, wobei der Puffer von der Kathode zur Anode umgewälzt wurde. Nach der Elektrophorese wurden die Gele in Puffer mit Ethidiumbromid [0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$] für 15 Minuten gefärbt und die DNA auf einem Transil-

luminator mit UV-Licht (302 nm) sichtbar gemacht.

2.5.1.4 Gelelektrophorese von Sequenzierungsprodukten

Die Produkte aus Sequenzierungsreaktionen (siehe Abschnitt 2.3.5) wurden in einer 38 cm x 50 cm Sequi-Gen II Sequencing Cell (Bio-Rad) unter denaturierenden Bedingungen in vertikalen 6% (w/v) Acrylamidgelen mit kontinuierlichem Salz-Sucrose-Gradienten aufgetrennt.

30 % (w/v) Acrylamidstammlösung:
28,5 g Acrylamid
1,5 g Bis-AA
H₂O ad 100 ml

Lösung A:
200 ml Acrylamidstammlösung (6% (w/v))
460 g Harnstoff (7,67 M)
50 ml 10 x TBE (0,5 x TBE)
H₂O ad 1000 ml

Lösung B:
200 ml Acrylamidstammlösung (6% (w/v))
460 g Harnstoff (7,67 M)
250 ml 10 x TBE (2,5 x TBE)
100 g Sucrose (10% (w/v))
H₂O ad 1000 ml

Lösung A und B wurden deionisiert, filtriert und entgast.

Die Glasplatten wurden mit Ethanol gereinigt; eine Platte wurde mit 5% (v/v) Dichlormethylsilan in Chloroform silanisiert. Nach dem Zusammensetzen der Gelapparatur wurde der Boden mit 20 ml Lösung B, 100 μ l 25% (w/v) APS und 100 μ l Temed versiegelt. Das Gel wurde mit 60 ml Lösung A mit 60 μ l 25% (w/v) APS und 60 μ l Temed und 30 ml Lösung B mit 30 μ l 25% (w/v) APS und 30 μ l Temed folgendermaßen gegossen: erst 20 ml Lösung B, dann ein Gemisch aus 10 ml Lösung B und 10 ml Lösung A, zum Schluß der Rest von Lösung A. Es polymerisierte über Nacht. Unmittelbar vor dem Auftragen auf das Gel wurden die DNA-Proben 5 Minuten bei 95 °C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte in 1 x TBE für 3–4 Stunden bei 2000 V. Nach dem Lauf wurde das Gel auf Filterpapier, abgedeckt mit Frischhaltefolie, für zwei Stunden bei 80 °C unter Vakuum getrocknet. DNA-Fragmente wurden durch Autoradiographie bei Raumtemperatur mit Röntgenfilm (XAR5, Kodak) detektiert.

2.5.2 Gelelektrophorese von Proteinen

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrer Größe erfolgte vertikal im SDS-PAGE-System nach Lämmli [106] in der Miniprotean II-Apparatur von

Bio-Rad. Vorbereitete Acrylamidlösungen wurden von der Firma Bio-Rad bezogen.

	Trenngel	Sammelgel
	15% T, 3,3% C	6% T, 2,6% C
50% T, 3,3% C Lösung	3,0 ml	
50% T, 2,6% C Lösung		0,6 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	2,5 ml	
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8		1,25 ml
20% (w/v) SDS	0,1 ml	50,0 μ l
H ₂ O	4,4 ml	3,1 ml
Temed	5,0 μ l	5,0 μ l
10% (w/v) APS	50,0 μ l	25,0 μ l

Die Gellösungen wurden entsprechend der Tabelle ohne APS hergestellt und 10 Minuten unter Vakuum entgast. Nach Zugabe von APS wurde das Trenngel in die vorbereitete Gelapparatur gegossen (3 ml für 0,75 mm dicke Gele; 3,5 ml für 1 mm dicke Gele) und mit wassergesättigtem Butanol überschichtet, um die Geloberfläche zu glätten. Nach der Polymerisation des Gels wurde das Butanol entfernt und die Geloberfläche gründlich mit Wasser gespült. Anschließend wurde nach Zugabe von APS das Sammelgel gegossen und der gewünschte Kamm eingeführt. Nachdem das Gel polymerisiert war, wurden die Geltaschen mit Wasser gespült.

Elektrophoreseprobenpuffer:

4% (w/v) SDS

10% (v/v) Glycerol

0,002% (w/v) Bromphenolblau

100 mM Tris-HCl, pH 6,8

0,4% (v/v) 2-Mercaptoethanol

5 x Elektrodenpuffer:

0,12 M Tris

0,192 M Glycin

0,5% (w/v) SDS

Die Proteinextrakte wurden in Elektrophoreseprobenpuffer unmittelbar vor dem Beladen des Gels 10 Minuten im siedenden Wasserbad inkubiert. Der Gellauf erfolgte in 1 x Elektrodenpuffer. Nach einem Vorlauf von 10 Minuten bei 50 V wurde das Gel beschickt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte zunächst bei 100 V für ca. 15 Minuten und wurde bei 200 V ca. 45 Minuten fortgesetzt, bis die Bromphenolblaufront den Boden des Gels erreicht hatte.

Nach der Auftrennung wurde das Gel entweder geblottet oder die Proteine durch Färbung mit Coomassie Blau oder Silbernitrat sichtbar gemacht. Das Gel wurde 30 Minuten mit 0,2% (w/v) Coomassie Blau R250 in 40% (v/v) Methanol und 10% (v/v) Essigsäure gefärbt und mehrere Stunden in 40% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure entfärbt, wobei die Entfärbelösung mehrmals durch frische Lösung ersetzt wurde. Die Silberfärbung erfolgte mit dem *Silver Stain Kit* von Bio-Rad. Gele wurden mindestens

30 Minuten in 40% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure fixiert, 5 Minuten in 100 ml frischem *Oxidierer* inkubiert, 15 Minuten mit Wasser, das mehrere Male ausgetauscht wurde, gewaschen, 20 Minuten in 100 ml frischem *Silberreagenz* inkubiert, 30 Sekunden mit Wasser gespült und in *Entwickler* entwickelt, bis die gewünschte Intensität erreicht war. Der *Entwickler* wurde dabei etwa alle 5 Minuten erneuert. Durch Inkubation in 5% (v/v) Essigsäure für mindestens 15 Minuten wurde die Entwicklung gestoppt. Gefärbte Gele wurden auf einem Leuchttisch betrachtet.

2.6 Chemische Methoden

2.6.1 Sulfidbestimmung

Die quantitative Bestimmung von Schwefelwasserstoff in Bakterienkulturen über die Bildung von Methylenblau erfolgte entsprechend einem modifizierten Protokoll nach Cline [28].

Lösung A:
2% (w/v) Zinkacetat in 18 mM Essigsäure

Lösung B:
0,2% (w/v) Dimethyl-*p*-phenyldiamin in 3,75 M H_2SO_4

Lösung C:
10% (w/v) Eisen(III)-ammoniumsulfat $\cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ in 375 mM H_2SO_4

2–20 μl Probe würden mit einer Hamilton-Spritze aus den verschlossenen Kulturgefäßen entnommen und in 1 ml Lösung A gegeben. Dabei wurde die Spitze der Spritze in die Lösung getaucht. Der Ansatz wurde mit 1 ml Wasser und 1 ml der 1:2,5 verdünnten Lösung B vermischt. Nach Zugabe von 1 ml der 1:50 verdünnten Lösung C wurde der Ansatz nochmals gemischt, 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert, und die Extinktion bei 670 nm gemessen. Zur Erstellung einer Eichkurve wurde ein Na_2S -Standard hergestellt. In 900 ml sauerstofffreies Wasser wurden 0,4 g NaOH und ein abgewogener Kristall $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$ gegeben. Der Kristall war kurz vor dem Wiegen mit Wasser gespült worden, um Oxidationsprodukte des Sulfids von der Oberfläche zu entfernen. Die Lösung wurde auf 1000 ml mit Wasser aufgefüllt, mit Stickstoff begast und mit einem Stopfen verschlossen. Durch Schwenken wurde das Na_2S gelöst. Die Lösung wurde unter anaeroben Bedingungen auf 100 ml-Flaschen verteilt, mit Stickstoff begast, mit einem Stopfen verschlossen und bei 4 °C aufbewahrt.

Die Sulfidproduktion in Anreicherungen wurde mit einem qualitativen Sulfidtest nach Cord-Ruwisch [30] detektiert.

Kupfersulfatlösung:
5 mM CuSO_4
50 mM HCl

Von der zu prüfenden Kultur wurden 0,25 ml in 1 ml Kupfersulfatlösung gegeben und sofort gemischt. Es bildete sich braunes CuS, das nach kurzer Zeit als Flocken ausfiel. Anhand der Intensität der Braunfärbung im Vergleich zu einer Kontrolle war eindeutig zu erkennen, ob in einer Kultur viel, wenig oder kein Schwefelwasserstoff produziert worden war.

2.6.2 DNA-Bestimmung

Für die quantitative Bestimmung von DNA in Zellextrakten wurde die von Burton beschriebene Diphenylaminreaktion [21, 36] verwendet.

Diphenylamin-Reagenz:

1,5 g Diphenylamin wurden in 100 ml Essigsäure gelöst und 1,5 ml konzentrierte Schwefelsäure hinzugefügt. Unmittelbar vor Gebrauch wurden 100 μ l einer wässrigen Acetaldehydlösung [16 mg/ml] zu 20 ml Reagenz gegeben.

DNA-Standard:

0,4 mg lyophilisierte Heringsperma-DNA wurden pro ml in 5 mM NaOH gelöst, mit 1 Volumen 1 M Perchlorsäure versetzt und 15 Minuten bei 70 °C inkubiert. Verdünnungen wurden in 0,5 M Perchlorsäure hergestellt.

Zellen einer 50 ml Kultur wurden pelletiert, in 5 ml SSC resuspendiert, nochmal pelletiert und in 900 μ l eiskaltem SSC aufgenommen. Nach Zugabe von 100 μ l 2,5 M Perchlorsäure wurde der Zellextrakt gut gemischt, 30 Minuten im Eisbad inkubiert und 10 Minuten bei 10000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert. Das gefrorene Zellpellet wurde dann in 750 μ l 0,5 M Perchlorsäure resuspendiert, 15 Minuten bei 70 °C unter Schütteln inkubiert und 10 Minuten bei 5000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, und das Pellet nochmal mit 400 μ l und anschließend mit 350 μ l Perchlorsäure wie oben beschrieben extrahiert. Die Überstände wurden gesammelt. 500 μ l Hydrolysat bzw. DNA-Standardverdünnungen (0–200 μ g DNA) wurden mit 1 ml Diphenylamin-Reagenz gemischt und 16–20 Stunden bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 600 nm gemessen, und die Konzentration anhand der erstellten Eichkurve bestimmt.

2.6.3 RNA-Bestimmung

RNA in Zellextrakten wurde über die Orcinol-Reaktion [36, 66] bestimmt.

Eisenchlorid-Reagenz:

100 mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ wurden in 100 ml konzentrierter Salzsäure gelöst.

Ethanol-Orcinol-Lösung:

6 g Orcinol wurden in 100 ml Ethanol gelöst.

Orcinol-Reagenz:

Unmittelbar vor Gebrauch wurden das Eisenchlorid-Reagenz und die Ethanol-Orcinol-Lösung im Verhältnis 1:1 gemischt.

RNA-Standard:

200 μg 16S und 23S rRNA von *Escherichia coli* (Boehringer) wurden pro ml in 0,25 M Perchlorsäure gelöst, 30 Minuten bei 70 °C inkubiert und 1 Volumen 0,1 M HCl zugegeben. Verdünnungen wurden in 0,25 M Perchlorsäure/0,1 M HCl (1:1) hergestellt.

Hydrolysate aus Zellsuspensionen wurden durch Behandlung mit Perchlorsäure hergestellt wie unter Abschnitt 2.6.2 beschrieben.

1 ml Hydrolysat (1:10 bis 1:2 verdünnt in 0,1 M HCl) bzw. RNA-Standardverdünnungen (0–100 μg RNA) wurden mit 2 ml Orcinol-Reagenz in Reagenzglaschen gemischt, die mit Aluminiumkappen verschlossen wurden. Nach 30 Minuten Inkubation bei 90 °C wurden die Proben unter laufendem Leitungswasser abgekühlt, und die Extinktion bei 665 nm gemessen. Die Konzentration wurde anhand der erstellten Eichkurve bestimmt.

2.6.4 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde nach Bradford [13] modifiziert.

Bradford-Reagenz:

70 mg Serva Blau G250
50 ml 96% (v/v) Ethanol
100 ml 85% (v/v) H_3PO_4
 H_2O ad 1000 ml

Zur Herstellung des Reagenzes wurde der Farbstoff zunächst vollständig in Ethanol gelöst. Nach Zugabe der weiteren Bestandteile wurde die Lösung durch einen Faltenfilter filtriert und lichtgeschützt in braunen Flaschen gelagert. Zu 20 μl Probe (1:20 verdünnte Proteinextrakte) wurde in einer Kunststoffküvette 1 ml Reagenz gegeben. Die Küvetten wurden mit Parafilm verschlossen und gut geschüttelt. Nach 5 Minuten wurde die Extinktion bei 595 nm gegen einen Leerwert mit 20 μl Probenpuffer (1:20 verdünnt) gemessen. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer mit Rinderserumalbumin (1–20 μg BSA) erstellten Eichkurve bestimmt.

2.7 Bearbeitung von Umweltproben

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Umweltproben untersucht. Die Probenahme und die speziellen, standortabhängigen methodischen Anforderungen sind im folgenden Abschnitt ausgeführt, so weit sie von den bisher beschriebenen Methoden abweichen.

DNA aus einer mikrobiellen Matte von Texel, Holland, sowie DNA-Präparationen von verschiedenen Biofilmen aus experimentellen Bioreaktoren (TU Delft, Holland) wurden

mir von Dr. Gerard Muyzer für erste Untersuchungen von Umweltproben zur Verfügung gestellt.

2.7.1 Bioreaktoren

2.7.1.1 Probennahme

Schlammproben von anaeroben experimentellen Abwasserbioreaktoren (TU Delft, Holland) wurden freundlicherweise von Dr. Mike Jetten genommen, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und mir zur weiteren Bearbeitung überlassen. Frisches Material eines methanogenen Bioreaktors für Anreicherungen wurde mir ebenfalls von Dr. Mike Jetten zur Verfügung gestellt.

Inkubationen von Schlammproben eines denitrifizierenden experimentellen Bioreaktors (ANNAMOX-Bioreaktor [130]) mit verschiedenen Substraten wurden von Dr. Mike Jetten (TU Delft, Holland) folgendermaßen durchgeführt. 100 ml Schlamm wurden zweimal mit anaerobem 20 mM KHCO_3 -Puffer, pH 7,2 gewaschen und in Portionen zu 25 ml mit 25 ml Medium (KHCO_3 , 0,1 g/l Hefeextrakt, 0,2 g/l Acetat, CaCl_2 , MgCl_2 , NaCl, KCl, KH_2PO_4 , Na_2SO_4 , Spurenelemente, 0,05 mM Na_2S , pH 7,3) in 125 ml-Kulturgefäße verteilt. Die Gefäße wurden mit Argon/ CO_2 [95/5 (v/v)], H_2 / CO_2 [90/10 (v/v)] bzw. mit Sauerstoff (Pressluft) begast. Die Proben wurden 20 Stunden bei 30 °C inkubiert, in 50 ml-Falcon-Röhrchen überführt, das Wasser entfernt und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.7.1.2 Extraktion und Analyse von Nucleinsäuren

Nucleinsäuren wurden mit der bereits in Abschnitt 2.3.1.2 beschriebenen Methode nach Oelmüller et al. [143] folgendermaßen extrahiert. Zunächst wurde das Naßgewicht der Schlammprobe bestimmt. 9–12 g gefrorenes Probenmaterial wurden in 8 ml AE-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 20 ml heißem Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) und 200 μl 25% (w/v) SDS wurde die Lösung 30 Minuten bei 60 °C inkubiert (wobei mehrmals kurz gevortext wurde), anschließend im Eisbad abgekühlt und 10 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert. Die wäßrige Phase wurde mit 1 ml 2 M Natriumacetat, pH 5,2 (Endkonzentration 0,25 M) gemischt und wenigstens dreimal mit 15 ml Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert. Die Fällung der Nucleinsäuren erfolgte durch Zugabe von 2,5 Vol. eiskaltem Ethanol für 30 Minuten bei –80 °C oder für 2 Stunden bei –20 °C. Nach Zentrifugation bei 5000 rpm für 60 Minuten wurde das Pellet mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, erneut 10 Minuten zentrifugiert, 20 Minuten unter Vakuum getrocknet und in einem kleinen Volumen Wasser gelöst. DNA bzw. RNA wurde aus diesen Präparationen durch die selektive Behandlung mit RNase bzw. DNase gewonnen. Als Richtwert galt dabei ein Einsatz von 0,5 μg RNase, um 1 μg RNA in 15 Minuten abzubauen, und von 10 U DNase, um 1 μg DNA in 30 Minuten in DNase-Puffer abzubauen. Die Enzyme wurden durch eine Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion und anschließende Ethanolfällung entfernt.

Nukleinsäurepräparationen wurden grundsätzlich spektrophotometrisch vermessen und ihre Reinheit anhand des Spektrums von 220–340 nm bewertet. Eine anschließende Auftrennung der Nukleinsäurepräparationen im Agarosegel gab Aufschluß über deren Qualität.

Für die Amplifikation des [NiFe] Hydrogenase-Gens mit Primerpaar Hyd1f-Hyd5r wurden 0,1–1 μg genomische DNA eingesetzt. Die cDNA-Synthese wurde mit 0,5–1 μg Gesamt-RNA durchgeführt und 1/4 Volumen des RT-Mixes in der anschließenden PCR verwendet.

In denaturierenden Gelen, mit Gradienten von 20–40% bis 60–70% an denaturierenden Agentien, wurden in der Regel 25–50 μl der PCR-Ansätze aufgetrennt; 100 μl wurden für Proben des denitrifizierenden Bioreaktors verwendet. Diese Menge war ausreichend, da die Anzahl an PCR-Produkten mit unterschiedlicher Sequenz relativ gering war.

2.7.2 Mariager Fjord, Dänemark

2.7.2.1 Probennahme

Proben wurden auf Station Dybet M3, etwa 1 km nördlich des Hafens von Mariager (lat. 56 39' 66" N, long. 09 58' 56" O) am 19. und 20. August 1993 genommen. Wasserproben wurden von der oxischen Wasserschicht in 8 m Tiefe, von der oberen, zentralen und unteren Chemokline in 13 m, 14,5 m und 16 m Tiefe und in der anoxischen Wasserschicht in 20 m Tiefe genommen; eine Sedimentprobe wurde in 26 m Tiefe genommen. Mit Hilfe eines Filtrieraufsatzes für Spritzen wurde die Biomasse aus jeweils 200 ml Seewasser durch Filtration auf einem Durapore Filter (Millipore GVWP 02500, 0,22 μm Porengröße, 25 mm Durchmesser) gesammelt. Die Filter wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und dort bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Da das Sediment extrem wäbrig und weich war, wurden 20 ml davon ebenfalls filtriert und der Filter zusammen mit dem konzentrierten Sediment eingefroren.

2.7.2.2 Extraktion und Analyse von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren wurden mit der in Abschnitt 2.3.1.2 beschriebenen Methode nach Oelmüller et al. [143] extrahiert, die folgendermaßen angepaßt wurde: Die Filter wurden aufgetaut und zweimal mit 1 ml eiskaltem AE-Puffer gewaschen. Der Puffer sowie die Filter wurden zu 6 ml heißem Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) und 60 μl 25% (w/v) SDS gegeben und 5 Minuten bei 60 °C inkubiert. Die Lösung wurde auf Eis abgekühlt und zur Phasentrennung 5 Minuten bei 4000 x *g* zentrifugiert. Die wäbrige Phase wurde mit 250 μl 2 M Natriumacetat, pH 5,2 vermischt und noch zweimal wie oben beschrieben mit 5 ml Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol extrahiert. Die Nukleinsäuren wurden mit 2,5 Vol. 96% (v/v) Ethanol für 3 Stunden bei –20 °C gefällt, 60 Minuten bei 4000 x *g* zentrifugiert, mit eiskaltem 75% (v/v) Ethanol gewaschen, zentrifugiert, etwa 20 Minuten unter Vakuum getrocknet und in

50 μ l DEPC-Wasser¹ gelöst. Für die Amplifikation von 16S rRNA-Genfragmenten wurden diese Nukleinsäure-Extrakte 1:10 (Wasserproben) bzw. 1:100 (Sedimentprobe) verdünnt und 1 μ l der Verdünnung in einer 50 μ l-PCR mit Primerpaar GM5fGC-DS907r (siehe Abschnitt 2.3.2.1) eingesetzt. Die Amplifikation des [NiFe] Hydrogenase-Gens mit Primerpaar Hyd1f-Hyd5r wurde mit bis zu 10 μ l der unverdünnten Nukleinsäurepräparationen durchgeführt.

Alternativ erfolgte die Zellyse nach einem Protokoll von Fuhrmann et al. [56] mit anschließender Phenol-Extraktion der Nukleinsäuren.

STE-Puffer:

10 mM Tris-HCl, pH 8

1 mM EDTA

100 mM NaCl

Die Filter wurden mit 1 ml STE-Puffer gespült, 100 μ l 10% (w/v) SDS zugegeben und 2 Minuten im siedenden Wasserbad inkubiert. Die Filter wurden ein zweites Mal mit 1 ml STE-Puffer gespült. Filter und Puffer wurden dann mit 2 ml Phenol extrahiert. Die wäßrige Phase wurde noch zweimal mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert, und die Nukleinsäuren durch Zugabe von 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat, pH 5,5 und 2,5 Vol. Ethanol bei -20°C für 3 Stunden gefällt. Nach dem Abzentrifugieren (30 Minuten bei 5000 rpm) wurde das Pellet mit 1 ml 70% (v/v) Ethanol gewaschen, erneut kurz abzentrifugiert, 15 Minuten unter Vakuum getrocknet und in 50 μ l Wasser aufgenommen.

Die cDNA-Synthese wurde im Prinzip wie unter Abschnitt 2.3.2.2 beschrieben durchgeführt. 17 μ l des Nukleinsäure-Extrakts wurden mit 2 μ l 10 x DNase-Puffer und 1 μ l DNase [10 U/ μ l] gemischt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die DNase wurde durch Extraktion mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol entfernt. Nach Ethanolfällung und Zentrifugation wurde das RNA-Pellet in 20 μ l Wasser gelöst. Die Reverse Transkription erfolgte mit 10 μ l Gesamt-RNA in einem Endvolumen von 20 μ l. Für die Amplifikation von 16S ribosomalen cDNA-Fragmenten wurde der RT-Mix 1:1000 verdünnt und 1 μ l davon in einer 50 μ l-PCR mit Primerpaar GM5fGC-DS907r eingesetzt. Die Amplifikation der [NiFe] Hydrogenase-mRNA mit Primerpaar Hyd1f-Hyd5r wurde mit bis zu 10 μ l der unverdünnten RT-Mixe durchgeführt.

Für die Analyse von amplifizierten 16S rRNA-Sequenzen in denaturierenden Gradientengelen wurden 300 μ l PCR-Produkte hergestellt und mit 30 μ l 5 M NaCl und 750 μ l Ethanol bei -80°C gefällt. Nach der Zentrifugation wurde das Pellet mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, abzentrifugiert, unter Vakuum getrocknet und in 15 μ l Wasser gelöst. Damit wurden Gele mit einem Gradienten von 20–70% an denaturierenden Agentien beschickt.

Nach der Elektrophorese wurden mit einer abgeschnittenen Pasteurpipette kleine Stücke der mit Ethidiumbromid-angefärbten DNA-Banden aus dem Gel entfernt; zum einen um die Positionen von Banden im Gel zu markieren und einen Vergleich der Banden

¹Wasser wurde mit 0,2% (v/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetzt, mehrere Stunden geschüttelt und anschließend autoklaviert.

nach der Hybridisierung zu erlauben, zum anderen, um PCR-Produkte interessanter Banden zu eluieren, reamplifizieren und sequenzieren. Die Sequenzierung und Identifizierung dieser PCR-Produkte wurde von Dr. Andreas Teske wie unter Abschnitt 2.3.5 beschrieben durchgeführt; als Primer dienten GM5f und DS907r.

Bis zu 200 μ l [NiFe] Hydrogenase-PCR-Produkte (durch Ethanol-fällung auf 1/10 des Volumens reduziert) wurden in denaturierenden Gradientengelen analysiert.

2.7.3 Golfo Dulce, Costa Rica

2.7.3.1 Probennahme

Proben wurden während einer Ausfahrt der *RV Viktor Hensen* im Januar 1994 auf Station GD1 (lat. 8 41' 07" N, long. 83 23' 07" O) im Golfo Dulce, Costa Rica genommen. Wasserproben wurden mit einer Niskin-Flasche in 20 m-Intervallen genommen. 500 ml Seewasser wurden durch einen Durapore Filter (Millipore GVWP 02500, 0,22 μ m Porengröße, 25 mm Durchmesser) mit Hilfe einer Vakuumpumpe filtriert, um die Biomasse zu sammeln. Die Filter wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20°C gelagert. Von einem Sedimentkern mit einem Durchmesser von 26 mm wurden die oberen 5 mm abgenommen, gemischt und bei -20°C gelagert.

2.7.3.2 Extraktion und Analyse von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren wurden wie unter Abschnitt 2.7.2.2 beschrieben von den Filtern bzw. aus 0,5 g Sediment extrahiert und in 50 μ l Wasser aufgenommen. 1 μ l dieser Extrakte wurde in einer 50 μ l-PCR eingesetzt. 200 μ l PCR-Produkte, bestehend aus 16S rRNA-Genfragmenten, wurden wie oben beschrieben auf ein Volumen von 15 μ l reduziert und in denaturierenden Gradientengelen aufgetrennt. Bis zu 200 μ l [NiFe] Hydrogenase-PCR-Produkte (reduziert auf 1/10 des Volumens) wurden in denaturierenden Gradientengelen analysiert.

2.7.4 Solar Lake, Sinai

2.7.4.1 Probennahme

Sedimentkerne einer mikrobiellen Matte vom Solar Lake, Sinai wurden von Dr. Andreas Teske von einer Reise im November 1994 mitgebracht. Unmittelbar nach Erhalt wurden die oberen 3 cm eines Sedimentkerns homogenisiert, auf 2 ml-Eppendorfgefäße verteilt, in Flüssigstickstoff eingefroren und über Nacht lyophilisiert. Zur Erprobung von Extraktionsmethoden für Nukleinsäuren wurde zunächst auch frisches Mattenmaterial verwendet.

2.7.4.2 Extraktion und Analyse von Nukleinsäuren

Die Extraktion von Nukleinsäuren aus Mattenmaterial vom Solar Lake erwies sich als relativ schwierig. Problematisch war sowohl der Zellaufschluß als auch die Ausbeute und die Reinheit der isolierten Nukleinsäuren. Daher wurden verschiedene Methoden ausprobiert und modifiziert.

- Zunächst wurde an frischem Mattenmaterial erfolglos eine Extraktion der Nukleinsäuren versucht entsprechend dem Protokoll für Bioreaktorproben wie unter Abschnitt 2.7.1.2 beschrieben. Dabei wurden pro g Mattenmaterial 1 ml Puffer und 2 ml Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol verwendet. Dann wurde diese Methode auf Mattenmaterial angewendet, das zunächst in flüssigem Stickstoff eingefroren und mit einem Mörser in flüssigem Stickstoff pulverisiert wurde.
- Die Extraktion von Nukleinsäuren unter Verwendung eines harschen denaturierenden Agens, dem Guanidinium-Isothiocyanat, in Kombination mit einer Phenol-Chloroform-Extraktion und zusätzlichem mechanischen Zellaufschluß [25, 80, 154] wurde ebenfalls versucht.

GIPS-Puffer:

4 M Guanidinium-Isothiocyanat

0,5% (w/v) Sarkosyl

25 mM Natriumcitrat, pH 7

0,1 M 2-Mercaptoethanol

2,5 g frisches Mattenmaterial wurden mit 2 g Glasperlen sowie 4 ml GIPS-Puffer, 0,4 ml 2 M Natriumacetat, pH 4, 4 ml Phenol und 0,8 ml Chloroform-Isoamylalkohol (49:1) gründlich gemischt, im Eisbad 5 Minuten abgekühlt und 3 Minuten bei 1600 rpm im "bead beater" geschüttelt. Durch 15 Minuten Zentrifugation bei 4 °C und 5000 rpm wurden die Phasen getrennt, und die wäßrige Phase mit 1 Vol. Isopropanol nach Zugabe von 1 µl Glycogenlösung [20 mg/ml] 60 Minuten bei -20 °C inkubiert. Die Lösung wurde 30 Minuten bei 4 °C und 5000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 5 ml 1 mM EDTA, pH 7 gelöst, mit 1 Vol. Isopropanol versetzt und erneut für 60 Minuten bei -20 °C gefällt. Die Lösung wurde wie oben beschrieben zentrifugiert, das Pellet mit 5 ml 70% (v/v) Ethanol gewaschen, kurz abzentrifugiert und in 200 µl Wasser gelöst.

- Es wurde eine weitere, schnelle Methode basierend auf dem Detergenz Hexadecyltrimethylammoniumbromid (CTAB), das Polysaccharide komplexiert, verwendet. Ursprünglich wurde sie beschrieben, um DNA aus Pflanzenmaterial zu isolieren [47].

CTAB-Lysepuffer:

2% (w/v) CTAB

1,4 M NaCl

0,2% (v/v) 2-Mercaptoethanol

20 mM EDTA

100 mM Tris-HCl, pH 8

- 1 g Lyophilisat, 1 g Glasperlen und 2,5 ml CTAB-Lysepuffer wurden gründlich gevortext und nach Zugabe von 7,5 ml CTAB-Lysepuffer 30 Minuten bei 60 °C inkubiert. Die Lösung wurde mit 10 ml Phenol-Chloroform-Isoamylalohol vermischt, 5 Minuten geschüttelt und zur Phasentrennung 10 Minuten bei 1600 x g zentrifugiert. Die wäßrige Oberphase wurde abgenommen, 2/3 Vol. kaltes Isopropanol zugefügt und 2 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde bei 4 °C und 500 x g für 2 Minuten zentrifugiert und der Überstand vorsichtig dekantiert. Das Nukleinsäurepellet wurde mit 20 ml 76% (v/v) Ethanol, 10 mM Ammoniumacetat 30 Minuten unter Schütteln gewaschen, 10 Minuten bei 1600 x g abzentrifugiert, 30 Minuten unter Vakuum getrocknet und in 200 µl Wasser aufgenommen.
- Im folgenden wurde eine Methode verwendet, die für Sedimentproben beschrieben wurde [162] (basierend auf [42, 74, 129, 218]). Dazu wurde 1 g gefrorenes Mattenmaterial, 1 g Glasperlen, 2 ml 120 mM Na-Phosphatpuffer, pH 8, 250 µl Phenol, 125 µl 10% (w/v) SDS, 10 mg Polyvinylpyrrolidon (PVVP) in einem "bead beater"-Gefäß 5 x 15 Sekunden bei 2000 rpm geschüttelt. Die Lösung wurde in 15 ml-Plastikröhrchen überführt, 750 µl Na-Phosphatpuffer, pH 8 und 2 ml Phenol zugegeben, gründlich gemischt und 10 Minuten bei 4 °C und 5000 rpm zentrifugiert. Die wäßrige Phase wurde abgenommen und aufbewahrt, während die Phenolphase mit 1,25 ml Na-Phosphatpuffer reextrahiert wurde. Die wäßrigen Phasen wurden vereinigt, mit 1 Vol. Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) 5 Minuten geschüttelt und dann 5 Minuten zur Phasentrennung zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde noch dreimal mit der wäßrigen Phase wiederholt. Die Fällung der Nukleinsäuren aus der wäßrigen Phase erfolgte mit 2,5 Vol. eiskaltem Ethanol für eine Stunde bei -20 °C. Die Proben wurden 60 Minuten bei 4 °C und 5000 rpm zentrifugiert, das Pellet in 70% (v/v) Ethanol gewaschen, kurz abzentrifugiert und in 200 µl Wasser aufgenommen. Eine Aufreinigung der unsauberen Extrakte wurde über die Bindung der Nukleinsäuren an das Reagenz Hydroxylapatit versucht [162].
 - Abschließend wurde eine Extraktion prinzipiell wie im vorhergehenden Absatz beschrieben durchgeführt, aber mit einigen Modifikationen. 0,5 g Lyophilisat wurden mit 1 g Glasperlen vermischt und nach Zugabe von 4 ml 120 mM Na-Phosphatpuffer, pH 8 mit 1% (w/v) PVVP, 500 µl Phenol und 250 µl 10% (w/v) SDS gründlich gevortext. Dann wurden 4 ml Phenol zugegeben und nochmals gründlich gevortext. Nach der Phasentrennung wurde die Phenolphase mit 2 ml Na-Phosphatpuffer reextrahiert. Die vereinigten wäßrigen Phasen wurden anschließend noch insgesamt viermal mit 1 Vol. Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol extrahiert. Um das Volumen der wäßrigen Phase zu vergrößern, wurde 1/3 Vol. Na-Phosphatpuffer zugefügt. Die Nukleinsäuren wurden, statt mit Ethanol, mit 2/3 Vol. Isopropanol für 30 Minuten bei Raumtemperatur gefällt und 45 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, kurz abzentrifugiert, 15 Minuten unter Vakuum getrocknet und in 100 µl Wasser aufgenommen. RNA wurde aus diesen Präparationen durch die Behandlung mit DNase gewonnen (siehe Abschnitt 2.7.1.2).

Für die Amplifikation des [NiFe] Hydrogenase-Gens mit Primerpaar Hyd1f-Hyd5r wurden etwa 0,1–1 μg genomische DNA eingesetzt. Die cDNA-Synthese wurde mit 0,5–1 μg Gesamt-RNA durchgeführt und 1/4 Volumen des RT-Mixes in der anschließenden PCR verwendet. 50 μl der [NiFe] Hydrogenase-PCR-Produkte wurden in denaturierenden Gradientengelen analysiert.

2.8 Computerunterstützte Sequenzanalyse

Vergleiche von Nukleotid- und Aminosäuresequenzen mit Datenbanken (EMBL) wurden mit Hilfe des FASTA Suchprogramms [151, 152] durchgeführt. Das Programm DNA-Strider 1.2 [124] wurde verwendet, um Nukleotidsequenzen in Aminosäuresequenzen umzuschreiben. Das "alignment" der Sequenzen wurde zunächst manuell in dem Sequenzeditor SEQAPP [63] durchgeführt. Der Zugriff auf die Großrechenanlage der Universität Göttingen erlaubte eine Verbesserung des Sequenzabgleiches mit dem Wisconsin GCG Analysis Software Package (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Biotechnology Center, Madison, Wisconsin). Das Programm PAUP 3.1.1 [209] wurde verwendet, um Sequenzen paarweise zu vergleichen und eine Distanzmatrix zu erstellen.

2.9 Dokumentation

Die Dokumentation von Gelläufen, Hybridisierungen und Immunreaktionen erfolgte entweder mit einer Polaroid-Kamera MP4 oder mit dem Cybertech CS1 System. Bilder, die nicht digitalisiert vorlagen, wurden mit der Software Fotolook SA 2.05 oder Ofoto 2.0 "gescannt". Digitale Bilder wurden mit Adobe Photoshop 3.0 bearbeitet; Text wurde mit Hilfe von FreeHand 5.0 zugefügt. Graphen wurden mit CA-Cricket Graph III 1.5.2 erstellt.

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Entwicklung eines molekularbiologischen Systems zum Nachweis von *Desulfovibrio* spp.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein molekularbiologisches Nachweissystem für sulfatreduzierende Bakterien entwickelt werden, das auf den Sequenzen der [NiFe] Hydrogenase basiert. Das [NiFe] Hydrogenase-Gen ist in allen bisher untersuchten *Desulfovibrio*-Stämmen vorhanden [232]. In erster Linie wurde untersucht, ob man mit Hilfe der PCR [NiFe] Hydrogenase-Gensequenzen amplifizieren und diese analysieren kann, um so Bakterienstämme der Gattung *Desulfovibrio* zu spezifizieren.

3.1.1 Design von PCR-Primern

Die bekannten Sequenzen der [NiFe] Hydrogenase-Gene von *Desulfovibrio vulgaris* [38], *Desulfovibrio gigas* [110] und *Desulfovibrio fructosovorans* [180] wurden von Dr. Gerard Muyzer mit Hilfe des BESTFIT Programms (Sequence Analysis Software Package, Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Biotechnology Center, Madison, Wisconsin [39]) miteinander verglichen. Es wurden sieben kurze Consensusregionen gefunden. Fünf dieser Sequenzen wurden als PCR-Primer synthetisiert. Abbildung 3.1 zeigt in einer schematischen Zeichnung die Position und Orientierung dieser Oligonucleotide innerhalb des [NiFe] Hydrogenase-Gens.

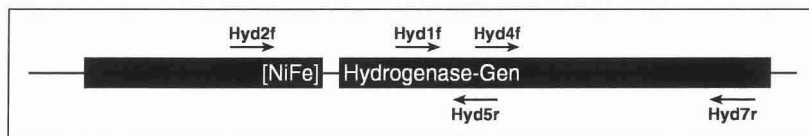


Abbildung 3.1: Schematische Zeichnung der Primerpositionen innerhalb des [NiFe] Hydrogenase-Gens von *Desulfovibrio* spp.

Tabelle 3.1: Sequenzen und Positionen der PCR-Primer

Primer ^a	Position ^b	Sequenz
Hyd2f	811–829	5'-CCGG(C/T)TGCCCGCC(G/C)AACCC-3'
Hyd1f	1441–1467	5'-CGCGACGCCAGCACTTACCCAGCGC-3'
Hyd4f	1786–1815	5'-TTCACCAA(C/T)GCCTACTTCCT(G/C)GGCGGCCAC-3'
Hyd5r	1844–1879	5'-GCAGGGCTTCCAGGTAGTGGCGGTGGCGATGAGGT-3'
Hyd7r	2859–2878	5'-CGCAGGCGATGCA(G/C)GGGTC-3'
GC-Klammer ^c		5'-CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCGCCCCG-3'

^af ist der "forward"-Primer; r ist der "reverse"-Primer

^bPosition im [NiFe] Hydrogenase-Gen von *Desulfovibrio vulgaris* [38]

^cDie GC-Klammer wird an das 5'-Ende des Primers Hyd1f angehängt (siehe Text).

kleotide innerhalb des [NiFe] Hydrogenase-Gens. Primer Hyd2f ist innerhalb der Region, die die kleine Untereinheit der [NiFe] Hydrogenase codiert, lokalisiert; die Primer Hyd1f, Hyd4f, Hyd5r und Hyd7r befinden sich innerhalb des Genabschnittes, der für die große Untereinheit der [NiFe] Hydrogenase codiert.

Die Primersequenzen und ihre exakte Position innerhalb des [NiFe] Hydrogenase-Gens von *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki [38] sind in Tabelle 3.1 dargestellt. Der Vergleich dieser Sequenzen mit allen in der EMBL Datenbank gespeicherten Sequenzen unter Verwendung des FASTA Suchprogramms [151, 152] ergab ausschließlich signifikante Ähnlichkeitswerte für Hydrogenase-Gene.

3.1.2 Amplifikation des [NiFe] Hydrogenase-Gens von Rein-kulturen

Zunächst wurden die zur Amplifikation des [NiFe] Hydrogenase-Gens erforderlichen PCR-Bedingungen ermittelt. Ausgehend von der berechneten mittleren Schmelztemperatur T_m (siehe Abschnitt 2.3.4.3) der Primersequenzen wurde die Annealingtemperatur auf 60 °C gesetzt und das [NiFe] Hydrogenase-Gen aus genomischer DNA von verschiedenen *Desulfovibrio*-Stämmen in 30 Zyklen amplifiziert. Als negative Kontrolle diente dabei *Escherichia coli*-DNA. Da auch in diesem Ansatz ein PCR-Produkt entstand, wurde die Annealingtemperatur in den folgenden Reaktionen um 5 °C erhöht. Abbildung 3.2 zeigt die PCR-Produkte aus genomischer DNA von *Desulfovibrio vulgaris* DSM 644, die man mit den verschiedenen, möglichen Primerkombinationen erhält, nach Auftrennung in einem Agarosegel. Primerpaar Hyd2f-Hyd7r sollte ein 2070 bp, Primerpaar Hyd1f-Hyd7r ein 1440 bp, Primerpaar Hyd4f-Hyd7r ein 1090 bp, Primerpaar Hyd2f-Hyd5r ein 1070 bp und Primerpaar Hyd1f-Hyd5r ein 440 bp großes DNA-Fragment amplifizieren. Die Größe der PCR-Produkte stimmt mit der aufgrund der bekannten Sequenzen erwarteten Größe überein.

Da die PCR-Primer zum Nachweis von *Desulfovibrio*-Stämmen in Umweltproben verwendet werden sollten, mußte zunächst ihre Spezifität bestimmt werden. Hierzu wurde eine Vielzahl von verschiedenen Bakterienstämmen untersucht. Neben 11 *Desulfovi-*

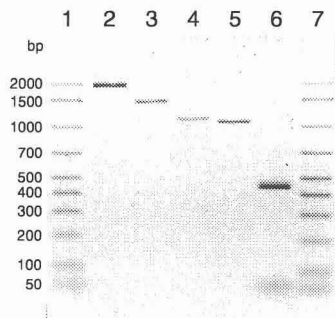


Abbildung 3.2: Gelelektrophoretische Analyse der PCR-Produkte nach Amplifikation des [NiFe] Hydrogenase-Gens aus genomischer DNA von *Desulfovibrio vulgaris* DSM 644 mit folgenden Primerpaaren: Hyd2f-Hyd7r (Bahn 2), Hyd1f-Hyd7r (Bahn 3), Hyd4f-Hyd7r (Bahn 4), Hyd2f-Hyd5r (Bahn 5), Hyd1f-Hyd5r (Bahn 6). DNA-Größenmarker (Bio-Rad) wurden in Bahn 1 und 7 aufgetragen. (Negatives Bild eines Ethidiumbromid-gefärbten 2% (w/v) TBE-Agarosegels)

brio-Stämmen wurden 10 Stämme aus 7 anderen Gattungen der Gram-negativen sulfatreduzierenden Bakterien, der Gram-positive Stamm *Desulfotomaculum orientis* und zwei neue Isolate von sulfatreduzierenden Bakterien, LTK4 [78] und PIB2 [100], getestet. Weiterhin wurden 12 Stämme aus anderen Bakteriengruppen untersucht, von denen etliche eine [NiFe] Hydrogenase besitzen [161, 255].

Die für die PCR verwendeten DNA-Präparationen wurden in einem 1,5% (w/v) Agarosegel überprüft. Es wurden nur Präparationen benutzt, die hochmolekulare DNA enthielten. Zusätzlich wurde das 16S rRNA-Gen aus dieser DNA in einem etablierten PCR-System [78, 135] amplifiziert. Dies stellt sicher, daß ein negatives Ergebnis weder durch die DNA-Präparation noch durch die PCR-Reagentien verursacht wird. Um die Spezifität der [NiFe] Hydrogenase-PCR zu erhöhen und die Bildung von falschen Nebenprodukten zu vermeiden, wurde eine sogenannte "touchdown"-PCR durchgeführt [46]. Die Annealingtemperatur wurde dazu auf 70 °C erhöht und in jedem zweiten Zyklus um 1 °C gesenkt bis 60 °C erreicht waren. Bei dieser Temperatur wurden dann 10 weitere Zyklen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.2 dargestellt.

Das [NiFe] Hydrogenase-Gen wurde hauptsächlich aus DNA von *Desulfovibrio*-Stämmen amplifiziert. PCR-Produkte entstanden dabei meistens mit allen Primerpaaren. Dasselbe galt für das neue Isolat PIB2, während DNA des Isolats LTK4 keine PCR-Produkte bildete. Unter stringenter PCR-Bedingungen ("touchdown"-PCR von 70–60 °C) amplifizierte das Primerpaar Hyd1f-Hyd5r ausschließlich PCR-Produkte mit DNA aus *Desulfovibrio*-Stämmen. Die weiteren Primerpaare amplifizierten auch DNA-Sequenzen von anderen Bakterien, sogar von solchen, die Wasserstoff nicht direkt nutzen können, z. B. *Desulfoarculus baarsii*, ein Stamm der früher zur Gattung *Desulfovibrio* gezählt wurde [40]. Voordouw et al. [232] konnten ebenso für *Desulfoarculus*

Tabelle 3.2: Spezifität der [NiFe] Hydrogenase-PCR

Bakterienstamm	Quelle	H ₂ ^b	PCR-Produkte ^a					
			Hyd2f Hyd7r	Hyd1f Hyd7r	Hyd4f Hyd7r	Hyd2f Hyd5r	Hyd1f Hyd5r	Hyd1f Hyd5r ^c
<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	DSM 1744	+	+	+	+	±	±	+
<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	DSM 644	+	+	+	+	+	+	+
<i>Desulfovibrio gigas</i>	DSM 1382	+	+	+	+	+	+	+
<i>Desulfovibrio baculatus</i>	DSM 2555	+	+	+	+	+	+	+
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	DSM 1926	+	+	+	+	+	+	+
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	DSM 1924	+	+	+	+	+	+	+
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	Vosjan	+	-	-	-	-	+	+
<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	DSM 644	+	+	+	+	+	+	+
<i>Desulfovibrio sulfodismutans</i>	DSM 3696	+	+	+	+	+	+	+
<i>Desulfovibrio longus</i>	DSM 6739	+	+	+	±	-	-	±
<i>Desulfovibrio saleregens</i>	DSM 2638	+	+	-	-	-	-	-
<i>Desulfobacterium autotrophicum</i>	DSM 3382	+	-	-	-	-	-	-
<i>Desulfobacterium vacuolatum</i>	DSM 3385	+	-	-	-	-	-	-
<i>Desulfobulbus</i> sp.	DSM 2058	+	-	-	-	-	-	-
<i>Desulfosarcina variabilis</i>	DSM 2060	+	+	-	*	*	-	-
<i>Desulfotomaculum orientis</i>	DSM 765	+	-	-	-	-	-	-
<i>Desulfobacter curvatus</i>	DSM 3379	+	-	-	-	-	-	-
<i>Desulfobacter postgatei</i>	DSM 2553	-	-	-	-	-	-	-
<i>Desulfobacter latus</i>	DSM 3381	-	-	-	-	-	-	-
<i>Desulfobotulus sapovorans</i>	DSM 2055	-	-	-	-	-	-	-
<i>Desulfoarculus baarsii</i>	DSM 2075	-	+	+	*	-	-	*
<i>Desulfococcus multivorans</i>	DSM 2059	-	*	-	-	*	-	*
LTK4	Isaksen	+	-	-	-	-	-	-
PIB2	Cohen	+	+	+	±	+	+	+
<i>Rhodocyclus gelatinosus</i>	DSM 1709	+	*	-	*	-	-	*
<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	DSM 123	+	-	-	-	-	-	-
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	DSM 1710	+	*	-	+	-	-	*
<i>Escherichia coli</i>	Goosens	+	+	-	-	-	-	*
<i>Alcaligenes eutrophus</i> H16	Friedrich	+	*	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas facilis</i>	DSM 649	+	-	-	-	-	-	-
<i>Xanthobacter autotrophicus</i>	DSM 432	+	+	-	-	-	-	*
<i>Paracoccus denitrificans</i>	DSM 1404	+	+	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas stutzeri</i> ZoBell	Zumft	-	*	-	*	*	-	*
<i>Bacillus cereus</i>	Thauer	-	-	nb	-	-	-	-
<i>Bacillus</i> sp.	de Vrind	-	-	-	-	-	-	*
<i>Leptothrix discophora</i>	Ghiorzi	-	-	-	nb	-	-	-

^a+, PCR-Produkt der erwarteten Größe; -, kein PCR-Produkt; ±, geringe Menge an PCR-Produkt; *, mehrere PCR-Produkte oder PCR-Produkt mit anderer Größe; nb, nicht bestimmt

^bH₂-Stoffwechsel: +, ja; -, nein

^c"Touchdown"-PCR von 65–55 °C

baarsii ein schwaches, aber reproduzierbares Signal nach Hybridisierung mit einer [NiFe] Hydrogenase-Gensonde nachweisen.

Die in der Tabelle 3.2 erfaßten Ergebnisse zeigen deutlich, daß ein stringentes PCR-Protokoll notwendig ist, um spezifische Reaktionsbedingungen zu gewährleisten. Dies hatte jedoch zur Folge, daß mit dem Primerpaar Hyd1f-Hyd5r nur eine geringe Menge an PCR-Produkten von *Desulfovibrio vulgaris* DSM 1744 und kein PCR-Produkt für *Desulfovibrio longus* erzielt wurde. Eine Variation der Annealingtemperatur, z. B. eine "touchdown"-PCR von 65–55 °C, führte zwar zu einer höheren Ausbeute bei *Desulfovibrio vulgaris* DSM 1744 und PCR-Produkten bei *Desulfovibrio longus*, aber auch bei anderen Bakterien. PCR-Produkte von anderen Bakterien hatten aber niemals die für *Desulfovibrio* spp. charakteristische Größe. Sie unterschieden sich in mindestens 200 bp. Aus genomischer DNA von *Desulfovibrio salexigens* konnte nur mit Primerpaar Hyd2f-Hyd7r ein PCR-Produkt amplifiziert werden. Ein Herabsenken der Annealingtemperatur führte nicht zur Bildung von weiteren Hydrogenase-Genfragmenten mit den anderen Primerpaaren.

Nachdem sich herausgestellt hatte, daß mit den Primern Hyd1f und Hyd5r eine spezifische Amplifikation des [NiFe] Hydrogenase-Gens von *Desulfovibrio*-Stämmen möglich ist, wurden deren Sequenzen überarbeitet. Sowohl aus Kostengründen als auch wegen unerwünschter Sekundärstrukturen, die sich bei langen Oligonukleotiden formieren können, sind kürzere Primer für eine PCR wünschenswert. Primer Hyd1f wurde auf die ersten 19 Nukleotide des 5'-Endes reduziert (Hyd1-19), Primer Hyd5r auf die ersten 18 Nukleotide des 5'-Endes (Hyd5-18). 20 bzw. 100 ng genomische DNA von neun *Desulfovibrio*-Stämmen wurden in einer PCR mit 30 Zyklen bei einer Annealingtemperatur von 58 °C eingesetzt. Leider zeigte dieses Primerpaar nicht mehr die gewünschte Spezifität. Nur fünf der getesteten Stämme bildeten ein PCR-Produkt, welches aufgrund seiner Größe als [NiFe] Hydrogenase-Genfragment identifiziert wurde. *Desulfovibrio vulgaris* DSM 644, *Desulfovibrio desulfuricans* Vosjan, *Desulfovibrio baculatus* und *Desulfovibrio salexigens* zeigten kein PCR-Produkt. Ein drastisches Herabsenken der Annealingtemperatur auf 40 °C führte bei diesen Stämmen zwar zur Amplifikation von mehreren DNA-Fragmenten, die aber ohne Ausnahme nicht der erwarteten Größe des [NiFe] Hydrogenase-Genfragments entsprachen. Daher wurde auf eine weitere Verwendung dieser kurzen Primer (zunächst) verzichtet.

3.1.3 Hybridisierungen

Parallel zu der Entwicklung eines Nachweissystems basierend auf der Amplifikation des [NiFe] Hydrogenase-Gens wurde geprüft, ob Fragmente dieses Gens zum direkten Nachweis von *Desulfovibrio*-Stämmen durch Hybridisierungen mit genomischer DNA geeignet sind.

In Dot Blot Experimenten wurden markierte PCR-Produkte des [NiFe] Hydrogenase-Gens von verschiedenen *Desulfovibrio*-Stämmen als Sonden verwendet. In Abbildung 3.3 ist ein Beispiel für eine solche Hybridisierung gezeigt. Als Sonde wurde das Hyd1f-

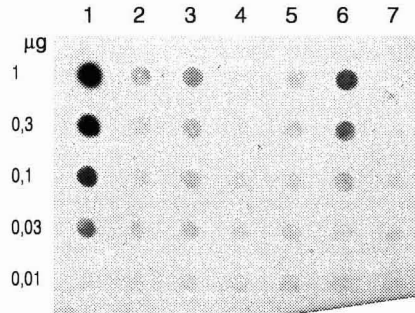


Abbildung 3.3: Dot Blot Analyse genomischer DNA hybridisiert mit dem Hyd1f-Hyd5r-Fragment von *Desulfovibrio baculatus*. Aufgetragen wurde in einer Verdünnungsreihe DNA von *Desulfovibrio baculatus* (Bahn 1), *Desulfovibrio desulfuricans* Vosjan (Bahn 2), *Desulfovibrio desulfuricans* DSM 1926 (Bahn 3), *Desulfosarcina variabilis* (Bahn 4), *Desulfobacter postgatei* (Bahn 5), *Rhodocyclus gelatinosus* (Bahn 6) und Heringsperma-DNA (Bahn 7).

Hyd5r-Fragment von *Desulfovibrio baculatus* eingesetzt und mit DNA von verschiedenen Bakterien hybridisiert. Ausgehend von 1 µg genomischer DNA wurde diese in drei Schritten jeweils 1:3 verdünnt und auf die Membran aufgetragen. Der anschließende Nachweis der Hybridmoleküle über das Chemilumineszenzsubstrat CSPD zeigte nach 10 Minuten Exposition auf einem Röntgenfilm, daß die Sonde, wie zu erwarten, ein starkes positives Hybridisierungssignal mit genomischer DNA von *Desulfovibrio baculatus* aufweist. Die Sonde hybridisierte jedoch vergleichsweise schwach mit *Desulfovibrio desulfuricans*. DNA von *Rhodobacter gelatinosus*, einem phototrophen Stamm mit einem [NiFe] Hydrogenase-Gen [221], reagierte hingegen positiv mit der Sonde. Ein ähnliches Bild zeigte sich für andere PCR-Produkte, die als Sonden verwendet wurden. So hybridisierte das Hyd2f-Hyd7r-Fragment von *Desulfovibrio vulgaris* zwar mit *Desulfovibrio desulfuricans*, aber auch mit genomischer DNA des Stammes *Rhodospseudomonas palustris* (Ergebnisse nicht gezeigt).

Diese ersten Experimente machten relativ schnell deutlich, daß PCR-Fragmente des [NiFe] Hydrogenase-Gens wenig geeignet sind, um als spezifische Sonden zum Nachweis von *Desulfovibrio* spp. in Umweltproben eingesetzt zu werden.

Weiterhin wurden PCR-Produkte mit markierten PCR-Produkten hybridisiert. Die Spezifität des Nachweises wird dabei durch die spezifische Amplifikation gewährleistet. Mit dieser Herangehensweise ist laut Steffan und Atlas [204] eine Erhöhung der Sensitivität des Nachweises spezifischer DNA-Fragmente in Umweltproben um den Faktor 1000 möglich verglichen mit der Hybridisierung nicht-amplifizierter DNA. Hyd1f-Hyd5r-PCR-Produkte verschiedener *Desulfovibrio*-Stämme wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran übertragen und mit markierten Hyd1f-Hyd5r-PCR-Produkten von *Desulfovibrio vulgaris*, *Desulfovibrio desulfuricans*,

Desulfovibrio gigas und *Desulfovibrio baculatus* hybridisiert (Southern Blot Analyse; Ergebnisse nicht gezeigt). Unabhängig von dem Stamm, aus dem die Sonde stammte, hybridisierten die Sonden mit allen getesteten PCR-Produkten. Dies ist vermutlich auf die langen Primersequenzen (von 27 und 36 Nukleotiden) zurückzuführen, die bei allen PCR-Produkten identisch sind. Hybridisierungssignale waren sogar mit Verdünnungen der PCR-Produkte um den Faktor 1000 nachweisbar.

Das bisher als Primer verwendete Oligonukleotid Hyd4f wurde ebenfalls als Sonde für Hybridisierungen mit gelelektrophoretisch aufgetrennten Hyd1f-Hyd5r-PCR-Produkten verwendet. Da die Sequenz innerhalb des amplifizierten DNA-Fragments liegt (Abbildung 3.1), gibt eine positive Hybridisierung weiteren Aufschluß über die Identität der PCR-Produkte. Diese Oligonukleotidsonde hybridisierte mit allen getesteten *Desulfovibrio*-Stämmen, zeigte jedoch kein Hybridisierungssignal mit dem PCR-Produkt des Isolats PIB2 (siehe Abbildung 3.8B).

3.1.4 Immunreaktionen

Eine Kreuzreaktion von spezifischen Antikörpern mit Proteinextrakten bietet ebenfalls die Möglichkeit, *Desulfovibrio* spp. zu detektieren. Für diese Experimente wurden zwei Antikörper verwendet, die gegen die [NiFe] Hydrogenase von *Desulfovibrio gigas* und *Desulfovibrio vulgaris* Groningen gerichtet waren und freundlicherweise von Dr. C. E. Hatchikian (CNRS Marseille, Frankreich) zur Verfügung gestellt wurden.

Zunächst wurden Immuno Dot Blot Experimente mit Proteinextrakten von vier *Desulfovibrio*-Stämmen durchgeführt, die auf Laktat angezogen worden waren (Ergebnisse nicht gezeigt). Drei Membranen wurden mit einer Verdünnungsreihe identischer Proteinextrakte beladen. Je eine Membran wurde für die zwei spezifischen Antikörper (1:500 verdünnt) verwendet. Als negative Kontrolle diente die dritte Membran, die mit Kaninchenserum (1:500 verdünnt) kreuzreagierte. Da sich die Signale der negativen Kontrolle nach der Farbreaktion nicht wesentlich von denen der spezifischen Antikörper unterschieden, wurden im folgenden Western Blots durchgeführt und die Konzentration der Antikörper auf 1:1000 herabgesetzt. Die Untereinheiten der [NiFe] Hydrogenase sind dann anhand ihrer Größe identifizierbar.

Abbildung 3.4 zeigt die Detektion der [NiFe] Hydrogenase in Proteinextrakten von verschiedenen *Desulfovibrio*-Stämmen nach einer Immunreaktion mit Anti-*Desulfovibrio gigas* [NiFe] Hydrogenase. *Desulfovibrio gigas*, *Desulfovibrio baculatus* und *Desulfovibrio vulgaris* DSM 644 kreuzreagierten mit dem Antikörper. Proteine von ca. 60 kDa und ca. 30 kDa entsprechend der großen und der kleinen Untereinheit der [NiFe] Hydrogenase [161] wurden angefärbt. Eine spezifische Kreuzreaktion mit Proteinen von *Desulfovibrio desulfuricans* DSM 1926 fand nicht statt. Die Identität weiterer angefarbter Banden, z. B. Proteine mit einer Größe von ca. 46 kDa ist unklar. Möglicherweise handelt es sich um Proteine, die die Aufreinigung der [NiFe] Hydrogenase kontaminierten und bei der Antikörperproduktion amplifiziert wurden. Mit dem Antikörper gegen die [NiFe] Hydrogenase von *Desulfovibrio vulgaris* Groningen wurde ein ähnliches Er-

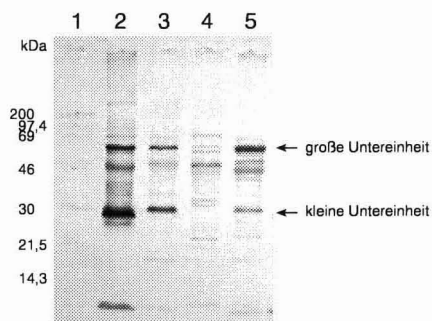


Abbildung 3.4: Immunoblot mit Anti-*Desulfovibrio gigas* [NiFe] Hydrogenase und Proteinextrakten aus *Desulfovibrio gigas* (Bahn 2), *Desulfovibrio vulgaris* DSM 644 (Bahn 3), *Desulfovibrio desulfuricans* DSM 1926 (Bahn 4) und *Desulfovibrio baculatus* (Bahn 5). Ein Proteingrößenmarker (RPN 756, Amersham) wurde in Bahn 1 aufgetragen.

gebnis erzielt (Ergebnisse nicht gezeigt).

Immunoblots zeigten in 3 von 4 *Desulfovibrio*-Stämmen die große und kleine Untereinheit der [NiFe] Hydrogenase auf. Proteinextrakte von *Desulfovibrio desulfuricans* DSM 1926 kreuzreagierten nicht spezifisch mit den verwendeten Antikörpern, obwohl im PCR-Test das [NiFe] Hydrogenase-Gen aus DNA dieses Stammes mit allen Primerpaaren amplifiziert werden konnte. Die Möglichkeit, daß die [NiFe] Hydrogenase unter den gewählten Kulturbedingungen nicht exprimiert wurde, konnte durch den Nachweis der [NiFe] Hydrogenase-mRNA (siehe Abschnitt 3.2.1) weitgehend ausgeschlossen werden.

Immunreaktionen können die Präsenz des Enzyms auf der funktionalen Proteinebene aufzeigen, und daher als Ergänzung zur Charakterisierung einer Bakteriengemeinschaft betrachtet werden. Sie zeichnen sich aber vermutlich durch eine geringe Spezifität aus. Die Spezifität der Kreuzreaktion wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht untersucht, da interspezifische Kreuzreaktionen von Hydrogenase-Antigenen und Hydrogenase-Antikörpern bekannt sind [97]. Die dargestellten Ergebnisse zeigen, daß die verwendeten Antikörper nicht Genus-spezifisch sind: Können keine spezifischen Proteine angefärbt werden, kann der betreffende Bakterienstamm trotzdem ein nachweisbares [NiFe] Hydrogenase-Gen besitzen und exprimieren.

3.1.5 Amplifikation des [NiFe] Hydrogenase-Gens aus Umweltproben

Im folgenden wurde das vielversprechende Nachweissystem für *Desulfovibrio* spp., basierend auf der Amplifikation des [NiFe] Hydrogenase-Gens, angewendet und weiterent-

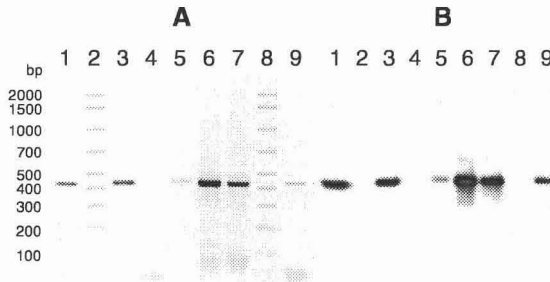


Abbildung 3.5: Nachweis von *Desulfovibrio* spp. in Umweltproben durch PCR-Amplifikation des [NiFe] Hydrogenase-Gens mit dem Primerpaar Hyd1f-Hyd5r. (A) Gelelektrophoretische Analyse der PCR-Produkte aus DNA von einer mikrobiellen Matte (Bahn 5), von Bakterien, die unter anaeroben Bedingungen in Bioreaktoren gewachsen sind (Bahn 3, 6 und 7) und von Bakterien, die unter aeroben Bedingungen in einem Bioreaktor gewachsen sind (Bahn 4). Bahn 1 zeigt die PCR-Produkte nach Amplifikation von genomischer DNA von *Desulfovibrio vulgaris* DSM 644, Bahn 9 die PCR-Produkte von *Desulfovibrio desulfuricans* DSM 1926. DNA-Größenmarker wurden in Bahn 2 und 8 aufgetragen. (Negatives Bild eines Ethidiumbromid-gefärbten 2% (w/v) TBE-Agarosegels) (B) Southern Blot Analyse der PCR-Produkte, hybridisiert mit der DIG-markierten Oligonukleotidsonde Hyd4f.

wickelt. Nachdem das spezifische Primerpaar Hyd1f-Hyd5r gefunden und spezifische PCR-Bedingungen ("touchdown" von 70–60 °C) ermittelt waren, wurden verschiedene Umweltproben untersucht. DNA isoliert aus einer mikrobiellen Matte (Texel, Holland) und aus Schlamm von verschiedenen experimentellen Bioreaktoren (TU Delft, Holland) wurde verwendet, um [NiFe] Hydrogenase-Genfragmente zu amplifizieren. Abbildung 3.5A zeigt die PCR-Produkte nach Auftrennung in einem Agarosegel. PCR-Produkte wurden aus DNA von Bakteriengemeinschaften, die in drei verschiedenen Bioreaktoren unter anaeroben Bedingungen gewachsen waren (Bahn 3, 6 und 7), und aus DNA der mikrobiellen Matte (Bahn 5) erhalten. DNA, die von einer Bakteriengemeinschaft stammte, die in einem Bioreaktor unter aeroben Bedingungen entstanden war, ergab kein PCR-Produkt. Alle PCR-Produkte hatten eine Länge von etwa 440 bp. Das entspricht der Länge der PCR-Produkte von *Desulfovibrio*-Reinkulturen, z. B. *Desulfovibrio vulgaris* DSM 644 (Bahn 1) und *Desulfovibrio desulfuricans* DSM 1926 (Bahn 9).

Zusätzlich wurde eine Southern Blot Analyse durchgeführt, um zu zeigen, daß die amplifizierten DNA-Fragmente tatsächlich [NiFe] Hydrogenase-Genfragmente von *Desulfovibrio* spp. waren. Als Gensonde wurde das DIG-markierte Oligonukleotid Hyd4f verwendet, dessen Zielsequenz innerhalb des amplifizierten Fragments liegt (Abbildung 3.1). Der anschließende Nachweis der Hybridmoleküle über das Chemilumineszenzsubstrat CSPD ist in Abbildung 3.5B gezeigt. Alle PCR-Produkte hybridisierten mit der spezifischen Sonde.

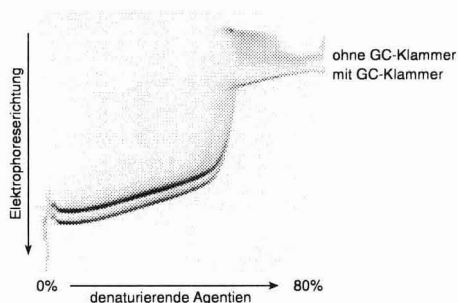


Abbildung 3.6: Perpendikuläre DGGE Analyse der PCR-Produkte von *Desulfovibrio vulgaris* DSM 644 nach Amplifikation des [NiFe] Hydrogenase-Gens mit dem Primerpaar Hyd1f-Hyd5r mit und ohne GC-Klammer. (Negatives Bild eines Ethidiumbromid-gefärbten Gels)

3.1.6 DGGE Analyse von [NiFe] Hydrogenase-Genfragmenten

Im Anschluß an eine erfolgreiche Amplifikation von DNA-Fragmenten kann man diese mittels denaturierender Gradientengelelektrophorese (DGGE) auftrennen [52]. Mit dieser Technik können DNA-Fragmente identischer Länge, aber mit einer unterschiedlichen Nukleotidsequenz separiert werden. Die Trennung erfolgt in einem Acrylamidgel, das einen linearen Gradienten an DNA-denaturierenden Agentien enthält. Sie basiert auf der Tatsache, daß doppelsträngige DNA-Fragmente, die sich in ihrer Basenzusammensetzung unterscheiden, ein unterschiedliches Schmelzverhalten aufweisen und die gelelektrophoretische Mobilität partiell denaturierter DNA-Moleküle im Gel abnimmt. Man erhält so charakteristische Elektrophoresemuster. Die DGGE Analyse sollte also die Auftrennung von verschiedenen [NiFe] Hydrogenase-Genfragmenten und damit eine Unterscheidung der *Desulfovibrio*-Stämme ermöglichen.

Zunächst mußte das Schmelzverhalten der amplifizierten [NiFe] Hydrogenase-Genfragmente bestimmt werden. Dazu verwendet man perpendikuläre denaturierende Gradientengele, in denen die Elektrophorese-richtung senkrecht zum Gradienten verläuft. Die DNA-Probe wird über die gesamte Breite des Gels aufgetragen. Abbildung 3.6 zeigt die Schmelzkurven von zwei [NiFe] Hydrogenase-PCR-Fragmenten, die aus DNA von *Desulfovibrio vulgaris* DSM 644 amplifiziert wurden, in einem perpendikulären denaturierenden Gradientengel. Das eine Fragment wurde mit den Primern Hyd1f-Hyd5r amplifiziert. Das andere Fragment wurde mit dem gleichen Primerpaar amplifiziert, wobei der "forward"-Primer jedoch zusätzlich am 5'-Ende eine 40 bp lange GC-reiche Sequenz enthält, die sogenannte GC-Klammer [195]. Es wurden jeweils 300 μ l PCR-Produkt aufgetragen. Das Gel enthielt einen Gradienten von 0% bis 80% denaturierender Agentien¹.

¹100% denaturierende Agentien sind definiert als 7 M Harnstoff und 40% (v/v) Formamid [133].

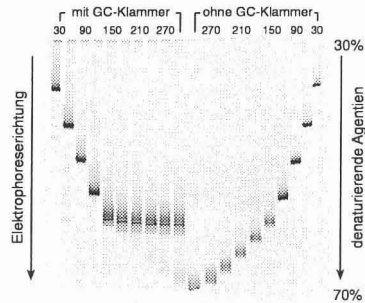


Abbildung 3.7: “Time travel” Experiment. DGGE Analyse von PCR-Fragmenten des [NiFe] Hydrogenase-Gens von *Desulfovibrio gigas* mit und ohne GC-Klammer. Die Proben wurden jeweils alle 30 Minuten auf das Gel geladen; die gesamte Laufzeit des Gels betrug 5 Stunden. Die Zahlen über den Bahnen geben die Elektrophoresedauer der Proben in Minuten an. (Negatives Bild eines Ethidiumbromid-gefärbten Gels)

In den Bereichen des Gels, wo geringe Konzentrationen an denaturierenden Agentien vorlagen (0% bis etwa 50%), hatten die DNA-Moleküle eine doppelsträngige helikale Konformation und wanderten entsprechend ihrer Größe in das Gel. Das um 40 bp längere DNA-Fragment mit GC-Klammer wanderte langsamer. Bei etwa 50% denaturierenden Agentien im Gel zeigten beide Fragmente eine deutlich verringerte Mobilität, da sie partiell denaturiert waren. Ohne GC-Klammer zeigte das Molekül jedoch kein stabiles Schmelzverhalten, es zerfiel in einzelsträngige DNA, die als diffuse “Wolke” im Gel zu erkennen war. Die GC-Klammer wurde an das PCR-Fragment angehängt, um ihm ein stabiles Schmelzverhalten zu geben [195]. Das Fragment mit GC-Klammer zeigte eine ähnliche Schmelzkurve wie das Fragment ohne GC-Klammer. Bei hohen Konzentrationen an denaturierenden Agentien im Gel (mehr als 50%) denaturierte das DNA-Molekül jedoch nicht vollständig, da die DNA-Stränge durch die GC-Klammer zusammengehalten wurden. Anhand solcher Schmelzkurven konnte der Bereich des Gradienten auf 30% bis 70% denaturierender Agentien eingegrenzt werden, um eine gute Auflösung von verschiedenen Sequenzen in parallelen denaturierenden Gradientengelen, in denen der Gradient parallel zur Elektrophoreserichtung verläuft, zu gewährleisten.

Die optimale Elektrophoresedauer wurde in einem sogenannten “time travel” Experiment in einem parallelen denaturierenden Gradientengel bestimmt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.7 dargestellt. PCR-Produkte von *Desulfovibrio gigas* mit und ohne GC-Klammer wurden in 30 Minuten-Intervallen über 5 Stunden auf ein Gel mit einem Gradienten von 30% bis 70% an denaturierenden Agentien aufgetragen. Nach etwa 120 Minuten Elektrophoresedauer begann das PCR-Produkt mit GC-Klammer zu denaturieren und stoppte nach 150 Minuten Elektrophoresedauer abrupt im Gel, während das PCR-Produkt ohne GC-Klammer mit zunehmender Elektrophoresedauer verlangsamt als diffuse Bande weiter in das Gel wanderte.

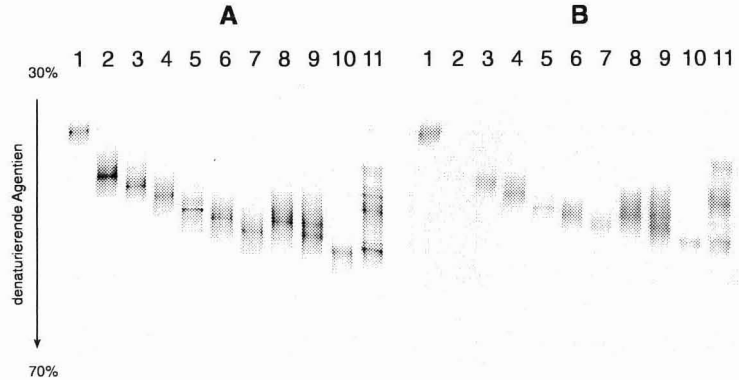


Abbildung 3.8: (A) DGGE Analyse der PCR-amplifizierten [NiFe] Hydrogenase-Genfragmente von Reinkulturen und Umweltproben. Aufgetragen wurden PCR-Produkte von *Desulfovibrio desulfuricans* DSM 1926 (Bahn 1), Isolat PIB2 (Bahn 2), *Desulfovibrio baculatus* (Bahn 3), *Desulfovibrio desulfuricans* DSM 1924 (Bahn 4), *Desulfovibrio vulgaris* DSM 644 (Bahn 5), *Desulfovibrio gigas* (Bahn 6), *Desulfovibrio sulfodismutans* (Bahn 7), PCR-Produkte von Bakteriengemeinschaften aus verschiedenen anaeroben Bioreaktoren A (Bahn 8), B (Bahn 9), C (Bahn 10) und PCR-Produkte von DNA aus einer mikrobiellen Matte (Bahn 11). (Negatives Bild eines Ethidiumbromid-gefärbten Gels) (B) Southern Blot Analyse der PCR-Produkte, hybridisiert mit der DIG-markierten Oligonukleotidsonde Hyd4f.

Alle folgenden DGGE Analysen wurden mit Hyd1f-Hyd5r-PCR-Produkten mit GC-Klammer in parallelen Gelen mit einem Gradienten von 30% bis 70% denaturierender Agentien für 4 Stunden durchgeführt, um eine gute Auftrennung von [NiFe] Hydrogenase-PCR-Produkten verschiedener *Desulfovibrio*-Stämme sicherzustellen.

Die Auflösung der DGGE Analyse von [NiFe] Hydrogenase-Genfragmenten wurde zunächst mit PCR-Produkten von verschiedenen *Desulfovibrio*-Reinkulturen bestimmt. Die Hyd1f-Hyd5r-PCR-Fragmente mit GC-Klammer von *Desulfovibrio sulfodismutans*, *Desulfovibrio gigas*, *Desulfovibrio vulgaris* DSM 644, *Desulfovibrio desulfuricans* DSM 1924, *Desulfovibrio baculatus*, Isolat PIB2 und *Desulfovibrio desulfuricans* DSM 1926 wurden in einem Gradientengel von 30% bis 70% denaturierender Agentien aufgetrennt. Wie Abbildung 3.8A zeigt, konnten die PCR-Produkte der verschiedenen Stämme auf diese Weise getrennt als Banden dargestellt werden. Das Elektrophoresemuster spiegelt die genetische Diversität der [NiFe] Hydrogenase-Gene von verschiedenen *Desulfovibrio*-Stämmen wider.

Zusätzlich wurden die PCR-Produkte von vier Umweltproben analysiert (vergleiche Abbildung 3.5). PCR-Produkte der Bakteriengemeinschaften aus den Bioreaktoren A und C zeigten je eine Bande im Gel (Abbildung 3.8, Bahn 8 und 10); PCR-Produkte der

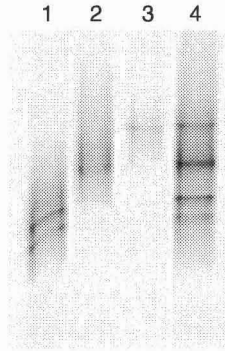


Abbildung 3.9: DGGE Analyse der amplifizierten [NiFe] Hydrogenase-Genfragmente aus 20 ng DNA von *Desulfovibrio vulgaris* DSM 644 und *Desulfovibrio gigas* (Bahn 1)², *Desulfovibrio baculatus* (Bahn 2) und *Desulfovibrio desulfuricans* DSM 1924 (Bahn 3), und PCR-Produkte aus einem Gemisch der DNA der Bakterienstämme (Bahn 4). (Negatives Bild eines Ethidiumbromid-gefärbten Gels)

DNA aus einem weiteren Bioreaktor B ergaben zwei Banden (Abbildung 3.8, Bahn 9). Die PCR-Produkte der DNA aus einer mikrobiellen Matte bestanden aus wenigstens fünf verschiedenen Nukleotidsequenzen, die als Banden im Gel erkennbar waren (Abbildung 3.8, Bahn 11). Ausgehend von der These, daß das [NiFe] Hydrogenase-Gen nur in einer Sequenz pro Bakterienstamm vorhanden ist, könnte jede Bande im Gel einem Bakterienstamm entsprechen.

Eine anschließende Southern Blot Analyse der PCR-Produkte ergab, daß alle DNA-Fragmente mit der spezifischen Oligonukleotidsonde Hyd4f hybridisierten; nur das PCR-Produkt des Isolats PIB2 zeigte kein Hybridisierungssignal (Abbildung 3.8B).

In weiteren Experimenten mit Reinkulturen konnte bestätigt werden, daß die Amplifikation von [NiFe] Hydrogenase-Genfragmenten und anschließende DGGE Analyse der PCR-Produkte tatsächlich die Diversität der in einer DNA-Präparation vorhandenen *Desulfovibrio*-Stämme wiedergibt. DNA von vier verschiedenen Stämmen wurde gemischt und in der PCR mit Primerpaar Hyd1fGC-Hyd5r amplifiziert. Die Auftrennung der PCR-Produkte zeigte vier Banden, die verglichen mit den Banden der PCR-Produkte der einzelnen Stämme die gleiche Position im Gel und etwa die gleiche Intensität nach Ethidiumbromid-Färbung aufwiesen (Abbildung 3.9).

²Die PCR-Produkte wurden gemischt und in einer Bahn aufgetrennt. Da diese Bahn am äußersten Rand des Gradientengels lag, sind die Banden nach außen heruntergezogen.

3.1.7 Agarosegelelektrophorese mit dem basensequenzspezifischen DNA-Liganden Bisbenzimid-PEG

Alternativ zu der DGGE Analyse von PCR-Fragmenten, zur Auftrennung von gleichlangen, aber in der Sequenz variierenden DNA-Fragmenten, wurde eine weitere Elektrophoresemethode etabliert. Damit können im Gegensatz zur DGGE auch längere DNA-Fragmente separiert werden. Die Auftrennung erfolgt nicht in Acrylamidgelen, sondern in Agarosegelen, die den DNA-Liganden Bisbenzimid enthalten, der an lange Ketten von Polyethylenglykoll (PEG) 6000 kovalent gebunden ist [132]. Der Farbstoff Bisbenzimid bindet bevorzugt an A+T-Sequenzmotive in doppelsträngiger DNA [131]. Das Beladen des DNA-Liganden mit langen PEG-Ketten bewirkt, daß AT-reiche Sequenzen im Gel zurückgehalten werden relativ zu Sequenzen, die einen geringen AT-Gehalt aufweisen [132]. Dies führt zu einer Trennung von Sequenzen mit unterschiedlicher Basenzusammensetzung. Das Prinzip dieser Methode ist seit mehr als 15 Jahren bekannt [132], wurde aber bisher nur zur Auftrennung genomischer DNA in zweidimensionalen Gelen verwendet [102].

Mittels Bisbenzimid-PEG-Agarosegelelektrophorese wurden PCR-Fragmente des [NiFe] Hydrogenase-Gens von verschiedenen *Desulfovibrio*-Stämmen untersucht. Die DNA-Fragmente wurden parallel in Agarosegelen mit und ohne DNA-Liganden aufgetrennt. In Abbildung 3.10 sind die etwa 440 bp langen, mit Primerpaar Hyd1f-Hyd5r amplifizierten PCR-Produkte dargestellt. Deutlich ist zu erkennen, daß in Gelen ohne Bisbenzimid-PEG eine Trennung der PCR-Produkte verschiedener Stämme nicht möglich war (Abbildung 3.10A), da die Auftrennung entsprechend der Größe der DNA-Fragmente erfolgte. Dagegen war in Gelen, die den DNA-Liganden enthielten, eine Unterscheidung der PCR-Produkte verschiedener Stämme möglich (Abbildung 3.10B).

In einem "time travel" Experiment wurde der Effekt der Elektrophoresedauer auf die Auftrennung untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.11 dargestellt. DNA-Fragmente von *Desulfovibrio gigas* und *Desulfovibrio baculatus*, mit Primerpaar Hyd1f-Hyd5r amplifiziert, wurden in 30 Minuten-Intervallen über 3,5 Stunden auf ein 3,5% (w/v) Agarosegel aufgetragen, das den basensequenzspezifischen DNA-Liganden Bisbenzimid-PEG enthielt. Zunächst wanderten die Fragmente als eine Bande in das Gel ein. Bereits nach einer Stunde Elektrophorese waren die beiden DNA-Fragmente voneinander getrennt. Je länger die Elektrophorese fortgesetzt wurde, desto besser wurde die Auftrennung. Die Elektrophoresedauer wird begrenzt durch die Länge des verwendeten Gels.

Abbildung 3.12 zeigt die Agarosegelelektrophorese mit basensequenzspezifischem DNA-Liganden von PCR-Produkten aus Reinkulturen und auch aus Umweltproben (vergleiche Abbildung 3.8), die mit Primerpaar Hyd1f-Hyd5r amplifiziert wurden. In Bahn 1 wurde ein Gemisch der PCR-Produkte von vier verschiedenen *Desulfovibrio*-Stämmen aufgetragen, in Bahn 6 ein Gemisch von drei Stämmen. Die PCR-Produkte der verwendeten Reinkulturen konnten größtenteils getrennt dargestellt werden. Die PCR-Produkte von *Desulfovibrio sulfodismutans* und PIB2 zeigten allerdings eine gemeinsame Bande im Gel, die auch etwa auf der gleichen Höhe lag wie das amplifizierte

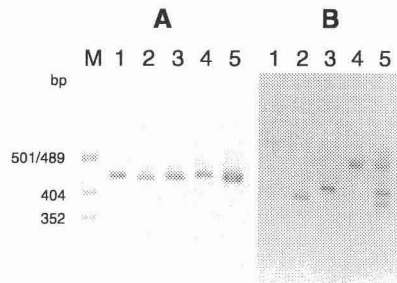


Abbildung 3.10: (A) Analyse der mit Primerpaar Hyd1f-Hyd5r amplifizierten [NiFe] Hydrogenase-Genfragmente (etwa 440 bp) von *Desulfovibrio desulfuricans* DSM 1926 (Bahn 1), *Desulfovibrio vulgaris* DSM 644 (Bahn 2), *Desulfovibrio gigas* (Bahn 3), *Desulfovibrio baculatus* (Bahn 4) und einem äquimolaren Gemisch der PCR-Fragmente (Bahn 5) in einem 3,5% (w/v) Agarosegel. Bahn M zeigt den DNA-Größenstandard pUC18 HpaII. (B) Analyse derselben DNA-Fragmente in einem 3,5% (w/v) Agarosegel, das den basensequenzspezifischen DNA-Liganden Bisbenzimid-PEG enthielt. (Negative Bilder von Ethidiumbromid-gefärbten Gelen)

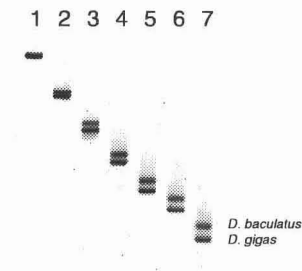


Abbildung 3.11: "Time travel" Experiment. Analyse der mit Primerpaar Hyd1f-Hyd5r amplifizierten [NiFe] Hydrogenase-Genfragmente von *Desulfovibrio gigas* und *Desulfovibrio baculatus* in einem 3,5% (w/v) Agarosegel, das den basensequenzspezifischen DNA-Liganden Bisbenzimid-PEG enthielt. Die Proben wurden alle 30 Minuten auf das Gel geladen (Bahn 1-7); Bahn 1 entspricht einer Elektrophoresedauer von 30 Minuten, Bahn 7 entspricht einer Elektrophoresedauer von 3,5 Stunden. Die Gelelektrophorese wurde von Dr. Hermann Rüggeberg (Hanse Analytik GmbH) durchgeführt. (Negatives Bild eines Ethidiumbromid-gefärbten Gels)

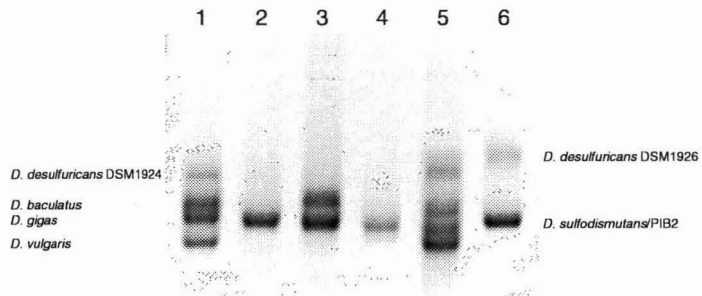


Abbildung 3.12: Analyse der PCR-amplifizierten [NiFe] Hydrogenase-Genfragmente (etwa 440bp) von Reinkulturen und Umweltproben in einem 3,5% (w/v) Agarosegel, das Bisbenzimid-PEG enthielt. Aufgetragen wurde ein Gemisch der PCR-Produkte von *Desulfovibrio desulfuricans* DSM 1924, *Desulfovibrio baculatus*, *Desulfovibrio vulgaris* DSM 644, *Desulfovibrio gigas* (Bahn 1), die PCR-Produkte von Bakteriengemeinschaften aus verschiedenen anaeroben Bioreaktoren A (Bahn 2), B (Bahn 3) und C (Bahn 4), die PCR-Produkte aus DNA einer mikrobiellen Matte (Bahn 5) sowie ein Gemisch der PCR-Produkte von *Desulfovibrio desulfuricans* DSM 1926, *Desulfovibrio sulfodismutans*, Isolat PIB2 (Bahn 6). (Negatives Bild eines Ethidiumbromid-gefärbten Gels)

[NiFe] Hydrogenase-Genfragment von *Desulfovibrio gigas*. Die Auftrennung der PCR-Produkte aus Umweltproben spiegelte das Ergebnis der DGGE Analyse wider: Eine bzw. zwei Banden resultierten aus den PCR-Produkten der Bakteriengemeinschaften aus den Bioreaktoren A, B, C (Bahn 2, 3 und 4) und fünf Banden aus den PCR-Produkten der DNA einer mikrobiellen Matte (Bahn 5). Die PCR-Produkte der Bioreaktoren A und C waren in denaturierenden Gradientengelen deutlich unterschiedlich positioniert (Abbildung 3.8A) und ließen auf zwei unterschiedliche Bakterienstämme schließen. In der Bisbenzimid-PEG-Agarosegelelektrophorese wurden die PCR-Produkte kaum sichtbar voneinander getrennt dargestellt. Eine bessere Auflösung könnte diese Methode möglicherweise durch die Separation in längeren Gelen bieten, die eine Ausdehnung der Elektrophoresedauer erlauben.

Die diffuse Erscheinung der Banden im Gel ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß der Farbstoff mit zunehmender Elektrophoresezeit in den Laufpuffer diffundiert. Dies könnte in weiteren Experimenten vermieden werden, in dem die Gele nicht mehr, wie normalerweise üblich, mit Puffer überschiedet werden. Die Verwendung einer Elektrophoresekammer nach Studier [207] bietet sich für diesen Zweck an. Auch der Effekt, daß der Farbstoff entgegen der Elektrophoreserichtung aus dem Gel wandert, würde dadurch minimiert.

Neben den oben dargestellten Ergebnissen mit dem 440 bp langen Hyd1f-Hyd5r-Fragment des [NiFe] Hydrogenase-Gens wurden mit dieser Methode auch größere PCR-Fragmente untersucht. Die Auftrennung erfolgte ebenfalls parallel in Agarosegelen mit und ohne DNA-Liganden. In Abbildung 3.13 sind die etwa 1440 bp langen, mit Pri-

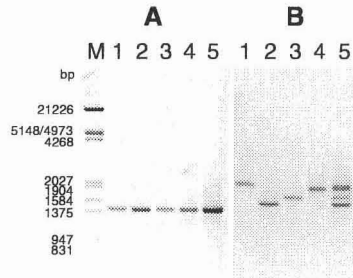


Abbildung 3.13: (A) Analyse der mit Primerpaar Hyd1f-Hyd7r amplifizierten [NiFe] Hydrogenase-Genfragmente (etwa 1440 bp) von *Desulfovibrio desulfuricans* DSM 1926 (Bahn 1), *Desulfovibrio vulgaris* DSM 644 (Bahn 2), *Desulfovibrio gigas* (Bahn 3), *Desulfovibrio baculatus* (Bahn 4) und einem äquimolaren Gemisch der PCR-Fragmente (Bahn 5) in einem 2% (w/v) Agarosegel. Bahn M zeigt den DNA-Größenstandard λ HindIII/EcoRI. (B) Analyse derselben DNA-Fragmente in einem 2% (w/v) Agarosegel, das den basensequenzspezifischen DNA-Liganden Bisbenzimid-PEG enthält. (Negative Bilder von Ethidiumbromid-gefärbten Gelen)

merpaar Hyd1f-Hyd7r amplifizierten PCR-Produkte von verschiedenen *Desulfovibrio*-Stämmen dargestellt.

Wiederum ist leicht zu festzustellen, daß in Gelen mit Bisbenzimid-PEG eine deutliche Trennung der PCR-Produkte verschiedener Stämme möglich war (Abbildung 3.13B), nicht jedoch in Gelen ohne den Farbstoff (Abbildung 3.13A). Eine bessere Auftrennung der Fragmente von *Desulfovibrio desulfuricans* und *Desulfovibrio baculatus* kann durch eine Ausdehnung der Elektrophoresezeit in längeren Gelen erreicht werden. Erste Experimente zur Optimierung des Gelsystems zur Auftrennung der Hyd1f-Hyd7r-PCR-Produkte verschiedener *Desulfovibrio*-Stämme sind vielversprechend. Dies gilt auch für die Auftrennung von anderen Genfragmenten, z. B. die etwa 1500 bp langen 16S rRNA-Gene.

An dieser Stelle sei bemerkt, daß auch Primerpaar Hyd1f-Hyd7r relativ spezifisch ist (Tabelle 3.2) und zum Nachweis von *Desulfovibrio* spp. durchaus verwendet werden kann. Aus den oben beschriebenen Proben der anaeroben Bioreaktoren konnten mit Primerpaar Hyd1f-Hyd7r ebenfalls [NiFe] Hydrogenase-Genfragmente amplifiziert werden.

3.2 Nachweis von Genexpression in *Desulfovibrio* spp.

Genexpression in *Desulfovibrio* spp. wurde anhand des [NiFe] Hydrogenase-Gens über die Amplifikation von mRNA-Sequenzen durch die Kombination von cDNA-Synthese und PCR (RT-PCR) nachgewiesen.

3.2.1 Expression des [NiFe] Hydrogenase-Gens in Reinkulturen

Die Expression des [NiFe] Hydrogenase-Gens wurde zunächst in Reinkulturen untersucht. Die Annahme, daß Bakterien, die das Gen exprimieren, metabolisch aktiv sind, und Bakterien, in denen die [NiFe] Hydrogenase-mRNA nicht nachweisbar ist, inaktiv sind, wurde durch Wachstumsversuche in statischen Kulturen überprüft.

Verschiedene *Desulfovibrio*-Stämme wurden mit 20 mM Laktat als Kohlenstoffquelle in Grundmedien für sulfatreduzierende Bakterien angezogen. Das Bakterienwachstum, d. h. die Zunahme der OD bei 660 nm, und die Sulfidproduktion wurden verfolgt, bis sich die Kulturen in der stationären Wachstumsphase befanden. Alle 5 Stunden wurden Zellen geerntet, aus denen Gesamt-RNA isoliert wurde. Um sicherzustellen, daß die labile RNA während der Extraktion nicht abgebaut worden war, wurden 0,5–1 µg der Gesamt-RNA gelelektrophoretisch aufgetrennt. Eine klare Auftrennung der ribosomalen RNA-Banden im Gel ließ auf eine gute, weitgehend intakte RNA-Präparation schließen (vergleiche Abbildungen 3.19 und 3.24). Mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase wurde die RNA in cDNA umgeschrieben (Erststrangsynthese). Als Primer wurde dafür ein Gemisch aus Hexanukleotiden eingesetzt. Diese sogenannten "random primer" transkribieren die gesamte RNA in cDNA, da sie unspezifisch und zufällig an die DNA binden. [NiFe] Hydrogenase-mRNA-Sequenzen wurden aus der cDNA mit Primerpaar Hyd1f-Hyd5r in einer PCR amplifiziert. PCR-Produkte wurden in 2% (w/v) Agarosegelen analysiert.

Die Abbildungen 3.14 und 3.15 dokumentieren die Ergebnisse von zwei unabhängigen Versuchen mit den Stämmen *Desulfovibrio baculatus* und *Desulfovibrio desulfuricans* DSM 1926 bzw. *Desulfovibrio baculatus* und *Desulfovibrio vulgaris* DSM 644. Neben den Graphen, in denen die Zunahme der OD bei 660 nm und der Sulfidproduktion während des Wachstums dargestellt ist, ist die Analyse der PCR-Produkte von Zellen, die zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet wurden, gezeigt. Die cDNA-Synthese wurde mit 0,5 µg (Abbildung 3.14) bzw. mit 1 µg Gesamt-RNA (Abbildung 3.15) durchgeführt. 1/4 des Reaktionsvolumen wurde anschließend in der PCR eingesetzt.

Die Kurven des Bakterienwachstum und der Sulfidproduktion zeigen den gleichen Verlauf über die Zeit. Nach etwa 35 Stunden befanden sich die Kulturen in der frühen stationären Wachstumsphase. Nur die Kulturen von *Desulfovibrio vulgaris* DSM 644 erreichten erst nach mehr als 65 Stunden die stationäre Phase; der letzte Meßpunkt,

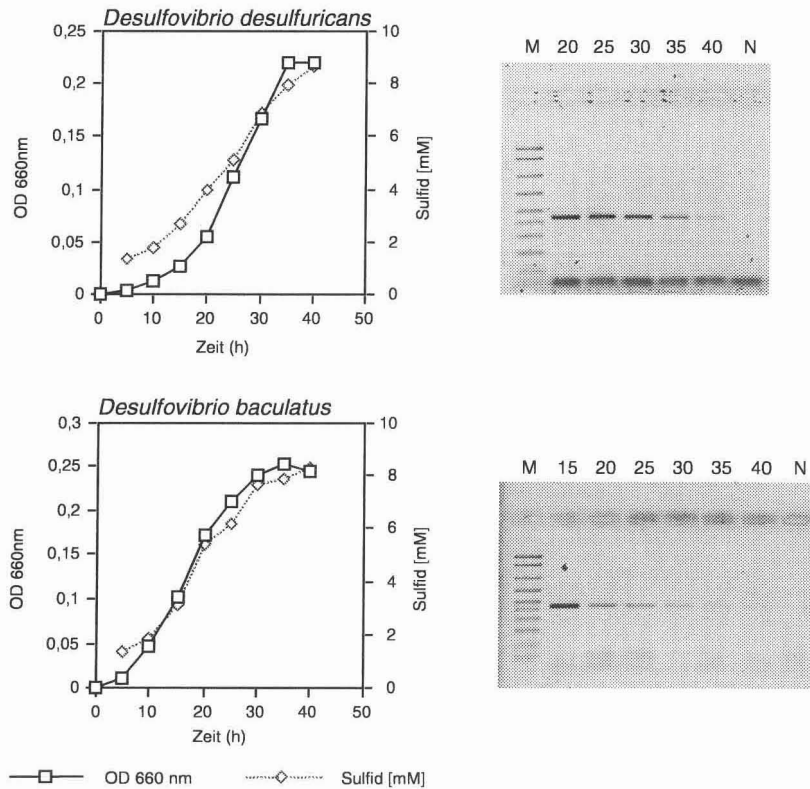


Abbildung 3.14: Nachweis der [NiFe] Hydrogenase-mRNA während des Wachstums von *Desulfovibrio desulfuricans* DSM 1926 (oben) und *Desulfovibrio baculatus* (unten) in statischer Kultur. Links: Bakterienwachstum als Zunahme der OD bei 660 nm und Sulfidproduktion. Rechts: Analyse der PCR-Produkte nach Amplifikation von [NiFe] Hydrogenase-mRNA-Sequenzen in 2% (w/v) TBE-Agarosegelen. Die cDNA-Synthese wurde mit 0,5 μ g Gesamt-RNA durchgeführt; 1/4 des Reaktionsvolumens wurde in der PCR eingesetzt. Die Zahlen über den Bahnen geben den Zeitpunkt der Probenahme in Stunden an. Bahn M zeigt einen DNA-Größenmarker mit 2000, 1500, 1000, 700, 500, 400, 300, 200, 100 und 50 bp langen Fragmenten (Bio-Rad), Bahn N die negative Kontrolle der PCR ohne DNA. (Negative Bilder von Ethidiumbromid-gefärbten Gelen)

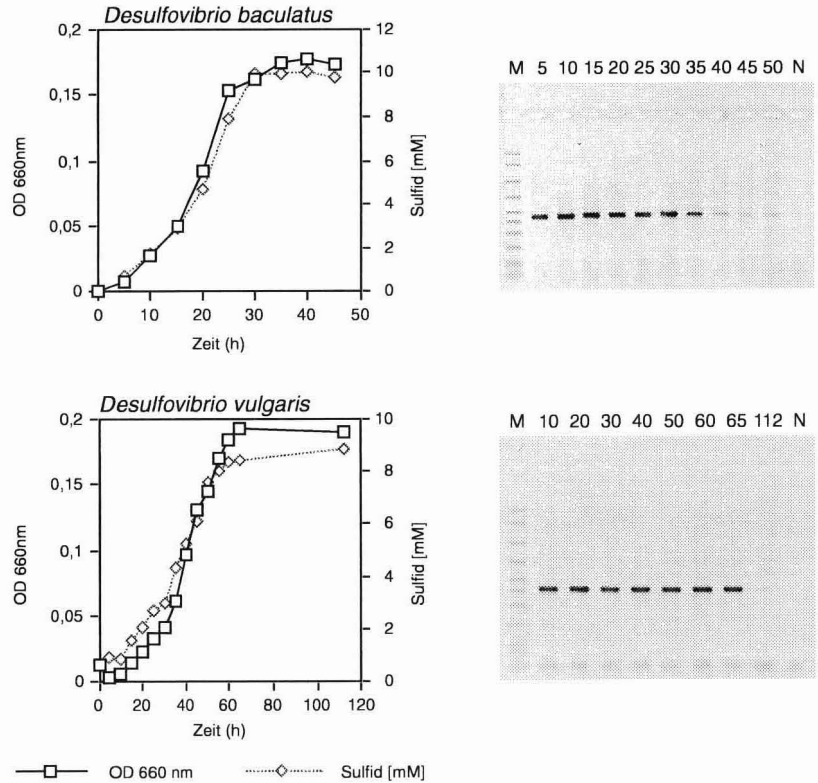


Abbildung 3.15: Nachweis der [NiFe] Hydrogenase-mRNA während des Wachstums von *Desulfovibrio baculatus* (oben) und *Desulfovibrio vulgaris* DSM 644 (unten) in statischer Kultur. Links: Bakterienwachstum als Zunahme der OD bei 660 nm und Sulfidproduktion. Rechts: Analyse der PCR-Produkte nach Amplifikation von [NiFe] Hydrogenase-mRNA-Sequenzen in 2% (w/v) TBE-Agarosegelen. Die cDNA-Synthese wurde mit 1 µg Gesamt-RNA durchgeführt; 1/4 des Reaktionsvolumens wurde in der PCR eingesetzt. Die Zahlen über den Bahnen geben den Zeitpunkt der Probennahme in Stunden an. Bahn M zeigt einen DNA-Größenmarker mit 2000, 1500, 1000, 700, 500, 400, 300, 200, 100 und 50 bp langen Fragmenten (Bio-Rad), Bahn N die negative Kontrolle der PCR ohne DNA. (Negative Bilder von Ethidiumbromid-gefärbten Gelen)

112 Stunden nach der Animpfung, lag deutlich am Ende des Bakterienwachstums. In der exponentiellen Wachstumsphase wurde das [NiFe] Hydrogenase-Gen exprimiert; PCR-Produkte von [NiFe] Hydrogenase-mRNA-Sequenzen waren im Gel sichtbar. Befanden sich die Zellen jedoch in der stationären Wachstumsphase, nahm der Hydrogenase-mRNA-Spiegel im Verhältnis zur ribosomalen RNA drastisch ab und lag zum Teil unterhalb der Nachweisgrenze.

Die Nachweisgrenze hängt natürlich ab von der Menge an Gesamt-RNA, die für die cDNA-Synthese verwendet wird, der Menge an cDNA, die für die nachfolgende PCR eingesetzt wird, und der Menge an PCR-Produkten, die gelelektrophoretisch analysiert werden. Wurde z. B. im zweiten Versuch nur 1/20 des Reaktionsvolumens der cDNA-Synthese in der PCR eingesetzt, war die Intensität der angefärbten Banden, wie erwartet, geringer. In Kulturen von *Desulfovibrio baculatus* war dann bereits nach 35 Stunden das PCR-Produkt kaum noch sichtbar im Gel (Ergebnisse nicht gezeigt).

Im zweiten Versuch mit *Desulfovibrio baculatus* und *Desulfovibrio vulgaris* DSM 644 wurde auch die [NiFe] Hydrogenase in Proteinextrakten im Verlauf des Wachstums der Kulturen durch Western Blots nachgewiesen. Es wurde ein Antikörper benutzt, der gegen die [NiFe] Hydrogenase von *Desulfovibrio gigas* gerichtet ist und mit den [NiFe] Hydrogenasen der verwendeten Bakterienstämme kreuzreagierte (siehe Abschnitt 3.1.4). In Abbildung 3.16 ist die gelelektrophoretische Auftrennung der verwendeten Proteinextrakte (2 µg pro Bahn) nach Silberfärbung und die Detektion der [NiFe] Hydrogenase nach der Immunreaktion mit Anti-*Desulfovibrio gigas* [NiFe] Hydrogenase dargestellt.

Im Gegensatz zum Nachweis der [NiFe] Hydrogenase-mRNA-Sequenzen zeigte der Nachweis des Proteins während des Wachstums keine Unterschiede. Der Spiegel an [NiFe] Hydrogenase im Verhältnis zum Gesamt-Proteingehalt erschien in allen Kulturen konstant. Auch in der stationären Phase der Kulturen, in denen keine [NiFe] Hydrogenase-mRNA nachgewiesen wurde, war die [NiFe] Hydrogenase in derselben Konzentration wie zu Beginn des Wachstums vorhanden, gemessen an der Intensität der angefärbten Banden. Ob die Zellen in der stationären Wachstumsphase noch eine aktive [NiFe] Hydrogenase enthielten, kann anhand dieser Ergebnisse nicht festgestellt werden. Mit der gewählten Nachweismethode kann nicht zwischen einem aktiven und einem inaktiven Enzym unterschieden werden.

Im zweiten Versuch wurde außerdem der Protein-, DNA- und RNA-Gehalt der Kulturen sowie die Zellzahl bestimmt. Diese Parameter beschreiben den metabolischen Zustand der Zellen im Verlauf der Zeit [62]. In Abbildung 3.17 ist die Zellzahl pro ml und die Menge an DNA, RNA und Proteinen berechnet auf eine Zelle über die Zeit graphisch dargestellt. Wie zu erwarten, war der DNA-Gehalt pro Zelle relativ konstant. Der RNA-Gehalt pro Zelle war zu Beginn des Wachstums zunächst hoch und nahm mit der Zeit und zunehmender Zellzahl kontinuierlich ab. Befanden sich die Zellen in der stationären Wachstumsphase, blieb der RNA-Gehalt pro Zelle konstant. Im Verlauf des Wachstums wurde der RNA-Gehalt pro Zelle um etwa 50% reduziert. Diese Beobachtung läßt sich auf Schwankungen der Konzentration an ribosomaler RNA zurückführen, da Gesamt-RNA hauptsächlich aus ribosomaler RNA besteht und der Anteil an mRNA nur etwa 3% beträgt [3]. Messungen des rRNA-Gehaltes pro Zelle

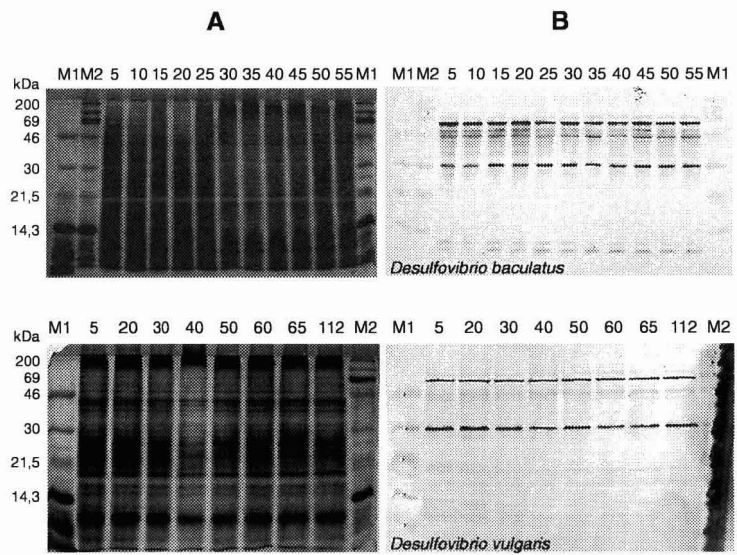


Abbildung 3.16: Nachweis der [NiFe] Hydrogenase während des Wachstums von *Desulfovibrio baculatus* (oben) und *Desulfovibrio vulgaris* DSM 644 (unten) in statischer Kultur. (A) SDS-PAGE der Proteinextrakte nach Silberfärbung. Die Zahlen über den Bahnen geben den Zeitpunkt der Probennahme in Stunden an. Bahn M1 zeigt einen farbigen Proteingrößenmarker mit 46, 30, 21,5, 14,3, 6,5, 3,4 und 2,35 kDa (RPN 755, Amersham), Bahn M2 mit 200, 97,4, 69, 46, 30, 21,5, 14,3 kDa (RPN 756, Amersham). (B) Immunoblot mit Anti-*Desulfovibrio gigas* [NiFe] Hydrogenase.

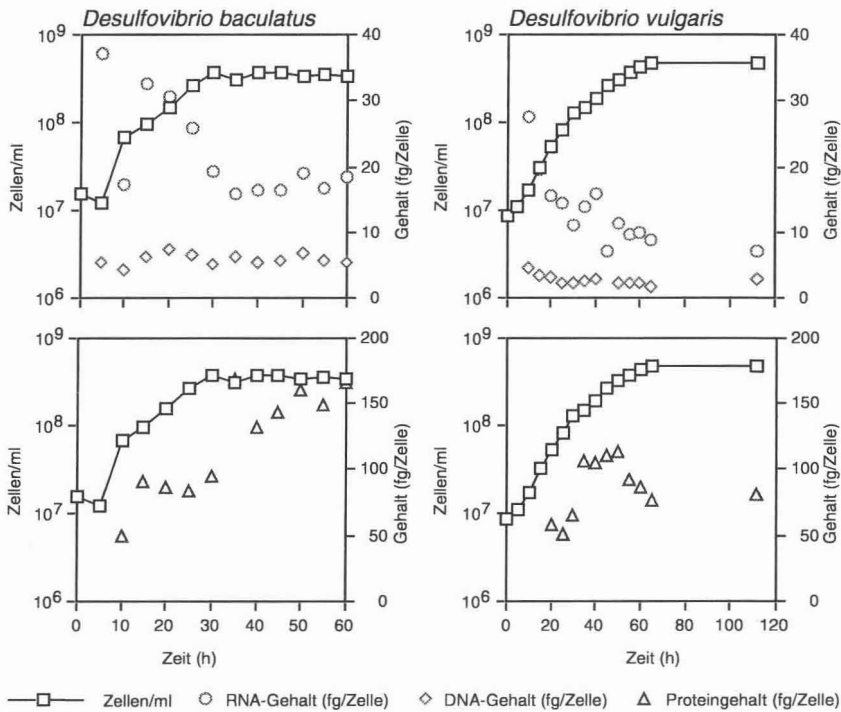


Abbildung 3.17: DNA-, RNA- und Proteingehalt pro Zelle während des Wachstums von *Desulfovibrio baculatus* (links) und *Desulfovibrio vulgaris* DSM 644 (rechts) in statischer Kultur. Das Wachstum wurde als Zunahme der Zellzahl gemessen und halb-logarithmisch gegen die Zeit aufgetragen. Die Zellzahlen wurden von Dr. Berit Cleven bestimmt.

Tabelle 3.3: Expression des [NiFe] Hydrogenase-Gens in *Desulfovibrio* spp. unter verschiedenen Wachstumsbedingungen

Bakterienstamm	Medium ^a	
	Laktat	Wasserstoff/Acetat
<i>Desulfovibrio baculatus</i>	+	+
<i>Desulfovibrio gigas</i>	+	+
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> DSM 1924	+	nb
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> DSM 1926	+	- ^b
<i>Desulfovibrio vulgaris</i> DSM 644	+	+
<i>Desulfovibrio vulgaris</i> DSM 1744	+	+

^a+, PCR-Produkt nach RT-PCR; nb, nicht bestimmt^bkein Wachstum

durch *in situ* Hybridisierungen bestätigen diese Korrelation des rRNA-Gehaltes mit dem metabolischen Zustand von Zellen [59, 109, 159, 184]. Der Proteingehalt pro Zelle war zu Beginn des Wachstums niedrig und stieg mit der Zeit um etwa 50% an. Kulturen von *Desulfovibrio baculatus* zeigten eine Zunahme des Proteingehaltes pro Zelle bis die Zellen die stationäre Wachstumsphase erreichten. In dieser Phase blieb der Proteingehalt pro Zelle konstant. Kulturen von *Desulfovibrio vulgaris* zeigten einen hohen Proteingehalt pro Zelle im Übergang der Kulturen von der exponentiellen zur stationären Wachstumsphase. Im Gegensatz zu den Kulturen von *Desulfovibrio baculatus* sank der Proteingehalt pro Zelle in der stationären Phase wieder.

Die Bezugsgröße für den Nachweis von [NiFe] Hydrogenase-mRNA war Gesamt-RNA, für das Protein selbst Gesamt-Protein. Bezieht man die oben dargestellten Ergebnisse bezüglich der Konzentrationen an RNA und Protein pro Zelle im Verlauf des Wachstums bei der Interpretation des Nachweises spezifischer mRNA und Proteine mit ein, bedeutet dies, daß eine konstante Menge an RNA bzw. Protein aus unterschiedlich vielen Zellen resultierte. Die [NiFe] Hydrogenase-mRNA nahm im Verhältnis zur ribosomalen RNA im Verlauf des Wachstums ab, wobei parallel eine Abnahme des rRNA-Gehaltes pro Zelle stattfand. Der Anteil an [NiFe] Hydrogenase im Gesamt-Proteinextrakt war konstant, wobei der Proteingehalt pro Zelle zunahm. Die Anzahl der Zellen, die für die eingesetzte konstante Menge an RNA bzw. Proteinen erforderlich waren, variierte maximal etwa um den Faktor 2 (siehe Abbildung 3.17).

Weiterhin wurde untersucht, ob *Desulfovibrio* spp. unter verschiedenen Wachstumsbedingungen, bei denen Sulfatreduktion stattfindet, das [NiFe] Hydrogenase-Gen exprimieren. Die Kulturen wurden in Grundmedium für sulfatreduzierende Bakterien mit 20 mM Laktat angezogen und in Grundmedium, das als Elektronendonator Wasserstoff und als Kohlenstoffquelle 2 mM Acetat enthielt. Exponentiell wachsende Zellen wurden geerntet und die [NiFe] Hydrogenase-mRNA mit Hilfe der RT-PCR nachgewiesen. 1 µg Gesamt-RNA wurden in einem Volumen von 20 µl in cDNA umgeschrieben und 5 µl dieses Ansatzes in der PCR mit Primerpaar Hyd1f-Hyd5r amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden in einem Agarosegel analysiert. Die Ergebnisse dieser Experimente

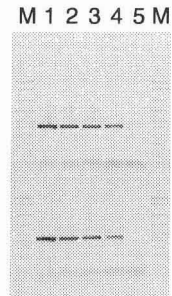


Abbildung 3.18: Analyse der PCR-Produkte aus 50 ng (Bahn 1), 10 ng (Bahn 2), 5 ng (Bahn 3), 1 ng (Bahn 4) und 0 ng (Bahn 5) genomischer DNA von *Desulfovibrio vulgaris* DSM 644 (oben). Analyse der PCR-Produkte aus 50 ng (Bahn 1), 10 ng (Bahn 2), 5 ng (Bahn 3), 1 ng (Bahn 4), 0 ng (Bahn 5) genomischer DNA von *Desulfovibrio vulgaris* DSM 644, der 1 μ g anderer DNA beigemischt worden war (unten). Bahn M zeigt einen DNA-Größenmarker mit 2000, 1500, 1000, 700, 500, 400, 300, 200, 100 und 50 bp langen Fragmenten (Bio-Rad). (Negatives Bild eines Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegels)

sind in Tabelle 3.3 zusammengefaßt.

Alle untersuchten *Desulfovibrio*-Stämme exprimierten das [NiFe] Hydrogenase-Gen, wenn Laktat als Elektronendonator verwendet wurde. *Desulfovibrio baculatus*, *Desulfovibrio gigas*, *Desulfovibrio vulgaris* DSM 644 und DSM 1744 exprimierten das [NiFe] Hydrogenase-Gen auch, wenn Wasserstoff die einzige Energiequelle war. Der Stamm *Desulfovibrio desulfuricans* DSM 1926 hingegen war nicht in der Lage war, auf diesem Medium zu wachsen. Devereux et al. [41] konnten ebenfalls kein Wachstum dieses Stammes mit Wasserstoff erzielen.

3.2.2 Sensitivität der Amplifikation von [NiFe] Hydrogenase-Sequenzen

Die Sensitivität des Nachweises von [NiFe] Hydrogenase-Genfragmenten bzw. von [NiFe] Hydrogenase-mRNA-Sequenzen über die PCR wurde anhand von *Desulfovibrio*-Reinkulturen untersucht.

Verschiedene Konzentrationen an genomischer DNA von *Desulfovibrio vulgaris* DSM 644 wurden in einer 50 μ l-PCR mit Primerpaar Hyd1f-Hyd5r amplifiziert. In einem zweiten Ansatz wurden die gleichen DNA-Mengen mit insgesamt 1 μ g DNA von sulfat-reduzierenden Bakterien der Stämme *Desulfobacter curvatus*, *Desulfobacterium vacuolatum*, *Desulfobotulus sapovorans* und *Desulfobulbus* sp., die keine nachweisbaren [NiFe] Hydrogenase-Gene enthalten, vermischt. 5 μ l dieser PCR-Ansätze wurden in einem Agarosegel aufgetrennt (Abbildung 3.18).

Es konnte kein Unterschied in der Effizienz der Amplifikation des [NiFe] Hydrogenase-Gens von Proben mit reiner *Desulfovibrio*-DNA und Proben, denen 1 μg anderer DNA beigemischt worden war, beobachtet werden. PCR-Produkte wurden aus 50 ng, 10 ng, 5 ng und 1 ng genomischer DNA gewonnen. Das [NiFe] Hydrogenase-Gen kann demnach aus 1 μg genomischer DNA amplifiziert werden, auch wenn der Anteil an DNA von *Desulfovibrio* spp. nur 0,1% beträgt.

Ähnliche Experimente mit dem Stamm *Desulfovibrio desulfuricans* DSM 1926 bestätigten das mit *Desulfovibrio vulgaris* DSM 644 erhaltene Ergebnis. Eine anschließende Hybridisierung der PCR-Produkte von *Desulfovibrio vulgaris* DSM 644 und *Desulfovibrio desulfuricans* DSM 1926 im Southern Blot mit der DIG-markierten Oligonukleotidsonde Hyd4f erhöhte die Nachweisgrenze (Ergebnisse nicht gezeigt).

Um die Sensitivität der RT-PCR zu bestimmen, wurde Gesamt-RNA aus exponentiell wachsenden Zellen von *Desulfovibrio vulgaris* DSM 644 isoliert, die mit 20 mM Laktat angezogen worden waren. In einer 20 μl -Reaktion wurden 1 μg , 100 ng und 10 ng dieser RNA in cDNA umgeschrieben. Je 2,5 μl dieser Ansätze wurden in einer 50 μl -PCR mit Primerpaar Hyd1f-Hyd5r amplifiziert. In allen Ansätzen waren PCR-Produkte nach Auftrennung von 5 μl PCR-Ansatz in einem Agarosegel sichtbar (Ergebnisse nicht gezeigt). Das bedeutet, nur 1,25 ng Gesamt-RNA, die in cDNA umgeschrieben wurde, ist ausreichend, um [NiFe] Hydrogenase-mRNA unter den oben genannten Bedingungen nachzuweisen.

3.2.3 Expression des [NiFe] Hydrogenase-Gens in Umweltproben

Im nächsten Schritt wurden natürliche Bakterienpopulationen ausgewählt, um die Diversität und Aktivität von *Desulfovibrio*-Stämmen unter Verwendung des entwickelten Nachweissystems zu bestimmen. Es wurde also sowohl die DNA, d. h. die vorhandenen Stämme, als auch die RNA und somit die Stämme, die das [NiFe] Hydrogenase-Gen exprimieren, also aktiv sind, untersucht. Hierzu wurden Proben von zwei verschiedenen experimentellen Bioreaktoren (TU Delft, Holland) verwendet.

3.2.3.1 Denitrifizierender Bioreaktor

Es wurde eine Bakteriengemeinschaft aus einem anaeroben, denitrifizierenden Bioreaktor untersucht, der von Mulder et al. [130] beschrieben worden ist. Hybridisierungen mit 16S rRNA-gerichteten Oligonukleotidsonden hatten das Vorhandensein sulfat-reduzierender Bakterien gezeigt (Muyzer und Hottenträger, persönliche Mitteilung). Auch konnte in Vorversuchen das [NiFe] Hydrogenase-Gen von *Desulfovibrio* spp. aus DNA amplifiziert werden, die aus Proben des Bioreaktors isoliert worden war.

Als Ausgangsmaterial dienten Schlammproben, die direkt aus dem Bioreaktor entnommen wurden, und Schlammproben, die nach der Entnahme über Nacht mit ver-

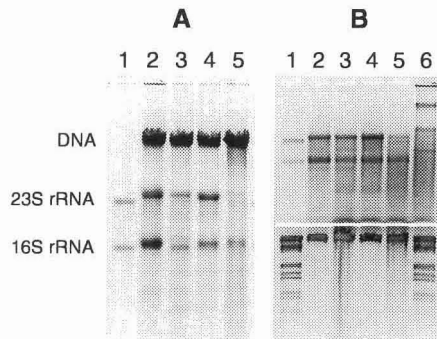


Abbildung 3.19: Gelelektrophoretische Analyse von Nukleinsäuren, isoliert aus Schlammproben von einem denitrifizierenden, experimentellen Bioreaktor (Bahn 2) sowie Proben nach Inkubation mit Wasserstoff (Bahn 3), ohne Substrat (Bahn 4) und mit Sauerstoff (Bahn 5) in einem 2% (w/v) MOPS-Agarosegel. (A) Je 2,5 μ l der 500 μ l-Nukleinsäurepräparationen aus etwa 10 g Probe wurden aufgetragen (etwa 5 μ g). Bahn 1 enthielt 1 μ g Gesamt-RNA von *Desulfovibrio baculatus*. (B) RNA- (oben) und DNA-Präparationen (unten) nach dem enzymatischen Abbau mit DNase bzw. RNase. Bahn 1 (oben) enthielt 500 ng Gesamt-RNA von *Desulfovibrio baculatus*, Bahn 6 (oben) enthielt 1,1 μ g DNA/RNA des Eukaryoten *Physarum polycephalum*. Bahn 1 und 6 (unten) zeigen den DNA-Größenmarker λ HindIII/EcoRI (21226, 5148/4973, 4268, 2027, 1904, 1584, 1375, 947 und 831 bp). (Negative Bilder von Ethidiumbromid-gefärbten Gelen)

schiedenen Substraten bzw. ohne Substrat als Kontrolle inkubiert wurden. Wasserstoff wurde verwendet, um das Wachstum von *Desulfovibrio*-Stämmen zu fördern, Sauerstoff, um das Wachstum sulfatreduzierender Bakterien möglicherweise zu hemmen. Die Nukleinsäuren wurden extrahiert und durch den enzymatischen Abbau mit RNase bzw. DNase wurde daraus DNA bzw. RNA gewonnen. Hochmolekulare DNA sowie prokaryotische RNA, identifizierbar anhand der ribosomalen RNA-Banden, wurde isoliert (Abbildung 3.19).

Das [NiFe] Hydrogenase-Gen wurde mit Primerpaar Hyd1fGC-Hyd5r aus DNA-Präparationen direkt amplifiziert; RNA-Präparationen wurden vor der PCR in cDNA umgeschrieben. Abbildung 3.20A zeigt die gelelektrophoretische Analyse der PCR-Produkte, die aus den verschiedenen Ansätzen amplifiziert wurden, in einem Agarosegel. In allen DNA-Präparationen konnten [NiFe] Hydrogenase-Genfragmente nachgewiesen werden. [NiFe] Hydrogenase-mRNA-Sequenzen wurden jedoch nur in der Probe amplifiziert, die mit Wasserstoff inkubiert worden war.

Anschließend wurden die PCR-Produkte in einem denaturierenden Gradientengel aufgetrennt. Das Elektrophoresemuster ist in Abbildung 3.20B dargestellt. In allen DNA-Präparationen waren mehrere Banden erkennbar. Es wurden demnach PCR-Produkte mit unterschiedlichen Sequenzen amplifiziert, d. h. hier waren wahrscheinlich verschie-

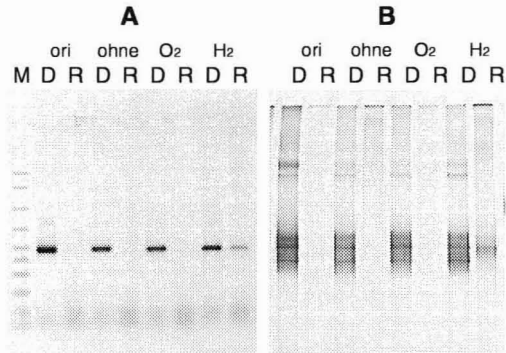


Abbildung 3.20: (A) Analyse der [NiFe] Hydrogenase-PCR-Produkte aus DNA (D) und RNA (R), die zuvor in cDNA umgeschrieben wurde, der Bakteriengemeinschaft eines denitrifizierenden, experimentellen Bioreaktors (ori) und nach Inkubation mit verschiedenen Substraten in einem 2% (w/v) TBE-Agarosegel. Bahn M zeigt einen DNA-Größenmarker (2000, 1500, 1000, 700, 500, 400, 300, 200, 100 und 50 bp). (B) DGGE Analyse der PCR-Produkte. (Negative Bilder von Ethidiumbromid-gefärbten Gelen)

dene Stämme vorhanden. Das Elektrophoresemuster veränderte sich durch die Inkubation der Proben mit den verschiedenen Substraten nicht; es war in allen Ansätzen identisch.

Die RNA-Probe, die aus dem Ansatz stammte, der mit Wasserstoff inkubiert wurde, enthielt allerdings nur PCR-Produkte mit identischer Sequenz. Nur eine Bande war im Gel erkennbar, die die gleiche Position im Gel einnahm, wie eine Bande im Elektrophoresemuster der DNA-Amplifikate. Dies deutet an, daß zum Zeitpunkt der Probennahme nur einer der vorhandenen Stämme das [NiFe] Hydrogenase-Gen exprimierte. Die Expression wurde dabei durch das Substrat induziert, denn in allen anderen Ansätzen war keine Genexpression nachweisbar. Möglicherweise konnte dieser Bakterienstamm schneller auf die veränderten Kulturbedingungen reagieren, als die anderen nachgewiesenen Stämme. Wäre die Probennahme nach längerer Inkubation erfolgt, hätte man eventuell keine Unterschiede im Elektrophoresemuster von DNA- und RNA-Amplifikaten gefunden. In Proben, die zu einem anderen Zeitpunkt aus dem Bioreaktor genommen und analysiert wurden, wurde nachgewiesen, daß alle vorhandenen Stämme das [NiFe] Hydrogenase-Gen exprimierten (Ergebnisse nicht gezeigt).

Die weitergehende Analyse der Sequenzen der PCR-Produkte ist in Abschnitt 3.3.3 beschrieben.

3.2.3.2 Methanogener Bioreaktor

Eine Bakteriengemeinschaft aus einem methanogenen Bioreaktor wurde untersucht. In solchen Bioreaktoren bilden methanogene und sulfatreduzierende Bakterien typische Populationen [148].

Schlamm dieses Bioreaktors diente als Inokulum für Anreicherungen mit verschiedenen Substraten, die von sulfatreduzierenden Bakterien verwertet werden können (Propionat, Formiat/Acetat, Acetat, Laktat, Wasserstoff/Acetat). Das Vorhandensein und die Aktivität sulfatreduzierender Bakterien wurde in den Anreicherungen durch den qualitativen Nachweis von Sulfid aufgezeigt. Die Anreicherungen mit Propionat, Laktat und Wasserstoff/Acetat zeigten nach 2 Tagen Inkubation eine deutliche Zunahme an Sulfid, verglichen mit einer negativen Kontrolle, in der Medium ohne Substrat mit Schlamm beimpft worden war. Nach 4 Tagen Inkubation unterschied sich die Anreicherung mit Formiat/Acetat im Sulfidgehalt ebenfalls deutlich von der negativen Kontrolle; die Anreicherung mit Acetat zeigte zu diesem Zeitpunkt noch keine Sulfidbildung. Nach 3 Tagen wurden 10% (v/v) der Kulturen mit Laktat und Wasserstoff/Acetat, Substrate die von *Desulfovibrio*-Stämmen verwertet werden können, in frisches Medium überführt. Die genetische Diversität von *Desulfovibrio* spp. und die Expression des [NiFe] Hydrogenase-Gens wurden in Proben, die direkt aus dem Reaktor entnommen wurden, und in den Anreicherungen mit Laktat und Wasserstoff/Acetat bestimmt.

Abbildung 3.21 zeigt die DGGE Analyse von PCR-Fragmenten, die aus DNA und RNA der Originalprobe, der Kultur ohne Substrat (negative Kontrolle) sowie den Anreicherungen mit Laktat und Wasserstoff/Acetat amplifiziert wurden. Die Bakterienkulturen wurden nach einem Tag Inkubation geerntet (ohne, Lak, H₂). Sulfidproduktion war zu diesem Zeitpunkt noch nicht nachweisbar (verglichen mit der negativen Kontrolle). Weiterhin wurden Zellen einer Bakterienkultur mit Laktat nach dem ersten Transfer in frisches Medium ebenfalls nach einem Tag Inkubation geerntet (Lak1). Diese Kultur wies eine deutliche Zunahme an Sulfid auf. In allen untersuchten Proben konnten sowohl [NiFe] Hydrogenase-Genfragmente als auch -mRNA-Sequenzen von *Desulfovibrio* spp. nachgewiesen werden.

Die PCR-Produkte aus der DNA der Originalbioreaktorprobe (Abbildung 3.21, Bahn 1) ergaben drei Banden im denaturierenden Gradientengel (Pfeile links markieren deren Positionen, Abbildung 3.21). Dies weist daraufhin, daß drei verschiedene *Desulfovibrio*-Stämme zum Zeitpunkt der Probennahme vorhanden waren. Die PCR-Produkte aus der RNA (Bahn 2) zeigten dasselbe Muster im Gel, wobei die obere Bande nur schwach mit Ethidiumbromid angefärbt und kaum zu erkennen war. Dieses Expressionsmuster deutet an, daß zumindest zwei der vorhandenen Stämme das [NiFe] Hydrogenase-Gen zum Zeitpunkt der Probennahme exprimierten. Die negative Kontrolle (Bahn 3) unterschied sich in der Population nicht von der Originalprobe; die Analyse der DNA-Amplifikate zeigte ein identisches Muster. Das Expressionsmuster, die Auftrennung der RNA-Amplifikate, unterschied sich bei dieser Probe nicht und zeigte ebenfalls drei Banden (Bahn 4). Möglicherweise regte die Zugabe von Medium auch ohne zusätzliches Substrat die Expression des [NiFe] Hydrogenase-Gens in den vorhandenen *Desul-*

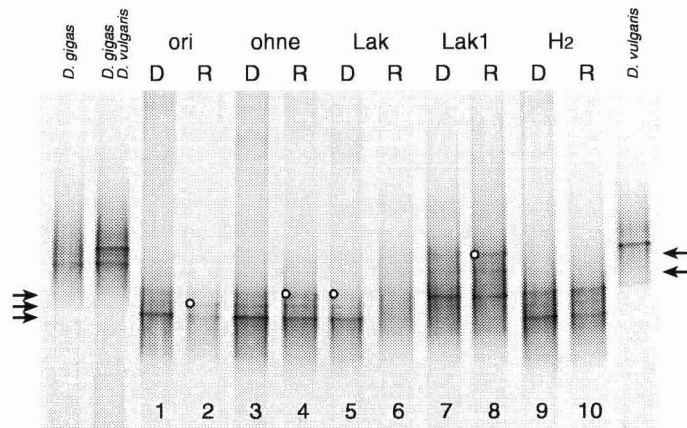


Abbildung 3.21: DGGE Analyse der [NiFe] Hydrogenase-PCR-Produkte aus DNA (D) und RNA (R), die zuvor in cDNA umgeschrieben wurde, der Bakteriengemeinschaft eines methanogenen Bioreaktors (ori) und Anreicherungskulturen von sulfatreduzierenden Bakterien ohne Substrat (ohne), mit Laktat (Lak, Lak1) und Wasserstoff/Acetat (H_2). Als Standard wurden die PCR-Produkte von *Desulfovibrio gigas* und *Desulfovibrio vulgaris* DSM 644 einzeln und als Gemisch aufgetragen. Durch Kreise markierte Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten, die DNA eluiert, reamplifiziert und sequenziert. (Negatives Bild eines Ethidiumbromid-gefärbten Gels)

fovibrio-Stämmen an. Die Analyse der PCR-Produkte aus DNA der Anreicherungen mit Laktat (Bahn 5) zeigte dasselbe Elektrophoresemuster wie die Originalprobe, aber die Auftrennung der amplifizierten mRNA-Sequenzen (Bahn 6) zeigte ein verändertes Muster. Zusätzliche Banden traten auf. Bahn 7 und 8 enthielten DNA- und RNA-Amplifikate aus Kulturen nach dem ersten Transfer in frisches Laktat-Sulfat-Medium. Die DNA-Amplifikate spiegelten ein Elektrophoresemuster wider, das sich in der Analyse der amplifizierten mRNA-Sequenzen der Anreicherung mit Laktat schon angekündigt hatte. Die RNA-Amplifikate bildeten das gleiche Muster. Während der Anreicherung auf Laktat-Sulfat-Medium hatte sich die Zusammensetzung der *Desulfovibrio*-Population verändert. Mit diesem Medium wurden offensichtlich nicht die Organismen, die in der Originalpopulation vorhanden waren, angereichert, sondern andere Organismen, die in der Originalprobe nicht nachweisbar waren (Pfeile rechts markieren die Positionen dieser PCR-Produkte im Gel, Abbildung 3.21). Anreicherungen mit Wasserstoff (Bahn 9 und 10) zeigten keine Unterschiede in der Population und dem Expressionsmuster verglichen mit der Originalprobe.

Anhand der untersuchten Populationen wurde die Frage überprüft, ob die Banden im DGGE-Muster tatsächlich zu einzelnen Bakterienstämmen gehören oder ob ein Stamm möglicherweise verschiedene Sequenzen des [NiFe] Hydrogenase-Gens besitzt. Die Anreicherungen mit Laktat und Wasserstoff wurden bis zum 4. Transfer der Kulturen fortgeführt. Mit der 4. Passage wurden dann Agarverdünnungsreihen zur Isolierung der Bakterien angelegt. Nach 8 Tagen Inkubation zeigten die Verdünnungsreihen mit Wasserstoff/Acetat heterogene, sehr kleine Kolonien, die zu dicht gewachsen waren, um eine Isolierung einzelner Kolonien zu erlauben. Die Verdünnungsreihe des Laktat-Ansatzes zeigte größere, weiße Kolonien. Der dominante Kolonietyp war scheibenförmig; vereinzelt traten dreieckige Kolonien und Kolonien mit ausgefranzten Rändern auf. Eine Isolierung von Reinkulturen wurde versucht. Insgesamt wurden 14 scheibenförmige Kolonien in frisches Medium überführt. Nach 3 Tagen zeigten alle Kulturen eine Zunahme der Zellzahl, erkennbar an der Trübung des Mediums. Die Betrachtung der Kulturen im Phasenkontrastmikroskop bei 400-facher Vergrößerung zeigte bewegliche, gekrümmte Bakterien. Sieben der Isolate wurden weiter analysiert. Das [NiFe] Hydrogenase-Gen konnte aus den DNA-Präparationen der gewählten Kulturen amplifiziert werden. Die anschließende DGGE Analyse der PCR-Produkte ist in Abbildung 3.22 gezeigt.

Das Gel zeigte eine DNA-Bande für jedes Isolat. Vermutlich wurden zwei unterschiedliche Stämme isoliert, Typ A (Abbildung 3.22, Bahnen 3, 4 und 6) und Typ B (Bahnen 2, 5, 7 und 8), da man davon ausgehen kann, daß die PCR-Produkte, die die gleiche elektrophoretische Mobilität im denaturierenden Gradientengel aufweisen, eine (nahezu) identische Sequenz haben [20, 212, 213] (siehe auch Abschnitt 3.3.4). Der Vergleich der Bandenmuster der Isolate mit dem Bandenmuster der vierten Passage der Anreicherung (Abbildung 3.22, Bahn 1), aus der die Verdünnungsreihen angesetzt wurden, zeigt, daß die zwei Banden, die in der Anreicherung vorhanden waren, durch unterschiedliche Isolate repräsentiert werden. Banden mit der gleichen Position waren auch in der vierten Passage der Anreicherung auf Wasserstoff/Acetat erkennbar (Abbildung 3.22, Bahn 9). Die weitergehende Analyse der Sequenzen der PCR-Produkte ist in Abschnitt 3.3.4 beschrieben.

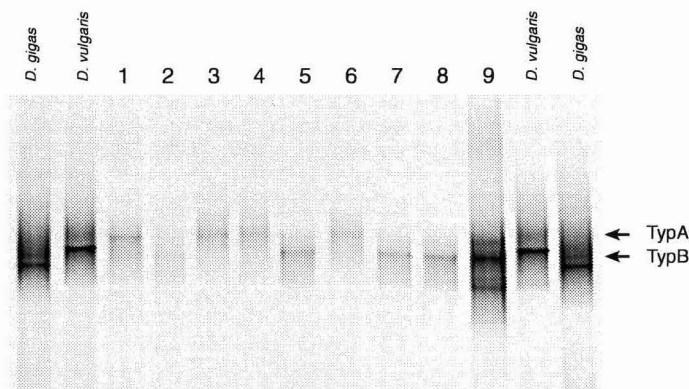


Abbildung 3.22: DGGE Analyse der [NiFe] Hydrogenase-Genfragmente von Isolaten (Bahn 2–8) und Anreicherungen einer Bakteriengemeinschaft aus einem methanogenen Bioreaktor mit Laktat (Bahn 1) und Wasserstoff/Acetat (Bahn 9). Als Standard wurden die PCR-Produkte von *Desulfovibrio vulgaris* DSM 644 und *Desulfovibrio gigas* aufgetragen. (Negatives Bild eines Ethidiumbromid-gefärbten Gels)

Anhand von Westernblots mit Anti-*Desulfovibrio gigas* [NiFe] Hydrogenase konnte zusätzlich gezeigt werden, daß sowohl in der 4. Passage der Anreicherungen mit Laktat und Wasserstoff/Acetat als auch in den Isolaten die große und kleine Untereinheit einer [NiFe] Hydrogenase vorhanden waren, die mit dem Antikörper kreuzreagierten (Ergebnisse nicht gezeigt).

Da die Isolate nicht weitergehend auf ihre Reinheit überprüft wurden, und das Nachweissystem für *Desulfovibrio* spp. spezifisch ist, kann nicht ausgeschlossen werden, daß es sich bei den Isolaten um Mischkulturen mit anderen sulfatreduzierenden und Laktatvergärenden Bakterien handelte. Eine Untersuchung der ribosomalen 16S rRNA-Sequenzen wurde nicht durchgeführt. Die DGGE Analyse solcher Sequenzen könnte über die tatsächliche Reinheit der Kulturen Aufschluss geben [20, 213].

3.3 Identifizierung von *Desulfovibrio* spp.

Bisher wurde in der vorliegenden Arbeit ausgeführt, wie in Umweltproben die genetische Diversität von *Desulfovibrio* spp. anhand des [NiFe] Hydrogenase-Gens mit Hilfe der PCR und anschließender Analyse der PCR-Produkte in denaturierenden Gradientengelen visualisiert werden kann. Die Identität der amplifizierten DNA-Fragmente wurde zusätzlich durch die Hybridisierung mit einer spezifischen Oligonukleotidsonde (Hyd4f) aufgezeigt. Eine weitergehende Identifizierung der nachgewiesenen *Desulfovibrio*-Stämme kann durch die Bestimmung der Nukleotidsequenz der [NiFe] Hydrogena-

se-Genfragmente und den Vergleich dieser Sequenzen mit bereits bekannten Sequenzen erfolgen. Um die Grundlage für eine solche vergleichende Sequenzanalyse von *Desulfovibrio*-Stämmen zu schaffen, wurden zunächst die Sequenzen der [NiFe] Hydrogenase-Genfragmente von Reinkulturen ermittelt.

3.3.1 Sequenzierung der [NiFe] Hydrogenase-Genfragmente

[NiFe] Hydrogenase-Genfragmente von verschiedenen Reinkulturen wurden mit Hilfe der PCR mit Primerpaar Hyd1f-Hyd5r amplifiziert und anschließend "manuell" direkt, d. h. ohne vorherige Klonierung, sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte dabei in beide Richtungen mit den Primern Hyd1f und Hyd5f. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Produkte aus den Sequenzierungsreaktionen waren in der Regel etwa 250 Nukleotide des insgesamt etwa 440 bp langen Genfragments lesbar. Die so ermittelten Sequenzen wurden durch zyklische Sequenzierungen der PCR-Produkte mit Hilfe eines automatischen Sequenzanalysators überprüft und verbessert. Auf diese Weise konnten nun im Durchschnitt mehr als 360 bp gelesen werden. Als Sequenzierprimer für diese Reaktionen wurden neben Hyd1f und Hyd5r auch deren Kurzformen Hyd1-19 und Hyd5-18 verwendet. Es stellte sich heraus, daß besonders der relativ lange Primer Hyd5r (36 Nukleotide) bei der zyklischen Sequenzierung Probleme bereitete, die durch die Verwendung der Kurzform dieses Primers, Hyd5-18, weitgehend gelöst werden konnten. Es wurden keine Unterschiede in der Effizienz der Sequenzierung bei Verwendung der Primer Hyd1f (27 Nukleotide) und Hyd1-19 festgestellt. Wie in Abschnitt 3.1.2 bereits beschrieben, wurde mit Primerpaar Hyd1f-Hyd5r nur eine geringe Ausbeute an PCR-Produkten mit den Stämmen *Desulfovibrio vulgaris* DSM 1744 und *Desulfovibrio longus* erzielt. Eine größere Menge an PCR-Produkten konnte durch die Verwendung des Primerpaares Hyd1-19-Hyd5-18 aus der DNA dieser Stämme hergestellt werden; anschließende Sequenzierungsreaktionen wurden daher mit diesen PCR-Produkten und den Primern Hyd1-19 und Hyd5-18 durchgeführt.

Weiterhin wurde versucht, auch die Regionen des [NiFe] Hydrogenase-Gens, wo die PCR-Primer Hyd1f und Hyd5r lokalisiert sind, zu sequenzieren. Diese Primer waren durch den Vergleich der [NiFe] Hydrogenase-Gene von nur drei verschiedenen *Desulfovibrio* spp. ermittelt worden, und es war bereits bekannt, daß sie nicht zur Amplifikation des [NiFe] Hydrogenase-Gens von allen untersuchten *Desulfovibrio*-Stämmen taugen (siehe Tabelle 3.2). Daher sollten die Primersequenzen überprüft und optimiert werden. Hierzu wurden [NiFe] Hydrogenase-Genfragmente mit dem Primerpaar Hyd2f-Hyd7r amplifiziert. Diese PCR-Produkte waren etwa 2000 bp lang und umfaßten fast das gesamte Gen für die große Untereinheit und einen Teil der kleinen Untereinheit der [NiFe] Hydrogenase. Die Sequenzierung erfolgte mit den Primern Hyd1f und Hyd5-18, die innerhalb dieses Fragments liegen (siehe Abbildung 3.1). Mit dem Primer Hyd1f sollte die Sequenz bis zur Position des Primers Hyd5r gelesen werden, mit Primer Hyd5-18 bis zur Position des Primers Hyd1r. Leider war eine Analyse der Primersequenzen nicht möglich, da sich der lesbare Teil der Sequenzierungsgele nie bis zu den Primerpositionen erstreckte.

Wie in den vorhergehenden Abschnitten beschrieben, wurden [NiFe] Hydrogenase-PCR-Produkte, die aus den extrahierten Nukleinsäuren diverser Umweltproben amplifiziert wurden, in denaturierenden Gradientengelen analysiert. Dadurch wurden PCR-Produkte unterschiedlicher Nukleotidsequenz vereinzelt und einer anschließenden Sequenzierung zugänglich. DNA-Fragmente, die als Banden im Elektrophoresemuster erschienen, wurden aus dem Gel ausgeschnitten, eluiert, in einer PCR mit Primerpaar Hyd1f-Hyd5r reamplifiziert und die entstandenen PCR-Produkte wie oben beschrieben mit Hilfe eines automatischen Sequenzanalysators sequenziert.

3.3.2 Analyse der [NiFe] Hydrogenase-Sequenzen

Alle ermittelten [NiFe] Hydrogenase-Sequenzen befinden sich im Anhang. Der Vergleich der Sequenzen mit den Sequenzen der EMBL Datenbank unter Verwendung des FASTA Suchprogramms [151, 152] ergab, daß alle Sequenzen die größte Ähnlichkeit zu den publizierten [NiFe] Hydrogenase-Gensequenzen von *Desulfovibrio* spp. aufweisen.

Mit Hilfe verschiedener Computerprogramme wurden die Sequenzen anschließend ausgewertet (siehe Abschnitt 2.8), d. h. sie wurden miteinander und auch mit den [NiFe] Hydrogenase-Sequenzen anderer Bakterien verglichen. Zunächst wurden aus den Nukleotidsequenzen die Aminosäuresequenzen abgeleitet und in ein "alignment" gebracht, d. h. homologe Aminosäuren wurden untereinander geschrieben, um die homologen Positionen in den Sequenzen miteinander vergleichen zu können. Das "alignment" der Nukleotidsequenzen erfolgte dann unter Berücksichtigung der Triplets, die für Aminosäuren codieren.

Es stellte sich heraus, daß die Länge der amplifizierten PCR-Produkte verschiedener *Desulfovibrio*-Stämme variierte. Der sequenzierte Bereich der [NiFe] Hydrogenase-Gene von *Desulfovibrio desulfuricans* DSM 1926 war 3 bp, von *Desulfovibrio baculatus* und *Desulfovibrio sulfodismutans* 6 bp, von *Desulfovibrio longus* 9 bp länger als der entsprechende Bereich der anderen *Desulfovibrio*-Stämme. Die Genfragmente von *Desulfovibrio vulgaris* DSM 1744 und PIB2 enthielten sogar 27 bzw. 33 bp mehr. Anhand der gelelektrophoretischen Analyse der PCR-Produkte waren leichte Variationen in der Größe schon erkennbar (vergleiche Abbildung 3.10A). Auch die Hyd1f-Hyd5r-Genfragmente der publizierten [NiFe] Hydrogenase-Gensequenzen sind unterschiedlich lang: *Desulfovibrio fructosovorans* mit 445 bp, *Desulfovibrio vulgaris* und *Desulfovibrio gigas* mit 439 bp.

Obwohl die Sequenzen der verwendeten PCR-Primer nicht überprüft werden konnten, so gelang doch zum Teil die Sequenzierung des Genbereiches, wo das Oligonukleotid Hyd4f lokalisiert ist (siehe Abbildung 3.1). Die [NiFe] Hydrogenase-Gene der Stämme PIB2, *Desulfovibrio longus*, *Desulfovibrio desulfuricans* DSM 1926, *Desulfovibrio vulgaris* DSM 1744 und *Desulfovibrio baculatus* zeigten Sequenzunterschiede (Tabelle 3.4). Der Stamm PIB2 enthielt in diesem Bereich 6 zusätzliche Basen, die in der Hyd4f-Sequenz nicht enthalten sind, sowie zwei Fehlpaarungen. PCR-Produkte dieses Stammes hybridisierten nicht mit der DIG-markierten Sonde Hyd4f (siehe Abbildung 3.8).

Tabelle 3.4: Vergleich der Sequenz Hyd4f (Position 1786–1815 im [NiFe] Hydrogenase-Gen von *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki [38]) mit den Zielsequenzen in verschiedenen *Desulfovibrio* spp.

Bakterienstamm	Sequenz
Hyd4f	TTCACCAAYGCCTACTTCCTS-----GGCGGCCAC
<i>Desulfovibrio fructosovorans</i> [180]	TTCACCAACGCCTACTTCCTC-----GGCGGCCAC
<i>Desulfovibrio gigas</i> [110]	TTCACCAACGCCTACTTCCTG-----GGCGGCCAC
<i>Desulfovibrio vulgaris</i> Miyazaki [38]	TTCACCAATGCCTACTTCCTG-----GGCGGCCAC
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> DSM1924	TTCACCAACGCCTACTTCCTG-----GGCGGCCAC
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> DSM1926	TTTACCAATACCTACTTCCTT-----GGCGGCCAC
<i>Desulfovibrio vulgaris</i> DSM 1744	TTCACCAACGCCTATTTCCTC-----GGCGGCCAC
<i>Desulfovibrio baculatus</i>	TTCACCAACGCCTACTTCCTG-----GGCGGCAC
<i>Desulfovibrio longus</i>	TTCACCAACGCCTACTTCCTGCGTGAAGCGGCCAC
PIB2	TTCAACAACGCCTACTTCCTGAAGCCGGCGGCAC

Wurde Hyd4f als Primer in der PCR eingesetzt, entstand eine geringere Ausbeute an PCR-Produkten im Vergleich zu anderen Primerpaaren. *Desulfovibrio longus* zeigte eine identische Sequenz zu Hyd4f, die aber ebenfalls 6 bp zusätzlich enthielt. Dies wirkte sich in der PCR nicht aus. *Desulfovibrio desulfuricans* DSM 1926 hatte vier Fehlpaarungen in der Hyd4f-Sequenz. Sie befanden sich am 5'-Ende, am 3'-Ende und in der "wobble"-Position von Hyd4f. Diese Sequenzunterschiede wirkten sich weder auf die Hybridisierung noch auf die Amplifikation mit Hyd4f als Primer aus. Das gleiche galt für die Stämme *Desulfovibrio vulgaris* DSM 1744, der zwei Fehlpaarungen aufwies, und *Desulfovibrio baculatus*, der eine Fehlpaarung am 3'-Ende zeigte.

Basierend auf den "alignments" der Nukleotid- und der Aminosäuresequenzen wurden die Ähnlichkeitswerte der [NiFe] Hydrogenase-Genfragmente von *Desulfovibrio*-Reinkulturen paarweise in einer Distanzmatrix berechnet, die in Tabelle 3.5 gezeigt ist. Fehlende Nukleotide bzw. Aminosäuren und Lücken im "alignment" wurden bei der Berechnung ignoriert. Die [NiFe] Hydrogenase-Genfragmente verschiedener *Desulfovibrio*-Stämme wiesen über den sequenzierten Bereich Sequenzhomologien von etwa 70–75% auf. Höhere Sequenzhomologien von 87,5% auf DNA-Ebene und 95,5% auf Aminosäure-Ebene wurden für zwei Stämme der Spezies *Desulfovibrio vulgaris* gefunden. Diese sind *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki [38] und *Desulfovibrio vulgaris* DSM 644. Die [NiFe] Hydrogenase-Genfragmente verschiedener Stämme, die als Spezies *Desulfovibrio desulfuricans* klassifiziert sind, zeigten keine größere Ähnlichkeit untereinander verglichen mit anderen Spezies. Die größte Ähnlichkeit in der Nukleotidsequenz zweier unterschiedlicher Spezies lag bei 85,9%; die abgeleiteten Aminosäuresequenzen wiesen jedoch mit 84,8% eine geringere Ähnlichkeit auf. Diese Spezies sind *Desulfovibrio sulfodismutans* und *Desulfovibrio fructosovorans*. Die Ähnlichkeiten zu [NiFe] Hydrogenase-Gensequenzen von nicht-sulfatreduzierenden Bakterien für den sequenzierten Bereich lagen bei ca. 60% (Ergebnisse nicht gezeigt).

Tabelle 3.5: Paarweiser Vergleich der [NiFe] Hydrogenase-Sequenzen von *Desulfovibrio*-Reinkulturen. Oberhalb der Diagonalen wurden Ähnlichkeiten in % angegeben, unterhalb der Diagonalen Unterschiede in absoluten Zahlen. Die obere Zeile gibt jeweils die Werte für die Nukleotidsequenzen an, die untere Zeile die kursiv gedruckten Werte für die abgeleiteten Aminosäuresequenzen. Angaben in Klammern geben die Länge der DNA-Sequenz an, die sequenziert wurde.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1 <i>D. baculatus</i> (362 bp)	–	72,1	77,6	73,6	72,8	69,9	72,1	67,6	76,1	75,0	72,8	78,7
	–	<i>63,3</i>	<i>74,4</i>	<i>79,8</i>	<i>68,1</i>	<i>66,9</i>	<i>71,9</i>	<i>72,2</i>	<i>74,3</i>	<i>72,9</i>	<i>70,3</i>	<i>78,0</i>
2 PIB2 (397 bp)	101	–	72,4	70,5	76,4	65,8	65,2	57,4	69,1	66,8	69,2	72,0
	<i>44</i>	–	<i>66,7</i>	<i>61,6</i>	<i>75,6</i>	<i>56,3</i>	<i>60,3</i>	<i>51,1</i>	<i>56,2</i>	<i>56,9</i>	<i>62,0</i>	<i>62,0</i>
3 <i>D. longus</i> (370 bp)	79	100	–	73,2	69,4	69,6	69,4	62,5	76,1	72,5	72,9	74,0
	<i>30</i>	<i>40</i>	–	<i>72,2</i>	<i>65,8</i>	<i>66,4</i>	<i>70,2</i>	<i>61,1</i>	<i>67,0</i>	<i>65,3</i>	<i>71,7</i>	<i>70,8</i>
4 <i>D. vulgaris</i> DSM 644 (336 bp)	87	99	87	–	69,1	73,3	67,6	66,1	72,6	71,7	75,3	87,5
	<i>22</i>	<i>43</i>	<i>30</i>	–	<i>64,5</i>	<i>73,4</i>	<i>74,5</i>	<i>74,4</i>	<i>77,3</i>	<i>74,1</i>	<i>73,2</i>	<i>95,5</i>
5 <i>D. vulgaris</i> DSM 1744 (382 bp)	98	90	108	102	–	64,5	66,1	58,5	69,8	69,8	67,9	71,0
	<i>38</i>	<i>31</i>	<i>40</i>	<i>39</i>	–	<i>57,6</i>	<i>62,9</i>	<i>57,8</i>	<i>60,7</i>	<i>60,8</i>	<i>64,4</i>	<i>64,4</i>
6 <i>D. desulfuricans</i> DSM 1924 (374 bp)	107	123	109	88	126	–	64,6	68,4	71,6	71,7	70,9	77,6
	<i>39</i>	<i>52</i>	<i>40</i>	<i>29</i>	<i>50</i>	–	<i>64,0</i>	<i>69,7</i>	<i>67,0</i>	<i>66,7</i>	<i>65,0</i>	<i>74,0</i>
7 <i>D. desulfuricans</i> DSM 1926 (348 bp)	96	121	105	107	118	121	–	66,9	68,4	68,1	67,5	69,3
	<i>32</i>	<i>46</i>	<i>34</i>	<i>28</i>	<i>43</i>	<i>41</i>	–	<i>64,4</i>	<i>73,0</i>	<i>73,3</i>	<i>69,6</i>	<i>73,0</i>
8 <i>D. desulfuricans</i> Vosjan (272 bp)	88	116	102	92	113	85	90	–	60,7	61,4	66,9	66,2
	<i>25</i>	<i>44</i>	<i>35</i>	<i>23</i>	<i>38</i>	<i>27</i>	<i>32</i>	–	<i>64,4</i>	<i>65,6</i>	<i>72,2</i>	<i>72,2</i>
9 <i>D. sulfodismutans</i> (340 bp)	79	105	79	91	102	94	106	107	–	85,9	74,0	76,3
	<i>28</i>	<i>49</i>	<i>36</i>	<i>25</i>	<i>44</i>	<i>36</i>	<i>30</i>	<i>32</i>	–	<i>84,8</i>	<i>71,8</i>	<i>77,3</i>
10 <i>D. fructosovorans</i> (445 bp)	89	123	100	95	109	105	111	105	48	–	74,3	78,4
	<i>32</i>	<i>53</i>	<i>42</i>	<i>29</i>	<i>47</i>	<i>41</i>	<i>31</i>	<i>31</i>	<i>17</i>	–	<i>74,7</i>	<i>78,1</i>
11 <i>D. gigas</i> (439 bp)	97	112	98	83	114	108	112	90	87	113	–	80,4
	<i>35</i>	<i>46</i>	<i>34</i>	<i>30</i>	<i>42</i>	<i>43</i>	<i>35</i>	<i>25</i>	<i>31</i>	<i>37</i>	–	<i>74,7</i>
12 <i>D. vulgaris</i> Miyazaki (439 bp)	76	102	94	42	103	83	106	92	79	95	86	–
	<i>26</i>	<i>46</i>	<i>35</i>	<i>5</i>	<i>42</i>	<i>32</i>	<i>31</i>	<i>25</i>	<i>25</i>	<i>32</i>	<i>37</i>	–

Tabelle 3.6: Paarweiser Vergleich der [NiFe] Hydrogenase-Sequenzen amplifiziert aus Nukleinsäuren eines denitrifizierenden Bioreaktors. Oberhalb der Diagonalen wurden Ähnlichkeiten in % angegeben, unterhalb der Diagonalen Unterschiede in absoluten Zahlen. Die obere Zeile gibt jeweils die Werte für die Nukleotidsequenzen an, die untere Zeile die kursiv gedruckten Werte für die abgeleiteten Aminosäuresequenzen. Angaben in Klammern geben die Länge der DNA-Sequenz an, die sequenziert wurde.

		1	2	3	4	5	6	7
1	K6S1 (371 bp)	–	97,6	96,5	90,5	97,6	95,5	84,9
		–	<i>98,4</i>	<i>96,7</i>	<i>93,4</i>	<i>96,7</i>	<i>96,4</i>	<i>83,7</i>
2	K6S2 (384 bp)	9	–	97,9	89,7	94,8	93,2	83,6
		<i>2</i>	–	<i>98,4</i>	<i>93,4</i>	<i>96,1</i>	<i>96,4</i>	<i>82,8</i>
3	K6S4 (375 bp)	13	8	–	88,0	93,9	92,2	83,7
		<i>4</i>	<i>2</i>	–	<i>91,8</i>	<i>95,2</i>	<i>94,6</i>	<i>81,6</i>
4	K6S8 (368 bp)	35	38	44	–	91,6	90,1	85,6
		<i>8</i>	<i>8</i>	<i>10</i>	–	<i>95,9</i>	<i>95,5</i>	<i>86,9</i>
5	K6S6 (384 bp)	9	20	23	31	–	97,9	85,7
		<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>5</i>	–	<i>99,1</i>	<i>85,9</i>
6	<i>D. sulfodismutans</i> (340 bp)	15	23	26	33	7	–	85,9
		<i>4</i>	<i>4</i>	<i>6</i>	<i>5</i>	<i>1</i>	–	<i>84,8</i>
7	<i>D. fructosovorans</i> (445 bp)	56	63	61	53	55	48	–
		<i>20</i>	<i>22</i>	<i>23</i>	<i>16</i>	<i>18</i>	<i>17</i>	–

3.3.3 [NiFe] Hydrogenase-Sequenzen eines denitrifizierenden Bioreaktors

In Abbildung 3.20 wurde die DGGE Analyse der amplifizierten [NiFe] Hydrogenase-Genfragmente der Bakteriengemeinschaft eines denitrifizierenden Bioreaktors dargestellt. Die Auftrennung der DNA-Amplifikate aus einer Probe, die direkt dem Bioreaktor entnommen wurde, und Proben, die mit verschiedenen Substraten inkubiert worden waren, zeigten identische Elektrophoresemuster, die aus fünf unterscheidbaren Banden bestanden. Im folgenden werden diese Banden als K6S1, K6S2, K6S4, K6S8 und K6S6 bezeichnet (Abbildung 3.20, Banden in Elektrophoreserichtung von oben nach unten). Die Auftrennung der mRNA-Amplifikate, die aus der mit Wasserstoff inkubierten Probe stammten, zeigte eine Bande im Gel, deren Position mit der Position einer Bande im Muster der DNA-Amplifikate übereinstimmte (K6S8). Die aufgetrennten PCR-Produkte wurden sequenziert, und wie zu erwarten, hatten die PCR-Produkte, die die gleiche Position im Gel einnahmen, eine identische Nukleotidsequenz.

Die ermittelten DNA- und die abgeleiteten Aminosäuresequenzen wurden miteinander verglichen. Das Ergebnis ist in Tabelle 3.6 dargestellt. Die Sequenzen wiesen zwar eine große Ähnlichkeit untereinander auf, waren aber nicht identisch. Der Vergleich der Sequenzen zeigte eine Identität auf DNA-Ebene von 88–97,6%. Die Identität der abgeleiteten Aminosäuresequenzen betrug mehr als 90%. Die größte Ähnlichkeit wiesen

diese Sequenzen mit der Sequenz des Stammes *Desulfovibrio sulfodismutans* auf. Die Sequenz K6S6 zeigte sogar 99,1% Sequenzidentität in der Aminosäuresequenz mit dem entsprechenden Bereich des [NiFe] Hydrogenase-Gens von *Desulfovibrio sulfodismutans*, das entspricht einer veränderten Aminosäure.

Die Sequenz K6S8 gehört zu einem Bakterienstamm, der durch die Inkubation mit Wasserstoff das [NiFe] Hydrogenase-Gen exprimiert. Diese Eigenschaft unterschied ihn von den anderen Bakterienstämmen, die das [NiFe] Hydrogenase-Gen zum Zeitpunkt der Probenahme nicht exprimierten. Die Sequenz des [NiFe] Hydrogenase-Gens dieses Bakterienstammes wies zwar eine hohe Ähnlichkeit mit den anderen Sequenzen auf, unterschied sich aber am stärksten von den anderen Sequenzen. Die Ähnlichkeitswerte variierten auf DNA-Ebene von 88% zu K6S4 bis zu 91,6% zu K6S6. Die geringste Ähnlichkeit der anderen Sequenzen untereinander betrug 93,6% (K6S4 und K6S6).

Aufgrund des DGGE-Musters wurde eine große Diversität der nachgewiesenen *Desulfovibrio*-Stämme angenommen, da in den DNA-Proben 5 unterscheidbare Banden vorhanden waren, die sequenziert werden konnten. Der Vergleich dieser Sequenzen zeigte jedoch, daß die genetische Diversität, gemessen an Unterschieden in der Sequenz des [NiFe] Hydrogenase-Gens, nur relativ gering war (88–97,6%).

3.3.4 [NiFe] Hydrogenase-Sequenzen eines methanogenen Bioreaktors

Auch die amplifizierten [NiFe] Hydrogenase-Genfragmente der Bakteriengemeinschaft eines methanogenen Bioreaktors wurden sequenziert. Die DGGE Analyse der PCR-Produkte dieser Umweltprobe ist in Abbildung 3.21 dargestellt. Die sequenzierten Banden sind markiert und werden im folgenden als K5S18 (Bahn 2), K5S14 (Bahn 4), K5S12 (Bahn 5) und K5S5 (Bahn 8) bezeichnet. Sequenzen wurden von PCR-Produkten aus der Originalbioreaktorprobe und aus den Anreicherungen mit Laktat ermittelt.

Die Banden K5S14 und K5S12 nahmen im denaturierenden Gradientengel die gleiche Position ein. Die anschließende Sequenzierung dieser PCR-Produkte bestätigte, daß sie eine identische Nukleotidsequenz hatten. Die Sequenz wird im folgenden als K5S12/14 bezeichnet. Tabelle 3.7 zeigt die Ähnlichkeiten der DNA- und Aminosäuresequenzen der [NiFe] Hydrogenase-Fragmente der Bakteriengemeinschaft des methanogenen Bioreaktors berechnet in einer Distanzmatrix. Zum Vergleich wurden die [NiFe] Hydrogenase-Sequenzen der Reinkulturen, die die höchste Ähnlichkeit zu diesen Sequenzen zeigten, aufgeführt sowie Sequenzen aus der Bakteriengemeinschaft des denitrifizierenden Bioreaktors.

Die Ähnlichkeiten der Nukleotidsequenzen untereinander variierten von 76,6–91,7% über den sequenzierten Bereich. Die Sequenzen K5S12 und K5S18 zeigten die höchste Ähnlichkeit mit Sequenzen von *Desulfovibrio sulfodismutans* (98,2 und 92,4%) und *Desulfovibrio fructosovorans* (85,5 und 82,2%). Die Sequenz K5S5 hingegen zeigte nur 76,5% Identität zu der Sequenz von *Desulfovibrio sulfodismutans* und 78,7% Identität

Tabelle 3.7: Paarweiser Vergleich der [NiFe] Hydrogenase-Sequenzen amplifiziert aus Nukleinsäuren eines methanogenen Bioreaktors. Oberhalb der Diagonalen wurden Ähnlichkeiten in % angegeben, unterhalb der Diagonalen Unterschiede in absoluten Zahlen. Die obere Zeile gibt jeweils die Werte für die Nukleotidsequenzen an, die untere Zeile die kursiv gedruckten Werte für die abgeleiteten Aminosäuresequenzen. Angaben in Klammern geben die Länge der DNA-Sequenz an, die sequenziert wurde.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	K5S18 (382 bp)	–	91,7	78,2	77,6	77,8	92,4	82,2	77,0	91,6	87,0	96,0
		–	<i>96,8</i>	<i>74,6</i>	<i>75,2</i>	<i>74,2</i>	<i>97,3</i>	<i>82,7</i>	<i>75,4</i>	<i>96,1</i>	<i>94,3</i>	<i>96,8</i>
2	K5S12/14 (373 bp)	31	–	76,6	77,7	77,4	98,2	85,5	75,9	99,7	91,3	93,6
		<i>4</i>	–	<i>74,6</i>	<i>74,6</i>	<i>73,8</i>	<i>99,1</i>	<i>85,5</i>	<i>74,4</i>	<i>100,0</i>	<i>95,9</i>	<i>95,2</i>
3	K5S5 (376 bp)	80	86	–	91,7	92,2	76,5	78,7	87,7	76,3	75,3	79,0
		<i>31</i>	<i>31</i>	–	<i>94,4</i>	<i>94,4</i>	<i>73,1</i>	<i>74,6</i>	<i>93,3</i>	<i>74,6</i>	<i>73,9</i>	<i>75,4</i>
4	K5TypA (393 bp)	84	82	31	–	98,7	77,8	77,1	89,8	77,6	76,8	78,0
		<i>31</i>	<i>31</i>	<i>7</i>	–	<i>98,4</i>	<i>74,5</i>	<i>72,0</i>	<i>95,0</i>	<i>74,4</i>	<i>74,2</i>	<i>75,6</i>
5	K5TypB (401 bp)	83	83	29	5	–	77,5	77,3	89,8	77,5	76,5	78,3
		<i>32</i>	<i>32</i>	<i>7</i>	<i>2</i>	–	<i>73,6</i>	<i>71,8</i>	<i>94,2</i>	<i>74,2</i>	<i>73,3</i>	<i>74,8</i>
6	<i>D. sulfodismutans</i> (340 bp)	26	6	77	74	75	–	85,9	76,1	97,9	90,1	92,2
		<i>3</i>	<i>1</i>	<i>29</i>	<i>28</i>	<i>29</i>	–	<i>84,8</i>	<i>74,3</i>	<i>99,1</i>	<i>95,5</i>	<i>94,6</i>
7	<i>D. fructosovorans</i> (445 bp)	68	54	78	86	85	48	–	75,0	85,7	85,6	83,7
		<i>22</i>	<i>18</i>	<i>31</i>	<i>35</i>	<i>35</i>	<i>17</i>	–	<i>72,9</i>	<i>85,9</i>	<i>86,9</i>	<i>81,6</i>
8	<i>D. baculatus</i> (362 bp)	82	85	44	37	37	79	89	–	75,8	74,9	76,6
		<i>29</i>	<i>30</i>	<i>8</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>28</i>	<i>32</i>	–	<i>74,6</i>	<i>74,6</i>	<i>75,4</i>
9	K6S6 (384 bp)	32	1	87	84	84	7	55	86	–	91,6	93,9
		<i>5</i>	<i>0</i>	<i>31</i>	<i>32</i>	<i>32</i>	<i>1</i>	<i>18</i>	<i>30</i>	–	<i>95,9</i>	<i>95,2</i>
10	K6S8 (368 bp)	48	32	89	84	85	33	53	89	31	–	88,0
		<i>7</i>	<i>5</i>	<i>31</i>	<i>31</i>	<i>32</i>	<i>5</i>	<i>16</i>	<i>30</i>	<i>5</i>	–	<i>91,8</i>
11	K6S4 (375 bp)	15	24	77	81	80	26	61	83	23	44	–
		<i>4</i>	<i>6</i>	<i>30</i>	<i>30</i>	<i>31</i>	<i>6</i>	<i>23</i>	<i>29</i>	<i>6</i>	<i>10</i>	–

zu der Sequenz von *Desulfovibrio fructosovorans*, aber 87,7% zu *Desulfovibrio baculatus*. Nahezu identisch war die Sequenz K5S12/14 auf DNA-Ebene zu der Sequenz K6S6 aus dem denitrifizierenden Bioreaktor (99,7% Identität); die abgeleiteten Aminosäuren ergaben sogar identische Sequenzen. Die Sequenz K5S18 wies mit 96% Identität die höchste Ähnlichkeit zur Sequenz K6S4 des denitrifizierenden Bioreaktors auf.

Aus Anreicherungen sulfatreduzierender Bakterien auf Laktat, die mit Proben des methanogenen Bioreaktors beimpft worden waren, konnten 14 Bakterienstämme isoliert werden. Die amplifizierten [NiFe] Hydrogenase-Genfragmente aus 7 Bakterienisolaten wurden in denaturierenden Gradientengelen analysiert (Abbildung 3.22). Die Ergebnisse deuteten an, daß die Sequenzen zweier Bakterientypen vorlagen. Dies wurde durch die Sequenzierung der [NiFe] Hydrogenase-Genfragmente bestätigt. Die erhaltenen Sequenzen werden als K5TypA und K5TypB bezeichnet (siehe Tabelle 3.7). Sie zeigten 98,7% Identität untereinander. Die höchste Ähnlichkeit wiesen sie zu der Sequenz K5S5 auf (91,7% und 92,2%). Diese Sequenz tauchte in den Anreicherungen mit Laktat auf und war in der Probe, die direkt aus dem Bioreaktor entnommen wurde, nicht nachweisbar.

3.3.5 [NiFe] Hydrogenase-Sequenzen einer mikrobiellen Matte

Amplifizierte [NiFe] Hydrogenase-Genfragmente aus einer mikrobiellen Matte (Texel, Holland), deren DGGE Analyse in Abbildung 3.8 gezeigt ist, wurden ebenfalls sequenziert. Dabei ergaben sich große Schwierigkeiten: Die PCR-Produkte wurden nur in eine Richtung sequenziert, da die Sequenzierung mit Hyd5-18 nicht funktionierte. Daher enthalten die Sequenzen Unsicherheiten. Vermutlich sind diese Schwierigkeiten auf eine schlechte Auftrennung der PCR-Produkte im denaturierenden Gradientengel zurückzuführen. Das Muster war sehr komplex, und möglicherweise überlappten sich unterschiedliche Sequenzen innerhalb des Gels. Solche Sequenzgemische können nicht sequenziert werden. Die zyklische Sequenzierung reagiert besonders empfindlich auf unterschiedliche Sequenzen in einer Probe, und mit dieser Methode können kontaminierende Sequenzen, die nur einen geringen Teil in der Probe ausmachen, nicht von der vorherrschenden Sequenz unterschieden werden.

Um einen ersten Eindruck über die genetische Diversität der *Desulfovibrio* spp. in dieser Umweltprobe zu gewinnen, wurden die drei besten Sequenzen ausgewählt und analysiert (Tabelle 3.8). Sie weisen auf eine große genetische Diversität der *Desulfovibrio*-Population hin und zeigten 77,6–87,8% Identität in der DNA-Sequenz untereinander. Die Sequenz MM10 wies die höchste Ähnlichkeit zu *Desulfovibrio sulfodismutans* auf. Die Sequenzen MM5 und MM8 zeigten etwa 80% Identität zu verschiedenen [NiFe] Hydrogenase-Gensequenzen anderer *Desulfovibrio*-Stämme.

Tabelle 3.8: Paarweiser Vergleich der [NiFe] Hydrogenase-Gensequenzen amplifiziert aus DNA einer mikrobiellen Matte (Texel, Holland). Oberhalb der Diagonalen wurden Ähnlichkeiten in der Nukleotidsequenz in % angegeben, unterhalb der Diagonalen Unterschiede in absoluten Zahlen. Angaben in Klammern geben die Länge der DNA-Sequenz an, die sequenziert wurde.

		1	2	3	4	5	6	7
1	MM5 (250 bp)	–	77,6	87,8	81,0	79,9	81,7	83,1
2	MM8 (340 bp)	55	–	77,7	73,7	68,6	73,7	72,7
3	MM10 (300 bp)	30	67	–	80,1	79,4	91,5	80,2
4	<i>D. baculatus</i> (362 bp)	46	78	66	–	77,6	76,1	78,7
5	<i>D. longus</i> (370 bp)	48	92	68	79	–	76,1	74,0
6	<i>D. sulfodismutans</i> (340 bp)	45	79	29	79	79	–	76,3
7	<i>D. vulgaris</i> Miyazaki (438 bp)	42	82	66	76	94	79	–

3.4 Untersuchung komplexer natürlicher Bakterienpopulationen

Neben den in den Abschnitten 3.1, 3.2 und 3.3 bereits vorgestellten Umweltproben wurden auch komplexere Ökosysteme untersucht. Dabei wurden umfassendere Studien unter Einbeziehung der chemischen Parameter, mikrobiologischer Beobachtungen und molekularbiologischer Untersuchungen der 16S rRNA-Gene durchgeführt. Im folgenden sind die Ergebnisse der Experimente, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, vergleichend mit den Ergebnissen der begleitenden Untersuchungen dargestellt.

3.4.1 Mariager Fjord, Dänemark

Mariager Fjord ist ein dänischer Fjord, der ein teilweise anoxisches Meeresbecken darstellt [50]. Solche Meeresbecken zeigen eine charakteristische chemische Zonierung [48]. Der Redoxgradient der Wassersäule spiegelt verschiedene Arten der Bakterienatmung wider: Er verläuft über Sauerstoffatmung, Denitrifikation, Mangan- und Eisenreduktion, Sulfatreduktion zur Methanogenese [87]. Bisher wird angenommen, daß oxidative Prozesse im oxischen Wasser und reduktive Prozesse, wie z. B. Sulfatreduktion, im anoxischen Wasser stattfinden. Diese Annahme wird jedoch durch neuere Untersuchungen in Frage gestellt. So konnten sowohl methanogene als auch sulfatreduzierende Bakterien aus oxischem Oberflächenwasser der Chesapeake Bay [196] angereichert werden und Sulfatreduktion wurde in Gegenwart von Sauerstoff in der Wassersäule von Cariaco Trench [71] nachgewiesen.

Im August 1993 fand eine Ausfahrt zum Mariager Fjord statt. Die mögliche Überlappung von aeroben und anaeroben Populationen sulfatreduzierender Bakterien in einer stratifizierten, d. h. in einen oxischen und anoxischen Teil gegliederten Wassersäule, sollte untersucht werden. Die Präsenz und Aktivität von *Desulfovibrio* spp. sollte mit

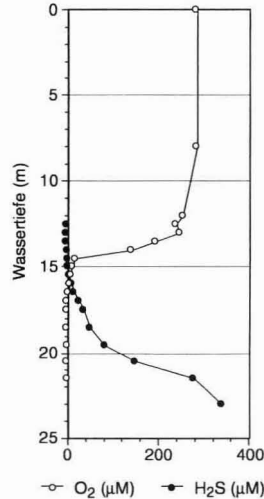


Abbildung 3.23: Konzentrationen von Sauerstoff und Schwefelwasserstoff in der Wassersäule vom Mariager Fjord, Dänemark (aus Ramsing et al. [167], modifiziert)

den entwickelten molekulargenetischen Verfahren nachgewiesen werden. Die auf dieser Ausfahrt gesammelten Daten wurden unter den Titeln "Distribution of bacterial populations in a stratified fjord (Mariager Fjord, Denmark) quantified by *in situ* hybridization and related to chemical gradients in the water column" [167] und "Distribution of sulfate-reducing bacteria in a stratified fjord (Mariager Fjord, Denmark) as evaluated by most-probable-number counts and denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified ribosomal DNA fragments" [212] publiziert.

Mariager Fjord ist mit der Ostsee über einen langen (> 20 km), engen (> 2 km) Zugang von weniger als 10 m Tiefe verbunden. Der zentrale Teil des Fjords ist ein Becken mit einer Wassertiefe von etwa 26 m. Der enge, flache Zugang limitiert den Austausch von oxygeniertem Wasser, sodaß das innere Becken ab 14 m Wassertiefe fast permanent anoxisch ist [128]. Proben wurden an der tiefsten Stelle des Fjords, etwa 1 km nördlich des Hafens Mariager, genommen.

Konzentrationsprofile von Sauerstoff und Sulfid (Abbildung 3.23) zeigten, daß der Sauerstoffgehalt ab etwa 14,5 m Wassertiefe abrupt abnahm. Nur Spuren von Sauerstoff (3–10 μM) wurden bis zu einer Tiefe von 16,5 m gefunden. Geringe Mengen an Sulfid (5–35 μM) konnten zwischen 15,5 m und 17,5 m Wassertiefe nachgewiesen werden. Der Sulfidgehalt stieg mit zunehmender Wassertiefe drastisch an auf ca. 400 μM in 23 m Tiefe. Als Chemokline wurde der Bereich der Wassersäule definiert, in dem Sauerstoff und Sulfid gleichzeitig in $\mu\text{molaren}$ Mengen auftraten (14–17,5 m Tiefe). Sulfatreduktionsraten konnten in der Wassersäule nicht bestimmt werden, da sie unterhalb der

Nachweisgrenze lagen [167].

3.4.1.1 Extraktion von Nukleinsäuren

200 ml Wasserproben wurden oberhalb der Chemokline in 8 m und 13 m, innerhalb der Chemokline in 14,5 m und 16 m und unterhalb der Chemokline in 20 m Wassertiefe genommen. Zusätzlich wurde eine Sedimentprobe aus 26 m Tiefe untersucht. Die Biomasse wurde durch Filtration konzentriert. Nukleinsäuren wurden von diesen Filtern direkt nach einem modifizierten Protokoll von Oelmüller et al. [143] isoliert. Diese Methode, die ursprünglich für die Isolation von RNA aus Bakterienkulturen beschrieben wurde, lieferte im Gegensatz zu anderen Methoden [56], die speziell für die Extraktion von Nukleinsäuren aus Umweltproben entwickelt wurden, eine äquivalente Ausbeute an DNA und als einzige Methode auch RNA.

Abbildung 3.24 zeigt die Auftrennung der Nukleinsäuren in einem Agarosegel. 1/10 Volumen des Gesamt-Extraktes aus 200 ml Seewasser bzw. 20 ml Sediment wurde aufgetragen. Im oberen Bereich des Gels war die hochmolekulare genomische DNA zu sehen. Die folgenden Doppelbanden stellten die ribosomale RNA dar. Dabei bestand die obere Doppelbande aus der rRNA der großen Untereinheit (LSU), der eukaryotischen 28S rRNA und der prokaryotischen 23S rRNA, die untere Doppelbande aus der rRNA der kleinen Untereinheit (SSU), der eukaryotischen 18S rRNA und der prokaryotischen 16S rRNA. Eukaryotische rRNA wurde nur aus oxygeniertem Wasserschichten oberhalb und in der Chemokline bis 14,5 m Tiefe isoliert. Prokaryotische rRNA hingegen wurde sowohl in oxischen als auch anoxischen Wasserschichten gefunden.

Der Vergleich der Intensitäten der angefärbten 16S rRNA-Banden zeigt ein Maximum an 16S rRNA in der Chemokline bei 14,5 m Wassertiefe. Dies wurde durch die gelelektrophoretische Analyse von weiteren Nukleinsäurepräparationen aus Wasserproben vom Mariager Fjord bestätigt. Eine Zunahme des 16S rRNA-Gehaltes der Zellen in der Chemokline war auch anhand der *in situ* Hybridisierungsintensitäten mit einer allgemeinen eubakteriellen 16S rRNA-Sonde erkennbar [167]. Die DNA-Konzentrationen waren in allen Wasserschichten etwa konstant bis auf einen leichten Anstieg in der Chemokline. Dies steht in Einklang mit der bestimmten Gesamt-Zellzahl ($> 10^6$ Zellen/ml), die in allen Wasserschichten ebenfalls nahezu gleich war [167].

3.4.1.2 Charakterisierung von sulfatreduzierenden Bakterien

DGGE Analyse von eubakteriellen 16S rRNA-Sequenzen. Für weitergehende Untersuchungen wurde die DNA in einem Teil der Nukleinsäurepräparationen enzymatisch abgebaut und die daraus resultierende RNA in cDNA umgeschrieben. Aus der DNA sowie der cDNA von Mariager Fjord Proben wurden DNA-Fragmente (ca. 590 bp plus 40 bp GC-Klammer) mit PCR-Primern, die spezifisch für eubakterielle 16S rRNA-Sequenzen sind, amplifiziert und in einem denaturierenden Gradientengel analysiert. Das komplexe Elektrophoresemuster der daraus resultierenden Banden ist in Abbil-

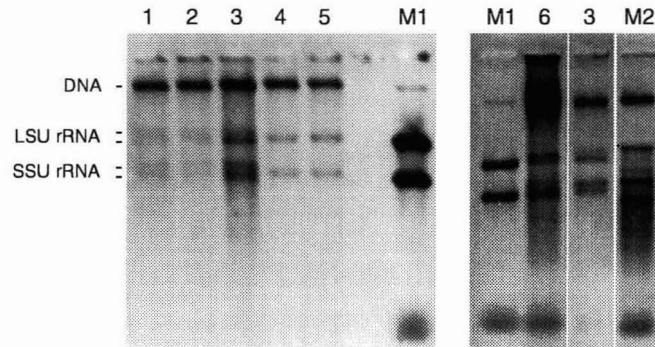


Abbildung 3.24: Analyse der Nukleinsäuren extrahiert von Mariager Fjord Wasserproben aus 8 m (Bahn 1), 13 m (Bahn 2), 14,5 m (Bahn 3), 16 m (Bahn 4) und 20 m (Bahn 5) Wassertiefe und einer Sedimentprobe (Bahn 6) in einem 1,5% (w/v) MOPS-Agarosegel. Je 5 μ l der 50 μ l-Präparationen wurden aufgetragen. In Bahn M1 wurde 1 μ g Gesamt-RNA von *Desulfovibrio baculatus* aufgetrennt, in Bahn M2 1,1 μ g DNA/RNA des Eukaryoten *Physarum polycephalum*. (Negatives Bild eines Ethidiumbromid-gefärbten Gels)

dung 3.25A gezeigt. Unterschiedliche Banden eines solchen DGGE Profils entsprechen amplifizierten DNA-Fragmenten unterschiedlicher Nukleotidsequenz, die in der Regel von unterschiedlichen Bakterienstämmen stammen [133, 135]. Die genetische Diversität von Eubakterien basierend auf den 16S rRNA-Genen (rDNA-Amplifikate) und der 16S rRNA (rRNA-Amplifikate) der Umweltprobe wurde so visualisiert.

Die DGGE-Muster lassen erkennen, daß bestimmte Banden in verschiedenen Wasserschichten auftauchen und verschwinden. Einige Banden traten in allen Wasserschichten auf (Bande 1), andere nur in oxischen Wasserschichten (Bande 2), in anoxischen Wasserschichten (Bande 3) oder in der Chemokline (Bande 4). Das Auftauchen und Verschwinden von Banden kann semiquantitativ als Zunahme und Abnahme der zu diesen DNA-Fragmenten gehörenden bakteriellen Populationen interpretiert werden [133]. Diese wichtige Voraussetzung zur Deutung der DGGE-Muster wird im folgenden näher erläutert.

Da der PCR-Technik, auf der eine DGGE Analyse basiert, eine exponentielle Amplifikation von DNA-Fragmenten zugrundeliegt, und verschiedene Sequenzen möglicherweise mit unterschiedlicher Effizienz amplifiziert werden [171, 208], lassen die Intensitäten von verschiedenen DNA-Banden keine quantitativen Rückschlüsse auf die Abundanz der zugehörigen Bakterienstämme zu. Betrachtet man eine Bande, die in allen Proben vorkommt, jedoch als sogenannten internen Standard, und geht man davon aus, daß der "PCR-Fehler" unter denselben experimentellen Bedingungen konstant ist, können die sich verändernden Intensitäten von Banden relativ zu diesem internen Standard als Zu- und Abnahme der zu diesen Banden gehörenden Populationen aufgefaßt werden.

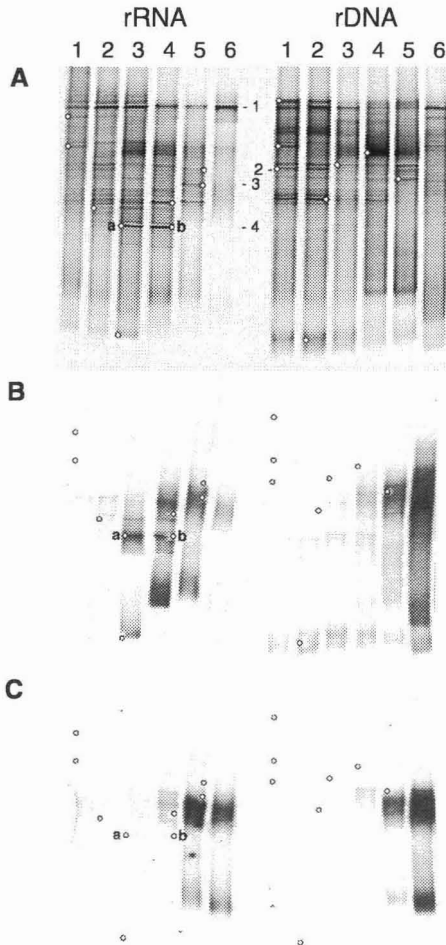


Abbildung 3.25: Mariager Fjord. (A) DGGE Analyse der 16S rRNA-Sequenzen aus Nukleinsäuren extrahiert von Proben aus 8 m (Bahn 1), 13 m (Bahn 2), 14,5 m (Bahn 3), 16 m (Bahn 4) und 20 m (Bahn 5) Wassertiefe und einer Sedimentprobe (Bahn 6). rRNA: PCR-Produkte nach Amplifikation von RNA, die zuvor in cDNA umgeschrieben wurde, mit Primerpaar GM5fGC-DS907r; rDNA: PCR-Produkte nach Amplifikation von DNA mit GM5fGC-DS907r. (Negatives Bild eines Ethidiumbromid-gefärbten Gels) (B) Southern Blot des Gels hybridisiert mit der Sonde SRB385. (C) Southern Blot des Gels hybridisiert mit der Sonde Db804. (Kreise markieren die Positionen von Banden des Ethidiumbromid-gefärbten Elektrophoresemusters.)

Vergleicht man die DGGE-Muster der PCR-Produkte, die ausgehend von DNA entstanden sind, mit denen, die ausgehend von RNA entstanden sind, sieht man deutliche Unterschiede. Einige Banden waren ausschließlich entweder in dem rRNA-Muster (Bande 4) oder dem rDNA-Muster (Bande 2) sichtbar oder unterschieden sich beträchtlich in der Intensität. Die Banden a und b, die in Wasserproben aus der Chemokline auftraten, erschienen dominant in dem DGGE-Muster der amplifizierten rRNA, waren aber nur schwach sichtbar in dem DGGE-Muster der amplifizierten rRNA-Genfragmente (rDNA).

Da metabolisch aktive Zellen einen höheren rRNA-Gehalt haben als inaktive, ruhende Zellen [109, 159, 179], könnten die rRNA-DGGE-Banden metabolisch aktive Bakterienpopulationen des Mariager Fjord darstellen, während die rDNA-DGGE-Banden die vorhandenen eventuell weniger aktiven oder ruhenden, aber abundanten Populationen repräsentieren. Ein Vergleich der DGGE-Banden mit identischer gelelektrophoretischer Mobilität, die ausgehend von DNA bzw. RNA entstanden sind, setzt verschiedene Annahmen voraus: 1. Die Ausbeute an cDNA spiegelt den rRNA-Gehalt wider. 2. Die PCR-Amplifikation genomischer DNA-Sequenzen und der korrespondierenden RNA-Sequenzen, die in cDNA umgeschrieben wurden, erfolgt annähernd mit der gleichen Effizienz. 3. Die Amplifikation bestimmter DNA-Sequenzen sollte nicht durch andere vorhandene Sequenzen beeinflusst werden.

Analyse der DGGE-Muster durch Hybridisierung. Um die Banden der DGGE-Muster zu identifizieren, die von DNA-Fragmenten sulfatreduzierender Bakterien stammen, wurden die gelelektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmente auf eine Nylonmembran übertragen und mit spezifischen 16S rRNA-gerichteten Oligonukleotidsonden hybridisiert. Die Sonde SRB385 wurde ursprünglich für Gram-negative sulfatreduzierende Bakterien der δ -Proteobakterien entworfen [4] und deckt diese Bakteriengruppe trotz einer Fehlpaarung in Position 395 der 16S rRNA-Sequenz, z. B. bei Mitgliedern der Genera *Desulfobacter* und *Desulfobacterium*, unter den gewählten Bedingungen vermutlich komplett ab. Die Sonde Db804 ist spezifisch für die vollständig oxidierenden sulfatreduzierenden Bakterien der Genera *Desulfobacter*, *Desulfobacterium* und *Desulfosarcina variabilis* und die Stämme *Desulfococcus multivorans* und *Desulfobotulus sapovorans*; die Sonde Dv687 ist spezifisch für die Gattung *Desulfovibrio* [42]. Die Hybridisierungen mit den Sonden SRB385 und Db804 sind in Abbildung 3.25B und Abbildung 3.25C gezeigt; Hybridmoleküle wurden über eine Chemilumineszenzreaktion auf Röntgenfilmen detektiert.

Die Sonde SRB385 zeigte nur schwache Hybridisierungssignale mit rRNA-Amplifikaten (Abbildung 3.25B) aus oxischen Wasserschichten in 8 m und 13 m Wassertiefe, aber starke Hybridisierungssignale mit Banden in der Chemokline, aus 14,5 m und 16 m Wassertiefe. Zwei dieser Banden sind mit a und b gekennzeichnet. Sie wiesen die gleiche Position im Gradientengel auf. Die anoxischen Wasserschichten in 20 m Tiefe und die Sedimentprobe zeigten intensive, aber diffuse Hybridisierungssignale. Dies ist entweder auf eine große Anzahl verschiedener Organismen, deren PCR-Produkte nicht optimal im Gradientengel aufgetrennt wurden, zurückzuführen oder auf Organismen, deren PCR-Produkte trotz GC-Klammer kein stabiles Schmelzverhalten zeigten, so-

daß einzelsträngige DNA, die vermutlich über die gesamte Bahn verteilt ist, mit der Sonde hybridisierte. Ein ähnliches Muster zeigten die Hybridisierungssignale der rDNA-Amplifikate (Abbildung 3.25B). Die Banden a und b waren jedoch nur schwach sichtbar (vergleiche Abbildung 3.25A). Das könnte bedeuten, daß die zu diesen Banden gehörenden Organismen der Chemokline sehr aktiv, aber nicht zahlreich vertreten waren.

Hybridisierungssignale mit der Sonde Db804 wurden nur in Wasserproben, die unterhalb der Chemokline genommen wurden, gefunden (Abbildung 3.25C). Da es sich um eine spezifischere Sonde handelt, hybridisierte erwartungsgemäß weniger DNA mit dieser Sonde verglichen mit der allgemeinen Sonde SRB385. Die Banden a und b hybridisierten nicht mit dieser Sonde. Hybridisierungen mit der Sonde Dv687 zeigten sehr schwache Hybridisierungssignale in Proben aus 16 m und 20 m Wassertiefe. In wiederholten Experimenten wurden ungewöhnlich schwache Hybridisierungssignale zum Teil auch mit den positiven Kontrollen erhalten. Daher wurde auf eine weitere Verwendung dieser Sonde verzichtet.

Generell war eine Zunahme der Hybridisierungsintensitäten mit zunehmender Wassertiefe zu beobachten. Dieses Ergebnis konnte durch *in situ* Hybridisierungen mit der Sonde SRB385 bestätigt werden; innerhalb der Chemokline wurden 5×10^4 Zellen pro ml gezählt, unterhalb der Chemokline bis zu 2×10^5 Zellen pro ml [167]. Leider konnte die Sonde Db804 nicht für *in situ* Hybridisierungen verwendet werden, da Referenzzellen nicht effizient angefärbt wurden [167].

Die Anzahl kultivierbarer sulfatreduzierender Bakterien der Wassersäule des Mariager Fjords wurde über Most-Probable-Number (MPN)-Verdünnungsreihen bestimmt [212]. Laktat, Acetat und Wasserstoff plus Acetat wurden als Substrate verwendet. Die Ergebnisse spiegeln ebenfalls die Ergebnisse der Hybridisierungen wider. Die Zellzahlen nahmen unterhalb der Chemokline in anoxischen Wasserschichten zu. MPN-Zählungen mit Laktat ergaben etwa 25 Zellen pro ml in oxischen Wasserschichten, etwa 250 Zellen pro ml in anoxischen Wasserschichten unterhalb der Chemokline und 10^5 – 10^6 Zellen pro ml im Sediment. Eine ähnliche Verteilung wurde für MPN-Zählungen mit Wasserstoff plus Acetat gefunden. Nur 10–30 Zellen pro ml Acetat-verwertender Bakterien wurden jedoch in 16 m und 20 m Wassertiefe gefunden, 10^3 – 10^4 Zellen pro ml im Sediment.

Sequenzierung von 16S rRNA-Sequenzen. Zur weiteren Identifizierung der amplifizierten 16S rRNA-Sequenzen wurden distinkte Banden, die nach Auftrennung in denaturierenden Gradientengelen mit Ethidiumbromid angefärbt waren, aus dem Gel ausgeschnitten, und die DNA eluiert. Da nur die Banden, die positiv mit den verwendeten Sonden hybridisierten, von Interesse waren, wurden nur die auffälligen Banden a und b des DGGE-Musters der rRNA-Amplifikate (Abbildung 3.25B) von Dr. Andreas Teske reamplifiziert und sequenziert. Die Sequenzen der beiden Banden waren identisch [212], was aufgrund der gleichen elektrophoretischen Mobilität im denaturierenden Gradientengel bereits vermutet wurde.

Die Sequenz wurde mit anderen 16S rRNA-Sequenzen verglichen und phylogenetisch eingeordnet [212]. Sie wurde als δ -Proteobakteriensequenz identifiziert, ließ sich allerdings keiner der bekannten phylogenetischen Zweige der δ -Proteobakterien zuord-

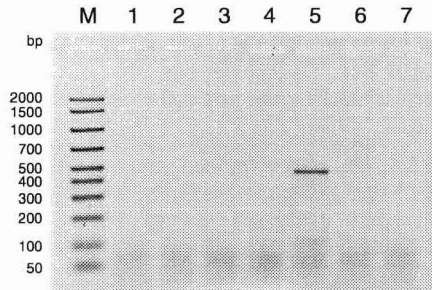


Abbildung 3.26: Mariager Fjord. Analyse der [NiFe] Hydrogenase-Genfragmente von *Desulfovibrio* spp. aus 8 m (Bahn 1), 13 m (Bahn 2), 14,5 m (Bahn 3), 16 m (Bahn 4) und 20 m (Bahn 5) Wassertiefe und einer Sedimentprobe (Bahn 6) in einem 2% (w/v) Agarosegel. Bahn M zeigt einen DNA-Größenstandard. (Negatives Bild eines Ethidiumbromid-gefärbten Gels)

nen und enthielt Fehlpaarungen zu allen bekannten Genus-spezifischen Oligonukleotidsequenzen für sulfatreduzierende Bakterien. 16S rRNA-Sequenzen, die aus MPN-Kulturen gewonnen wurden, waren nicht mit der Sequenz a/b verwandt; hier wurden nur Sequenzen ermittelt, die in die bekannten Gattungen sulfatreduzierender Bakterien wie *Desulfobulbus* und *Desulfovibrio* fielen [212].

3.4.1.3 Charakterisierung von *Desulfovibrio* spp.

Nukleinsäurepräparationen der Proben vom Mariager Fjord wurden verwendet, um die genetische Diversität von *Desulfovibrio* spp. durch den Nachweis und die Analyse von [NiFe] Hydrogenase-Genfragmenten zu beschreiben und die Expression des Gens in diesen Umweltproben aufzuzeigen.

Abbildung 3.26 zeigt die Analyse von [NiFe] Hydrogenase-Genfragmenten, die aus der DNA von Mariager Fjord Proben mit Primerpaar Hyd1f-Hyd5r amplifiziert wurden. Für die PCR (Endvolumen 50 μ l) wurden 1 μ l der Nukleinsäurepräparationen eingesetzt. PCR-Produkte, mit einer Größe von etwa 440 bp, waren nur in Proben aus 20 m Wassertiefe nachweisbar. Wurde die eingesetzte Menge an DNA auf 10 μ l der Nukleinsäurepräparationen erhöht, wurde ebenfalls nur in Proben aus 20 m Wassertiefe ein PCR-Produkt amplifiziert. Daraus können folgende Schlüsse gezogen werden: Entweder unterschieden sich die anderen Wasserschichten in der Anzahl der Bakterien der Gattung *Desulfovibrio* um mehr als eine Größenordnung, denn die Gesamt-Zellzahl war in allen Wasserschichten etwa gleich groß [167], und/oder es existierten unterschiedliche Populationen an *Desulfovibrio*-Stämmen in den verschiedenen Wasserschichten, die möglicherweise nicht mit dem verwendeten Primerpaar amplifiziert werden konnten. Aus DNA von zwei MPN-Kulturen, die aufgrund ihrer 16S rRNA-Sequenzen als

PCR-Produkte amplifiziert werden. Die 16S rRNA-Sequenzen dieser Kulturen zeigten große Verwandtschaft zu *Desulfovibrio salerigens* [212], ein Stamm von dem bekannt war, daß dessen [NiFe] Hydrogenase-Gen mit diesem Primerpaar nicht amplifiziert werden kann (vergleiche Tabelle 3.2). Andererseits lagen in MPN-Zählungen sulfatreduzierender Bakterien mit Laktat, einem charakteristischen Substrat für *Desulfovibrio* spp., die höchsten Zellzahlen mit mehr als 10^2 Zellen pro ml ebenfalls in 20 m Wassertiefe; in darüberliegenden Wasserschichten waren die Zellzahlen um bis zu eine Größenordnung geringer [212].

Das [NiFe] Hydrogenase-Gen konnte nicht aus DNA einer Sedimentprobe gewonnen werden. Auch hier führte eine Erhöhung der eingesetzten DNA-Menge nicht zur Amplifikation von PCR-Produkten. Da die eingesetzte DNA nicht aufgereinigt wurde, führte der Einsatz von $1\mu\text{l}$ der unverdünnten Nukleinsäurepräparationen sogar zur Hemmung der PCR. Dies wurde anhand des Primerpaares für die Amplifikation eubakterieller 16S rRNA-Genfragmente ermittelt. Nichtsdestotrotz ist das Ergebnis erstaunlich, da die Zellzahlen für sulfatreduzierende Bakterien, bestimmt durch MPN-Zählungen, im Sediment drastisch anstiegen [212].

Leider ergab die Oligonukleotidsonde Dv687, die spezifisch mit 16S rRNA-Sequenzen von *Desulfovibrio* spp. hybridisieren sollte, sowohl in Hybridisierungen von Southern Blots (siehe Abschnitt 3.4.1.2) als auch in *in situ* Hybridisierungen [167] keine zuverlässigen Ergebnisse. Versucht man allerdings die spärlichen Resultate, die mit dieser Sonde erzielt werden konnten, zu deuten, stehen sie sehr wohl in Einklang mit den Resultaten der spezifischen [NiFe] Hydrogenase-PCR. In Southern Blots hybridisierten nur 16S rRNA-Sequenzen aus 16 und 20 m Wassertiefe mit der Sonde, nicht die Sedimentprobe. In *in situ* Hybridisierungen konnten vereinzelt Zellen ab 18 m Wassertiefe mit der Sonde angefärbt werden; Sedimentproben wurden hier nicht untersucht [167].

Zur Charakterisierung der *Desulfovibrio*-Populationen wurde eine Verdünnungsreihe der PCR-Produkte der [NiFe] Hydrogenase-Gene aus 20 m Wassertiefe in einem denaturierenden Gradientengel aufgetrennt. Das Gel ist in Abbildung 3.27 gezeigt. Im Gegensatz zu allen bisher gezeigten Bildern von denaturierenden Gradientengelen konnten die [NiFe] Hydrogenase-PCR-Produkte nicht als distinkte Banden im Gel separiert werden. Die Anfärbung der DNA-Fragmente mit Ethidiumbromid zeigte eine diffuse Bande, wenn 100 bzw. 200 μl der PCR-Produkte aufgetragen wurden (Abbildung 3.27A, Bahn 3 und 4). Die Intensität der Färbung war extrem gering, bedenkt man, daß bereits 5 μl der PCR-Produkte in einem Agarosegel eine gut sichtbare DNA-Bande ergaben (vergleiche Abbildung 3.26). Diese Tatsache spricht dafür, daß die amplifizierten DNA-Fragmente trotz GC-Klammer kein stabiles Schmelzverhalten unter den denaturierenden Bedingungen im Gel hatten und vollständig denaturierten. Der Farbstoff Ethidiumbromid intercaliert hauptsächlich in doppelsträngige DNA-Moleküle und macht daher nur diese sichtbar. Eine Anfärbung des Gels mit Silbernitrat zeigte, daß DNA über die gesamte Bahn verteilt war (Abbildung 3.27B). Eine Untersuchung des Schmelzverhaltens dieser PCR-Produkte in perpendikulären denaturierenden Gradientengelen wäre sinnvoll, da es sich offensichtlich von allen bisher untersuchten [NiFe] Hydrogenase-Genfragmenten unterscheidet. Eine Interpretation des Elektrophoresemu-

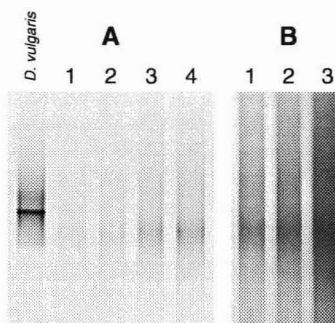


Abbildung 3.27: Mariager Fjord. DGGE Analyse der [NiFe] Hydrogenase-Genfragmente von *Desulfovibrio* spp. aus 20 m Wassertiefe. Es wurden 25 μ l (Bahn 1), 50 μ l (Bahn 2), 100 μ l (Bahn 3) und 200 μ l (Bahn 4) der PCR-Produkte, die zuvor auf 1/10 des Volumens reduziert wurden, aufgetragen. Als Standard wurden PCR-Produkte von *Desulfovibrio vulgaris* DSM 644 aufgetragen. ((A) Negatives Bild des Ethidiumbromid-gefärbten Gels, (B) Bild des Silber-gefärbten Gels)

Hydrogenase-Genfragmenten unterscheidet. Eine Interpretation des Elektrophoresemusters im Hinblick auf die Diversität der *Desulfovibrio*-Population war nicht möglich.

Weiterhin wurde RNA, die aus den Proben vom Mariager Fjord isoliert und in cDNA umgeschrieben wurde, in einer PCR mit dem spezifischen Primerpaar für *Desulfovibrio*-Stämme, Hyd1f-Hyd5r, eingesetzt. In keinem Ansatz konnten nach gelelektrophoretischer Auftrennung [NiFe] Hydrogenase-mRNA-Sequenzen nachgewiesen werden.

3.4.2 Golfo Dulce, Costa Rica

Zum Vergleich zu einer stratifizierten Wassersäule in der gemäßigten Zone wurde eine Wassersäule im tropischem Klima untersucht. Bisher wurden fünf tropische, anoxische Meeresbecken beschrieben, von denen eines der Golfo Dulce, Costa Rica ist. Die anderen sind Cariaco Trench und Golfo de Cariaco, Venezuela, Kau Bay, Indonesien und Darwin Bay, Galapagos-Inseln [215].

Im Januar 1994 fand eine Ausfahrt der *RV Viktor Hensen* zum Golfo Dulce, Costa Rica statt, u. a. sollte die Verteilung sulfatreduzierender Bakterien in der Wassersäule mit mikrobiologischen und molekularbiologischen Methoden beschrieben werden. Es wurde angenommen, daß die hohe Temperatur und der hohe Eintrag organischer Stoffe in den Golfo Dulce die mikrobiellen Prozesse stimulieren.

Golfo Dulce ist eine kleine, tropische Bucht an der Pazifikküste von Costa Rica. Die Bucht ist ca. 20 km breit und 50 km lang. An ihrer Mündung liegt in etwa 60 m Wassertiefe eine "Schwelle". Dahinter nimmt die Wassertiefe bis auf ca. 200 m zu. Im

tersucht. Die Beobachtungen von damals stimmen im wesentlichen überein mit denen, die Thamdrup et al. [215] im Januar 1994 machten.

Die Pycnokline, die Zone der größten Dichteänderung, lag bei 40 m Wassertiefe. Die photische, d. h. lichtdurchlässige Zone, erstreckte sich bis auf 30–40 m Wassertiefe. Sauerstoff war ab einer Wassertiefe von ca. 100 m nicht mehr nachweisbar ($< 3 \mu\text{M}$) und Sulfid wurde niemals über 180 m Wassertiefe detektiert ($< 0,5 \mu\text{M}$). Am 6. Januar 1994 wurden Sulfidkonzentrationen von 1, 5 und $7 \mu\text{M}$ in 180, 200 und 203 m Tiefe auf Station GD1, dem tiefsten Teil der Bucht, gemessen. 6 Tage später hingegen wurde an der gleichen Stelle ein Maximum von nur $0,7 \mu\text{M}$ Sulfid in 203 m Tiefe bestimmt. Richards et al. [173] fanden niedrige, aber signifikante Konzentrationen an Sulfid ($> 1 \mu\text{M}$) unterhalb von 180 m im gesamten Becken. Eine Chemokline, wo gegenläufige Gradienten von Sauerstoff und Sulfid aufeinandertreffen, existierte nicht. Sulfatreduktionsraten lagen in anoxischen Wasserschichten und auch im teilweise sulfidischem Tiefenwasser unterhalb der Nachweisgrenze. Im Sediment war Sulfatreduktion der dominante Prozeß, über den bis zu 100% des Kohlenstoffs mineralisiert wurden, z. B. auf Station GD1 [215]. Die Lage der Pycnokline oberhalb der Schwelle und die schwache Stratifizierung der Wassersäule unterhalb der Pycnokline erleichtert den Wasseraustausch zwischen dem Meeresbecken und dem Pazifik. Die schwache Stratifizierung der Wasserschichten unterhalb der Schwelle ist in anderen bekannten tropischen anoxischen Becken ähnlich [215].

3.4.2.1 Extraktion von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren wurden aus 500 ml Wasserproben, die in 20 m-Intervallen auf Station GD1 genommen wurden, und aus 0,5 g der oberen 5 mm eines Sedimentkernes isoliert. 1/10 Volumen der Nukleinsäurepräparationen verschiedener Wasserschichten und des Sediments wurden in einem Agarosegel analysiert. Genomische DNA war nur in den Proben des Oberflächenwassers und aus 20 m Wassertiefe als schwache Bande ($< 50 \text{ ng}$) sichtbar; RNA war in keiner der untersuchten Proben nachweisbar (Ergebnisse nicht gezeigt). Eine Untersuchung der RNA war daher nicht sinnvoll.

Die Gesamt-Zellzahlen waren über die gesamte Wassersäule konstant mit Ausnahme des Oberflächenwassers (Dr. Niels B. Ramsing, mündliche Mitteilung). Die Werte hierfür betragen allerdings nur etwa 5–20% der Zellzahlen im Mariager Fjord und lagen bei mehr als 10^6 Zellen pro ml im Oberflächenwasser und mehr als 10^5 Zellen pro ml in tieferen Wasserschichten. Diese Ergebnisse können die geringe Ausbeute an Nukleinsäuren erklären.

3.4.2.2 Charakterisierung von sulfatreduzierenden Bakterien

DGGE Analyse von eubakteriellen 16S rRNA-Sequenzen. Die Nukleinsäurepräparationen wurden verwendet, um eubakterielle 16S rRNA-Genfragmente in der PCR mit Primerpaar GM5fGC-DS907r zu amplifizieren. Trotz der geringen, nicht

quantifizierbaren Menge an DNA war die Amplifikation in allen untersuchten Proben erfolgreich. Die anschließende DGGE Analyse der PCR-Produkte zeigte ein Muster, das die Diversität der 16S rRNA-Genfragmente und der zugehörigen Bakterienstämme in der Wassersäule repräsentiert (Abbildung 3.28A). Die Anzahl der Banden nahm mit zunehmender Wassertiefe ab, was auf eine Abnahme der genetischen Diversität der Eubakterien hinweisen könnte.

Analyse der DGGE-Muster durch Hybridisierung. Die Hybridisierung der amplifizierten DNA-Fragmente des DGGE-Musters mit der allgemeinen Sonde SRB385 für sulfatreduzierende Bakterien der δ -Proteobakterien zeigte positive Hybridisierungssignale in allen Wasserschichten, mit sehr starken Signalen in oxischen Schichten bei 60 m und 80 m Wassertiefe und in der Sedimentoberfläche (Abbildung 3.28B).

Im Gegensatz dazu ergab die Hybridisierung mit der spezifischeren Sonde Db804 (hauptsächlich für vollständig oxidierende sulfatreduzierende Bakterien) keine positiven Hybridisierungssignale in Proben aus der Wassersäule und nur ein extrem schwaches Signal mit der Sedimentprobe (Abbildung 3.28C). Kontrollen bestehend aus amplifizierten 16S rRNA-Genfragmenten von *Desulfobacterium vacuolatum*, die mit beiden Sonden reagieren sollten, waren positiv; Kontrollen mit 16S rRNA-Genfragmenten der nicht-sulfatreduzierenden Bakterien *Escherichia coli* und *Alcaligenes eutrophus* waren negativ.

Zur Zählung von kultivierbaren sulfatreduzierenden Bakterien wurden von Dr. Rolf Lillebæk MPN-Verdünnungsreihen angelegt: Proben aus dem Oberflächenwasser, 100 m und 200 m Wassertiefe sowie der oberen 8 cm (0–3 cm und 5–8 cm) des Sediments wurden untersucht [103]. MPN-Zählungen Laktat-oxidierender Bakterien ergaben etwa 7 Zellen pro ml im Oberflächenwasser sowie in 200 m Wassertiefe und mehr als 10^3 Zellen pro ml im Sediment. MPN-Zählungen mit Acetat als Substrat zeigten 1,5 Zellen pro ml im Oberflächenwasser, 3,8 Zellen pro ml in 200 m Wassertiefe und mehr als 10^2 Zellen pro ml im Sediment. Auf Wasserstoff ohne zusätzlicher Kohlenstoffquelle konnte kein Wachstum sulfatreduzierender Bakterien aus Proben der Wassersäule beobachtet werden; im Sediment wurden mehr als 10^2 Zellen pro ml bestimmt. In Proben aus 100 m Wassertiefe wurde mit allen Substraten kein Wachstum sulfatreduzierender Bakterien gefunden. Dies ist möglicherweise auf die starke Klumpung von Zellen in dieser Wassertiefe zurückzuführen (Dr. Niels B. Ramsing, mündliche Mitteilung). Ebenso wie in oxischen Wasserschichten des Mariager Fjords waren auch im Golfo Dulce sulfatreduzierende Bakterien im oxygenierten Wasser in geringer Anzahl vorhanden. Im Sediment nahm die Anzahl der SRB drastisch zu, lag aber unterhalb der für ein tropisches System mit terrestrischem Eintrag erwarteten Werte [103] und auch weit unterhalb der Werte, die für Sedimentproben vom Mariager Fjord ermittelt wurden [212].

Die geringe Anzahl sulfatreduzierender Bakterien in der Wassersäule, die vermutlich unterhalb der Nachweisgrenze durch die gewählte molekularbiologische Herangehensweise lagen, sowie die starken Hybridisierungssignale mit der Sonde SRB385 mit DNA-Fragmenten aus oxischen Wasserschichten lassen vermuten, daß die Sonde mit nicht-sulfatreduzierenden Bakterien hybridisierte. Es ist bekannt, daß die Sequenz der Sonde SRB385 auch in 16S rRNA-Sequenzen von nicht-sulfatreduzierenden Bakterien der

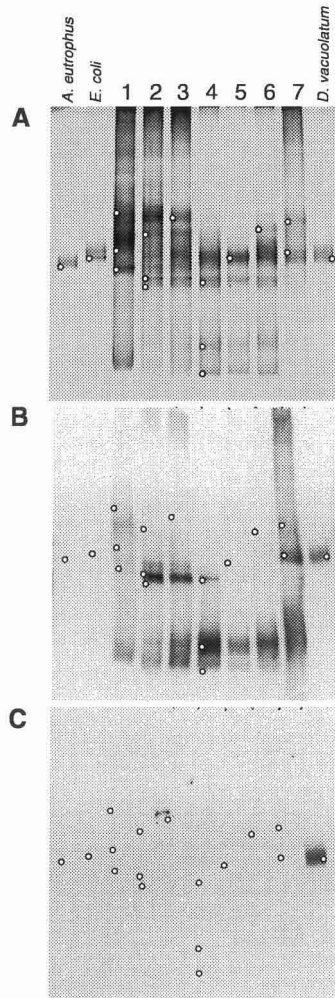


Abbildung 3.28: GolfoDulce. (A) DGGE Analyse der amplifizierten 16S rRNA-Genfragmente aus DNA extrahiert von Proben aus 20 m (Bahn 1), 60 m (Bahn 2), 80 m (Bahn 3), 120 m (Bahn 4), 160 m (Bahn 5) Wassertiefe, dem Tiefenwasser (Bahn 6) und einer Sedimentprobe (Bahn 7). Als Kontrollen dienten PCR-Produkte von *Alcaligenes eutrophus*, *Escherichia coli* und *Desulfobacterium vacuolatum*. (Negatives Bild eines Ethidiumbromid-gefärbten Gels). (B) Southern Blot des Gels hybridisiert mit der Sonde SRB385. (C) Southern Blot des Gels hybridisiert mit der Sonde Db804. (Kreise markieren die Positionen von Banden des Ethidiumbromid-gefärbten DGGE-Musters.)

δ -Proteobakterien vorkommt. Diese sind aber zum größten Teil typische Bodenorganismen [167]. Bedenklich ist allerdings, daß bei den gewählten Hybridisierungsbedingungen eine Fehlpaarung in der Sondensequenz nicht unterschieden werden kann und ein positives Hybridisierungssignal ergibt (wie z. B. mit 16S rRNA-Genfragmenten von *Desulfobacterium vacuolatum*). Es macht keinen Sinn, an dieser Stelle all die Bakterienstämme aufzuzählen, die eine Fehlpaarung in einer beliebigen Position mit der Sondensequenz haben, da diese sehr zahlreich sind. Hinweisen möchte ich nur auf verschiedene fakultativ aerobe Stämme der Gattung *Campylobacter* und phototrophe Bakterien der Gattung *Chlorobium* [164], die man in aquatischen Habitaten vorfindet. Anhand der Hybridisierungsergebnisse der Proben des Golfo Dulce wird deutlich, daß eine eindeutige Identifizierung von amplifizierten 16S rRNA-Sequenzen aus Umweltproben erst durch eine anschließende Sequenzierung möglich wird.

3.4.2.3 Charakterisierung von *Desulfovibrio* spp.

Zur Charakterisierung von *Desulfovibrio*-Populationen wurden Nukleinsäurepräparationen von Proben des Golfo Dulce mit Primerpaar Hyd1f-Hyd5r in einer PCR verwendet. PCR-Produkte des [NiFe] Hydrogenase-Gens, mit einer Größe von etwa 440 bp, waren in Proben des Tiefenwassers nachweisbar und überraschend auch in Proben des Oberflächenwassers. Eine Variation der eingesetzten Menge an DNA führte nicht zu PCR-Produkten in Proben aus anderen Wasserschichten oder Sedimentproben.

Die anschließende DGGE Analyse der PCR-Produkte sollte Aufschluß über die Diversität der nachgewiesenen Populationen geben. Sie ist in Abbildung 3.29 dargestellt. Wie bereits für die [NiFe] Hydrogenase-PCR-Produkte vom Mariager Fjord ausführlich beschrieben (Abschnitt 3.4.1.3), zeigten auch diese PCR-Produkte vermutlich kein stabiles Schmelzverhalten, sodaß eine klare Auftrennung von DNA-Banden im denaturierenden Gel nicht möglich war. Besonders deutlich war dies bei der Auftrennung der PCR-Produkte aus DNA des Oberflächenwassers zu erkennen (Bahn 1–4). PCR-Produkte aus DNA des Tiefenwassers (Bahn 5) ergaben mehrere, diffuse Banden im oberen Bereich des Gels sowie vier eng beieinanderliegende Banden weiter unten im Gel (Pfeile markieren deren Positionen, Abbildung 3.29). Eine Interpretation des Elektrophoresemusters im Hinblick auf die genetische Diversität der *Desulfovibrio*-Population erscheint daher schwierig. Eine Identifizierung einzelner Banden des Gels durch Sequenzierung wurde aufgrund der relativ schlechten Auflösung der Banden nicht durchgeführt.

Allerdings wurde versucht, das interessante PCR-Produkt aus DNA des Oberflächenwassers direkt zu sequenzieren, obwohl nicht klar war, ob das PCR-Produkt nur aus einer Sequenz besteht. Die Qualität der daraus resultierenden Sequenz war nicht gut. Sie enthielt viele unbestimmbare Basen, was vermutlich auf überlappende Bereiche mit weiteren Sequenzen zurückzuführen ist. Eine eindeutige Identifizierung der Sequenz war daher nicht möglich.

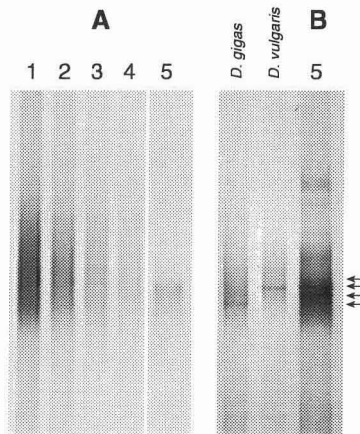


Abbildung 3.29: Golfo Dulce. DGGE Analyse der [NiFe] Hydrogenase-Genfragmente von *Desulfovibrio* spp. aus dem Oberflächenwasser (Bahn 1–4) und dem Tiefenwasser (Bahn 5). Es wurden 100 μl (Bahn 1), 50 μl (Bahn 2), 25 μl (Bahn 3), 12,5 μl (Bahn 4) und 50 μl (Bahn 5) der PCR-Produkte aufgetragen. Als Standard wurden PCR-Produkte von *Desulfovibrio vulgaris* DSM 644 und *Desulfovibrio gigas* aufgetragen. ((A) Negatives Bild des Ethidiumbromid-gefärbten Gels, (B) Bild des Silbergefärbten Gels)

3.4.3 Solar Lake, Sinai

Solar Lake ist ein hypersaliner Wüstensee am Roten Meer im Sinai, der benthische mikrobielle Matten ausbildet. Als mikrobielle Matten bezeichnet man geschichtete Mikrobengemeinschaften, die gewöhnlich in der obersten Schicht Cyanobakterien enthalten, phototrophe Bakterien in darunterliegenden Schichten und organotrophe, besonders sulfatreduzierende Bakterien in unteren Schichten [15, 203]. Die filamentösen Cyanobakterien sind eng mit Sedimentpartikeln sowie den anderen Mikroorganismen assoziiert und bilden eine zusammenhängende widerstandsfähige Matrix aus. Die vertikale Zonierung von Elektronendonatoren und Elektronenakzeptoren und die damit verbundene Zonierung mikrobieller Prozesse ähneln in solchen mikrobiellen Matten der Zonierung in stratifizierten Wassersäulen. Im Gegensatz zu stratifizierten Wassersäulen, in denen sich das Redoxgradientensystem über mehrere Meter erstreckt, finden Veränderungen der mikrobiellen Prozesse in mikrobiellen Matten innerhalb von wenigen Millimetern statt, und die Redoxgradienten wechseln im Tag-Nacht-Rhythmus von hoher Sauerstoffsättigung zu Anoxia [203].

In marinen Cyanobakterienmatten wurden sowohl die bisher höchsten Sulfatreduktionsraten, in der Größenordnung von 500–15000 $\text{nmol Sulfat pro cm}^3$ pro Tag, als auch die höchsten bekannten Zelldichten sulfatreduzierender Bakterien, ca. 10^6 – 10^8 Zellen pro

cm³ in den oberen 5–10 mm der Matte gefunden [22, 23, 55, 83, 227]. Bemerkenswert hohe Sulfatreduktionsraten wurden auch in den oxischen Schichten der Cyanobakterienmatten gemessen.

Im Juni und November 1994 fanden Exkursionen zum Solar Lake statt, deren Ziel u. a. die Charakterisierung der sulfatreduzierenden Bakterien in den oberen, am Tage Sauerstoff-gesättigten Schichten der Cyanobakterienmatten mit mikrobiologischen und molekularbiologischen Methoden war [214]. Dr. Andreas Teske stellte mir freundlicherweise Sedimentkerne dieser Matten zur Verfügung, die im November 1994 genommen worden waren. Mit diesem Material sollte die genetische Diversität von *Desulfovibrio* spp. anhand des [NiFe] Hydrogenase-Gens sowie die metabolische Aktivität über die Expression des Gens bestimmt werden. Aufgrund der hohen Sulfatreduktionsraten lag die Vermutung nahe, daß sulfatreduzierende Bakterien extrem aktiv sein müssen.

3.4.3.1 Extraktion von Nukleinsäuren

Der erste und grundlegende Schritt der Analyse von Umweltproben mit molekularbiologischen Methoden ist die Extraktion von Nukleinsäuren. Dies erwies sich bei Proben der Cyanobakterienmatten vom Solar Lake als relativ schwierig. In Abbildung 3.30 ist die gelelektrophoretische Analyse von Nukleinsäurepräparationen, die mit verschiedenen Methoden³ extrahiert wurden, dargestellt.

Mit der bis dahin für Umweltproben erfolgreich verwendeten Methode, ein modifiziertes Protokoll nach Oelmüller et al. [143], konnten aus frischem Mattenmaterial keine Nukleinsäuren gewonnen werden. Wurde das Mattenmaterial zunächst in flüssigem Stickstoff eingefroren und pulverisiert, konnte DNA isoliert werden (Bahn 2). Die Ausbeute war aber im Hinblick auf die Biomasse extrem gering. Bei einer anderen klassischen Extraktionsmethode für RNA, wurde das stark denaturierend wirkende, Ribonukleasen-inhibierende Guanidinium-Isothiocyanat verwendet [25, 80, 154]. Ein zusätzlicher mechanischer Aufschluß der Zellen erfolgte in einem "bead beater". Die Anwendung dieser Methode auf frisches Mattenmaterial führte zu einem braunen, schwer in Wasser löslichen Pellet, das keine Nukleinsäuren enthielt (Bahn 4). Eine Extraktion von Nukleinsäuren mit herkömmlichen Methoden blieb möglicherweise erfolglos, da die mikrobielle Matte einen hohen Anteil an Polysacchariden und weiteren Stoffen enthielt. Daher wurde eine Methode basierend auf dem Detergens CTAB benutzt, das Polysaccharide komplexiert. Diese Methode hat sich für die Extraktion von DNA aus Pflanzenmaterial, welches oft störende Bestandteile enthält, bewährt [47]. Das Mattenmaterial wurde vorher lyophilisiert und lag dann als Pulver vor. Auf diese Weise konnte zwar die Ausbeute an Nukleinsäuren erhöht werden, deren Qualität entsprach jedoch nicht den gewünschten Vorstellungen, da sie zum Teil abgebaut waren (Bahn 7).

Dann wurden Nukleinsäuren entsprechend einem Protokoll für Sedimentproben [162], in denen die Bakterien wie in der Matte an Partikel gebunden sind, ausprobiert. Der Zellaufschluß von gefrorenem Mattenmaterial erfolgte dabei mit einem "bead beater"

³Die verwendeten Methoden sind ausführlich in Abschnitt 2.7.4.2 beschrieben.

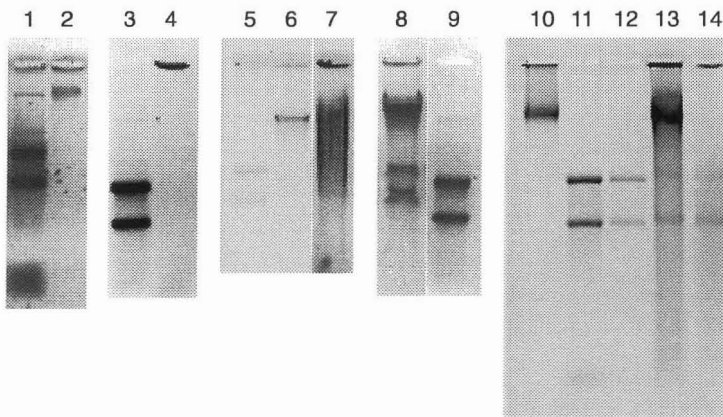


Abbildung 3.30: Gelelektrophoretische Analyse von Nukleinsäurepräparationen, die mit verschiedenen Methoden aus Mattenmaterial vom Solar Lake erhalten wurden, in 1,5% (w/v) MOPS-Agarosegelen. Extraktion nach Oelmüller et al. [143], modifiziert (Bahn 2); Extraktion mit Guanidinium-Isothiocyanat [25, 80, 154] (Bahn 4); Extraktion mit CTAB [47] (Bahn 7); Extraktion nach Purdy et al. [162] (Bahn 8); Extraktion nach Purdy et al. [162], modifiziert (Bahn 13), nach Abbau der DNA (Bahn 14). Die aufgetragenen Volumen der Nukleinsäurepräparationen entsprechen der Ausbeute aus etwa 100 μg Mattenmaterial. Folgende Standards wurden aufgetragen: 1 μg (Bahnen 1, 3, 9), 500 ng (Bahn 11), 100 ng (Bahn 5, 12) Gesamt-RNA und 200 ng (Bahn 5), 500 ng (Bahn 10) DNA aus *Desulfovibrio baculatus*. (Negative Bilder von Ethidiumbromid-gefärbten Gelen)

in einer Phenollösung. Die anschließende Fällung der Nucleinsäuren wurde mit Ethanol durchgeführt und resultierte in einem dicken, weißen Pellet, das relativ leicht in Wasser zu lösen war. Mit dieser Methode konnte DNA und erstmals auch RNA isoliert werden (Bahn 8). Die Ausbeute war sehr gut. Durch den weißen Niederschlag, der bei der Ethanolfällung entstanden war, waren die Nucleinsäuren jedoch stark verunreinigt und für anschließende enzymatische Behandlungen unbrauchbar. Bei der Aufreinigung der Nucleinsäurepräparationen mit Hydroxylapatit gingen die Nucleinsäuren allerdings verloren.

Weitere Versuche zeigten, daß die Entstehung des weißen Niederschlags durch eine Fällung der Nucleinsäuren mit Isopropanol anstelle von Ethanol verhindert werden kann. Im folgenden wurde die oben genannte Methode dementsprechend modifiziert. Auf die Verwendung des "bead beaters" wurde aus praktischen Gründen verzichtet, da damit maximal drei Proben parallel bearbeitet werden können. Stattdessen wurde lyophilisiertes Mattenmaterial mit Glasperlen und Extraktionspuffer versetzt und gründlich gevortext. So konnte eine zufriedenstellende Ausbeute an hochmolekularer DNA und weitgehend intakter RNA erzielt werden (Bahn 13); pro g Mattenmaterial (Naßgewicht) wurden $> 30 \mu\text{g}$ Nucleinsäuren isoliert. RNA wurde aus diesen Präparationen durch den Verdau mit DNase gewonnen (Bahn 14).

3.4.3.2 Charakterisierung von *Desulfovibrio* spp.

Das [NiFe] Hydrogenase-Gen konnte mit Primerpaar Hyd1f-Hyd5r aus etwa 100 ng DNA, isoliert aus Mattenmaterial der oberen 3 cm der Cyanobakterienmatte, amplifiziert werden. Abbildung 3.31 zeigt die Auftrennung der [NiFe] Hydrogenase-PCR-Produkte in einem 2% (w/v) Agarosegel. Wurde allerdings $1 \mu\text{g}$ DNA dieser Umweltprobe eingesetzt, konnten keine PCR-Produkte amplifiziert werden. Dies weist auf Verunreinigungen in der Nucleinsäurepräparation hin, die die PCR inhibierten [74, 188, 204, 205]. [NiFe] Hydrogenase-mRNA-Sequenzen konnten nicht nachgewiesen werden. Die Ursache dafür könnte in der Nucleinsäurepräparation liegen, die möglicherweise nicht rein genug war, um eine effiziente cDNA-Synthese zu gewährleisten. Andererseits war der enzymatische Abbau der DNA problemlos, und die Probe wurde durch diesen zusätzlichen Schritt nochmals gewaschen. Auch die Tatsache, daß die Mattenproben nach der Probennahme während des Transports gekühlt wurden, also für etwa 3 Tage nicht unter optimalen *in situ* Bedingungen gehalten wurden, könnte zu einer verringerten Aktivität sulfatreduzierender Bakterien geführt haben.

Um einen Eindruck über die genetische Diversität der *Desulfovibrio*-Stämme, die in der Cyanobakterienmatte vorkommen, zu erhalten, wurden [NiFe] Hydrogenase-PCR-Produkte aus DNA, die nur mit einer geringen Ausbeute mit Primerpaar Hyd1fGC-Hyd5r amplifiziert werden konnten, in einem denaturierenden Gradientengel aufgetrennt. Nach anschließender Ethidiumbromidfärbung waren keine DNA-Fragmente sichtbar, sodaß eine sensitivere Anfärbung des Gels mit Silbernitrat durchgeführt wurde. In Abbildung 3.32 ist das Ergebnis dargestellt.

Die [NiFe] Hydrogenase-Genfragmente gliederten sich in vier deutlich voneinander ge-

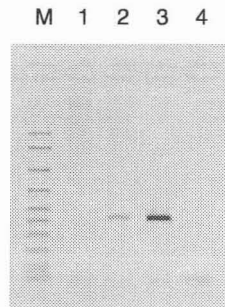


Abbildung 3.31: Gelelektrophoretische Analyse von PCR-Produkten, amplifiziert mit Primerpaar Hyd1f-Hyd5r, aus etwa 1 μg (Bahn 1) und 100 ng DNA (Bahn 2) einer Cyanobakterienmatte vom Solar Lake, Sinai in einem 2% (w/v) Agarosegel. Bahn M zeigt einen DNA-Größenmarker, Bahn 3 PCR-Produkte aus 100 ng DNA der Cyanobakterienmatte plus 20 ng DNA aus *Desulfovibrio gigas* und Bahn 4 die negative Kontrolle der PCR ohne DNA. (Negatives Bild eines Ethidiumbromid-gefärbten Gels)

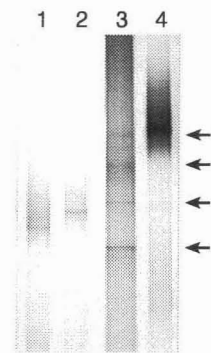


Abbildung 3.32: DGGE Analyse von [NiFe] Hydrogenase-Genfragmenten aus einer Cyanobakterienmatte vom Solar Lake, Sinai (Bahn 3). Als Standard wurden die [NiFe] Hydrogenase-Genfragmente von *Desulfovibrio gigas* (Bahn 1) *Desulfovibrio vulgaris* DSM 644 (Bahn 2) und PIB2 (Bahn 4) aufgetrennt. (Bild eines Silber-gefärbten Gels).

trennte Banden (Pfeile markieren deren Positionen im Gel), die erfahrungsgemäß zu vier verschiedenen *Desulfovibrio*-Stämmen gehören. Bemerkenswert ist, daß eine der Banden die gleiche Position im Gel einnahm wie das [NiFe] Hydrogenase-Genfragment von PIB2, einem *Desulfovibrio*-Stamm der aus den oberen Mattenschichten vom Solar Lake isoliert wurde [100]. Ob es sich tatsächlich, um identische DNA-Fragmente handelt, müßte durch eine anschließende Sequenzierung geklärt werden. Die Reamplifikation des DNA-Fragments und anschließende Auftrennung im Agarosegel könnte zuvor jedoch zeigen, ob die Größe mit der Größe des Hyd1f-Hyd5r-Fragments von PIB2 übereinstimmt, das mit etwa 470 bp etwas größer ist als die [NiFe] Hydrogenase-Genfragmente von anderen *Desulfovibrio*-Stämmen.

Kapitel 4

Diskussion

Natürliche Bakteriengemeinschaften werden zunehmend über die Analyse der DNA, die aus einer Umweltprobe extrahiert wurde, charakterisiert. Bakterien können durch die Hybridisierung mit spezifischen Sonden oder die Amplifikation charakteristischer DNA-Regionen nachgewiesen werden. Dabei bestimmt die Auswahl der untersuchten DNA-Region, welche Gruppe von Bakterien detektiert wird. Gewinnt man zusätzliche Informationen über die Nukleotidsequenz der nachgewiesenen DNA-Fragmente, können Rückschlüsse auf die Identität einzelner Bakterienstämme und die genetische Diversität innerhalb der Bakterienpopulation gezogen werden.

Der Nachweis und die Identifizierung von Bakterien wird auf die molekulare Ebene reduziert und ist dadurch nicht mehr von einer vorherigen Kultivierung und Isolierung der Bakterien abhängig. Gruppen von Bakterien und auch einzelne Bakterienstämme können in einem Gemisch von verschiedenen Bakterien, das natürliche Bakteriengemeinschaften kennzeichnet, untersucht werden. Man hofft, auf diese Weise die Struktur mikrobieller Lebensgemeinschaften besser und auch schneller beschreiben zu können. Werden die Untersuchungen auf die Analyse der RNA ausgedehnt, können Aussagen über die metabolische Aktivität individueller Bakterienpopulationen in ihrer natürlichen Umgebung gemacht werden, denn metabolisch aktive Zellen haben einen höheren rRNA-Gehalt und die Expression von Genen wird vorwiegend auf Transkriptionsebene reguliert. Man hofft, auf diese Weise die Funktion verschiedener Bakterienpopulationen in mikrobiellen Lebensgemeinschaften klären zu können.

In der vorliegenden Arbeit wurde die genetische Diversität sulfatreduzierender Bakterien der Gattung *Desulfovibrio* in Umweltproben anhand des [NiFe] Hydrogenase-Gens bestimmt. Die Untersuchungen beschränkten sich dabei nicht nur auf die DNA-Ebene. Metabolisch aktive *Desulfovibrio* spp. wurden durch den Nachweis und die Analyse der [NiFe] Hydrogenase-mRNA aufgezeigt. In komplexen mikrobiellen Lebensgemeinschaften wurde zusätzlich ein größeres Spektrum sulfatreduzierender Bakterien anhand von 16S rRNA-Sequenzen charakterisiert.

4.1 Nachweissystem für sulfatreduzierende Bakterien der Gattung *Desulfovibrio*

Als taxonomisches Merkmal für die Gattung *Desulfovibrio* der sulfatreduzierenden Bakterien wurde das [NiFe] Hydrogenase-Gen verwendet, da alle bisher untersuchten Stämme dieser Gruppe dieses Gen aufwiesen [232]. Zudem hatten Voordouw et al. [211, 232] bereits gezeigt, daß mittels einer [NiFe] Hydrogenase-Gensonde der Nachweis von *Desulfovibrio* spp. in Anreicherungen von sulfatreduzierenden Bakterien möglich ist, und [NiFe] Hydrogenase-Gene von *Desulfovibrio gigas*, *Desulfovibrio vulgaris* und *Desulfovibrio fructosovorans* waren sequenziert worden [38, 110, 180, 231]. Ein PCR-Test, mit dem spezifisch die Genfragmente dieser Bakteriengruppe amplifiziert werden können, wurde in der vorliegenden Arbeit zum Nachweis der Bakterien in Umweltproben entwickelt. Die Amplifikation charakteristischer Gensequenzen ist eine sehr sensitive Methode, um Bakterien nachzuweisen und ermöglicht zudem eine anschließende Analyse der Nukleotidsequenzen der amplifizierten DNA-Fragmente, um die zugehörigen Bakterien zu identifizieren.

Als Ergänzung wurde auch der Nachweis von *Desulfovibrio* spp. über die Hybridisierung mit [NiFe] Hydrogenase-Gensonden und die Kreuzreaktion mit [NiFe] Hydrogenase-Antikörpern untersucht. Die geringe Spezifität der Hybridisierungen (Abschnitt 3.1.3) und der Kreuzreaktionen (Abschnitt 3.1.4, [97]) beschränken allerdings die Anwendung dieser Methoden zum Nachweis von *Desulfovibrio* spp.: Interspezifische Kreuzreaktionen und Hybridisierungen kommen vor, und eine Unterscheidung und Identifizierung verschiedener Bakterienstämme anhand der angefärbten Banden ist nicht möglich.

In der PCR konnten [NiFe] Hydrogenase-Genfragmente von allen untersuchten *Desulfovibrio*-Stämmen mit verschiedenen Primerpaaren, deren Sequenzen auf fünf Consensusregionen in drei *Desulfovibrio* spp. basierten, amplifiziert werden (Abschnitt 3.1.1). Die meisten *Desulfovibrio*-Stämme zeigten mit allen Primerpaaren positive Ergebnisse. Dies galt auch für einen neuen sulfatreduzierenden Bakterienstamm, PIB2. Die Vermutung, daß dieser Stamm der Gattung *Desulfovibrio* angehört, wurde durch die spätere Klassifizierung dieses Isolats als *Desulfovibrio oxyclini* bestätigt [100]. Hydrogenasen sulfatreduzierender Bakterien aus anderen Gattungen wurden durch die Primer nicht erfaßt, mit Ausnahme von *Desulfosarcina variabilis* und *Desulfoarculus baarsii*. Ein weiterer neuer sulfatreduzierender Bakterienstamm, LTK4, der als Spezies einer neuen Gattung, *Desulforhopalus vacuolatus*, klassifiziert wurde [78], zeigte ebenfalls keine PCR-Produkte.

Die verwendeten Primerpaare unterschieden sich in ihrer Spezifität bei der Amplifikation des [NiFe] Hydrogenase-Gens (Abschnitt 3.1.2). Aus DNA des Stammes *Desulfovibrio salexigens* konnte beispielsweise ausschließlich mit Primerpaar Hyd2f-Hyd7r ein PCR-Produkt amplifiziert werden. Dieses Primerpaar ergab auch PCR-Produkte mit anderen Bakterien, wie *Desulfosarcina variabilis*, *Desulfoarculus baarsii*, *Escherichia coli*, *Xanthobacter autotrophicus* und *Paracoccus denitrificans*, die mit Ausnahme von *Desulfoarculus baarsii* H₂ metabolisieren können. Die Zielsequenzen für diese Primer

sind offensichtlich in stärker konservierten Bereichen des Gens lokalisiert als die der anderen Primer. Wu et al. [255] verglichen die Sequenzen von 30 mikrobiellen Hydrogenasen und fanden mehrere konservierte Sequenzmotive bzw. Signaturen von Aminosäureresten. Der Vergleich der Primerpositionen mit den Positionen dieser Signaturen ergab, daß die Sequenz des Primers Hyd2f, die innerhalb des Gens für die kleine Untereinheit der [NiFe] Hydrogenase lokalisiert ist, eine Signatursequenz codiert, die in allen bakteriellen [NiFe] Hydrogenasen vorhanden ist. Auch die Sequenz des Primers Hyd7r, die sich innerhalb der großen Untereinheit der [NiFe] Hydrogenase befindet, codiert eine solche Signatursequenz. Im Gegensatz dazu befinden sich alle anderen Primersequenzen in Regionen des Gens für die große Untereinheit der [NiFe] Hydrogenasen, die keine allgemein konservierten Sequenzregionen codieren. Wu et al. [255] ermittelten auch zwei Signatursequenzen, die man ausschließlich in den [NiFe] Hydrogenasen von sulfatreduzierenden Bakterien findet. Die sieben Consensusregionen, die durch den Vergleich der publizierten [NiFe] Hydrogenase-Gensequenzen von *Desulfovibrio* spp. ermittelt und von denen fünf als PCR-Primer verwendet wurden, codieren allerdings nicht diese Regionen des Proteins.

Die Primerpaare Hyd4f-Hyd7r und Hyd2f-Hyd5r amplifizierten unter den gewählten PCR-Bedingungen auch unspezifische PCR-Produkte aus DNA von Bakterienstämmen, die nicht zur Gattung *Desulfovibrio* gehören. Als unspezifische PCR-Produkte bezeichnet man mehrere PCR-Produkte unterschiedlicher Größe und/oder PCR-Produkte, die sich in der Größe von der erwarteten Größe des DNA-Fragments signifikant unterscheiden. Das Primerpaar Hyd1f-Hyd7r amplifizierte mit einer Ausnahme ausschließlich [NiFe] Hydrogenase-Genfragmente von *Desulfovibrio* spp. Diese Ausnahme war der Stamm *Desulfoarculus baarsii*, der früher zur Gattung *Desulfovibrio* gezählt wurde [40]. Voordouw et al. [232] konnten ebenso für *Desulfoarculus baarsii* ein schwaches, aber reproduzierbares Signal nach Hybridisierung mit einer [NiFe] Hydrogenase-Gensonde nachweisen. Das spezifischste Primerpaar war Hyd1f-Hyd5r: Unter stringenten PCR-Bedingungen wurden mit diesem Primerpaar ausschließlich [NiFe] Hydrogenase-Genfragmente von *Desulfovibrio* spp. amplifiziert. Die Stämme *Desulfovibrio vulgaris* und *Desulfovibrio longus* bildeten allerdings nur unter weniger stringenten Bedingungen eine gute Ausbeute bzw. überhaupt PCR-Produkte mit diesem Primerpaar. Solche Bedingungen führten allerdings auch zu unspezifischen PCR-Produkten von anderen Bakterien. Die unterschiedliche Effizienz in der Ausbeute an PCR-Produkten weist daraufhin, daß die Zielsequenzen der PCR-Primer in verschiedenen *Desulfovibrio*-Stämmen nicht komplett identisch sind. Die Primersequenzen von Hyd1f und Hyd5r wurden überarbeitet hin zu kürzeren Oligonukleotiden (Hyd1-19 und Hyd5-18). Mit diesem Primerpaar konnte die Ausbeute an PCR-Produkten der beiden oben genannten Stämme zwar deutlich verbessert werden, die [NiFe] Hydrogenase-Gene einiger anderer *Desulfovibrio*-Stämme wurden jedoch nicht mit diesem Primerpaar amplifiziert. Die langen Sequenzen der Primer mit 27 bp (Hyd1f) und 36 bp (Hyd5r) gewährleisteten demnach erst den erfolgreichen Nachweis eines Großteils von *Desulfovibrio*-Stämmen über die Amplifikation des [NiFe] Hydrogenase-Genfragments.

Keines der verwendeten Primerpaare konnte das [NiFe] Hydrogenase-Gen von allen untersuchten *Desulfovibrio*-Stämmen amplifizieren. Aufgrund der hohen Spezifität un-

ter stringenten Bedingungen ("touchdown"-PCR von 70–60 °C) sowie der optimalen Größe des PCR-Produktes (ca. 440 bp) für anschließende DGGE Analysen konzentrierten sich die Untersuchungen von Umweltproben auf die Verwendung des Primerpaar Hyd1f-Hyd5r. Da in Umweltproben vielfältige Nukleinsäuresequenzen aufgrund der heterogenen Bakterienpopulationen zu erwarten sind, muß für ein solches Nachweissystem ein Kompromiß eingegangen werden zwischen der Spezifität des Nachweises und dem Spektrum der nachweisbaren Bakterien. Hier wurde der Spezifität des PCR-Testes große Beachtung geschenkt, was zu Lasten der nachweisbaren *Desulfovibrio*-Stämme ging, wie die Versuche mit Reinkulturen bereits zeigten (siehe Tabelle 3.2). Dadurch wird diese Bakteriengruppe in Umweltproben möglicherweise unterschätzt.

Die gute Qualität des entwickelten Nachweissystems basierend auf der Amplifikation des [NiFe] Hydrogenase-Gens mit Primerpaar Hyd1f-Hyd5r wurde durch die Analyse von DNA, die aus verschiedenen Umweltproben extrahiert wurde, aufgezeigt. Bakterien der Gattung *Desulfovibrio* wurden in verschiedenen anaeroben Bioreaktoren, in mikrobiellen Matten und marinen Wassersäulen nachgewiesen. Die Sequenzen aller untersuchten PCR-Produkte aus Umweltproben zeigten die höchste Homologie zu den Sequenzen der [NiFe] Hydrogenase-Gene von *Desulfovibrio* spp. Dies unterstreicht die hohe Spezifität des entwickelten Nachweissystems. Die Untersuchungen von Umweltproben werden in den Abschnitten 4.3 und 4.4 detailliert diskutiert.

4.1.1 Unterscheidung verschiedener *Desulfovibrio*-Stämme

In Abschnitt 1.3.4 wurde bereits auf andere Nachweissysteme für sulfatreduzierende Bakterien auf molekularer Ebene eingegangen: Hydrogenase-Gensonden wurden verwendet, um *Desulfovibrio* spp. in Anreicherungen nachzuweisen und auch zu identifizieren [211, 232]. Diese Sonden wurden jedoch nie zur Untersuchung von DNA, die direkt aus Umweltproben extrahiert wurde, verwendet. Eigene Versuche durch Hybridisierungen mit [NiFe] Hydrogenase-Genfragmenten spezifisch *Desulfovibrio* spp. zu detektieren, weisen darauf hin, daß diese Sonden vermutlich nicht spezifisch sind und auch mit [NiFe] Hydrogenase-Genen anderer Bakterien, z. B. *Rhodobacter capsulatus*, hybridisieren (Abschnitt 3.1.3). 16S rRNA-gerichtete Oligonukleotidsonden wurden erfolgreich eingesetzt, um sulfatreduzierende Bakterien in Umweltproben nachzuweisen [5, 42, 159, 166, 175]. Diese Sonden wurden entwickelt, um alle [4] oder bestimmte Gruppen [42] von sulfatreduzierenden Bakterien zu erfassen. Spezies- oder Stamm-spezifische Sonden für Mitglieder der sulfatreduzierenden Bakterien wurden bisher jedoch nicht entwickelt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die spezifische Amplifikation von [NiFe] Hydrogenase-Genfragmenten mit der denaturierenden Gradientengelelektrophorese (DGGE) kombiniert [245]. Abschnitt 3.1.6 zeigt, daß mit Hilfe der DGGE Analyse die Hyd1fGC-Hyd5r-PCR-Produkte verschiedener *Desulfovibrio*-Stämme getrennt dargestellt werden können. Die in der Nukleotidsequenz variierenden DNA-Fragmente verschiedener *Desulfovibrio*-Stämme nahmen unterschiedliche Positionen im denaturierenden Gradienten ein und waren als gut unterscheidbare Banden sichtbar. Die sequenzabhängige

gelelektrophoretische Analyse von [NiFe] Hydrogenase-Genfragmenten erlaubt also eine Unterscheidung von verschiedenen *Desulfovibrio*-Stämmen aufgrund der unterschiedlichen gelelektrophoretischen Mobilität ihrer PCR-Produkte. Die DGGE Analyse von [NiFe] Hydrogenase-Genfragmenten, die aus Umweltproben gewonnen wurden, zeigte dementsprechend die verschiedenen Mitglieder einer *Desulfovibrio*-Population auf und spiegelt die genetische Diversität dieser Population wider.

Die Untersuchungen von Voordouw et al. [232] weisen daraufhin, daß nur ein [NiFe] Hydrogenase-Gen pro Bakterienstamm vorhanden ist. Die PCR-Produkte einer *Desulfovibrio*-Reinkultur sollten daher eine identische Sequenz aufweisen und theoretisch nur eine Bande im denaturierenden Gradientengel aufweisen. Die Betrachtung von Abbildung 3.8, in der die [NiFe] Hydrogenase-Genfragmente verschiedener Reinkulturen dargestellt sind, macht jedoch deutlich, daß dies in der Praxis anders aussehen kann. Einige *Desulfovibrio*-Stämme zeigten in diesem Gel mehrere eng beieinanderliegende Banden, z. B. *Desulfovibrio gigas* und *Desulfovibrio baculatus*. Dieses Phänomen war jedoch nicht reproduzierbar, wie die Auftrennung der PCR-Produkte von *Desulfovibrio gigas* und *Desulfovibrio baculatus* in einem anderen Gel zeigte (Abbildung 3.9). Daher scheint es unwahrscheinlich, daß diese Mehrfachbanden tatsächlich in der Sequenz variierende [NiFe] Hydrogenase-Genfragmente einer Reinkultur repräsentieren. Dies wird auch durch die Tatsache unterstützt, daß die Sequenzierung der PCR-Fragmente der Reinkulturen ohne Ausnahme eine eindeutige Sequenz ergab. Bei der zyklischen Sequenzierung von PCR-Produkten, die aus mehreren Sequenzen bestehen, wäre dies anderenfalls durch überlappende, nicht lesbare Sequenzbereiche deutlich geworden.

Möglicherweise werden die manchmal zu beobachtenden Mehrfachbanden für eine Reinkultur durch die GC-Klammer des "forward"-Primers verursacht. Diese Modifikation des PCR-Primers ist für eine anschließende DGGE Analyse von PCR-Produkten notwendig, um den Molekülen ein stabiles Schmelzverhalten zu geben (Abschnitt 3.1.6, [195]). Fehler bei der Synthese von Primern mit dieser GC-reichen Sequenz oder Sekundärstrukturen, die sich innerhalb dieser Sequenz in der PCR formieren, könnten zu unterschiedlichen PCR-Produkten führen. Diese Beobachtung muß bei der Interpretation der DGGE-Muster von Umweltproben berücksichtigt werden, da nicht ausgeschlossen werden kann, daß ein Bakterienstamm im Bandenmuster durch mehrere Banden vertreten ist und die genetische Diversität der Population dadurch möglicherweise überschätzt wird. Die anschließende Sequenzierung von [NiFe] Hydrogenase-Genfragmenten, die als Banden im DGGE-Muster erscheinen, kann zur Lösung dieses Problems beitragen: Stimmt die These, daß die GC-Klammer für Mehrfachbanden der PCR-Produkte eines *Desulfovibrio*-Stammes verantwortlich ist, sollte die Nukleotidsequenz des [NiFe] Hydrogenase-Gens nicht von einer Änderung betroffen sein. Das bedeutet, daß unterschiedliche Sequenzen, die aus Banden des DGGE-Musters einer Umweltprobe ermittelt wurden, auch tatsächlich zu verschiedenen *Desulfovibrio*-Stämmen gehören.

Verschiedene andere Methoden wurden beschrieben, um gleichlange, aber in der Nukleotidsequenz variierende DNA-Fragmente gelelektrophoretisch aufzutrennen, u. a. die Temperaturgradientengelelektrophorese (TGGE) [178] und die Untersuchung des Einzelstrang-Konformationspolymorphismus (SSCP) [147]. Ebenso wie bei der DGGE

Analyse erfolgt die Auftrennung in Polyacrylamidgelen und erfordert eine spezielle Ausrüstung sowie aufwendige Vorversuche, um die optimalen Elektrophoresebedingungen zu ermitteln. Eine Beschränkung dieser Methoden, einschließlich der DGGE Analyse, liegt darin, daß nur relativ kleine DNA-Fragmente (bis zu 500 bp) optimal aufgetrennt werden können.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Hermann Rüggeberg und Dr. Georg Meyer (Hanse Analytik GmbH) eine einfache und schnelle Elektrophoresemethode eingeführt, um Sequenzvariationen in gleichlangen DNA-Fragmenten zu detektieren. Bereits vor 15 Jahren wurde gezeigt, daß man DNA-Fragmente sequenzabhängig in Agarosegelen trennen kann, die einen basensequenzspezifischen DNA-Liganden enthalten, der mit langen Polyethylenglykollketten (PEG) verestert ist [132]. Dieses Prinzip wurde aufgegriffen, auf die Analyse von gleichlangen PCR-Fragmenten ausgedehnt und beispielhaft für die Charakterisierung von *Desulfovibrio*-Populationen anhand der [NiFe] Hydrogenase-Genfragmente angewendet [246]. Als DNA-Ligand wurde der Farbstoff Bisbenzimid verwendet, der bevorzugt an A+T-Sequenzmotive in doppelsträngiger DNA bindet [131]. Auch mit dieser Methode war es möglich, die 440 bp langen [NiFe] Hydrogenase-Genfragmente verschiedener *Desulfovibrio*-Reinkulturen, die mit dem spezifischen Primerpaar Hyd1f-Hyd5r amplifiziert wurden, gelelektrophoretisch als einzelne Banden aufzutrennen (Abbildung 3.10). Zusätzlich wurde gezeigt, daß auch die 1440 bp langen Hyd1f-Hyd7r-PCR-Fragmente von *Desulfovibrio* spp. im Gel getrennt dargestellt werden können (Abbildung 3.13).

Die Auftrennung von längeren DNA-Fragmenten ist ein großer Vorteil, den die Agarosegelelektrophorese mit basensequenzspezifischen DNA-Liganden gegenüber anderen beschriebenen Methoden bietet, da so mehr Sequenzinformationen für eine anschließende Identifizierung der DNA-Fragmente durch Hybridisierung oder Sequenzierung vorliegen. Offensichtlich ist aber die Auflösung der trennbaren PCR-Fragmente geringer: Während die DGGE Analyse der Hyd1f-Hyd5r-PCR-Fragmente eine klare Trennung aller untersuchten [NiFe] Hydrogenase-Genfragmente von Reinkulturen zeigte (Abbildung 3.8), lagen die Banden der in einem Agarosegel mit dem DNA-Liganden Bisbenzimid-PEG aufgetrennten PCR-Produkte enger beieinander. Die [NiFe] Hydrogenase-Genfragmente von *Desulfovibrio sulfodismutans* und PIB2 waren unter den gewählten Bedingungen nur als eine Bande im Gel erkennbar und nicht voneinander zu unterscheiden (Abbildung 3.12). Eine Optimierung der Elektrophoresebedingungen, z. B. die Ausdehnung der Elektrophoresezeit in längeren Gelen, könnte eine bessere Auftrennung der PCR-Fragmente ermöglichen (siehe Abbildung 3.11). Da die Auflösung der verschiedenen Methoden von der Länge der untersuchten DNA-Fragmente und auch von der Position der Basenaustausche innerhalb der Fragmente abhängt, kann sie nur empirisch bestimmt werden. Für denaturierende Gradientengele ist die Auflösung gut dokumentiert: Unter optimalen Bedingungen können DNA-Fragmente, die sich in einem Nukleotid unterscheiden, getrennt dargestellt werden [195]. Buchholz-Cleven et al. [20] zeigten, daß unter Bedingungen, wie sie auch in dieser Arbeit für die DGGE Analyse verwendet wurden, eine Trennung von gleichlangen PCR-Fragmenten, die Unterschiede von bis zu drei Nukleotiden aufwiesen, nicht möglich war. Für die Bisbenzimid-PEG-Agarosegelelektrophorese wurden empirische Untersuchungen hinsichtlich der poten-

Tabelle 4.1: Gegenüberstellung der denaturierenden Gradientengelelektrophorese (DGGE) und der Agarosegelelektrophorese mit DNA-Liganden (Bisbenzimid-PEG) zur Auftrennung gleichlanger, in der Nukleotidsequenz variierender DNA-Fragmente

	DGGE	Bisbenzimid-PEG
Prinzip	verringerte gelelektrophoretische Mobilität von partiell denaturierten DNA-Fragmenten	Retardation von DNA-Fragmenten durch die sequenzspezifische Anlagerung eines DNA-Liganden
Gelsystem	Acrylamid	Agarose
Ausrüstung	speziell	Standard
Fragmentlänge	optimal bis zu 500 bp	auch Fragmente mit > 500bp
Auflösung	hoch, im Idealfall ein Nukleotidaustausch	noch nicht bestimmt, vermutlich geringer
Optimierung	Variation der Elektrophorese-dauer, Länge des Gels, denaturierenden Bedingungen (Gradient, Temperatur)	Variation der Elektrophorese-dauer, Länge des Gels
Probleme	Mehrfachbanden, diffuse Banden, GC-Klammer erforderlich, einzelsträngige DNA entsteht	diffuse Banden

tiellen Auflösung noch nicht durchgeführt. Müller et al. [132] postulierten, daß der Nachweis einer Punktmutation in 200–300 bp langen DNA-Fragmenten möglich sein sollte. Da für die meisten der verwendeten [NiFe] Hydrogenase-Gensequenzen nur partielle Sequenzinformationen vorliegen (Abschnitt 3.3), kann die Auflösung dieser Methode vorerst nur geschätzt werden. Die Sequenzdaten deuten an, daß Unterschiede von < 30% aufgetrennt werden konnten. Da der DNA-Ligand Bisbenzimid-PEG bevorzugt an A+T-Sequenzmotive bindet [131], basiert die Trennung von DNA-Fragmenten u. a. auf dem AT-Gehalt der untersuchten Sequenzen. AT-reiche Sequenzen werden im Gel zurückgehalten relativ zu Sequenzen, die einen geringen AT-Gehalt aufweisen. Für die untersuchten DNA-Fragmente, die mit der Bisbenzimid-PEG-Agarosegelelektrophorese aufgetrennt werden konnten, können weniger als 1% Unterschied im AT-Gehalt angenommen werden. Eine Gegenüberstellung der Methoden, DGGE und Agarosegelelektrophorese mit basensequenzspezifischen DNA-Liganden, ist in Tabelle 4.1 gezeigt.

Da mit der Bisbenzimid-PEG-Agarosegelelektrophorese eine andere Methode zur Untersuchung von PCR-Produkten aus Umweltproben zur Verfügung stand, konnte die Zuverlässigkeit der DGGE Analyse überprüft werden. Wie oben beschrieben basieren diese Methoden auf unterschiedlichen Prinzipien: Während bei der DGGE Analyse eine Trennung von PCR-Fragmenten auf der verringerten gelelektrophoretischen Mobilität partiell denaturierter DNA-Fragmente beruht, basiert eine Trennung mit der

Bisbenzimid-PEG-Agarosegelelektrophorese auf der Retardation von DNA-Fragmenten durch die sequenzspezifische Anlagerung eines DNA-Liganden. Für diese Art der Gelelektrophorese müssen die PCR-Produkte nicht mit einer GC-Klammer amplifiziert werden, während dies für die DGGE Analyse eine Voraussetzung ist.

Die amplifizierten [NiFe] Hydrogenase-Genfragmente von drei verschiedenen Umweltproben wurden mit beiden Methoden untersucht (Abbildungen 3.8 und 3.12). Die *Desulfovibrio*-Populationen in Bakteriengemeinschaften aus zwei verschiedenen anaeroben Bioreaktoren zeigten mit beiden Methoden eine Bande bzw. 2 Banden im Elektrophoresemuster. Daher kann man davon ausgehen, daß hier in der jeweiligen Umweltprobe ein bzw. zwei verschiedene nachweisbare *Desulfovibrio*-Stämme vorhanden waren. Die DGGE Analyse der PCR-Produkte aus DNA einer mikrobiellen Matte zeigte im Gegensatz zu den Bioreaktorproben ein recht komplexes Muster, das aus mindestens fünf verschiedenen Banden bestand. Eine eindeutige Zählung der Banden war nicht möglich. Die Analyse der entsprechenden PCR-Produkte in Bisbenzimid-PEG-Agarosegelen zeigte fünf eindeutig unterscheidbare Banden. Ruft man sich die Grenzen der beiden Methoden ins Gedächtnis – Die DGGE Analyse überschätzt möglicherweise die Anzahl der nachweisbaren *Desulfovibrio*-Stämme, während bei der Bisbenzimid-PEG-Agarosegelelektrophorese aufgrund einer geringeren Auflösung die genetische Diversität der nachweisbaren Population unterschätzt werden kann – kann man den Schluß ziehen, daß die *Desulfovibrio*-Population in der untersuchten mikrobiellen Matte aus mindestens fünf verschiedenen nachweisbaren Bakterienstämmen bestand, möglicherweise sogar mehr. Die genetische Diversität von *Desulfovibrio* spp. ist anscheinend in experimentellen Bioreaktoren unter definierten Bedingungen geringer als die genetische Diversität dieser Bakteriengruppe in einer mikrobiellen Matte, die wechselnden Umweltfaktoren (z. B. Licht, Temperatur) in der Natur ausgesetzt ist und eine komplexe mikrobielle Gemeinschaft darstellt.

Die sequenzabhängige gelelektrophoretische Auftrennung von amplifizierten [NiFe] Hydrogenase-Genfragmenten, die aus Umweltproben gewonnen wurden, visualisiert die verschiedenen Bakterienstämme einer *Desulfovibrio*-Population und spiegelt so deren genetische Diversität wider. Mit unterschiedlichen Methoden wurden dabei vergleichbare Resultate erzielt. Die Tatsache, daß die DGGE Analyse von [NiFe] Hydrogenase-Genfragmenten für die Unterscheidung von *Desulfovibrio* spp. bereits optimiert worden war, gab dieser Methode bei den folgenden Untersuchungen von Umweltproben den Vorzug. Die Bisbenzimid-PEG-Agarosegelelektrophorese ist eine vielversprechende Methode, um Sequenzvariationen in gleichlangen DNA-Fragmenten aufzuzeigen. Sie bedarf allerdings noch der Optimierung sowohl für die Analyse von [NiFe] Hydrogenase-Genfragmenten als auch für die Analyse anderer DNA-Fragmente. Es ist jedoch abzusehen, daß diese Methode sowohl für die Grundlagenforschung als auch für die angewandte Forschung im Bereich der Molekularbiologie von großer Tragweite sein kann. Ein großes Potential liegt in der Charakterisierung von Mikroorganismen: Werden geeignete Primersysteme gewählt, können Bakterienkulturen sowie Umweltproben auf Kontaminanten oder neue Stämme rasch durchgesehen und die mikrobielle Diversität kann aufgezeigt werden. Auch der Nachweis von mutierten Genen ist denkbar.

4.1.2 Genetische Diversität und Identifizierung

Bisher wurde die genetische Diversität von *Desulfovibrio* spp. in Umweltproben über die Anzahl unterscheidbarer Banden nach der sequenzabhängigen Separation spezifischer PCR-Produkte beschrieben. Anhand der erhaltenen Elektrophoresemuster können allerdings keine Aussagen darüber getroffen werden, ob die nachgewiesenen *Desulfovibrio*-Stämme eng miteinander verwandt sind oder nicht. Die Spezifität des Nachweissystems stellt nur sicher, daß sie der gleichen Gattung angehören. Prinzipiell ist die Identifizierung von Bakterienstämmen über eine DGGE Analyse möglich, wenn geeignete Referenzstämme zur Verfügung stehen, denn identische DNA-Fragmente nehmen die gleiche Position im denaturierenden Gradientengel ein. Da jedoch nicht ausgeschlossen werden kann, daß in der Nukleotidsequenz variierende DNA-Fragmente ein ähnliches Schmelzverhalten aufweisen und aufgrunddessen die gleiche Position im Gel einnehmen, sollten die DNA-Fragmente zusätzlich sequenziert werden.

Die Identifizierung von Bakterienstämmen über die Nukleotidsequenzen bestimmter Gene setzt voraus, daß Sequenzdaten von möglichst vielen Bakterienstämmen für einen Vergleich der Sequenzen vorliegen. Da für die [NiFe] Hydrogenase nur Sequenzen von drei verschiedenen *Desulfovibrio* spp. bekannt waren, wurde zunächst die Nukleotidsequenz der Hyd1f-Hyd5r-PCR-Produkte, die zum Nachweis und für die Analyse von *Desulfovibrio*-Stämmen in Umweltproben amplifiziert wurden, von einer Reihe charakterisierter *Desulfovibrio*-Reinkulturen ermittelt. Im Durchschnitt wurden mehr als 360 bp des insgesamt etwa 440 bp langen [NiFe] Hydrogenase-Genfragments bestimmt.

Der Vergleich der Sequenzen mit der EMBL Datenbank zeigte, daß die ermittelten Sequenzen, wie zu erwarten, die größte Ähnlichkeit zu den drei bekannten *Desulfovibrio* [NiFe] Hydrogenasen zeigten. Der Vergleich der Sequenzen untereinander ergab Sequenzhomologien von durchschnittlich etwa 70% (Tabelle 3.5). Für *Desulfovibrio gigas*, *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki und *Desulfovibrio fructosovorans* sind die Sequenzen des kompletten [NiFe] Hydrogenase-Gens bekannt [38, 110, 180, 230]. Dadurch ist ein Vergleich der Ähnlichkeit des gesamten Proteins (codiert durch ca. 2500 bp) mit der Region, die durch die PCR-Primer Hyd1f und Hyd5r definiert wird (ca. 440 bp), möglich. Der Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen des Hyd1f-Hyd5r-[NiFe] Hydrogenase-Genfragments, welches für einen Teil der großen Untereinheit der [NiFe] Hydrogenase codiert, von *Desulfovibrio gigas* und *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki zeigte 74,7% Identität. Die Analyse des kompletten Gens ergab 61% Homologie für die kleine Untereinheit und 68% Homologie für die große Untereinheit des Proteins [238]. Ähnliche Werte ergeben sich bei dem Vergleich der [NiFe] Hydrogenase von *Desulfovibrio gigas* und *Desulfovibrio fructosovorans*: 74,7% Identität für das Teilstück der [NiFe] Hydrogenase und 65% und 63% Sequenzhomologie für die kleine und große Untereinheit des Enzyms [238]. Die Ähnlichkeiten der partiellen Sequenzen sind verglichen mit der gesamten Sequenz höher. Das ist darauf zurückzuführen, daß dieser Genabschnitt Bereiche mit hochkonservierten Aminosäureresten enthält: RxCGVCTxxxH (in Position 1465–1493 des [NiFe] Hydrogenase-Gens von *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki [38]) und HDHxxHxxxxxxxD (in Position 1594–1635) [255].

Die partiellen DNA-Fragmente von *Desulfovibrio* spp. wiesen zum Teil eine größere Identität auf DNA-Ebene auf als auf Aminosäure-Ebene (Tabelle 3.5). Dies ist erstaunlich, da angenommen wird, daß der Selektionsdruck auf der Aminosäure-Ebene ansetzt, um die Funktion des Proteins aufrechtzuerhalten, und nicht auf der DNA-Ebene. Eine weitergehende, vergleichende Analyse der [NiFe] Hydrogenase-Sequenzen besonders im Hinblick auf die Positionen der Nukleotidaustausche in synonymen (stillen) und nicht-synonymen Positionen sowie der verwendeten Codonen wäre daher sehr interessant.

Die größte Ähnlichkeit in der Nukleotidsequenz zweier unterschiedlicher Spezies, *Desulfovibrio sulfodismutans* und *Desulfovibrio fructosovarians*, lag bei etwa 85,9%. Interessant war die Frage, ob [NiFe] Hydrogenase-Genfragmente von *Desulfovibrio*-Stämmen, die der gleichen Spezies zugeordnet werden, eine größere Ähnlichkeit aufweisen. Zwei Stämme der Spezies *Desulfovibrio vulgaris*, Miyazaki [38] und Hildenborough (DSM 644), wurden untersucht. Über den sequenzierten Bereich wiesen die DNA-Sequenzen 87,5% Identität auf. Wu et al. [255] standen die kompletten Sequenzen der [NiFe] Hydrogenasen dieser beiden Stämme zur Verfügung, und die phylogenetische Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz bestätigt die nahe Verwandtschaft der Proteine. Der marine Stamm *Desulfovibrio vulgaris* DSM 1744 zeichnete sich hingegen durch eine geringe Ähnlichkeit der [NiFe] Hydrogenase zu diesen beiden Stämmen aus. Genfragmente verschiedener Stämme, die als Spezies *Desulfovibrio desulfuricans* klassifiziert wurden, zeigten keine größere Ähnlichkeit untereinander verglichen mit anderen Spezies. Dies steht im Einklang mit der phylogenetischen Verwandtschaft verschiedener Stämme von *Desulfovibrio desulfuricans* basierend auf dem Vergleich von 16S rRNA-Sequenzen [41]. Devereux et al. [41] vermuteten daher, daß einige *Desulfovibrio desulfuricans* Stämme falsch klassifiziert sind.

Vergleichende Untersuchungen der intra- und interspezifischen genetischen Diversität wurden bisher anhand verschiedener Protein-codierender Gene nur weniger Bakteriengruppen durchgeführt. Gene von natürlichen Isolaten der Spezies *Escherichia coli* unterschieden sich typischerweise um 1–2% in ihrer Nukleotidsequenz [68]. Gene der Spezies *Bacillus subtilis* wiesen im Durchschnitt 5,6% Unterschiede in der Nukleotidsequenz auf; die Werte variierten von 1,6–7,5% zwischen verschiedenen Genen [193, 194]. Gene von Bakterienstämmen der Gattung *Bacillus*, die verschiedenen Spezies angehören, zeigten im Durchschnitt mehr als 20% Unterschiede in der DNA-Sequenz [194]. Dabei variierten die Werte für verschiedene Gene der Stämme *Bacillus subtilis* und *Bacillus licheniformis* beispielsweise von 10–35%. Der Vergleich einer großen Anzahl von Genen von *Escherichia coli* und dem nahe verwandten Enterobakterienstamm *Salmonella typhimurium* ergab im Durchschnitt 15,6% Unterschiede auf DNA-Ebene [192]. Auch hier variierten die Werte einzelner Gene beträchtlich von 1–27,5%. Dementsprechend zeigten die Aminosäuresequenzen der Genprodukte Unterschiede von 0–24,7%. Die Werte für das [NiFe] Hydrogenase-Genfragment von *Desulfovibrio* spp. liegen mit durchschnittlich 30% Unterschieden auf DNA-Ebene zwischen verschiedenen Spezies (aber auch Stämmen, die der gleichen Spezies zugeordnet werden) und 15,5% Unterschieden zwischen zwei Stämmen der Spezies *Desulfovibrio vulgaris* vergleichsweise hoch. Dies wird bestätigt, wenn man die Diversität bekannter [NiFe] Hydrogenase-Gene

Tabelle 4.2: Paarweiser Vergleich der [NiFe] Hydrogenase-Sequenzen von nicht-sulfatreduzierenden Bakterienstämmen der α -, β -, γ - und ϵ -Gruppe der Proteobakterien sowie *Desulfovibrio gigas* (δ -Gruppe). Oberhalb der Diagonalen wurden Ähnlichkeiten in % angegeben, unterhalb der Diagonalen Unterschiede in absoluten Zahlen. Die obere Zeile gibt jeweils die Werte für die Nukleotidsequenzen an, die untere Zeile die kursiv gedruckten Werte für die abgeleiteten Aminosäuresequenzen. Verglichen wurde der homologe Genbereich zu dem durch die Primer Hyd1f und Hyd5r definierten Fragment in *Desulfovibrio* spp. Die Sequenzen wurden der EMBL Datenbank entnommen.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	<i>Desulfovibrio gigas</i>	δ	–	59,7	66,7	61,6	58,4	60,2	60,9	63,7	63,5	50,7
			–	<i>52,8</i>	<i>55,9</i>	<i>47,9</i>	<i>53,8</i>	<i>57,0</i>	<i>55,6</i>	<i>55,9</i>	<i>52,8</i>	<i>46,8</i>
2	<i>Escherichia coli</i>	γ	172	–	66,1	60,3	63,8	66,3	67,2	67,0	64,9	49,5
			<i>67</i>	–	<i>67,6</i>	<i>56,6</i>	<i>67,6</i>	<i>70,3</i>	<i>70,3</i>	<i>68,3</i>	<i>66,9</i>	<i>44,7</i>
3	<i>Azotobacter vinelandii</i>	γ	143	148	–	85,3	71,5	76,1	74,1	80,9	80,2	54,1
			<i>63</i>	<i>47</i>	–	<i>82,1</i>	<i>80,1</i>	<i>77,9</i>	<i>79,3</i>	<i>84,9</i>	<i>80,1</i>	<i>45,1</i>
4	<i>Azotobacter chroococcum</i>	γ	164	173	64	–	62,4	67,4	66,3	71,3	70,6	51,2
			<i>74</i>	<i>63</i>	<i>26</i>	–	<i>64,1</i>	<i>65,5</i>	<i>66,9</i>	<i>70,3</i>	<i>66,9</i>	<i>40,4</i>
5	<i>Alcaligenes eutrophus</i>	β	179	158	125	164	–	71,6	69,7	71,5	78,6	50,6
			<i>66</i>	<i>47</i>	<i>29</i>	<i>52</i>	–	<i>77,9</i>	<i>77,2</i>	<i>76,0</i>	<i>89,7</i>	<i>47,9</i>
6	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	α	170	147	104	142	124	–	84,6	80,5	75,9	54,7
			<i>61</i>	<i>43</i>	<i>32</i>	<i>50</i>	<i>32</i>	–	<i>94,5</i>	<i>81,4</i>	<i>78,6</i>	<i>49,6</i>
7	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	α	167	143	113	147	132	67	–	77,5	71,8	53,5
			<i>63</i>	<i>43</i>	<i>30</i>	<i>48</i>	<i>33</i>	<i>8</i>	–	<i>82,8</i>	<i>77,2</i>	<i>48,2</i>
8	<i>Rhodobacter capsulatus</i>	α	156	144	84	125	125	85	98	–	74,7	50,1
			<i>63</i>	<i>46</i>	<i>22</i>	<i>43</i>	<i>35</i>	<i>27</i>	<i>25</i>	–	<i>77,4</i>	<i>44,4</i>
9	<i>Rhodocyclus gelatinosus</i>	β	158	153	87	128	94	105	123	111	–	54,6
			<i>68</i>	<i>48</i>	<i>29</i>	<i>48</i>	<i>15</i>	<i>31</i>	<i>33</i>	<i>33</i>	–	<i>46,5</i>
10	<i>Wollinella succinogenes</i>	ϵ	206	214	196	207	211	192	197	213	194	–
			<i>74</i>	<i>78</i>	<i>78</i>	<i>84</i>	<i>74</i>	<i>71</i>	<i>73</i>	<i>79</i>	<i>76</i>	–

nicht-sulfatreduzierender Bakteriengruppen betrachtet.

Tabelle 4.2 zeigt das Ergebnis des Sequenzvergleichs der [NiFe] Hydrogenase-Genbereiche, die homolog zu dem untersuchten *Desulfovibrio* [NiFe] Hydrogenase-Fragment sind, einer Reihe unterschiedlicher nicht-sulfatreduzierender Bakterienstämme der Proteobakterien. Die DNA-Sequenzen von Bakterien der α -, β - und γ - Gruppe der Proteobakterien zeigten durchschnittlich etwa 70% Identität auf DNA-Ebene. Dieser Wert entspricht der genetischen Diversität der partiellen [NiFe] Hydrogenase-Gene innerhalb der Gattung *Desulfovibrio*. Für zwei Spezies unterschiedlicher Gattungen der α -Proteobakterien, *Rhizobium* und *Bradyrhizobium*, wurde eine Identität von 84,6% in der Nukleotidsequenz ermittelt und 94,5% in der abgeleiteten Aminosäuresequenz. Diese Werte sind vergleichbar mit den Ähnlichkeiten, die für zwei Bakterienstämme derselben Spezies sulfatreduzierender Bakterien (*Desulfovibrio vulgaris*) gefunden wurden. Die Daten weisen auf eine große Diversität innerhalb der Gattung *Desulfovibrio*

hin. Die Diversität des [NiFe] Hydrogenase-Gens nicht-sulfatreduzierender Bakterien innerhalb einer Gattung kann nur anhand von zwei *Azotobacter* Spezies betrachtet werden. *Azotobacter vinelandii* und *Azotobacter chroococcum* zeigten 85,3% Identität in der Nukleotidsequenz und 82,1% in der Aminosäuresequenz. So hohe Werte wurden bei dem Vergleich von 12 *Desulfovibrio*-Stämmen nur zweimal gefunden: Für die Spezies *Desulfovibrio fructosovorans* und *Desulfovibrio sulfodismutans* sowie zwei Stämme der Spezies *Desulfovibrio vulgaris*.

16S rRNA-Sequenzen sind als phylogenetische Marker für Bakterien etabliert. Es stellt sich die Frage, ob der Vergleich der [NiFe] Hydrogenase-Sequenzen ähnliche Verwandtschaftsbeziehungen widerspiegelt wie der Vergleich der 16S rRNA-Sequenzen. Tabelle 4.3 zeigt die Ähnlichkeitswerte der 16S rRNA-Sequenzen und der [NiFe] Hydrogenase-Gensequenzen für einige *Desulfovibrio* spp. und *Escherichia coli*. Erkennbar ist, daß die Häufigkeit von Basenaustauschen in 16S rRNA-Sequenzen geringer war als in [NiFe] Hydrogenase-Gensequenzen. Basenaustausche innerhalb der 16S rRNA-codierenden Gene werden beschränkt durch die Tatsache, daß ein Großteil der primären und sekundären Struktur der 16S rRNA bedeutsam für deren Funktion ist. Protein-codierende Gene können aufgrund des degenerierten genetischen Codes stärker variieren, ohne daß die Funktion des Proteins dadurch beeinträchtigt wird. Die Werte für die Ähnlichkeiten der 16S rRNA- und [NiFe] Hydrogenase-Gensequenzen verschiedener *Desulfovibrio* spp. sind vergleichbar mit Ausnahme der Werte für *Desulfovibrio desulfuricans* DSM 1926. Die [NiFe] Hydrogenase-Gensequenz von *Desulfovibrio desulfuricans* DSM 1926 wies große Unterschiede zu den anderen *Desulfovibrio* [NiFe] Hydrogenasen auf (> 30%). Diese Unterschiede finden sich im Vergleich der 16S rRNA-Sequenzen nicht wieder: Der Stamm zeigte im Vergleich zu den anderen *Desulfovibrio*-Stämmen mit mehr als 90% die höchste Ähnlichkeit zu *Desulfovibrio longus*.

Auch wenn die Verwandtschaftsbeziehungen basierend auf 16S rRNA- und [NiFe] Hydrogenase-Gensequenzen im Einzelfall divergieren, zeigen sie doch insgesamt eine gute Übereinstimmung. Devereux et al. [41] zeigten, daß *Desulfovibrio* spp. einen Zweig innerhalb der δ -Proteobakterien bildeten. Dieser Zweig, die Familie *Desulfovibrionaceae*, enthielt fünf tiefe Linien, die durch *Desulfovibrio* und die physiologisch sehr ähnlichen *Desulfomicrobium* spp. repräsentiert wurden. Die Sequenzen der *Desulfovibrio* [NiFe]

Tabelle 4.3: Ähnlichkeiten (%) der 16S rRNA und [NiFe] Hydrogenase-Gensequenzen

Stamm	Ähnlichkeit 16S rRNA ^a /[NiFe] Hydrogenase mit:				
	1	2	3	4	5
1 <i>D. vulgaris</i> DSM 644	–	88,9/75,3	88,3/67,6	89,8/73,2	80,3/57,0
2 <i>D. gigas</i>	–	–	88,3/67,5	88,8/72,9	79,6/59,7
3 <i>D. desulfuricans</i> DSM 1926	–	–	–	90,3/69,4	80,3/56,2
4 <i>D. longus</i>	–	–	–	–	79,9/56,5
5 <i>Escherichia coli</i>	–	–	–	–	–

^aErgebnisse aus Redburn und Patel [168]

Hydrogenasen bildeten ebenfalls eine Gruppe und unterschieden sich von den [NiFe] Hydrogenasen anderer Bakterien [255]. Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten [NiFe] Hydrogenase-Sequenzvergleiche von *Desulfovibrio* spp. weisen innerhalb der Gattung auf eine große Diversität hin, wie sie auch durch die tiefen Abzweigungen in 16S rRNA-Stammbäumen reflektiert wurde. Die aus Umweltproben gewonnenen Sequenzen werden in Abschnitt 4.3 im Zusammenhang mit der Untersuchung der jeweiligen Standorte interpretiert.

4.2 Expression des [NiFe] Hydrogenase-Gens in *Desulfovibrio* spp.

Sulfatreduzierende Bakterien findet man in allen anaeroben Biotopen, wo sie eine wichtige Rolle bei der Mineralisierung von organischem Material, dem Schwefelkreislauf und der anaeroben Korrosion von Metallen spielen [250]. Die ökologische Bedeutung dieser Bakterien basiert auf metabolischen Eigenschaften, bei denen Wasserstoff eine entscheidende Rolle spielt [122, 140]. Hydrogenasen sind daher die Schlüsselenzyme in solchen Prozessen. Das Hydrogenase-System einzelner *Desulfovibrio* spp. kann dabei aus einer oder mehreren verschiedenen Enzymen bestehen [49, 232]. Nur die [NiFe] Hydrogenase ist in Stämmen der Gattung *Desulfovibrio* universell verbreitet [232]. Dies weist darauf hin, daß das Enzym maßgeblich an der Energiekonservierung beteiligt ist. Der Nachweis der Expression dieses Gens sollte daher ein exzellenter Marker für die Bestimmung der metabolischen Aktivität von *Desulfovibrio* spp. sein.

Man nimmt an, daß die [NiFe] Hydrogenase hauptsächlich als Aufnahmehydrogenase fungiert und die Oxidation von molekularem Wasserstoff, der auch aus der Oxidation von organischen Substraten stammen kann, katalysiert [138, 153]. Das Ausmaß der [NiFe] Hydrogenase-Aktivität variiert allerdings in verschiedenen *Desulfovibrio*-Stämmen und hängt möglicherweise von der Präsenz anderer Hydrogenasen ab. Für *Desulfovibrio vulgaris*, wurde gezeigt, daß 95% der gesamten Hydrogenase-Aktivität auf der Aktivität der periplasmatischen [Fe] Hydrogenase beruhten und nur 5% der Aktivität auf die [NiFe] und [NiFeSe] Hydrogenase zurückzuführen waren, wenn dieser Stamm mit Laktat und Sulfat wuchs [223]. Die Autoren postulierten, daß die [Fe] Hydrogenase hauptsächlich für die Produktion von Wasserstoff zuständig ist. Im Gegensatz dazu stehen Untersuchungen von Rousset et al. [181] an *Desulfovibrio fructosovorans*. Sie zeigten, daß in diesem Stamm 90% der gesamten Hydrogenase-Aktivität durch die Aktivität der [NiFe] Hydrogenase hervorgerufen wurde. Die Experimente wurden mit einer Mutante von *Desulfovibrio fructosovorans* durchgeführt, in der das [NiFe] Hydrogenase-Gen eliminiert worden war. Der Stamm besitzt aber eine weitere Hydrogenase. Voordouw et al. [232] hatten im Wildtyp durch die Hybridisierung mit Hydrogenase-Gensonden neben dem [NiFe] auch ein [Fe] Hydrogenase-Gen nachgewiesen. Die Mutante konnte auf organischen Substraten angezogen werden, obwohl sie nur noch 10% der Hydrogenase-Aktivität aufwies verglichen mit dem Wildtyp. Überraschend war, daß die Mutante ebenso gut mit Wasserstoff-Sulfat-Medium wuchs wie

der Wildtyp. Dieses Ergebnis unterstützt die These einiger Autoren, daß die Funktion der [Fe] Hydrogenase die Wasserstoffaufnahme ist und daß für die Produktion von Wasserstoff eine andere cytoplasmatische Hydrogenase verantwortlich ist [238]. Die für eine [Fe] Hydrogenase codierenden Genbereiche von *Desulfovibrio fructosovorans* hybridisieren zwar mit dem [Fe] Hydrogenase-Gen von *Desulfovibrio vulgaris*, das Enzym unterscheidet sich allerdings stark von der Hydrogenase in *Desulfovibrio vulgaris*: Es ist vermutlich im Cytoplasma lokalisiert, zeigt eine H₂-abhängige NADP-Reduktase-Aktivität und wird durch ein Operon codiert, daß aus wenigstens 4 Genen besteht [123].

Die oben angeführten Beispiele (siehe auch Abschnitt 1.4) zeigen deutlich, daß der Wasserstoffmetabolismus von *Desulfovibrio* spp. und die physiologische Funktion der daran beteiligten Hydrogenasen noch nicht vollständig verstanden ist. Modelle, die diese Phänomene erklären sollen, werden kontrovers diskutiert, und es ist fraglich, ob trotz der Komplexität des Hydrogenase-Systems allgemeingültige Modelle postuliert werden können. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob und unter welchen Bedingungen die Bestimmung der Expression des [NiFe] Hydrogenase-Gens von *Desulfovibrio* spp. auf mRNA-Ebene möglich ist und ob die Genexpression mit der Stoffwechselaktivität von *Desulfovibrio* spp. korreliert. Zunächst wurden Wachstumsversuche mit Reinkulturen durchgeführt.

Die Expression des [NiFe] Hydrogenase-Gens wurde in marinen und Süßwasserstämmen von *Desulfovibrio* über den Nachweis der mRNA bestimmt. Die untersuchten Stämme unterscheiden sich in der Komplexität ihres Hydrogenase-Systems: Der Stamm *Desulfovibrio gigas* besitzt wahrscheinlich nur eine [NiFe] Hydrogenase, während der Stamm *Desulfovibrio vulgaris* DSM 644 sowohl eine [Fe], eine [NiFe] und eine [NiFeSe] Hydrogenase besitzt [49, 232]. Für die anderen verwendeten Stämme sind keine Daten bezüglich der vorhandenen Hydrogenasen bekannt. Voordouw et al. [232] untersuchten die Verteilung der Hydrogenase-Gene zwar in 22 verschiedenen *Desulfovibrio*-Stämmen, darunter befanden sich jedoch nicht die für die Expressionsstudien verwendeten Stämme *Desulfovibrio desulfuricans* DSM 1924 und DSM 1926, *Desulfovibrio vulgaris* DSM 1744 und *Desulfovibrio baculatus* DSM 2555. Die in der zitierten Studie gezeigten Ergebnisse weisen daraufhin, daß die Verteilung der [Fe] und [NiFeSe] Hydrogenasen in Stämmen dergleichen Spezies variieren. Daher erlauben Ergebnisse, die für andere Stämme der verwendeten Spezies beschrieben wurden, keine Rückschlüsse auf das Hydrogenase-System dieser Stämme.

Alle untersuchten *Desulfovibrio*-Stämme exprimierten unabhängig von der Komplexität ihres Hydrogenase-Systems das [NiFe] Hydrogenase-Gen, wenn Laktat oder Wasserstoff als Energiequelle in Gegenwart von Sulfat verwertet wurde (Abschnitt 3.2.1, Tabelle 3.3). Erstaunliche Ergebnisse zeigte allerdings die Untersuchung des Stammes *Desulfovibrio desulfuricans* DSM 1926. Dieser Stamm besitzt offensichtlich wie alle anderen *Desulfovibrio* spp. eine [NiFe] Hydrogenase (Tabelle 3.2). Wuchs der Stamm in Laktat-Sulfat-Medium, konnte auch die Expression des [NiFe] Hydrogenase-Gens aufgezeigt werden. Dieser Stamm war allerdings nicht in der Lage, mit Wasserstoff als einziger Energiequelle und Acetat als Kohlenstoffquelle in Gegenwart von Sulfat

zu wachsen. Dies ist merkwürdig, da theoretisch für die Oxidation von molekularem Wasserstoff als Energiequelle nur eine periplasmatische Hydrogenase erforderlich ist, während man für die Oxidation von organischen Substraten zwei unterschiedliche im Periplasma und im Cytoplasma lokalisierte Hydrogenasen postuliert [122, 140]. Angenommen, dieser Stamm besitzt ausschließlich eine [NiFe] Hydrogenase, sollte er doch ebenso wie der Stamm *Desulfovibrio gigas*, in dem die periplasmatische [NiFe] Hydrogenase vermutlich für alle Aspekte des Wasserstoffmetabolismus verantwortlich ist [138], zur Oxidation von molekularem Wasserstoff als einziger Energiequelle fähig sein. Da dies nicht der Fall war, liegt die Vermutung nahe, daß sich die [NiFe] Hydrogenase dieses Stammes von der [NiFe] Hydrogenase anderer *Desulfovibrio*-Stämme unterscheidet. 348 bp des Gens, das für die große Untereinheit der [NiFe] Hydrogenase codiert, wurden sequenziert. Der Vergleich der Sequenz von *Desulfovibrio desulfuricans* DSM 1926 mit den Sequenzen anderer *Desulfovibrio* spp. zeigte Ähnlichkeitswerte von durchschnittlich 68% (Tabelle 3.5). Dieser Wert ist vergleichbar mit der Homologie, die zwischen anderen *Desulfovibrio* spp., z. B. *Desulfovibrio vulgaris* DSM 1744 und *Desulfovibrio gigas*, für diesen Bereich des Gens, der etwa 1/4 des gesamten Gens für die große Untereinheit umfaßt, gefunden wurde. Andererseits ergaben immunologische Untersuchungen der Proteinoxtrakte von *Desulfovibrio desulfuricans* DSM 1926 keine spezifische Kreuzreaktion mit Antikörpern, die gegen die [NiFe] Hydrogenase von *Desulfovibrio gigas* bzw. *Desulfovibrio vulgaris* Groningen gerichtet waren (Abschnitt 3.1.4). Dieser Unterschied in den immunologischen Eigenschaften des Enzyms, ist ein Hinweis darauf, daß das Enzym möglicherweise auch andere katalytische Eigenschaften aufweist als die [NiFe] Hydrogenase von *Desulfovibrio gigas*, wodurch die Unfähigkeit des Wachstums mit Wasserstoff erklärt werden könnte. Eine andere These ist, daß am Wasserstoffmetabolismus von *Desulfovibrio gigas* weitere bisher nicht charakterisierte Hydrogenasen beteiligt sind, die dem Stamm *Desulfovibrio desulfuricans* DSM 1926 fehlen. Dafür spricht, daß auch sulfatreduzierende Bakterien anderer Gattungen die Fähigkeit besitzen, Wasserstoff als einzige Energiequelle zu nutzen. Deren Hydrogenase-Gene sind aber offensichtlich nicht homolog zu den bisher von *Desulfovibrio* spp. charakterisierten Genen [232].

Die Tatsache, daß eine [NiFe] Hydrogenase in allen bisher untersuchten *Desulfovibrio* spp. vorhanden ist und daß dieses Enzym unter sulfatreduzierenden Bedingungen exprimiert wird, bildet eine Voraussetzung, um die Expression dieses Gens auch in Umweltproben als Kriterium für metabolisch aktive *Desulfovibrio* spp. zu untersuchen. Eine weitere Voraussetzung dafür ist, daß die Genexpression auf transkriptionaler Ebene mit der Aktivität der Zellen korreliert ist. Dies wurde an drei verschiedenen *Desulfovibrio* spp. gezeigt (Abschnitt 3.2.1).

Desulfovibrio baculatus, *Desulfovibrio vulgaris* DSM 644 und *Desulfovibrio desulfuricans* DSM 1926 wurden in Laktat-Sulfat-Medium angezogen. Das Wachstum wurde über die Zunahme der Biomasse bestimmt, die Stoffwechselaktivität über die Produktion von Sulfid. Es wurde gezeigt, daß der [NiFe] Hydrogenase-mRNA-Spiegel in exponentiell wachsenden Zellen hoch war. Erreichten die Kulturen die stationäre Phase, in der die Zellzahl und die Sulfidproduktion konstant ist, war die [NiFe] Hydrogenase-mRNA nicht mehr nachweisbar. Direkte Messungen der Hydrogenase-Aktivität im Verlauf des

Wachstums wurden nicht durchgeführt, da diese Messungen keine Unterscheidung zwischen den Aktivitäten verschiedener Hydrogenasen erlauben. Für den Stamm *Desulfovibrio vulgaris* DSM 644 war gezeigt worden, daß unter ähnlichen Wachstumsbedingungen 95% der Hydrogenase-Aktivität auf die Aktivität der [Fe] Hydrogenase zurückzuführen waren, sodaß Änderungen in der Gesamt-Hydrogenase-Aktivität als Änderungen der Aktivität der [Fe] Hydrogenase betrachtet werden konnten [223]. Messungen der Hydrogenase-Aktivität im Verlauf des Wachstums von *Desulfovibrio gigas* auf Laktat-Sulfat-Medium zeigten, daß die Aktivität der [NiFe] Hydrogenase in der exponentiellen Wachstumsphase anstieg und abnahm, als die Kultur die stationäre Wachstumsphase erreichte [138]. *Desulfovibrio gigas* besitzt soweit bekannt ausschließlich eine [NiFe] Hydrogenase [138]. Daher sollten Änderungen der gemessenen Hydrogenase-Aktivität Änderungen der [NiFe] Hydrogenase reflektieren. Wahrscheinlich geht die Abnahme der [NiFe] Hydrogenase-mRNA im Verlauf des Wachstums auch in den untersuchten Kulturen mit einer Abnahme der [NiFe] Hydrogenase-Aktivität einher.

Van den Berg et al. [224] bestimmten die Hydrogenase-Aktivität und die [Fe] Hydrogenase-mRNA-Spiegel im Verlauf des Wachstums von *Desulfovibrio vulgaris* DSM 644 mit organischen Elektronendonatoren. Die Menge an mRNA war am höchsten in Zellen zu Beginn des Wachstums. Während die Menge an mRNA leicht abnahm bis zum Ende der exponentiellen Wachstumsphase, stieg die Hydrogenase-Aktivität bis zu einem Maximalwert am Ende des exponentiellen Wachstums. Dann sank der mRNA-Spiegel abrupt ab, was durch einen Abfall der Hydrogenase-Aktivität begleitet wurde. Dies weist auf eine Regulation der Hydrogenase-Expression auf transkriptionaler Ebene abhängig von der Wachstumsphase hin [224]. Die Expressionsmuster der [NiFe] Hydrogenasen verschiedener *Desulfovibrio* spp. zeigten einen ähnlichen Verlauf (Abschnitt 3.2.1). Die Experimente zeigten deutlich, daß die [NiFe] Hydrogenase-mRNA in exponentiell wachsenden Bakterienpopulationen exprimiert wurde und in Populationen, die sich in der stationären Wachstumsphase befanden, nicht mehr nachweisbar war.

Kürzlich wurde die Transkriptionseinheit für das [NiFe] Hydrogenase-Gen von *Desulfovibrio fructosovorans* untersucht [182]. Drei unterschiedliche Transkripte wurden für das [NiFe] Hydrogenase-Operon gefunden. Neben einem Haupttranskript von 2,9 kb, dessen Länge darauf hinweist, daß es die Strukturgene für die kleine und große Untereinheit der [NiFe] Hydrogenase enthält, wurden zwei größere Transkripte (4,4 und 5,8 kb) in geringen Mengen gefunden. Dies weist daraufhin, daß die [NiFe] Hydrogenase durch ein komplexes Operon codiert wird, das weitere (regulatorische) Gene enthält. Zusätzlich wurde in dieser Studie der Promotor des Hydrogenase-Operons stromaufwärts des [NiFe] Hydrogenase-Gens identifiziert. Die Daten sprechen dafür, daß es sich um einen starken Promoter handelt, der vermutlich zur *Escherichia coli* σ^{70} -Gruppe gehört.

In Wachstumsversuchen mit *Desulfovibrio baculatus* und *Desulfovibrio vulgaris* DSM 644 wurde zusätzlich zum Nachweis der mRNA des [NiFe] Hydrogenase-Gens, auch der RNA- und Proteingehalt der Zellen im Verlauf des Wachstums verfolgt und der Anteil der [NiFe] Hydrogenase in Gesamt-Proteinextrakten betrachtet (Abschnitt 3.2.1). Der [NiFe] Hydrogenase-mRNA-Spiegel wurde im Verhältnis zum Gesamt-RNA-Gehalt untersucht und nahm im Verlauf des Wachstums ab. Parallel dazu sank der Gesamt-RNA-

Gehalt pro Zelle in der stationären Wachstumsphase (Abbildung 3.17). Da Gesamt-RNA zu 80% aus ribosomaler RNA besteht und der Anteil an mRNA nur etwa 3% beträgt [3], ist eine Abnahme des RNA-Gehaltes pro Zelle auf die Verringerung der Anzahl der Ribosomen in der späten Wachstumsphase zurückzuführen. Diese Beziehung des rRNA-Gehaltes zum metabolischen Zustand der Zellen ist seit langem bekannt [179] und wurde durch neuere Untersuchungen mit Hilfe der *in situ* Hybridisierung bestätigt [109, 159, 184]. Mit Hilfe dieser Technik wurde auch gezeigt, daß hungrierende Zellen die Anzahl der Ribosomen pro Zelle reduzierten [59]. Bezieht man die Tatsache, daß der rRNA-Gehalt pro Zelle im Verlauf des Wachstums um etwa 50% abnahm, bei der Interpretation des Nachweises der mRNA mit ein, können folgende Aussagen gemacht werden: Die konstante Menge an Gesamt-RNA, die für diese Experimente eingesetzt wurde, resultierte aus unterschiedlich vielen Zellen. Zum Ende des Wachstums waren mehr Zellen erforderlich, um diese konstante Menge von Gesamt-RNA zu erbringen. Trotzdem und trotz der sensitiven RT-PCR, die zum Nachweis des [NiFe] Hydrogenase-Transkript angewendet wurde, war es in der stationären Phase nicht mehr nachweisbar.

Der Gesamt-Proteingehalt pro Zelle verhielt sich im Verlauf des Wachstums genau umgekehrt wie der Gesamt-RNA-Gehalt. Er war in exponentiell wachsenden Zellen gering und stieg im Verlauf des Wachstums um etwa 50% an (Abbildung 3.17). Der Anteil der [NiFe] Hydrogenase wurde im Verhältnis zum Gesamt-Protein betrachtet und durch die spezifische Kreuzreaktion mit einem Antikörper nachgewiesen. Es wurden keine Unterschiede in der Konzentration des [NiFe] Hydrogenase im Verlauf des Wachstums beobachtet. Auch hier resultierte die konstante Menge an Gesamt-Protein, die für diese Experimente eingesetzt wurden, aus unterschiedlich vielen Zellen. Zum Ende des Wachstums waren weniger Zellen erforderlich, um diese konstante Menge von Gesamt-Protein zu erbringen. Daher kann man spekulieren, daß der [NiFe] Hydrogenase-Gehalt pro Zelle im Verlauf des Wachstums leicht sank und auf die Abnahme der mRNA zurückgeführt werden kann. Dies ging vermutlich mit der Abnahme der Hydrogenase-Aktivität einher. Leider erlaubt die gewählte Versuchsanordnung keinen direkten Hinweis darauf. Im Gegensatz zu der [NiFe] Hydrogenase-mRNA ist das Protein offensichtlich sehr stabil. Untersuchungen an *Desulfovibrio vulgaris* zeigten, daß sogar in alten Kulturen, die nicht lebensfähige Bakterienzellen enthielten, die Hydrogenasen durch Zugabe des Reduktionsmittels Dithionit aktiviert werden konnten [24]. Der Nachweis des Proteins erlaubt daher keine Rückschlüsse darüber, ob die [NiFe] Hydrogenase auch aktiv ist und aus lebensfähigen, aktiven Zellen stammt.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, daß zum einen der Nachweis von [NiFe] Hydrogenase-mRNA unter sulfatreduzierenden Bedingungen prinzipiell möglich ist und daß das Transkript in der stationären Wachstumsphase nicht mehr nachweisbar ist. Dies eröffnet die Möglichkeit, metabolisch aktive *Desulfovibrio* spp. in Umweltproben durch die Bestimmung der [NiFe] Hydrogenase-Genexpression auf mRNA-Ebene nachzuweisen. Die mit Umweltproben durchgeführten Versuche werden detailliert in Abschnitt 4.3 diskutiert.

4.3 Diversität und Aktivität von *Desulfovibrio* spp. in Umweltproben

4.3.1 *Desulfovibrio* spp. in einem denitrifizierenden Bioreaktor

Die *Desulfovibrio*-Population eines experimentellen denitrifizierenden Bioreaktors wurde untersucht. Die Bakteriengemeinschaft dieses Bioreaktors ist gekennzeichnet durch die Fähigkeit, unter anaeroben Bedingungen Ammonium mit Nitrat als Elektronenakzeptor zu oxidieren [130, 222]. Als Endprodukt dieses Prozesses entsteht molekularer Stickstoff. Die Oxidation von Ammonium war bisher nur als aerober Prozeß bekannt, der mit Sauerstoff als Elektronenakzeptor durchgeführt wird und dessen Endprodukt Nitrat ist (Nitrifikation). In Abwesenheit von Sauerstoff wird dann effizient Nitrat als Elektronenakzeptor zu molekularem Stickstoff reduziert (Denitrifikation). Die Bakteriengemeinschaft des untersuchten Bioreaktors ist offensichtlich in der Lage, die vollständige Oxidation von Ammonium zu N_2 in Abhängigkeit von Nitrat unter anaeroben Bedingungen durchzuführen [130, 222]. Dieser Prozeß könnte eine wichtige Rolle bei der Behandlung von Abwasser spielen, um Verunreinigungen durch Stickstoffverbindungen zu reduzieren. Bisher ist eine Isolierung der dafür verantwortlichen Bakterienstämme nicht gelungen. Sulfatreduzierende Bakterien bilden einen Teil der Bakteriengemeinschaft dieses Bioreaktors. Es wurde gezeigt, daß innerhalb der Bakteriengemeinschaft Sulfatreduktion stattfand, wenn der Elektronenakzeptor Nitrat verbraucht war; sobald frisches Nitrat zugefügt wurde, stoppte die Sulfatreduktion [130].

Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Nachweissystem für sulfatreduzierende Bakterien der Gattung *Desulfovibrio* wurde angewendet, um die genetische Diversität dieser Gruppe der Bakteriengemeinschaft zu untersuchen (Abschnitt 3.2.3.1). Es wurde gezeigt, daß die Zusammensetzung der nachweisbaren *Desulfovibrio*-Population nach Inkubation mit verschiedenen Substraten über 20 Stunden konstant blieb (Abbildung 3.20). Fünf verschiedene Sequenzen des [NiFe] Hydrogenase-Gens wurden aus der Bakteriengemeinschaft gewonnen. Der Vergleich dieser Sequenzen untereinander (Tabelle 3.6) zeigte eine Identität auf DNA-Ebene von 88–97,6%. Die Identität der abgeleiteten Aminosäuresequenzen betrug mehr als 90%. Solche geringen Unterschiede in den Sequenzen von [NiFe] Hydrogenase-Genfragmenten wurden ansonsten nur für zwei Stämme der gleichen Spezies gefunden (*Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki und DSM 644). Die größte Ähnlichkeit wiesen diese Sequenzen mit der Sequenz des Stammes *Desulfovibrio sulfodismutans* auf. Die Sequenz K6S6 zeigte sogar 99,1% Sequenzidentität in der Aminosäuresequenz mit dem entsprechenden Bereich des [NiFe] Hydrogenase-Gens von *Desulfovibrio sulfodismutans*; das entspricht einer veränderten Aminosäure. Aufgrund der geringen Sequenzunterschiede kann man vermuten, daß es sich bei den nachgewiesenen *Desulfovibrio*-Populationen um Stämme von *Desulfovibrio sulfodismutans* handelt.

Der Stamm *Desulfovibrio sulfodismutans* wurde von Bak und Pfennig aus Schlamm eines Süßwassergrabens in der Nähe von Konstanz isoliert und beschrieben [11]. Dieser

Sulfatreduzierer kann chemolithotroph durch die Disproportionierung von Thiosulfat oder Sulfit zu Sulfat und Sulfid wachsen. Als Kohlenstoffquelle wird Acetat für diesen Prozeß benötigt. Im Gegensatz zu anderen sulfatreduzierenden Bakterien wächst dieser Stamm schneller durch die Disproportionierung von anorganischen Schwefelverbindungen als durch Sulfatreduktion. Er unterscheidet sich von den klassischen *Desulfovibrio* spp. auch dadurch, daß er sehr langsam mit Wasserstoff als Energiequelle wächst und Pyruvat nicht verwerten kann. Einige metabolische Eigenschaften von *Desulfovibrio sulfodismutans* sind in Tabelle 4.4 aufgeführt.

Zum Zeitpunkt der Probennahme exprimierte vermutlich keiner der nachgewiesenen *Desulfovibrio*-Stämme in dem Bioreaktor das [NiFe] Hydrogenase-Gen. In einem der vorhandenen Stämme der Bakteriengemeinschaft führte die Inkubation mit Wasserstoff zur Expression des Gens. Dieser Stamm unterschied sich offensichtlich in seinen physiologischen Fähigkeiten von den anderen *Desulfovibrio*-Stämmen, obwohl die Sequenz des [NiFe] Hydrogenase-Genfragments eine sehr hohe Ähnlichkeit zu diesen aufwies. Auch zeigte sie eine hohe Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz zu der [NiFe] Hydrogenase von *Desulfovibrio sulfodismutans* (95,5% Identität). Diese Sequenz, K6S8, wies jedoch mit 86,9% eine größere Ähnlichkeit zu *Desulfovibrio fructosovorans* auf als die anderen Sequenzen, die aus den PCR-Produkten des denitrifizierenden Bioreaktors gewonnen wurden (Tabelle 3.6). Die [NiFe] Hydrogenase-Gensequenzen von *Desulfovibrio sulfodismutans* und *Desulfovibrio fructosovorans* wiesen auf Aminosäure-Ebene eine Identität von 84,8% auf. Möglicherweise ist der zur Sequenz K6S8 gehörende Bakterienstamm näher mit *Desulfovibrio fructosovorans* verwandt als mit *Desulfovibrio sulfodismutans*. Im Gegensatz zu *Desulfovibrio sulfodismutans* ist *Desulfovibrio fructosovorans* ein typischer Wasserstoffoxidierer. Der Stamm ist außerdem gekennzeichnet durch die herausragende Fähigkeit, Fructose unter sulfatreduzierenden und sogar fermentativen Bedingungen als Energiequelle zu nutzen [145]. Er wurde aus dem Sediment eines Ästuars isoliert [82]. Einige metabolische Eigenschaften von *Desulfovibrio fructosovorans* sind in Tabelle 4.4 aufgeführt.

Der Hauptprozeß in dem untersuchten Bioreaktor betrifft den Stickstoffkreislauf. Sulfatreduktion fand innerhalb der Bakteriengemeinschaft des Bioreaktors nur statt, wenn der Elektronenakzeptor Nitrat verbraucht war [130]. Dieser inhibitorische Effekt von Nitrat auf die Sulfatreduktion, wurde auch in Klärschlammproben [81] und in Reinkulturen sulfatreduzierender Bakterien [191] beobachtet. So stellt sich die Frage, welche Rolle spielt die Population sulfatreduzierender Bakterien in einem denitrifizierenden Bioreaktor? Und wie konkurriert sie mit den anderen Bakterien? Stellen sulfatreduzierende Bakterien möglicherweise Substrate für die Ammoniumoxidation zur Verfügung? Sind sie maßgeblich an diesem Prozeß beteiligt oder sind sie nur Randeffekte?

Sulfatreduzierende Bakterien sind auch in den Stickstoffkreislauf involviert: Einige *Desulfovibrio* spp. reduzieren Nitrat oder Nitrit als Elektronenakzeptor zu Ammonium [35, 99, 191]. Untersuchungen eines Isolats aus Bodenproben eines Reisfeldes, *Desulfovibrio desulfuricans* C4S, zeigten, daß dieser Stamm eine sehr hohe Affinität zu Nitrat hat und in hohen Zellzahlen in Bodenproben eines Reisfeldes vorhanden war [35]. Daher wurde vermutet, daß dieser Stamm eine wichtige Rolle als Nitratreduzierer

an diesem Standort spielen könnte. Die Identifizierung der *Desulfovibrio*-Stämme in der Bakteriengemeinschaft des denitrifizierenden Bioreaktors basierend auf dem [NiFe] Hydrogenase-Gen zeigte, daß die nächsten Verwandten *Desulfovibrio sulfodismutans* und *Desulfovibrio fructosovorans* waren. Beide Bakterienstämme sind nicht in der Lage Nitrat zu reduzieren [11, 145]. Möglicherweise wurde diese Fähigkeit allerdings falsch eingeschätzt. Dalsgaard und Bak [35] zeigten, daß die Fähigkeit sulfatreduzierender Bakterien, Nitrat zu reduzieren wahrscheinlich unterschätzt wurde, da die verwendeten Medien Sulfid enthielten. Sulfid hemmt in einer Konzentration von 0,1 mM die Nitratreduktion in sulfatreduzierenden Bakterien [35]. In dem zufließenden Abwasser des untersuchten Bioreaktors wurde Sulfid in Konzentrationen von mehr als 2 mM nachgewiesen [130]. Unter diesen Bedingungen erscheint es unwahrscheinlich, daß die nachgewiesenen *Desulfovibrio*-Stämme in dem Bioreaktor Nitrat reduzieren und an dem Stickstoffmetabolismus direkt beteiligt sind.

Es ist bekannt, daß beträchtliche Populationen sulfatreduzierender Bakterien in anaeroben Habitaten wie Abwasseranlagen auch unter nicht-sulfatreduzierenden Bedingungen aufrechterhalten werden [142]. Dies geschieht durch Fermentationsprozesse und erklärt wahrscheinlich auch das Überleben von *Desulfovibrio* spp. in dem denitrifizierenden Bioreaktor: *Desulfovibrio fructosovorans* kann beispielsweise eine Reihe von organischen Kohlenstoffverbindungen fermentieren [145]. Zudem kann dieser Bakterienstamm aktiv am "interspecies hydrogen transfer" teilnehmen, sowohl als Wasserstoffoxidierer mit syntrophen Bakterien als auch als Wasserstoffproduzierer mit methanogenen Bakterien [31, 82]. *Desulfovibrio sulfodismutans* kann sogar die anorganischen Substrate Sulfid oder Thiosulfat zu Sulfat und Sulfid fermentieren [11]. Die Tatsache, daß zum Zeitpunkt der Probennahme keiner der nachgewiesenen *Desulfovibrio*-Stämme das [NiFe] Hydrogenase-Gen exprimiert, läßt darauf schließen, daß die Populationen zu diesem Zeitpunkt weder durch Sulfat- und vermutlich auch nicht durch Nitrat- oder Nitritreduktion wuchsen, denn diese Prozesse erfordern die Aktivität der [NiFe] Hydrogenase. Meines Wissens wurde bisher nicht untersucht, ob das [NiFe] Hydrogenase-Gen exprimiert wird, wenn *Desulfovibrio* spp. fermentativ leben. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, daß die nachgewiesenen Stämme zum Zeitpunkt der Probennahme durch Fermentationsreaktionen metabolisch aktiv waren. Krämer und Cypionka [98] zeigten, daß das Wachstum sulfatreduzierender Bakterien mit Thiosulfat oder Sulfid zu einer 3–10-fachen Zunahme der Hydrogenase-Aktivität führt. Inwieweit die [NiFe] Hydrogenase dabei involviert ist, ist nicht bekannt. Angenommen die *Desulfovibrio*-Population war zum Zeitpunkt der Probennahme tatsächlich nicht aktiv, so zeigte doch die Induktion der Expression des [NiFe] Hydrogenase-Gens durch Wasserstoff, daß diese Bakterienpopulationen rasch auf wechselnde Umweltbedingungen reagieren können und Elektronendonatoren nutzen, sobald diese zur Verfügung stehen. Daher ist anzunehmen, daß die *Desulfovibrio* spp. in dem denitrifizierenden Bioreaktor zu anderen Zeitpunkten aktiv sind.

Der denitrifizierende Bioreaktor ist vermutlich ein "extremer" Standort für sulfatreduzierende Bakterien, in dem sie mit anderen Bakterien zwar nicht um Sulfat, aber um Elektronendonatoren konkurrieren müssen. Trotz der geringen Diversität des [NiFe] Hydrogenase-Gens der nachweisbaren Populationen der Gattung *Desulfovibrio* besit-

zen diese vermutlich unterschiedliche physiologische Fähigkeiten.

4.3.2 *Desulfovibrio* spp. in einem methanogenen Bioreaktor

In anaeroben Biotopen leben sulfatreduzierende Bakterien in enger Assoziation mit methanogenen Bakterien und fermentativen Bakterien [199]. Eine solche Bakteriengemeinschaft findet man auch in methanogenen Bioreaktoren, die zur Behandlung von Abwässern verwendet werden [148]. Die Methanbildung erfolgt prinzipiell in drei Schritten: Fermentation organischer Substrate, Acetogenese (Bildung von Acetat) und Methanogenese. *Desulfovibrio* spp. können in anaeroben Bioreaktoren als sulfatreduzierende Bakterien fungieren, wenn die Sulfatkonzentration hoch ist. Sie bauen Fermentationsprodukte wie Laktat zu Acetat und CO₂ ab und stellen so Substrate für die methanogenen Bakterien zur Verfügung. Andererseits konkurrieren sie mit diesen Bakterien um den Elektronendonator Wasserstoff. Ist die Sulfatkonzentration gering, sind sie fähig, fermentativ oder in syntropher Assoziation mit methanogenen Bakterien zu wachsen.

Die *Desulfovibrio*-Population eines experimentellen methanogenen Bioreaktors wurde untersucht (Abschnitt 3.2.3.2). Dieser Reaktor wird mit Abwasser aus einer Bäckerhefeherstellungsanlage gespeist, das eine hohe Sulfatkonzentration aufweist [130]. Besonders interessant ist dieser Reaktor, da das abfließende Abwasser in den oben beschriebenen denitrifizierenden Bioreaktor fließt. Beide Bioreaktoren unterscheiden sich in den stattfindenden mikrobiellen Prozessen: Anaerobe Ammoniumoxidation bzw. Methanbildung. Wie wird dadurch die *Desulfovibrio*-Population beeinflusst?

Physiologisch unterschiedliche Typen sulfatreduzierender Bakterien konnten in Süßwassermedium für sulfatreduzierende Bakterien, das mit Schlamm aus dem methanogenen Bioreaktor beimpft wurde, leicht angereichert werden (Abschnitt 3.2.3.2). Dem Medium wurden verschiedene organische Energiequellen bzw. Wasserstoff zugesetzt. Die Verwertung von Propionat wies auf das Vorhandensein von *Desulfobulbus* spp. hin, während die Verwertung von Laktat und Wasserstoff die selektive Anreicherung von *Desulfovibrio* spp. anzeigte [251]. *Desulfovibrio* spp. wurden in den Anreicherungen mit Laktat und Wasserstoff zusätzlich über die spezifische Amplifikation des [NiFe] Hydrogenase-Gens nachgewiesen (Abbildung 3.21). Anreicherungskulturen mit Acetat zeigten auch nach 9 Tagen Inkubation keine Sulfidproduktion. Dies kann darauf hinweisen, daß Acetat-oxidierende Sulfatreduzierer keine große Rolle in dem untersuchten Bioreaktor spielen. Diese Sulfatreduzierer konkurrieren mit methanogenen Bakterien um das Substrat Acetat. Eine höhere Affinität zu Acetat favorisiert möglicherweise das Wachstum methanogener Bakterien in dem Bioreaktor [148]. Denkbar ist auch, daß das für die Anreicherungen verwendete Medium für Acetat-oxidierende Sulfatreduzierer nicht geeignet war. Acetat kann von sulfatreduzierenden Bakterien der Gattung *Desulfobacter* und *Desulfobacterium* komplett oxidiert werden. Diese Bakterienstämme sind jedoch typische Brack- und Salzwasserstämme, die hohe Konzentrationen an NaCl (> 150 mM) und Mg (> 5 mM) für ein optimales Wachstum benötigen. Solche hohen Salzkonzentrationen waren in dem verwendeten Medium nicht gegeben.

Die *Desulfovibrio*-Populationen in dem Bioreaktor und in den Anreicherungen mit Laktat wurden weitergehend untersucht. Aus DNA- und RNA-Präparationen dieser Proben wurden [NiFe] Hydrogenase-Genfragmente amplifiziert und in denaturierenden Gradientengelen analysiert (Abbildung 3.21). Der Vergleich der Elektrophoresemuster der PCR-Produkte ausgehend von DNA-Sequenzen zeigte gravierende Unterschiede in Proben, die direkt aus dem Bioreaktor gewonnen wurden, und Proben, aus den Anreicherungskulturen mit Laktat. In den Laktatanreicherungen tauchten PCR-Produkte von *Desulfovibrio* spp. auf, die in der Originalprobe nicht nachweisbar waren. Dies weist auf eine Veränderung der Zusammensetzung der Lebensgemeinschaft durch den Kultivierungsprozeß und die damit verbundene Veränderung der Wachstumsbedingungen hin. Die angeführten Ergebnisse zeigen ein weiteres Beispiel dafür, daß die Struktur einer mikrobiellen Lebensgemeinschaft mit kultivierungsabhängigen Techniken möglicherweise nicht adäquat aufgezeigt werden kann, da durch die verwendeten Medien bestimmte Bakteriengruppen selektiv angereichert werden. Die Untersuchung der Populationszusammensetzung mit molekularbiologischen Methoden bietet die Möglichkeit diese Verschiebungen während der Anreicherung und Isolierung von Bakterien zu verfolgen. Dies wurde ebenfalls elegant mit Hilfe der *in situ* Hybridisierung ganzer Zellen demonstriert: Wagner et al. [241] untersuchten beispielsweise Belebtschlammproben und zeigten durch den Einsatz 16S rRNA-gerichteter Oligonukleotidsonden die Unzulänglichkeit von kultivierungsabhängigen Methoden auf, die Struktur dieser mikrobiellen Gemeinschaft zu erfassen.

Im Gegensatz zu dem denitrifizierenden Bioreaktor wurde das [NiFe] Hydrogenase-Gen der nachgewiesenen *Desulfovibrio* spp. zum Zeitpunkt der Probenahme in dem methanogenen Bioreaktor exprimiert. Die zugehörigen Bakterienstämme waren demnach metabolisch aktiv. [NiFe] Hydrogenase-mRNA-Sequenzen wurden auch in den Anreicherungen nachgewiesen und gelelektrophoretisch analysiert. Die Veränderung der *Desulfovibrio*-Population im Verlauf des Anreicherungsprozesses zeigte sich auch in Unterschieden im Elektrophoresemuster der amplifizierten RNA-Sequenzen. Auf der mRNA-Ebene war die Reaktion der *Desulfovibrio*-Population auf die Änderung der Wachstumsbedingungen allerdings schon erkennbar, bevor die Änderungen der Populationszusammensetzung auf DNA-Ebene sichtbar wurden (Abbildung 3.21). Unterschiede in den Elektrophoresemustern von DNA-Amplifikaten und mRNA-Amplifikaten einer Umweltprobe, die zum gleichen Zeitpunkt genommen wurde, können demnach auf eine Änderung der Umweltbedingungen an einem Standort hinweisen.

Die ermittelten Sequenzen von PCR-Produkten des denitrifizierenden Bioreaktors und von Bakterienisolaten des methanogenen Bioreaktors ergaben, daß Sequenzen, die die gleiche Position in denaturierenden Gradientengelen einnahmen, auch eine identische Nukleotidsequenz aufwiesen. Aus dem DGGE-Muster von amplifizierten [NiFe] Hydrogenase-Sequenzen des methanogenen Bioreaktors wurden die Sequenzen von vier Banden ermittelt (Abschnitt 3.3.4). Zwei der sequenzierten PCR-Produkte nahmen die gleiche Position im denaturierenden Gradientengel ein und zeigten ebenso eine identische Sequenz (K5S12 und K5S14). Daher wurde davon ausgegangen, daß gleich positionierte Banden des methanogenen Bioreaktors, die im DGGE-Muster eine identische Sequenz aufwiesen, den gleichen Bakterienstamm repräsentierten. Die Sequenz K5S12/14 fand

sich in der Originalprobe und in den frühen Anreicherungen auf Laktat (Abbildung 3.21). In der 4. Passage der Anreicherung trat sie im DGGE-Muster nicht mehr auf (Abbildung 3.22). Eine weitere Sequenz, K5S18, wurde ausschließlich in der Originalprobe und nicht in den Anreicherungen gefunden. Die Sequenzen K5S12/14 und K5S18 wiesen untereinander eine hohe Identität auf (91,7% auf DNA-Ebene) und zeigten die höchste Ähnlichkeit mit Sequenzen von *Desulfovibrio sulfodismutans* (98,2 und 92,4%) und *Desulfovibrio fructosovorans* (85,5 und 82,2%). Die abgeleitete Aminosäuresequenz von K5S12/14 war identisch mit der Sequenz K6S6 aus dem denitrifizierenden Bioreaktor, auf DNA Ebene unterschieden sich die beiden Sequenzen nur in einem Nukleotid (99,7% Identität). Die Sequenz K5S18 zeigte mit 96% Identität die größte Ähnlichkeit zu der Sequenz K6S4 des denitrifizierenden Bioreaktors. Nahezu identische *Desulfovibrio*-Populationen wurden demnach sowohl in dem denitrifizierenden als auch in dem methanogenen Bioreaktor nachgewiesen.

Desweiteren wurde eine Bande des DGGE-Musters sequenziert, die in den Laktatanreicherungen auftauchte und in der Originalprobe nicht nachweisbar war. Diese Sequenz, K5S5, zeigte eine wesentlich geringere Ähnlichkeit zu den anderen Sequenzen des methanogenen Bioreaktors und nur 76,5% Identität zu der Sequenz von *Desulfovibrio sulfodismutans* und 78,7% Identität zu der Sequenz von *Desulfovibrio fructosovorans*. Sie war am ähnlichsten zu der [NiFe] Hydrogenase-Sequenz von *Desulfovibrio baculatus* DSM 2555 (87,7% Identität auf DNA-Ebene und 93,3% Identität für die abgeleitete Aminosäuresequenz). Aufgrund der hohen Ähnlichkeitswerte könnten diese Sequenzen zur Spezies *Desulfovibrio baculatus* gehören. Der Stamm *Desulfovibrio baculatus* DSM 2555 ist ein marines Isolat aus Sedimentproben des Ems-Dollard-Ästuars [104, 105]. Einige physiologische Fähigkeiten von *Desulfovibrio baculatus*, *Desulfovibrio sulfodismutans* und *Desulfovibrio fructosovorans* sind in Tabelle 4.4 aufgeführt. Betrachtet man die Fähigkeiten von *Desulfovibrio baculatus* und *Desulfovibrio sulfodismutans*, kann man spekulieren, daß Stämme ähnlich zu *Desulfovibrio baculatus* schneller auf Laktat-Sulfat-Medium wachsen können, denn Stämme ähnlich zu *Desulfovibrio sulfodismutans* konservieren Energie bevorzugt aus der Disproportionierung von Thiosulfat und Sulfid und wachsen langsamer durch Sulfatreduktion verglichen mit klassischen Sulfatreduzierern [11]. So kann man erklären, daß mit dem verwendeten Laktat-Sulfat-Medium selektiv *Desulfovibrio baculatus*-ähnliche Stämme kultiviert wurden. Dies ist ein Hinweis darauf, daß *Desulfovibrio*-Stämme, die ähnliche [NiFe] Hydrogenase-Sequenzen aufweisen, auch ähnliche physiologische Eigenschaften besitzen.

Die Tatsache, daß *Desulfovibrio baculatus*-ähnliche Bakterienstämme in Proben, die direkt aus dem methanogenen Bioreaktor entnommen wurden, weder aktiv noch nachweisbar waren, läßt darauf schließen, daß die Umweltbedingungen für diese Bakterienstämme zum Zeitpunkt der Probenahme nicht optimal waren. *Desulfovibrio baculatus*-ähnliche Bakterienstämme wuchsen aber relativ schnell nach Veränderung der Umweltbedingungen. Möglicherweise haben sie eine besondere Überlebensstrategie entwickelt. Man nimmt an, daß sulfatreduzierende Bakterien im allgemeinen nicht sehr fest an Schlammpartikel binden und so durch Auswaschung in relativ geringen Dichten in methanogenen Bioreaktoren gehalten werden [250]. Im Gegensatz zu anderen sulfatreduzierenden Bakterien zeichnet sich *Desulfovibrio baculatus* DSM 2555 durch

Tabelle 4.4: Physiologische Eigenschaften von *Desulfovibrio sulfodismutans*, *Desulfovibrio fructosovorans* und *Desulfovibrio baculatus* DSM 2555. Diese Bakterienstämme wiesen [NiFe] Hydrogenase-Sequenzen auf, die sehr ähnlich zu den Sequenzen waren, die aus einem denitrifizierenden bzw. einem methanogenen Bioreaktor ermittelt wurden.

Substrat ^a	<i>D. sulfodismutans</i> ^b	<i>D. fructosovorans</i> ^c	<i>D. baculatus</i> ^d
In Gegenwart von Sulfat:			
H ₂ , CO ₂ und Acetat	(+)	+	+
Formiat und Acetat	-	+	+
Acetat	-	-	-
Propionat	-	-	-
Butyrat	-	-	-
Pyruvat	-	+	nb
Laktat	+	+	+
Succinat	-	-	nb
Fumarat	-	+	nb
Malat	-	+	+
Ethanol	+	(+)	+
Glycerol	(+)	+	nb
Cholin	-	-	nb
Fructose	-	+	nb
In Abwesenheit von Sulfat:			
Pyruvat	nb	+	+
Laktat	nb	-	-
Als Elektronenakzeptor:			
Elementarer Schwefel	-	+	nb
Nitrat	-	-	nb

^a+, Wachstum; (+), langsames, geringes Wachstum; -, kein Wachstum; nb, nicht berichtet

^bErgebnisse aus Bak und Pfenning [11]

^cErgebnisse aus Ollivier et al. [145]

^dErgebnisse aus Laanbroek und Pfenning [104]

die Fähigkeit aus, daß sich hungernde Zellen an Partikel anheften [105]. Möglicherweise wird so das Überleben dieser Bakterienpopulation (und auch der anderen *Desulfovibrio*-Populationen) gesichert. Untersuchungen an *Desulfovibrio desulfuricans* [58] zeigten, daß unter optimalen Konzentrationen an Laktat und Sulfat eine Adhäsion der Bakterienzellen an Partikel zu einer geringeren Aktivität (Sulfatreduktion) der Bakterienpopulation führte im Vergleich zu freilebenden Bakterienzellen. Unter laktatreichen und sulfatarmen Bedingungen war die Aktivität Partikel-assoziiierter Bakterienzellen höher als die der freilebenden Zellen und unter sulfatreichen und laktatarmen Bedingungen zeigten sich keine Unterschiede in der bakteriellen Aktivität. Diese Ergebnisse demonstrieren, daß Partikel-assoziierte sulfatreduzierende Bakterien gegenüber freilebenden Bakterien unter limitierenden Sulfatkonzentrationen einen Vorteil haben. Solche Bedingungen herrschten möglicherweise auch in dem untersuchten methanogenen Bioreaktor.

Das [NiFe] Hydrogenase-Genfragment von sieben Bakterienisolaten aus Anreicherungen mit Laktat wurde ebenfalls sequenziert. Es wurde gezeigt, daß zwei verschiedene Bakterientypen (K5TypA und K5TypB) isoliert wurden, deren [NiFe] Hydrogenase-Genfragmente 98,7% Identität aufwiesen. Erstaunlicherweise war keine der ermittelten Sequenzen identisch zu der Sequenz K5S5; 31 bzw. 29 Nukleotide waren unterschiedlich. Daraus kann man schließen, daß eine natürliche *Desulfovibrio*-Population aus vielen sehr ähnlichen Bakterienstämmen besteht, die an die Umweltbedingungen speziell angepaßt sind und unter günstigen Bedingungen wachsen. Denkbar ist auch, daß sich die Bakterienstämme kontinuierlich durch wechselnde Umweltbedingungen ändern und an diese anpassen, bis der genetische Pool verarmt ist und die Evolutionsgeschwindigkeit dadurch herabgesetzt wird. Dies würde eine hohe Evolutionsgeschwindigkeit zu Beginn der Diversifizierung voraussetzen, die bisher nicht gefunden wurde. Für Proteincodierende Gene wird derzeit eine durchschnittliche Substitutionsrate von 0,7–0,8% pro 1 Million Jahre postuliert [139].

Die [NiFe] Hydrogenase-Sequenzen, die aus der Originalprobe des methanogenen Bioreaktors gewonnen wurden, waren ebenso wie die Sequenzen des denitrifizierenden Bioreaktors durch eine geringe Diversität gekennzeichnet. Sie zeigten untereinander eine höhere Identität als der höchste Wert, der für zwei *Desulfovibrio*-Stämme der gleichen Spezies gefunden wurde. Es ist unwahrscheinlich, daß Fehler und Artefakte der PCR für diese geringen Sequenzunterschiede verantwortlich sind, da die höchste Fehlerrate, die für die Taq Polymerase berichtet wurde (1 in 400 nach 30 PCR-Zyklen) [185], dafür nicht ausreicht. Unwahrscheinlich ist auch die Annahme, daß die Sequenzunterschiede die genetische Variabilität verschiedener [NiFe] Hydrogenase-Operone einer Spezies widerspiegeln, da zum einen für alle untersuchten Reinkulturen eindeutige Sequenzen des [NiFe] Hydrogenase-Gens bestimmt werden konnten und zum anderen Bakterienstämme aus dem methanogenen Bioreaktor isoliert wurden, deren [NiFe] Hydrogenase-Genfragmente ebenfalls eine sehr hohe Identität (99%) aufwiesen. In einer vergleichbaren Studie wurden N₂-fixierende Bakterienstämme, die man in phylogenetisch unterschiedlichen Bakteriengruppen findet, in der Reishizosphäre durch die spezifische Amplifikation eines *nifD* (Nitrogenase)-Genfragments nachgewiesen und über die Sequenzierung der PCR-Produkte identifiziert [220]. Die Autoren dieser Studie fanden verschiedene Cluster von Sequenzen. Innerhalb der Cluster befanden sich Sequenzen, die durch sehr geringe Unterschiede gekennzeichnet waren. Die Autoren schlossen daraus, daß die genetische Variabilität innerhalb der Cluster, die Coexistenz vieler eng verwandter Bakterienlinien innerhalb der diazotrophen Bakteriengemeinschaft der Reiswurzeln anzeigt. Cluster von sehr ähnlichen Sequenzen (> 99% Sequenzidentität) wurden auch in Untersuchungen von 16S rRNA-Sequenzen in Umweltproben gefunden [57, 65]. Da die ribosomale RNA durch mehrere Operone in einem Bakterienstamm codiert werden kann und diese genetische Variabilität zeigen [26, 27], kann nicht ausgeschlossen werden, daß diese nahezu identischen 16S rRNA-Sequenzen von dem gleichen Organismenstyp stammen.

Für die Bakteriengemeinschaft des methanogenen Bioreaktors wurde gezeigt, daß das genetische Potential der *Desulfovibrio*-Population größer ist, als durch die in der Originalprobe nachweisbaren Bakterienstämme zunächst ersichtlich war. Die Anreicherung

und Isolierung von Bakterien ergaben, daß neben den nachweisbaren *Desulfovibrio*-Stämmen noch eine Reihe anderer, vermutlich eng verwandter *Desulfovibrio*-Stämme in dem Bioreaktor vorhanden waren. Das Vorhandensein dieser Stämme weist auf eine größere genetische (76,6–98,7%) und wahrscheinlich auch physiologische Diversität der *Desulfovibrio*-Population an diesem Standort hin. Die Reaktion von *Desulfovibrio*-Stämmen in mikrobiellen Gemeinschaften auf veränderte Umweltbedingungen kann mit der beschriebenen molekularbiologischen Herangehensweise aufgezeigt werden. So führte die Inkubation von Schlammproben des denitrifizierenden Bioreaktors mit Wasserstoff zur Expression des [NiFe] Hydrogenase-Gens eines *Desulfovibrio*-Stammes, und die Inkubation von Schlammproben des methanogenen Bioreaktors in Laktat-Sulfat-Medium resultierte sogar in einer Änderung der Zusammensetzung der *Desulfovibrio*-Population. Untersuchungen der Expressionsmuster des [NiFe] Hydrogenase-Gens ließen dabei die strukturelle Änderung der Population bereits erkennen, bevor diese sich auf DNA-Ebene wiederfand.

Molekularbiologische Charakterisierung sulfatreduzierender Bakterien der Gattung *Desulfovibrio*

- Die spezifische Amplifikation von [NiFe] Hydrogenase-Genfragmenten mittels PCR zeigt das Vorhandensein von *Desulfovibrio* spp. in Umweltproben auf.
- Die sequenzabhängige gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte, z. B. über DGGE, erlaubt die Unterscheidung verschiedener Bakterienstämme.
- Der Nachweis von [NiFe] Hydrogenase-Genexpression in Umweltproben ist mittels RT-PCR möglich.
- Die DGGE Analyse der RT-PCR-amplifizierten mRNA zeigt metabolisch aktive *Desulfovibrio* spp. in Umweltproben auf.
- Die vergleichende Sequenzanalyse von [NiFe] Hydrogenase-Sequenzen verhilft zur Identifizierung der nachgewiesenen *Desulfovibrio* spp.

4.4 Komplexe natürliche Mikrobengemeinschaften

Sulfatreduzierende Bakterien wurden in komplexen natürlichen mikrobiellen Lebensgemeinschaften molekulargenetisch charakterisiert. Neben *Desulfovibrio* spp. wurden auch andere Bakterienpopulationen erfaßt. Die Analyse der Umweltproben erstreckte sich auf eubakterielle 16S rRNA-Sequenzen, und 16S rRNA-gerichtete Oligonukleotidsonden für Bakterien der δ -Proteobakterien und der vollständig oxidierenden Sulfatreduzierer wurden verwendet. Unglücklicherweise konnten mit einer spezifischen 16S rRNA-gerichteten Sonde für die Gattung *Desulfovibrio* keine zuverlässigen Ergebnisse erzielt werden. Dies ist bedauerlich, da so ein Vergleich nachweisbarer *Desulfovibrio*-Populationen basierend auf 16S rRNA-Sequenzen und [NiFe] Hydrogenase-Gensequenzen nicht möglich war. Die Resultate der durchgeführten Untersuchungen wurden teilweise bereits im Kapitel Ergebnisse unter Abschnitt 3.4 diskutiert. In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse zusammenfassend und vergleichend erläutert und neue Aspekte, die bisher nicht angesprochen wurden, aufgegriffen.

4.4.1 Marine Wassersäulen

Die vertikale Verteilung von sulfatreduzierenden Bakterien und speziell *Desulfovibrio*-Stämmen wurde in zwei Meeresbecken untersucht: Mariager Fjord, Dänemark, eine stratifizierte Wassersäule im gemäßigten Klima und Golfo Dulce, Costa Rica, ein teilweise anoxisches Meeresbecken in den Tropen. Diese Standorte unterscheiden sich nicht nur aufgrund des Klimas, sondern auch in der vertikalen chemischen Zonierung. Mariager Fjord ist fast permanent in einen oxischen und einen anoxischen Wasserkörper geteilt und bildet eine Chemokline, in der gleichzeitig geringe Mengen an Sauerstoff und Schwefelwasserstoff auftreten [128, 167]. Der Golfo Dulce hingegen zeigt keine Chemokline. Die Wassertiefen, in denen Sauerstoff verschwindet und Sulfid auftaucht, sind über mehr als 100 m voneinander getrennt [173, 215]. Der Austausch von tieferen Wasserschichten ist im Golfo Dulce vermutlich häufig, da die Pycnokline oberhalb einer Schwelle liegt, die den Wasserkörper der Bucht vom offenen Meer trennt [215].

Unterschiede zeigten sich dementsprechend in der vertikalen Verteilung der Bakterienpopulationen. Die Gesamt-Zellzahlen waren im Mariager Fjord innerhalb der Wassersäule nahezu konstant (10^6 Zellen/ml) [167]. Im Golfo Dulce hingegen enthielt das Oberflächenwasser mehr Zellen (10^6 Zellen/ml) als die tieferliegenden Wasserschichten (10^5 Zellen/ml). Insgesamt waren die Zellzahlen im Golfo Dulce geringer als im Mariager Fjord (Dr. N. B. Ramsing, mündliche Mitteilung). Diese Unterschiede spiegeln sich in der Ausbeute an Nukleinsäuren aus Wasserproben wider.

Sulfatreduzierende Bakterienpopulationen in der Wassersäule des Mariager Fjords wurden über die DGGE Analyse von amplifizierten 16S rRNA- und rDNA-Sequenzen und anschließende Hybridisierungen mit spezifischen 16S rRNA-gerichteten Oligonukleotidsonden (Abschnitt 3.4.1, [212]), durch *in situ* Hybridisierungen ganzer Zellen [167], sowie MPN-Zählungen [212] charakterisiert. Zusammenfassend ergab sich folgendes,

einheitliches Bild: Sulfatreduzierende Bakterien der δ -Proteobakterien wurden hauptsächlich in den Wasserschichten innerhalb und unterhalb der Chemokline gefunden. Vollständig-oxidierende (Acetat-verwertende) sulfatreduzierende Bakterien bildeten einen Teil der gesamten sulfatreduzierenden Bakterienpopulation in der Wassersäule, waren jedoch auf die anoxischen Wasserschichten beschränkt. Laut Ramsing et al. [167] könnte dies darauf zurückgeführt werden, daß die meisten dieser Bakterien nicht beweglich sind. Quantitative MPN-Bestimmungen kultivierbarer Bakterien [212] sowie Zellzählungen nach *in situ* Hybridisierung mit 16S rRNA-gerichteten Oligonukleotidsonden [167] zeigten eine Zunahme der sulfatreduzierenden Bakterien mit zunehmender Wassertiefe an. Diese vertikale Verteilung sulfatreduzierender Bakterien war auch anhand der Southern Blots amplifizierter 16S rRNA-Sequenzen, die mit den Sonden SRB385 und Db804 hybridisiert wurden, ablesbar: Eine Zunahme der Hybridisierungsintensitäten, d. h. der 16S rRNA-Sequenzen sulfatreduzierender Bakterien, wurde in den Proben mit zunehmender Wassertiefe beobachtet und zeigte die Zunahme der zugehörigen Bakterienpopulationen an.

Die kontinuierlichen Gradienten der chemischen Bedingungen in der Wassersäule vom Mariager Fjord [167] spiegelten sich in den unterschiedlichen Bakterienpopulationen, wie sie durch die DGGE Analyse aufgezeigt wurden, wider (Abbildung 3.25). In der Chemokline standen eine Vielzahl von Elektronenakzeptoren und -donatoren zur Verfügung, wie O_2 , Sulfid, elementarer Schwefel, Sulfat, Nitrat, Ammonium sowie oxidierte und reduzierte Formen von Mangan und Eisen [167]. Dies steht in Einklang mit der hohen rRNA-Ausbeute aus Proben der Chemokline und weist auf eine hohe bakterielle Aktivität hin. Der Vergleich der DGGE Analyse von 16S rRNA-Sequenzen, die aus DNA und RNA gewonnen wurden, zeigte in der Chemokline eine interessante rRNA-reiche und daher wahrscheinlich hochaktive Population eines δ -Proteobakteriums an. Die Analyse der Nukleotidsequenz erlaubte keine Zuordnung zu einer der bekannten Gattungen von sulfatreduzierenden Bakterien [212]. Auch wurden keine ähnlichen Bakterienstämme in MPN-Kulturen gefunden [212]. Die Physiologie dieser neuen, unter den gewählten Bedingungen nicht kultivierbaren Bakterienpopulation ist unbekannt und kann nur durch die Isolierung des Bakterienstammes ermittelt werden. Die chemische Zonierung innerhalb der Chemokline [167] sowie die physiologischen Eigenschaften der Mitglieder der δ -Proteobakterien [37, 45, 118, 120, 191] weisen auf eine Vielzahl von Möglichkeiten hin: Die Bakterienpopulation könnte an der Umsetzung von Metallen, Stickstoff oder tatsächlich Schwefelverbindungen beteiligt sein [212].

Sulfatreduzierende Bakterien der Gattung *Desulfovibrio* wurden anhand der [NiFe] Hydrogenase-Genfragmente ausschließlich im Tiefenwasser des Mariager Fjords detektiert (Abschnitt 3.4.1.3). Für diese Wasserschicht wurden die höchsten Zellzahlen kultivierbarer sulfatreduzierender Bakterien über MPN-Bestimmungen ermittelt (10^2 Zellen/ml) [212]. Die Bakterien wurden mit Laktat-Sulfat-Medium angezogen, das selektiv zur Anreicherung von *Desulfovibrio* spp. verwendet wird [251]. Die genetische Diversität der *Desulfovibrio*-Population konnte über die DGGE Analyse der amplifizierten [NiFe] Hydrogenase-Genfragmente nicht bestimmt werden, da das resultierende Elektrophoresemuster keine distinkten Banden zeigte. Möglicherweise waren die denaturierenden Bedingungen im Gel nicht optimal auf das Schmelzverhalten dieser DNA-Fragmente

abgestimmt. Offensichtlich kamen hier andere *Desulfovibrio*-Stämme vor als in den bisher untersuchten Umweltproben und Reinkulturen.

Eine Expression des [NiFe] Hydrogenase-Gens konnte für diese *Desulfovibrio*-Population zum Zeitpunkt der Probennahme nicht aufgezeigt werden. Ob die Population tatsächlich nicht aktiv war, kann nicht eindeutig geklärt werden. Denkbar ist, daß die [NiFe] Hydrogenase-mRNA während der Probennahme bzw. der Extraktion der Nukleinsäuren abgebaut wurde oder daß der spezifische mRNA-Gehalt im Verhältnis zur gesamten mRNA in dieser komplexen Lebensgemeinschaft sehr gering war und dadurch unterhalb der Nachweisgrenze lag. Andererseits lagen die Sulfatreduktionsraten im Tiefenwasser ebenfalls unterhalb der Nachweisgrenze [167]. Um das Potential der [NiFe] Hydrogenase-Genexpression dieser Bakterienpopulationen aufzuzeigen, wäre eine Inkubation der Umweltproben mit verschiedenen Substraten sinnvoll, wie sie für die Bakteriengemeinschaft der Bioreaktoren durchgeführt wurde. Auch das genetische Potential der *Desulfovibrio*-Populationen würde so vermutlich zu Tage treten.

Sowohl im Mariager Fjord als auch im Golfo Dulce wurden kultivierbare sulfatreduzierende Bakterien in geringen Anzahlen im oxygenierten Wasser über MPN-Bestimmungen gefunden [103, 212]. Während die Zellzahlen sulfatreduzierender Bakterien im Mariager Fjord mit zunehmender Wassertiefe kontinuierlich zunahm [212], war die gesamte Wassersäule im Golfo Dulce durch eine sehr geringe Anzahl sulfatreduzierender Bakterien gekennzeichnet [103]. Im Gegensatz zum Mariager Fjord zeigten die DGGE Analyse von amplifizierten 16S rDNA-Sequenzen aus dem Golfo Dulce und anschließende Hybridisierungen mit spezifischen 16S rRNA-gerichteten Oligonukleotidsonden allerdings keine schlüssigen Ergebnisse. In allen Wasserschichten wurden PCR-Fragmente gefunden, die mit der Sonde SRB385 [4] hybridisierten, welche für den Nachweis sulfatreduzierender Bakterien der δ -Proteobakteriengruppe verwendet wurde (Abschnitt 3.4.2). Besonders intensive Hybridisierungssignale zeigten dabei Proben aus den oxischen Wasserschichten. Andererseits zeigte die spezifische Sonde Db804 [42] für die vollständig oxidierenden sulfatreduzierenden Bakterien, u. a. der Gattungen *Desulfobacter* und *Desulfobacterium*, keine positiven Hybridisierungssignale. Zweifel an der Spezifität der Sonde SRB385 wurden bereits in Abschnitt 3.4.2.2 diskutiert. Die geringe Anzahl kultivierbarer sulfatreduzierender Bakterien in der gesamten Wassersäule des Golfo Dulce [103] weist daraufhin, daß sulfatreduzierende Bakterien im Gegensatz zum Mariager Fjord an diesem Standort wahrscheinlich keine große Rolle spielten. Dies könnte auf die schwache Stratifizierung der Wassersäule und den vermutlich häufig auftretenden Austausch der tieferliegenden Wasserschichten zurückgeführt werden [215].

[NiFe] Hydrogenase-Genfragmente von *Desulfovibrio* spp. konnten aus dem Oberflächenwasser sowie dem Tiefenwasser des Golfo Dulce amplifiziert werden (Abschnitt 3.4.2.3). Die Existenz dieser spezifischen Genfragmente im Oberflächenwasser ist ebenso rätselhaft wie die starken positiven Hybridisierungssignale mit der 16S rRNA-gerichteten Oligonukleotidsonde SRB385 in oxygenierten Wasserschichten. Im Gegensatz zu der 16S rRNA-Sonde weisen alle bisher über die Amplifikation von [NiFe] Hydrogenase-Genfragmenten erzielten Ergebnisse auf eine sehr hohe Spezifität des PCR-Testes für *Desulfovibrio* spp. hin. Die Frage, welche Bakterienpopulationen durch die Sonde

SRB385 nachgewiesen wurden bzw. zur Amplifikation von Hyd1f-Hyd5r-Genfragmenten führten, könnte durch die Sequenzierung der PCR-Produkte beantwortet werden. Dann würden mehr Sequenzdaten für eine vergleichende Sequenzanalyse zur Verfügung stehen.

Das Beispiel Golfo Dulce zeigt deutlich, daß der erfolgreiche und zuverlässige Nachweis von definierten Bakteriengruppen in Umweltproben mit molekulargenetischen Methoden von den zur Verfügung stehenden DNA-Sonden bzw. Primer-Systemen abhängt. Die Entwicklung geeigneter Nachweissysteme wird bestimmt durch die derzeit vorhandenen Sequenzdaten von charakterisierten Bakterienstämmen. Da angenommen wird, daß ein Großteil der in der Natur vorkommenden Bakterien bisher nicht kultiviert [14, 79, 243, 247], geschweige denn sequenziert wurde, sind diese Nachweissysteme möglicherweise unzureichend. Verstärkt tritt dieses Problem bei der Untersuchung von komplexen mikrobiellen Gemeinschaften auf, da hier unzählige, unbekannte Nukleinsäuresequenzen vorkommen können. Devereux et al. [44] verwendeten beispielsweise die Sequenz SRB385 als Primer zur Amplifikation von DNA-Fragmenten aus Sedimentproben. Nur 13 von 20 ermittelten Sequenzen fielen in die Gruppe der δ -Proteobakterien; drei dieser Sequenzen enthielten die identische Zielsequenz für eine spezifische 16S rRNA-gerichtete Oligonukleotidsonde, die anhand von Reinkulturen sulfatreduzierender Bakterien entwickelt wurde. Vorsicht ist daher bei der Interpretation von molekulargenetischen Untersuchungen komplexer natürlicher Mikrobengemeinschaften angebracht, im besonderen wenn keine Sequenzdaten ermittelt wurden, und zusätzliche Informationen über die vorkommenden Organismen und biologischen Prozesse sind hilfreich.

4.4.2 Marine Sedimente

Die Bakterienpopulationen in Sedimentproben der im vorherigen Abschnitt beschriebenen Meeresbecken wurden ebenfalls mit molekularbiologischen Methoden untersucht. Die Sedimente unterschieden sich gravierend in ihrer Konsistenz: Das Sediment des Mariager Fjord war extrem weich und wässrig, während das Sediment des Golfo Dulce eine feste Matrix bildete. MPN-Zählungen zeigten, daß die Anzahl sulfatreduzierender Bakterien im Sediment verglichen mit den darüberliegenden Wasserschichten drastisch anstieg, auf ca. 10^6 Zellen pro ml im Mariager Fjord [212] und ca. 10^3 Zellen pro ml im Golfo Dulce [103]. Die höchsten Werte wurden dabei in Zählungen Laktat-oxidierender Sulfatreduzierer ermittelt. Die Hybridisierung amplifizierter 16S rRNA-Sequenzen mit 16S rRNA-gerichteten Oligonukleotidsonden zeigte sowohl in Proben vom Mariager Fjord als auch in Proben vom Golfo Dulce eine Zunahme in der Intensität der Hybridisierungssignale. Die allgemeine Sonde für sulfatreduzierende Bakterien (SRB385) zeigte in der Regel stärkere Hybridisierungssignale als eine spezifische Sonde für vollständig oxidierende Sulfatreduzierer (Db804). Dies weist auf die Existenz weiterer Populationen sulfatreduzierender Bakterien hin, z. B. der Gattung *Desulfovibrio*.

Obwohl sowohl im Tiefenwasser des Mariager Fjords als auch im Tiefenwasser des Golfo Dulce *Desulfovibrio* spp. nachgewiesen wurden, konnten aus DNA der angrenzenden

Sedimentschichten keine [NiFe] Hydrogenase-Genfragmente amplifiziert werden. Verschiedene methodische Schwierigkeiten könnten dafür verantwortlich sein: Der erste, kritische Schritt der Analyse einer Umweltprobe ist die Extraktion der Nukleinsäuren. Dabei ist es zunächst wichtig, daß alle Bakterienzellen lysiert werden. Aufgrund der unterschiedlichen Eigenschaften der Zellwände lysieren beispielsweise Gram-positive Bakterien schlechter als Gram-negative Bakterien. Im Falle der Sedimentproben ist der negative Nachweis von *Desulfovibrio* spp. jedoch nicht durch eine preferentielle Lyse von Bakterienzellen durch die verwendete Extraktionsmethode zu erklären, denn *Desulfovibrio* spp. sind leicht lysierbare Gram-negative Zellen. Oft enthalten DNA-Präparationen, die aus Sediment- oder Bodenproben extrahiert werden, PCR-Inhibitoren, wie z. B. Huminsäuren [74, 188, 204, 205]. Diese können durch eine Aufreinigung der DNA-Präparationen reduziert werden, z. B. durch die Behandlung mit PVPP [74] oder Hydroxylapatit [162]. Auf eine ausreichende Reinheit der verwendeten DNA-Präparationen wies allerdings hin, daß mit eubakteriellen 16S rRNA-Primern PCR-Produkte amplifiziert werden konnten. Lechner [108] isolierte DNA aus Gartenboden und konnte ebenso mit universellen 16S rRNA-Primern PCR-Produkte erzeugen, nicht aber mit Hydrogenase-spezifischen Primern für Bakterien der Gattung *Alcaligenes*. Möglicherweise war der Anteil der *Desulfovibrio*-DNA an der Gesamt-DNA zu gering, sodaß sie trotz der hohen Sensitivität des PCR-Nachweissystems (Abschnitt 3.2.2) nicht detektierbar waren. In anderen marinen Sedimenten wurde gezeigt, daß die Populationen sulfatreduzierender Bakterien nur einen geringen Anteil an der Gesamt-Population ausmachen (ca. 1–10%) [111]. *Desulfovibrio*-Populationen können zwar den Hauptanteil der sulfatreduzierenden Bakterien im Sediment stellen, dies hängt jedoch von den zur Verfügung stehenden Substraten ab und variiert in verschiedenen Sedimenttypen [150]. Denkbar ist auch, daß vorhandene *Desulfovibrio* spp. durch das verwendete Nachweissystem nicht erfaßt wurden.

4.4.3 Mikrobielle Matten

Zwei mikrobielle Matten wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht. Die eine stammte von einem Sediment im Wattenmeer vor der holländischen Insel Texel (Abschnitt 3.1.6, 3.1.7 und 3.3.5), die andere von einem hypersalinen Standort, dem Solar Lake im Sinai (Abschnitt 3.4.3). "Mikrobielle Matten stellen verfestigte Verflechtungen zwischen mikrobiellen Gemeinschaften und dem Substrat dar" [203]. Dominante Organismen in diesen Ökosystemen sind Cyanobakterien, die das Sediment mit organischem Material anreichern, und so den Lebensraum für eine Reihe weiterer Mikroorganismen, wie Schwefelbakterien und sulfatreduzierende Bakterien, schaffen. An diesen Standorten sind eine große Biomasse, eine hohe mikrobielle Aktivität und verschiedene Organismen auf engstem Raum konzentriert. Geprägt werden die mikrobiellen Aktivitäten durch den Tag-Nacht-Rhythmus der Photosynthese-betreibenden Cyanobakterien und die damit einhergehenden Änderungen des Redoxgradienten. In mikrobiellen Matten wurden hohe Sulfatreduktionsraten in den tagsüber oxischen Mattenschichten gemessen [22, 23, 55, 91, 227]. Dies weist auf speziell angepasste Sauerstoff-tolerante Sulfatreduzierer hin oder auf Mechanismen der bekannten Sulfatreduzierer, in solchen

Gemeinschaften, dem Einfluß des für anaerobe Bakterien toxischen Sauerstoffs zu entgehen. Bisher ist nicht bekannt, wie die hohen Sulfatreduktionsraten in Gegenwart von Sauerstoff zustande kommen. Neuere Untersuchungen weisen auf eine Beteiligung filamentöser, gleitender sulfatreduzierender Bakterien der Gattung *Desulfonema* an diesen Prozessen hin [214].

Aus DNA der mikrobiellen Matte von Texel konnten [NiFe] Hydrogenase-Genfragmente von *Desulfovibrio* spp. amplifiziert werden. Die anschließende DGGE Analyse dieser PCR-Produkte zeigte ein komplexes Muster, daß auf eine große genetische Diversität dieser Bakterienpopulation schließen ließ. Versuche die entsprechenden DNA-Banden des Elektrophoresemusters zu sequenzieren, führten größtenteils zu recht schlechten DNA-Sequenzen. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß eine vollständige Vereinzelung der [NiFe] Hydrogenase-Sequenzen in denaturierenden Gradientengelen nicht möglich war, sodaß die reamplifizierten PCR-Produkte aus unterschiedlichen Sequenzen bestanden und einer Sequenzierung nicht zugänglich waren. Drei ermittelte Sequenzen, die zum Teil unbestimmbare Nukleotide enthielten, wurden miteinander verglichen. So wurde allerdings nur ein erster Einblick in die genetische Diversität der *Desulfovibrio* spp. gewährt. Eine Überprüfung der reamplifizierten PCR-Produkte in denaturierenden Gradientengelen sollte zukünftig zeigen, welche Banden des Elektrophoresemusters reamplifiziert wurden, und ob die PCR-Produkte aus einer identischen Sequenz bestehen. Dies sollte zu besseren Sequenzdaten führen. Der Sequenzvergleich der drei ausgewählten Sequenzen läßt unter Vorbehalt auf eine große Diversität der nachweisbaren *Desulfovibrio* spp. schließen, im Bereich von 77,6–87,8% (Tabelle 3.8). Die günstigen Umweltbedingungen (hohe Sulfatkonzentration, Sediment reich an organischen Substraten durch die Aktivität der Cyanobakterien) ermöglichen wahrscheinlich die Coexistenz vielfältiger *Desulfovibrio* spp. an diesem Standort, während die eher ungünstigen Umweltbedingungen (vermutlich limitierende Sulfatkonzentration und geringeres Substratspektrum) für sulfatreduzierende Bakterien in den untersuchten anaeroben Bioreaktoren vermutlich für eine geringe genetische Diversität der *Desulfovibrio*-Population verantwortlich sind (Abschnitt 4.3).

Zwei Sequenzen aus der mikrobiellen Matte von Texel waren keiner der bekannten [NiFe] Hydrogenase-Gensequenzen zuzuordnen. Dies muß nicht bedeuten, daß es sich hier um neue *Desulfovibrio* spp. handelt. Sie könnten zu bereits kultivierten Spezies gehören, deren [NiFe] Hydrogenase-Gene bisher nicht sequenziert wurden. Bemerkenswert ist, daß die dritte Sequenz eine sehr große Ähnlichkeit zu *Desulfovibrio sulfodismutans* zeigte (91,5% Identität auf DNA-Ebene). Stämme, deren [NiFe] Hydrogenase-Gen ebenfalls eine sehr hohe Ähnlichkeit zu dieser Spezies sowie zu der Sequenz aus der mikrobiellen Matte aufwies, bildeten die in anaeroben Bioreaktoren nachweisbaren *Desulfovibrio*-Populationen (Abschnitt 4.3). Dies läßt vermuten, daß *Desulfovibrio sulfodismutans*-ähnliche Stämme eine große Verbreitung haben. *Desulfovibrio sulfodismutans* ist kein typischer Sulfatreduzierer; er konserviert Energie bevorzugt aus der Disproportionierung von Thiosulfat (oder Sulfit) zu Sulfat und Sulfid [11]. Diese Eigenschaft wurde auch in anderen sulfatreduzierenden Bakterien beobachtet, geht aber nicht immer mit dem Wachstum der Bakterien einher [98]. Thiosulfat spielt in Süßwasser- und marinen Sedimenten sowie in mikrobiellen Matten eine große Rolle im Schwefel-

kreislauf, und die Disproportionierung von Thiosulfat ist dabei ein wichtiger Stoffwechselweg [88, 89, 90, 91]. Bak und Pfennig [11] konnten Thiosulfat-disproportionierende Bakterien ähnlich zu *Desulfovibrio sulfodismutans* aus Süßwasser-, Brackwasser- und marinen Sedimentproben anreichern [11]. Jørgensen und Bak [90] zeigten hingegen, daß aus einem marinen Sediment im Kattegat keine spezialisierten disproportionierenden Bakterien, wie *Desulfovibrio sulfodismutans*, isoliert werden konnten, obwohl die Disproportionierung von Thiosulfat der dominante Stoffwechselprozeß in diesem Sediment war. Thiosulfatdisproportionierung erfolgte hier nur als Cometabolismus in Acetat-oxidierenden Sulfatreduzierern, die durch diesen Prozeß allein nicht genügend Energie für das Wachstum konservieren konnten. Untersuchungen an Reinkulturen zeigten, daß einige *Desulfovibrio* spp. durch die Disproportionierung von Thiosulfat wachsen können, Acetat-oxidierende *Desulfobacter* spp. hingegen disproportionierten zwar Thiosulfat, wuchsen dadurch aber nicht [98].

Mitglieder der Gattung *Desulfovibrio* wurden auch in einer mikrobiellen Matte vom Solar Lake nachgewiesen. Die Analyse der [NiFe] Hydrogenase-Genfragmente zeigte im DGGE-Muster vier klar voneinander getrennte Banden, die wahrscheinlich zu vier unterschiedlichen *Desulfovibrio*-Stämmen gehören (Abbildung 3.32). Eine weitergehende Analyse der Sequenzen der PCR-Produkte fand bisher nicht statt. Interessant ist die Beobachtung, daß eine der Banden im Elektrophoresemuster eine identische Position im Gel einnahm wie das [NiFe] Hydrogenase-Genfragment des Bakterienstammes PIB2. Dieser Bakterienstamm, der als *Desulfovibrio oxyclini* klassifiziert wurde [100], wurde von diesem Standort isoliert. Die Identität des PCR-Produktes aus der mikrobiellen Matte, kann jedoch erst durch die anschließende Sequenzierung des Genfragments bestätigt werden.

[NiFe] Hydrogenase-mRNA-Sequenzen konnten in den bisher untersuchten Proben der mikrobiellen Matte vom Solar Lake nicht nachgewiesen werden. Eine einfache Erklärung hierfür ist, daß die sulfatreduzierenden Bakterien tatsächlich nicht mehr aktiv waren, da die Sedimentkerne mehrere Tage gekühlt gelagert wurden. Möglicherweise wurde die mRNA auch während der Extraktion der RNA abgebaut. Als Kriterium für eine gute RNA-Präparation wurden die intakten rRNA-Banden in Agarosegelen herangezogen. Ogram et al. [144] zeigten allerdings, daß trotz einer klaren, gelelektrophoretischen Auftrennung der rRNA die mRNA in der entsprechenden Probe mehr oder weniger abgebaut sein kann. Eine weitere Optimierung der Extraktionsmethode könnte zu einer besseren Ausbeute an mRNA führen. Andererseits ist auch denkbar, daß die [NiFe] Hydrogenase-mRNA im Verhältnis zur Gesamt-RNA so gering war, daß sie nicht mehr nachweisbar war. Gesamt-RNA besteht hauptsächlich aus rRNA und deren Anteil ist in aktiven Bakterienzellen, wie sie in der mikrobiellen Matte anzutreffen sind, vermutlich sehr hoch. Eine Anreicherung der mRNA-Sequenzen oder eine anschließende Southern Blot Analyse könnte dieses Problem lösen und die Sensitivität des Nachweises erhöhen. Nach Beseitigung der oben angeführten technischen Probleme könnte die Aktivität der nachweisbaren *Desulfovibrio* spp. elegant in der mikrobiellen Matte aufgezeigt werden. Weiterführende Untersuchungen der genetischen Diversität der *Desulfovibrio* spp., der vertikalen Verteilung dieser Bakterienstämme in der mikrobiellen Matte und der Expression des [NiFe] Hydrogenase-Gens im Verlauf der Zeit sollten sich an diese ersten

vielversprechenden Experimente anschließen. Möglicherweise könnte so erstmals direkt gezeigt werden, daß die vorhandenen *Desulfovibrio* spp. auch in den oxischen Mattenschichten aktiv sind.

Molekularbiologische Charakterisierung komplexer mikrobieller Lebensgemeinschaften

- Die DGGE Analyse von amplifizierten eubakteriellen 16S rRNA-Sequenzen visualisiert einen großen Bereich der genetischen Diversität in mikrobiellen Gemeinschaften. Dabei repräsentieren die PCR-Produkte aus extrahierter DNA wahrscheinlich die vorhandenen, möglicherweise aber nicht aktiven, die PCR-Produkte aus RNA die rRNA-reichen, daher vermutlich metabolisch aktiven Populationen.
- Anschließende Hybridisierungen mit 16S rRNA-gerichteten Oligonukleotidsonden können definierte Bakteriengruppen in der Gesamt-Population, wie z. B. Mitglieder der δ -Proteobakterien (SRB385) oder vollständig oxidierende Sulfatreduzierer (Db804), aufzeigen. Die Zuverlässigkeit des Nachweises hängt u. a. von der Güte der verwendeten Sonden und Hybridisierungsbedingungen ab.
- Bestimmte Bakteriengruppen der Gesamt-Population können auch in komplexen mikrobiellen Gemeinschaften durch die Amplifikation Proteincodierender Genfragmente, z. B. des [NiFe] Hydrogenase-Gens von *Desulfovibrio* spp., detektiert werden. Der Nachweis der spezifischen mRNA mittels RT-PCR war in Umweltproben komplexer Populationen allerdings nicht möglich. Dies kann bedeuten, daß die nachgewiesenen Organismen das Gen nicht exprimierten oder aber daß die Menge bzw. Qualität der mRNA in den untersuchten Proben nicht ausreichend war.

4.5 Schlußfolgerungen und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden Aspekte der Diversität und Aktivität von sulfatreduzierenden Bakterien, im besonderen *Desulfovibrio* spp., in verschiedenen Umweltprouben untersucht. Es wurde gezeigt, daß der Nachweis und die Unterscheidung von sulfatreduzierenden Bakterienstämmen der Gattung *Desulfovibrio* in Umweltprouben ohne vorherige Kultivierung der Organismen möglich ist. Dies wurde durch die Kombination eines Gattungsspezifischen PCR-Testes basierend auf der Amplifikation von [NiFe] Hydrogenase-Genfragmenten und der anschließenden sequenzabhängigen Auftrennung der PCR-Produkte mittels denaturierender Gradientengelelektrophorese (DGGE), aber auch mit einer wiederentdeckten Technik, der Bisbenzimid-PEG-Agarosegelelektrophorese erzielt. Die genetische Diversität der *Desulfovibrio*-Populationen konnte durch DGGE Analysen visualisiert und ihr Ausmaß durch die Sequenzierung der amplifizierten [NiFe] Hydrogenase-Fragmente bestimmt werden. Die vergleichende Sequenzanalyse erlaubte eine Identifizierung der nachgewiesenen Bakterienstämme. Auch der Nachweis von Genexpression war in natürlichen Populationen möglich über die Verknüpfung von cDNA-Synthese und PCR (RT-PCR). Die anschließende DGGE Analyse der RT-PCR-amplifizierten [NiFe] Hydrogenase-mRNA-Sequenzen zeigte metabolisch aktive Bakterienstämme auf.

Die Komplexität des Hydrogenase-Systems und des Wasserstoffmetabolismus innerhalb der Gattung *Desulfovibrio* erschwert allerdings Aussagen über die Art der bakteriellen Aktivität in Umweltprouben, wenn das [NiFe] Hydrogenase-Gen untersucht wird, denn dieses Enzym ist in vielerlei Stoffwechselwegen von *Desulfovibrio* spp. involviert. Bisher wurde gezeigt, daß unter sulfatreduzierenden Bedingungen das [NiFe] Hydrogenase-Gen in Reinkulturen exprimiert wird, andere Bedingungen wurden jedoch noch nicht untersucht. Um speziell Sulfatreduktion in mikrobiellen Lebensgemeinschaften aufzuzeigen, könnte man die Expression der Enzyme, die direkt an diesem Prozeß beteiligt sind, untersuchen. Kürzlich wurde das Desulfoviridin-Gen von *Desulfovibrio vulgaris* sequenziert, das eine dissimilatorische Sulfitreduktase codiert [93]. Der Vergleich mit dem homologen Gen des thermophilen Sulfatreduzierers *Archaeoglobus fulgidus* erlaubte das Design von PCR-Primern, deren Anwendung PCR-Produkte aus sulfatreduzierenden Bakterien verschiedener Gattungen sowie Umweltprouben ergab [93]. Parallele Untersuchungen der Expression des Desulfoviridin-Gens und des [NiFe] Hydrogenase-Gens mit der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Herangehensweise könnten zum Nachweis der Aktivität sulfatreduzierender Bakterien in Umweltprouben dienen und zu einem besseren Verständnis der Aktivitäten sulfatreduzierender Bakterien in der Natur und der Rolle der [NiFe] Hydrogenase beitragen.

Einen interessanten Gesichtspunkt der vorliegenden Arbeit stellen die ermittelten partiellen [NiFe] Hydrogenase-Sequenzen dar, denn sie weisen innerhalb der Gattung *Desulfovibrio* und innerhalb verschiedener Spezies (mit Ausnahme der Sequenzen aus Umweltprouben) eine sehr große Variabilität auf, verglichen mit der durchschnittlichen intra- und interspezifischen genetischen Variabilität Protein-codierender Gene in anderen Bakteriengruppen, wie *Escherichia coli* und *Bacillus* [68, 192, 193, 194]. Ebenso

wie die Sequenzdaten der 16S rRNA weist dies auf eine große Diversität innerhalb der Gattung *Desulfovibrio* hin. Zudem waren die [NiFe] Hydrogenase-Sequenzen teilweise auf DNA-Ebene konservierter als auf Aminosäure-Ebene. Hier müßte geklärt werden, was das für die Bestimmung der Phylogenie der Gattung *Desulfovibrio* basierend auf [NiFe] Hydrogenase-Sequenzen bedeutet. Dies soll in Zusammenarbeit mit Dr. Paul Sharp zukünftig erarbeitet werden. Im Hinblick auf die Physiologie der nachgewiesenen Bakterienstämme stellt sich die Frage, was die Unterschiede in der Sequenz der [NiFe] Hydrogenase bedeuten. Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, daß Bakterienstämme in Umweltproben, deren [NiFe] Hydrogenase-Genfragmente eine sehr hohe Ähnlichkeit zu *Desulfovibrio sulfodismutans* aufwiesen, möglicherweise auch ähnliche physiologische Eigenschaften aufweisen, da diese Bakterienstämme unter sulfatreduzierenden Bedingungen nicht angereichert werden konnten. Andererseits wurde auch gezeigt, daß Bakterienstämme, die sich durch geringe Unterschiede in der [NiFe] Hydrogenase-Sequenz unterscheiden, unterschiedliche physiologische Eigenschaften haben können. So wurde die Expression des Gens durch Inkubation mit Wasserstoff in einem der nachweisbaren Bakterienstämme einer Umweltprobe induziert, nicht aber in den coexistierenden, in der [NiFe] Hydrogenase-Sequenz sehr ähnlichen Bakterienstämmen. Bakterien, die auf molekularer Ebene nachgewiesen wurden, sollten daher zusätzlich isoliert und auf ihre biochemischen und physiologischen Eigenschaften getestet werden. Stehen mehr Daten zur Verfügung, können später möglicherweise Rückschlüsse auf die Physiologie anhand der Sequenzen gezogen werden.

Ein wichtiger Aspekt der Diversität und Aktivität von Organismen in Umweltproben wurde in der vorliegenden Arbeit bisher ausgespart: die Quantifizierung. Es wurde fast ausschließlich die Struktur einer Lebensgemeinschaft beschrieben, d. h. die verschiedenen *Desulfovibrio* spp., die in einer Umweltprobe vorhanden waren, wurden aufgezeigt. Zukünftig sollte auch die Abundanz (Häufigkeit) der verschiedenen *Desulfovibrio* spp. in einer Umweltprobe, d. h. die Zusammensetzung der Lebensgemeinschaft berücksichtigt werden. Aufgrund der exponentiellen Natur der PCR, die dem Nachweis zugrunde liegt, kann die Menge an amplifizierten PCR-Produkten allerdings nur als semiquantitative Abschätzung der zugehörigen Populationen betrachtet werden, denn unterschiedliche Ziel-DNA-Sequenzen werden vermutlich nicht mit derselben Effizienz amplifiziert. Dies ist offensichtlich für Ziel-DNA-Sequenzen, die Fehlpaarungen zu den Primersequenzen aufweisen und daher mit einer geringeren Effizienz amplifiziert werden. Dieser Fehler kann nie ausgeschlossen werden, da man DNA-Fragmente aus einem unbekanntem heterogenen Nukleinsäuregemisch, das eine Umweltprobe kennzeichnet, amplifiziert. Kürzlich wurden aber sogar unterschiedliche Amplifikationsraten beobachtet, wenn die Primer zu 100% identisch mit den Zielsequenzen sind [171, 208]. Eine absolute Quantifizierung der nachgewiesenen DNA-Fragmente scheint daher unmöglich. Relative Veränderungen der Abundanz der nachgewiesenen Bakterienpopulationen, z. B. eine Zunahme oder Abnahme der Ziel-DNA-Sequenzen in Proben, die zu verschiedenen Zeiten genommen wurden, sollten aber prinzipiell möglich sein. Wird bei der PCR beispielsweise ein interner Standard coamplifiziert, können die Mengen an PCR-Produkten nach der sequenzabhängigen Auftrennung relativ zu diesem Standard berechnet werden [64]. Als interner Standard können den Umweltproben definierte Mengen an Bakterien-

zellen, DNA oder RNA vor der Nukleinsäurepräparation oder vor der PCR zugegeben werden. Das quantitative Potential der PCR in der mikrobiellen Ökologie bedarf allerdings weiterer Untersuchungen, da die preferentielle Amplifikation von homologen Sequenzen mit identischen Primersequenzen in komplexen DNA-Gemischen bisher nur unzureichend verstanden wird [208].

Generell eignen sich für eine Quantifizierung von Bakterien in Umweltproben Hybridisierungen der Nukleinsäuren, die aus einer Umweltprobe isoliert wurden, mit spezifischen Sonden besser, da dem Nachweis der Sequenzen keine exponentielle Amplifikation vorausgeht. Allerdings muß auch hierbei berücksichtigt werden, daß ein schwaches Hybridisierungssignal sowohl durch eine große Menge an Ziel-DNA, die Fehlpaarungen zu der Sonde aufweist, hervorgerufen werden kann oder durch wenige Zielsequenzen, die optimal zu der Sonde passen. Ein Nachteil dieser Herangehensweise ist, daß eine Unterscheidung verschiedener Stämme einer Gruppe von Bakterien nur möglich ist, wenn Spezies- oder Stamm-spezifische Sonden entwickelt werden können. Als spezifische Sonde für *Desulfovibrio* spp. könnte neben Hyd4f möglicherweise das Oligonukleotid Hyd1f eingesetzt werden, denn diese Sequenz erwies sich in der PCR als spezifisch für diese Gattung. Die Hybridisierungsbedingungen müßten allerdings zunächst empirisch bestimmt werden. Eine elegante Lösung zur Quantifizierung von Bakterienzellen in Umweltproben ist die *in situ* Hybridisierung ganzer Zellen. Bisher wurde dabei als Zielsequenz für DNA-Sonden fast ausschließlich die ribosomale RNA verwendet. Die rRNA ist Bestandteil der Ribosomen und bietet daher eine große Anzahl von Zielmolekülen pro Zelle. Protein-codierende Gene können auf diese Weise wahrscheinlich nicht nachgewiesen werden, da sie meist nur in einer oder wenigen Kopien pro Zelle vorliegen, und die Sensitivität des Nachweises dafür nicht ausreicht. Die mRNA hingegen findet man in einer höheren Anzahl pro Zelle. Im Vergleich zu den Ribosomen kommt sie jedoch in Konzentrationen vor, die mehrere Größenordnungen geringer sind. Einige Studien belegen, daß prinzipiell der Nachweis spezifischer mRNA-Sequenzen über die *in situ* Hybridisierung möglich ist [67, 77, 160]. Die Untersuchungen wurden an Gram-positiven Bakterien in Reinkulturen, Bodenproben und innerhalb von Pflanzengewebe durchgeführt. Die Autoren dieser Untersuchungen wiesen jedoch daraufhin, daß derzeit zwar der qualitative Nachweis von mRNA "*in situ*" möglich ist, quantitative Aussagen sind allerdings noch nicht machbar. Bis jetzt wurde kein Protokoll für kleine, Gram-negative Zellen beschrieben. Wahrscheinlich ist es nur eine Frage der Zeit bis die *in situ* Hybridisierung ganzer Zellen auch für mRNA-Sequenzen zuverlässig anwendbar ist. Mit dieser Herangehensweise wäre es möglich die *Desulfovibrio*-Zellen zu zählen, die das [NiFe] Hydrogenase-Gen exprimieren, und die Stoffwechselaktivität einzelner Zellen könnte in Umweltproben beobachtet werden.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Darstellung der *Desulfovibrio*-Populationen in einer Umweltprobe durch die direkte, parallele Visualisierung der vorhandenen und der aktiven Bakterienstämme mittels denaturierender Gradientengelelektrophorese amplifizierter [NiFe] Hydrogenase-Sequenzen. Diese direkte Gegenüberstellung der vorhandenen und aktiven Bakterienstämme ist ein großer Vorteil, den keine andere molekularbiologische Herangehensweise derzeit leisten kann. Pichard und Paul [155] schlugen vor, die mRNA-Hybridisierungssignale in Umweltproben zu normalisieren, indem parallel

die Abundanz des Gens durch Hybridisierungen gemessen wird: Dies ist notwendig, da Veränderungen der Menge an mRNA in einer Umweltprobe durch Variationen der Transkriptionsrate, der Anzahl der Gene, der Populationsgröße oder einer Kombination dieser Faktoren hervorgerufen werden kann. Änderungen des Verhältnisses der [NiFe] Hydrogenase-mRNA zur -DNA können mit der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Herangehensweise aufgezeigt werden, denn die Amplifikationsrate der PCR sollte für identische Sequenzen konstant sein, unabhängig, ob diese Sequenzen aus DNA oder cDNA stammen. Ein interner Standard wäre allerdings notwendig, um die Intensitäten der PCR-Signale zu quantifizieren. Eine weitere Voraussetzung ist die quantitative Präparation sowohl von DNA als auch von RNA aus Umweltproben. Dafür müssen die Extraktionsmethoden vermutlich speziell an die zu untersuchenden Standorte angepaßt werden.

Ein weiterer Aspekt natürlicher Bakteriengemeinschaften, der bisher nicht berücksichtigt wurde, sollte zukünftig untersucht werden: Die Veränderung der Populationen im Verlauf der Zeit. Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, daß *Desulfovibrio*-Populationen rasch auf eine Veränderung der Umweltbedingungen reagieren und daß diese Veränderungen der Zusammensetzung und Aktivität der Populationen mit Hilfe molekulargenetischer Methoden verfolgt werden können. Die Dynamik natürlicher Bakterienpopulationen und die Reaktionen auf veränderte Lebensbedingungen sollten in Verbindung mit anderen Methoden untersucht werden, um ein umfassendes Bild der Bakterienpopulationen erhalten. Mikroelektroden und chemische Meßmethoden sind beispielsweise erforderlich, um die äußeren Parameter und die mikrobielle Aktivität zu messen. So könnten möglicherweise Parameter erfaßt werden, die die Diversität und auch Aktivität der Bakterienpopulationen bestimmen. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Herangehensweise könnte dazu beitragen, die Rolle spezifischer Gene und damit die Funktion der zugehörigen Bakterienpopulationen in komplexen biologischen Lebensgemeinschaften zu definieren.

Literaturverzeichnis

- [1] Adams, M. W. W., L. D. Mortenson und J.-S. Chen. 1981. Hydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* 594: 105–176.
- [2] Aeckersberg, F., F. Bak und F. Widdel. 1991. Anaerobic oxidation of saturated hydrocarbons to CO₂ by a new type of sulfate-reducing bacterium. *Arch. Microbiol.* 156: 5–14.
- [3] Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts und J. D. Watson. 1989. *Molecular biology of the cell*. 2. Auflage. Garland Publishing, New York, London.
- [4] Amann, R. I., B. Binder, S. W. Chisholm, R. Olsen, R. Devereux und D. A. Stahl. 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1919–1925.
- [5] Amann, R. I., J. Stromley, R. Devereux, R. Key und D. A. Stahl. 1992. Molecular and microscopic identification of sulfate-reducing bacteria in multispecies biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 614–623.
- [6] Amann, R., W. Ludwig und K.-H. Schleifer. 1992. Identification and *in situ* detection of individual bacterial cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 100: 45–50.
- [7] Amann, R. I., W. Ludwig und K.-H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59: 143–169.
- [8] American Public Health Association. 1969. Standard methods for the examination of water and wastewater, including bottom sediments and sludge. American Public Health Association, Washington, D. C., pp. 604–609.
- [9] Atlas, R. M. und R. Bartha. 1993. *Microbial Ecology: Fundamentals and applications*. 3. Auflage. The Benjamin/Cummings Publishing Co., Inc., Redwood City, CA.
- [10] Badziong, W. und R. K. Thauer. 1978. Isolation and characterization of *Desulfovibrio* growing on hydrogen plus sulfate as sole energy source. *Arch. Microbiol.* 116: 41–49.

- [11] Bak, F. und N. Pfennig. 1987. Chemolithotrophic growth of *Desulfovibrio sulfodismutans* sp. nov. by disproportionation of inorganic sulfur compounds. Arch. Microbiol. 147: 184-189.
- [12] Böttger, E. C. 1989. Rapid determination of bacterial ribosomal RNA sequences by direct sequencing of enzymatically amplified DNA. FEMS Microbiol. Lett. 65: 171-176.
- [13] Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.
- [14] Brock, T. D. 1987. The study of microorganisms *in situ*: Progress and problems. Symp. Soc. Gen. Microbiol. 41: 1-17.
- [15] Brock, T. D. und M. T. Madigan. 1991. Biology of microorganisms. 6. Auflage. Prentice-Hall International, Inc. Englewood Cliffs, New Jersey.
- [16] Brosius, J., T. L. Dull, D. D. Sleeter und H. F. Noller. 1981. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 148: 107-127.
- [17] Bruce, K. D., W. D. Hiorns, J. L. Hobman, A. M. Osborn, P. Strike und D. A. Ritchie. 1992. Amplification of DNA from native populations of soil bacteria by using the polymerase chain reaction. Appl. Environ. Microbiol. 58: 3413-3416.
- [18] Bryant, M. P. 1972. Commentary on the Hungate technique for culture of anaerobic bacteria. Am. J. Clin. Nutr. 25: 1324-1328.
- [19] Bryant, M. P., L. L. Campbell, C. A. Reddy und N. R. Crabill. 1977. Growth of *Desulfovibrio* in lactate or ethanol media low in sulfate in association with H₂-utilizing methanogenic bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 33: 1162-1169.
- [20] Buchholz-Cleven, B., B. Rattunde und K. Straub. 1996. Screening for genetic diversity of isolates of anaerobic Fe(II)-oxidizing bacteria using DGGE and whole-cell hybridization. Syst. Appl. Microbiol. (im Druck)
- [21] Burton, K. 1957. A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. Biochem. J. 62: 315-323.
- [22] Canfield, D. E. und D. J. des Marais. 1991. Aerobic sulfate reduction in microbial mats. Am. J. Science 251: 1471-1473.
- [23] Caumette, P., R. Matheron, N. Raymond und J.-C. Relexans. 1994. Microbial mats in the hypersaline ponds of Mediterranean salterns (Salins-de-Girard, France). FEMS Microbiol. Ecol. 13: 273-286.

- [24] Chatelus, C., P. Carrier, P. Saignes, M. F. Libert, Y. Berlier, P. A. Lespinat, G. Fauque und J. LeGall. 1987. Hydrogenase activity in aged, nonviable *Desulfovibrio vulgaris* cultures and its significance in anaerobic biocorrosion. Appl. Environ. Microbiol. 53: 1708–1710.
- [25] Chomczynski, P. und N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Ann. Biochem. 162: 156–159.
- [26] Cilia, V., B. Lafay und R. Christen. 1996. Sequence heterogeneities among 16S ribosomal RNA sequences, and their effect on phylogentic analyses at the species level. Mol. Biol. Evol. 13: 451–461.
- [27] Clayton, R. A., G. Sutton, P. S. Hinkle, Jr., C. Bult und C. Fields. 1995. Intraspecific variation in small-subunit rRNA sequences in GenBank: Why single sequences may not adequately represent prokaryotic taxa. Int. J. Sys. Bacteriol. 45: 595–599.
- [28] Cline, J. D. 1969. Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters. Limnol. Oceanogr. 14: 454–458.
- [29] Coleman, M. L., D. B. Hedrick, D. R. Lovley, D. C. White und K. Pye. 1993. Reduction of Fe(III) in sediments by sulfate-reducing bacteria. Nature 361: 436–438.
- [30] Cord-Ruwisch, R. 1985. A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfate-reducing bacteria. J. Microbiol. Methods 4: 33–36.
- [31] Cord-Ruwisch, R., B. Ollivier und J. B. Garcia. 1986. Fructose degradation by *Desulfovibrio* sp. in pure culture and in coculture with *Methanospirillum hungatei*. Curr. Microbiol. 13: 285–289.
- [32] Costello, J. A. 1974. Cathodic depolarization by sulfate-reducing bacteria. Science 70: 202–204.
- [33] Cypionka, H., F. Widdel und N. Pfennig. 1985. Survival of sulfate-reducing bacteria after oxygen stress, and growth in sulfide-free oxygen-sulfide gradients. FEMS Microbiol. Ecol. 31: 39–45.
- [34] Cypionka, H. und W. Dilling. 1986. Intracellular localization of the hydrogenase in *Desulfotomaculum orientis*. FEMS Microbiol. Lett. 36: 257–260.
- [35] Dalsgaard, T. und F. Bak. 1994. Nitrate reduction in a sulfate-reducing bacterium, *Desulfovibrio desulfuricans*, isolated from rice paddy soil: Sulfide inhibition, kinetics, and regulation. Appl. Environ. Microbiol. 60: 291–297.

- [36] Daniels, L., R. S. Hanson und J. A. Phillips. 1994. Chemical Analysis. In: P. Gerhardt, R. G. E. Murray, W. A. Wood und N. R. Krieg (eds.). Methods for general and molecular bacteriology. American Society for Microbiology, Washington, D. C., pp. 534–537.
- [37] Dannenberg, S., M. Kroder, W. Dilling und H. Cypionka. 1992. Oxidation of H₂, organic compounds and inorganic sulfur compounds coupled to reduction of O₂ or nitrate by sulfate-reducing bacteria. Arch. Microbiol. 158: 93–99.
- [38] Deckers, H. M., F. R. Wilson und G. Voordouw. 1990. Cloning and sequencing of a [NiFe] hydrogenase operon from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F. J. Gen. Microbiol. 136: 2021–2028.
- [39] Devereux, J., P. Haerberli und O. Smithies. 1984. A comprehensive set of sequence analysis programs for the Vax. Nucleic Acids Res. 12: 387–395.
- [40] Devereux, R., M. Delaney, F. Widdel und D. Stahl. 1989. Natural relationships among sulfate-reducing bacteria. J. Bacteriol. 171: 6689–6695.
- [41] Devereux, R., S.-H. He, C. Doyle, S. Orkland, D. A. Stahl, J. LeGall und W. B. Whitman. 1990. Diversity and origin of *Desulfovibrio* species: Phylogenetic definition of a family. J. Bacteriol. 172: 3609–3619.
- [42] Devereux, R., M. D. Kane, J. Winfrey und D. A. Stahl. 1992. Genus- and group-specific hybridization probes for determinative and environmental studies of sulfate-reducing bacteria. Syst. Appl. Microbiol. 15: 601–609.
- [43] Devereux, R. und D. Stahl. 1993. Phylogeny of sulfate-reducing bacteria and a perspective for analyzing their natural communities. In J. M. Odom and R. Singleton, Jr. (eds.). The sulfate-reducing bacteria: Contemporary perspectives, Springer-Verlag, New York, pp. 131–160.
- [44] Devereux, R. und G. W. Mufson. 1994. A phylogenetic tree of 16S rRNA sequences from sulfate-reducing bacteria in a sandy marine sediment. Appl. Environ. Microbiol. 60: 3437–3439.
- [45] Dilling, W. und H. Cypionka. 1990. Aerobic respiration in sulfate-reducing bacteria. FEMS Microbiol. Lett. 71: 123–128.
- [46] Don, R. H., P. T. Cox, B. J. Wainwright, K. Baker und J. S. Mattick. 1991. "Touchdown" PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. Nucleic Acids Res. 19: 4008.
- [47] Doyle, J. J. und J. L. Doyle. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12. Nummer 1: 13–15.
- [48] Emerson, S., R. E. Cranston und P. S. Liss. 1979. Redox species in a reducing fjord: equilibrium and kinetic considerations. Deep-Sea Research 26A: 859–878.

- [49] Fauque, G., H. D. Peck, Jr., J. J. G. Moura, B. H. Huynh, Y. Berlier, D. V. DerVartanian, M. Teixeira, A. E. Przybyla, P. A. Lespinat, I. Moura und J. LeGall. 1988. The three classes of hydrogenases from sulfate-reducing bacteria of the genus *Desulfovibrio*. FEMS Microbiol. Rev. 54: 299–344.
- [50] Fenchel, T. 1990. Water column anoxia. Marine Ecology Progress Series 62: 1–10.
- [51] Ferris, M., G. Muyzer und D. M. Ward. 1996. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. Appl. Environ. Microbiol. 62: 340–346.
- [52] Fischer, S. G. und L. S. Lerman. 1983. DNA fragments differing by single basepair substitutions are separated in denaturing gradient gels: Correspondence with melting theory. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 1579–1583.
- [53] Fossing, H. und B. B. Jørgensen. 1989. Measurement of bacterial sulfate reduction in sediments: Evaluation of a single-step chromium reduction method. Biogeochemistry 8: 205–222.
- [54] Fowler, V. J., F. Widdel, N. Pfennig, C. R. Woese und E. Stackebrandt. 1986. Phylogenetic relationships of sulfate- and sulfur reducing eubacteria. System. Appl. Microbiol. 8: 32–41.
- [55] Fründ, C. und Y. Cohen. 1992. Diurnal cycles of sulfate reduction under oxic conditions in cyanobacterial mats. Appl. Environ. Microbiol. 58: 70–77.
- [56] Fuhrmann, J. A., D. E. Comeau, A. Hagström und A. M. Chan. 1988. Extraction from natural planktonic microorganisms of DNA suitable for molecular biological studies. Appl. Environ. Microbiol. 54: 1426–1429.
- [57] Fuhrman, J. A., K. McCallum und A. A. Davis. 1993. Phylogenetic diversity of subsurface marine microbial communities from the Atlantic and Pacific Oceans. Appl. Environ. Microbiol. 59: 1294–1302.
- [58] Fukui, M. und S. Takii. 1994. Kinetics of sulfate respiration by free-living and particle-associated sulfate-reducing bacteria. FEMS Microbiol. Ecol. 13: 241–248.
- [59] Fukui, M., Y. Suwa und Y. Urushigawa. 1996. High survival efficiency and ribosomal RNA decaying pattern of *Desulfovibrio latus*, a highly specific acetate-utilizing organism, during starvation. FEMS Microbiol. Ecol. 19: 17–25.
- [60] Fukui, M., G. Muyzer und F. Widdel. (Manuskript in Vorbereitung)
- [61] Gaffron, H. und J. Rubin. 1942. Fermentation and photochemical production of hydrogenase in algae. J. Gen. Physiol. 26: 219–240.
- [62] Gerhardt, P. 1994. Growth. In: P. Gerhardt, R. G. E. Murray, W. A. Wood und N. R. Krieg (eds.). Methods for general and molecular bacteriology. American Society for Microbiology, Washington, D. C., pp. 135–278.

- [63] Gilbert, D. G. 1992. SeqApp - a bio-sequence analysis application. Indiana University, Bloomington.
- [64] Gilliland, G., S. Perrin und H. F. Bunn. 1990. Competitive PCR for quantitation of mRNA. In: M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sininsky und T. J. White (eds.). PCR Protocols: A guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, pp. 60-69.
- [65] Giovannoni, S. J., T. B. Britschgi, C. L. Moyer und K. G. Field. 1990. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* 345: 60-63.
- [66] Griswold, B. L., F. L. Humoller und A. R. McIntyre. 1951. Inorganic phosphates and phosphate esters in tissue extracts. *Anal. Chem.* 23: 192-194.
- [67] Hahn, D., R. I. Amman und J. Zeyer. 1993. Detection of mRNA in *Streptomyces* cells by whole-cell hybridization with digoxigenin-labeled probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 2753-2757.
- [68] Hall, B. G. und P. M. Sharp. 1992. Molecular population genetics of *Escherichia coli*: DNA sequence diversity at the *celC*, *crr*, and *gutB* loci of natural isolates. *Mol. Biol. Evol.* 9: 654-665.
- [69] Hamilton, W. A. 1985. Sulphate-reducing bacteria and anaerobic corrosion. *Ann. Rev. Microbiol.* 39: 195-217.
- [70] Hansen, T. A. 1993. Carbon metabolism of sulfate-reducing bacteria. In: J. M. Odom und R. Singleton, Jr. (eds.). The sulfate-reducing bacteria: Contemporary perspectives. Springer-Verlag, New York, pp. 21-40.
- [71] Hastings, D. und S. Emerson. 1988. Sulfate reduction in the presence of low oxygen levels in the watercolumn of Cariaco Trench. *Limnol. Oceanogr.* 33: 391-396.
- [72] Hatchikian, E. C., V. M. Fernandez und R. Cammack. 1990. The hydrogenases of sulfate-reducing bacteria: Physiological, biochemical and catalytic aspects. In: J.-P. Bélaich, M. Bruschi und J.-L. Garcia (eds.). Microbiology and biochemistry of strict anaerobes involved in interspecies hydrogen transfer. Plenum Press, New York, pp. 53-73.
- [73] Höfle, M. G. 1992. Bacterioplankton community structure and dynamics after large-scale release of nonindigenous bacteria as revealed by low-molecular-weight-RNA analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3387-3394.
- [74] Holben, W. E., J. K. Jansson, B. K. Chelm und J. M. Tiedje. 1988. DNA probe method for the detection of specific microorganisms in soil bacterial community. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 703-711.
- [75] Holben, W. E. und J. M. Tiedje. 1988. Applications of nucleic acid hybridization in microbial ecology. *Ecology* 69: 561-568.

- [76] Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley und S. T. Williams (eds.). 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9. Auflage. Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 335–346.
- [77] Hönerlage, W., D. Hahn und J. Zeyer. 1995. Detection of mRNA of *nprM* in *Bacillus megaterium* ATCC 14581 grown in soil by whole-cell hybridization. *Arch. Microbiol.* 163: 235–241.
- [78] Isaksen, M. F. und A. Teske. 1996. *Desulforhopalus vacuolatus* gen. nov., a new psychrotrophic sulfate-reducing bacterium with gas vacuoles isolated from a temperate estuarium, Kysing Fjord, Denmark. In: A. Teske. Phylogenetische und ökologische Untersuchungen an Bakterien des oxidativen und reduktiven marinen Schwefelkreislaufs mittels ribosomaler RNA, Berichte, Fachbereich Geowissenschaften, Universität Bremen, Nr. 72, Bremen (ISSN 0931-0800), pp. 105–122.
- [79] Jannasch, H. W. und G. E. Jones. 1959. Bacterial populations in seawater as determined by different methods of enumeration. *Limnol. Oceanogr.* 4: 128–139.
- [80] Jeffrey, W. H., S. Nazaret und R. von Haven. 1994. Improved method for recovery of mRNA from aquatic samples and its application to detection of *mer* expression. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1814–1821.
- [81] Jennemann, G. E., M. J. McNerney und R. M. Knapp. 1986. Effect of nitrate on biogenic sulfide production. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 1205–1211.
- [82] Jones, W. J., J. P. Guyot und R. S. Wolfe. 1984. Methanogenesis from sucrose by defined immobilized consortia. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 1–6.
- [83] Jørgensen, B. B. und Y. Cohen. 1977. Solar Lake, Sinai. 5. The sulfur cycle of the benthic cyanobacterial mats. *Limnol. Oceanogr.* 22: 657–666.
- [84] Jørgensen, B. B. 1977. The sulfur cycle of a coastal marine sediment (Limfjorden, Denmark). *Limnol. Oceanogr.* 22: 814–832.
- [85] Jørgensen, B. B. 1978. A comparison of methods for the quantification of bacterial sulfate reduction in coastal marine sediments. II. Estimation from chemical and bacteriological field data. *Geomicrobiol. J.* 1: 49–64.
- [86] Jørgensen, B. B. 1982. Mineralization of organic matter in the sea bed - the role of sulphate reduction. *Nature* 296: 643–645.
- [87] Jørgensen, B. B. 1989. Sulfate reduction in marine sediments from the Baltic Sea - North Sea transition. *Ophelia* 31: 1–15.
- [88] Jørgensen, B. B. 1990. The sulfur cycle of freshwater sediments: Role of thiosulfate. *Limnol. Oceanogr.* 35: 1329–1342.
- [89] Jørgensen, B. B. 1990. A thiosulfate shunt in the sulfur cycle of marine sediments. *Science* 249: 152–154.

- [90] Jørgensen, B. B. und F. Bak. 1991. Pathways and microbiology of thiosulfate transformations and sulfate reduction in a marine sediment (Kattegat, Denmark). *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 847–856.
- [91] Jørgensen, B. B. 1994. Sulfate reduction and thiosulfate transformations in a cyanobacterial mat during a diel oxygen cycle. *FEMS Microbiol. Ecol.* 13: 303–312.
- [92] Kane, M. D., Poulsen, L. K. und D. Stahl. 1993. Monitoring the enrichment and isolation of sulfate-reducing bacteria by using oligonucleotide hybridization probes designed from environmentally derived 16S rRNA sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 682–686.
- [93] Karkhoff-Schweizer, R. R., D. P. W. Huber und G. Voordouw. 1995. Conservation of the genes for the dissimilatory sulfite reductase from *Desulfovibrio vulgaris* and *Archaeoglobus fulgidus* allows their detection by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 290–296.
- [94] Kawasaki, E. S. 1990. Amplification of RNA. In: M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sininsky und T. J. White (eds.). *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, pp. 21–27.
- [95] Klüber, H. D., S. Lechner und R. Conrad. 1995. Characterization of populations of aerobic hydrogen-oxidizing soil bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* 16: 167–176.
- [96] Kohring, L. L., D. B. Ringelberg, R. Devereux, D. A. Stahl, M. W. Mittelman und D. C. White. 1994. Comparison of phylogenetic relationships based on phospholipid fatty acid profiles and ribosomal RNA sequence similarities among dissimilatory sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 119: 303–308.
- [97] Kovacs, K. L., L. S. Seefeldt, G. Tigyí, C. M. Doyle, L.E. Mortenson und D. J. Arp. 1989. Immunological relationship among hydrogenases. *J. Bacteriol.* 171: 430–435.
- [98] Krämer, M. und H. Cypionka. 1989. Sulfate formation via ATP sulfurylase in the thiosulfate- and sulfite-disproportionating bacteria. *Arch. Microbiol.* 151: 232–237.
- [99] Krekeler, D. und H. Cypionka. 1995. The preferred electron acceptor of *Desulfovibrio desulfuricans* CSN. *FEMS Microbiol. Ecol.* 17: 271–278.
- [100] Krekeler, D., P. Sigalevich, A. Teske, H. Cypionka und Y. Cohen. 1996. *Desulfovibrio oxyclini* sp. nov., a sulfate-reducing bacterium from the oxic layer of a microbial mat from Solar Lake, Sinai. In: A. Teske. *Phylogenetische und ökologische Untersuchungen an Bakterien des oxidativen und reduktiven marinen Schwefelkreislaufs mittels ribosomaler RNA*, Berichte, Fachbereich Geowissenschaften, Universität Bremen, Nr. 72, Bremen (ISSN 0931-0800), pp. 43–54.

- [101] Kremer, D. R. und T. A. Hansen. 1988. Pathway of propionate degradation in *Desulfobulbus propionicus*. FEMS Microbiol. Lett. 49: 273–277.
- [102] Kruse, L., G. Meyer und A. Hildebrandt. 1993. A highly conserved repetitive sequence from *Physarum polycephalum* contains nucleotide arrangements similar to replicator sequences. Biochim. Biophys. Acta. 1216: 129–133.
- [103] Kuever, J., C. Wawer und R. Lillebæk. 1996. Microbiological observations in the anoxic basin Golfo Dulce, Costa Rica. Rev. Biol. Trop. (im Druck)
- [104] Laanbroek, H. J. und N. Pfennig. 1981. Oxidation of short-chain fatty acids by sulfate-reducing bacteria in freshwater and in marine sediments. Arch. Microbiol. 128: 330–335.
- [105] Laanbroek, H. J. und H. J. Geerligs. 1983. Influence of clay particles (illite) on substrate utilization by sulfate-reducing bacteria. Arch. Microbiol. 134: 161–163.
- [106] Lämmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680–685.
- [107] Lanzillo, J. J. 1991. Chemiluminescent nucleic acid detection with digoxigenin-labelled probes: A model system with probes for angiotensin converting enzyme which detects less than one attomole of target DNA. Anal. Biochem. 194: 45–53.
- [108] Lechner, S. 1994. Charakterisierung natürlicher Bakterienpopulationen mit physiologischen und molekularbiologischen Techniken. Konstanzer Dissertationen, Band 439. Hartung-Gorre Verlag, Konstanz (ISSN 0930-8105, ISBN 3-89191-827-5).
- [109] Lee, S. und P. F. Kemp. 1994. Single-cell RNA content of natural marine planktonic bacteria measured by hybridization with multiple 16S rRNA-targeted fluorescent probes. Limnol. Oceanogr. 39: 869–879.
- [110] Li, C., H. D. Peck, Jr., J. LeGall und A. E. Przybyla. 1987. Cloning, characterization, and sequencing of the genes encoding the large and small subunits of the periplasmic [NiFe] hydrogenase of *Desulfovibrio gigas*. DNA 6: 539–551.
- [111] Lillebæk, R. 1995. Application of antisera raised against sulfate-reducing bacteria for indirect immunofluorescent detection of immunoreactive bacteria in sediment from the German Baltic Sea. Appl. Environ. Microbiol. 61: 3436–3442.
- [112] Lindmark, D. G. und M. Muller. 1973. Hydrogenosome, a cytoplasmic organelle of the anaerobic flagellate, *Trichomonas foetus*, and its role in pyruvate metabolism. J. Biol. Chem. 248: 7724–7728.
- [113] Linne von Berg, K.-H. und H. Bothe. 1992. The distribution of denitrifying bacteria in soils monitored by DNA-probing. FEMS Microbiol. Ecol. 86: 331–340.

- [114] Lissolo, T., E. S. Choi, J. LeGall und H. D. Peck, Jr. 1986. The presence of multiple intrinsic membrane nickel containing hydrogenases in *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 139: 701-708.
- [115] Lovell, C. R. und Y. Hui. 1991. Design and testing of a functional group-specific DNA probe for the study of natural populations of acetogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2602-2609.
- [116] Lovley, R. D. und E. J. P. Phillips. 1992. Reduction of uranium by *Desulfovibrio desulfuricans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 850-856.
- [117] Lovley, D. R., P. K. Widman, J. C. Woodward und E. J. P. Phillips. 1993. Reduction of uranium by cytochrome c_3 of *Desulfovibrio vulgaris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 3572-3576.
- [118] Lovley, D. R., E. E. Roden, E. J. P. Phillips und J. C. Woodward. 1993. Enzymatic iron and uranium reduction by sulfate-reducing bacteria. *Marine Geology* 113: 41-53.
- [119] Lovley, R. D. und E. J. P. Phillips. 1994. Reduction of chromate by *Desulfovibrio vulgaris* and its c_3 cytochrome. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 726-728.
- [120] Lovley, R. D. und E. J. P. Phillips. 1994. Novel processes for anaerobic sulfate production from elemental sulfur by sulfate-reducing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2394-2399.
- [121] Ludwig, W. und K.-H. Schleifer. 1994. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* 15: 155-173.
- [122] Lupton, F. S., R. Conrad und J. G. Zeikus. 1984. Physiological function of hydrogen metabolism during growth of sulfidogenic bacteria on organic substrates. *J. Bacteriol.* 159: 843-849.
- [123] Malki, S., I. Saimmaime, G. de Luca, M. Rousset, Z. Dermoun und J. P. Bélaïch. 1995. Characterization of an operon encoding a NADP-reducing hydrogenase in *Desulfovibrio fructosovorans*. *J. Bacteriol.* 177: 2628-2636.
- [124] Marck, C. 1988. 'DNA Strider': A 'C' program for fast analysis of DNA and protein sequences on the Apple Macintosh family of Computers. *Nucleic Acids Res.* 16: 1829-1836.
- [125] Marmur, J. 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* 3: 208-218.
- [126] Marschall, C., P. Frenzel und H. Cypionka. 1993. Influence of oxygen on sulfate reduction and growth of sulfate-reducing bacteria. *Arch. Microbiol.* 159: 168-173.
- [127] Menon, N. K., H. D. Peck, Jr., J. LeGall und A. E. Przybyla. 1987. Cloning and sequencing of the genes encoding the large and small subunits of the periplasmic [NiFeSe] hydrogenase of *Desulfovibrio baculatus*. *J. Bacteriol.* 169: 5401-5407.

- [128] Miljøkontor i Århus og Nordjyllands amtskommuner. 1990. Mariager Fjord 1985–1989. Udvikling og status. Forvaltningerne for teknik og miljø, Århus, Dänemark.
- [129] Moran, M. A., V. L. Torsvik, T. Torsvik und R. E. Hodson. 1993. Direct extraction and purification of rRNA for ecological studies. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 915–918.
- [130] Mulder, A., A. A. van de Graaf, L. A. Robertson und J. G. Kuenen. 1995. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiol. Ecol.* 16: 177–184.
- [131] Müller, W. und F. Gautier. 1975. Interactions of heteroaromatic compounds with nucleic acids. A · T-specific non-intercalating DNA ligands. *Eur. J. Biochem.* 54: 385–394.
- [132] Müller, W., I. Hattesoehl, H.-J. Schütz und G. Meyer. 1981. Polyethylene glycol derivatives of base and sequence specific DNA ligands: DNA interaction and application for base specific separation of DNA fragments by gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* 8: 95–119.
- [133] Muyzer, G., E. C. de Waal und A. G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 695–700.
- [134] Muyzer, G. und E. C. de Waal. 1994. Determination of the genetic diversity of microbial communities using DGGE analysis of PCR-amplified 16S rDNA. In: L. J. Stal und P. Caumette (eds.). *Microbial mats - Structure, development and environmental significance*. NATO ASI Series G 35. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 207–214.
- [135] Muyzer, G., A. Teske, C. O. Wirsen und H. W. Jannasch. 1995. Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Arch. Microbiol.* 164: 165–172.
- [136] Muyzer, G. und N. B. Ramsing. 1995. Molecular methods to study the organization of microbial communities. *Wat. Sci. Tech.* 32: 1–9.
- [137] Muyzer, G., S. Hottenträger, A. Teske und C. Wawer. 1996. Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA - A new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities. In: A. D. L. Akkermans, J. D. van Elsas und F. J. de Bruijn (eds.). *Molecular microbial ecology manual*. 2. Auflage. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 3.4.4.1–3.4.4.22.

- [138] Nivière, V., A. Bernadac, N. Froget, V. M. Fernández und C. E. Hatchikian. 1991. Localization of hydrogenase in *Desulfovibrio gigas* cells. Arch. Microbiol. 155: 579–586.
- [139] Ochman, H. und A. C. Wilson. 1987. Evolution in bacteria: Evidence for a universal substitution rate in cellular genomes. J. Mol. Evol. 26: 74–86.
- [140] Odom, J. M. und H. D. Peck, Jr. 1981. Hydrogen cycling as a general mechanism for energy coupling in the sulfate-reducing bacteria, *Desulfovibrio* sp. FEMS Microbiol. Lett. 12: 47–50.
- [141] Odom, J. M. und H. D. Peck, Jr. 1984. Hydrogenase, electron-transfer proteins, and energy coupling in the sulfate-reducing bacteria *Desulfovibrio*. Ann. Rev. Microbiol. 38: 551–592.
- [142] Odom, J. M. 1993. Industrial and environmental activities of sulfate-reducing bacteria. In: J. M. Odom und R. Singleton, Jr. (eds.). The sulfate-reducing bacteria: Contemporary perspectives. Springer-Verlag, New York, pp. 189–210.
- [143] Oelmüller, U., N. Krüger, A. Steinbüchel und G. C. Friedrich. 1990. Isolation of prokaryotic RNA and detection of specific mRNA with biotinylated probes. J. Microbiol. Methods 11: 73–84.
- [144] Ogram, A., W. Sun, F. J. Brockman und J. K. Fredrickson. 1995. Isolation and characterization of RNA from low-biomass deep-subsurface sediments. Appl. Environ. Microbiol. 61: 763–768.
- [145] Ollivier, B., R. Cord-Ruwisch, E. C. Hatchikian und J. L. Garcia. 1988. Characterization of *Desulfovibrio fructosovorans* sp. nov. Arch. Microbiol. 149: 447–450.
- [146] Ollivier, B., C. E. Hatchikian, G. Prensier, J. Guezennec, J. L. Garcia. 1991. *Desulfohalobium retbaense* gen. nov., sp. nov., a halophilic sulfate-reducing bacterium from sediments of a hypersaline lake in Senegal. Int. J. Syst. Bacteriol. 41: 74–81.
- [147] Orita, M., H. Iwahana, H. Kanazawa, K. Hayashi und T. Sekiya. 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis and single-strand conformation polymorphisms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 2766–2770.
- [148] Oude Elferink, S. J. W. H., A. Visser, L. W. Hulshoff Pol und A. J. M. Stams. 1994. Sulfate reduction in methanogenic bioreactors. FEMS Microbiol. Rev. 15: 119–136.
- [149] Parkes, R. J. 1987. Analysis of microbial communities within sediments using biomarkers. In: M. Fletcher, T. R. G. Gray und J. G. Jones (eds.). The ecology of microbial communities. SGM Symposium Series: Cambridge University Press, Cambridge, pp. 147–171.

- [150] Parkes, R. J., N. J. E. Dowling, D. C. White, R. A. Herbert und G. R. Gibson. 1993. Characterization of sulphate-reducing bacterial populations within marine and estuarine sediments with different rates of sulphate reduction. *FEMS Microbiol. Ecol.* 102: 235–250.
- [151] Pearson, W. R. und D. J. Lipman. 1988. Improved tools for biological sequence analysis. *Proc. Nat. Acad. Am. Sc.* 85: 2444–2448.
- [152] Pearson, W. R. 1990. Rapid and sensitive sequence comparison with FAST and FASTA. *Methods Enzymol.* 183: 63–98.
- [153] Peck, H. D., Jr. 1993. Bioenergetic strategies of sulfate-reducing bacteria. In: J. M. Odom und R. Singleton, Jr. (eds.). *The sulfate-reducing bacteria: Contemporary perspectives*. Springer-Verlag, New York, pp. 41–76.
- [154] Pichard, S. L. und J. H. Paul. 1991. Detection of gene expression in genetically engineered microorganisms and natural phytoplankton populations in the marine environment by mRNA analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1721–1727.
- [155] Pichard, S. L. und J. H. Paul. 1993. Gene expression per gene dose, a specific measure of gene expression in aquatic microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 451–457.
- [156] Porter, K. G. und Y. S. Feig. 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.* 25: 943–948.
- [157] Postgate, J. R. 1984. *The sulphate-reducing bacteria*. 2. Auflage. Cambridge University Press, Cambridge.
- [158] Postgate, J. R., H. M. Kent und R. L. Robson. 1986. DNA from diazotrophic *Desulfovibrio* strains is homologous to *Klebsiella pneumoniae* structural *nif* DNA and can be chromosomal or plasmid-borne. *FEMS Microbiol. Lett.* 33: 159–163.
- [159] Poulsen, L. K., G. Ballard und D. A. Stahl. 1993. Use of rRNA *in situ* fluorescence *in situ* hybridization for measuring the activity of single cells in young and established biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1354–1360.
- [160] Prins, Y., F. Mallein-Gerin und P. Simonet. 1993. Identification and localization of *Frankia* strains in *Alnus* nodules by *in situ* hybridization of *nifH* mRNA with strain-specific oligonucleotide probes. *J. Experimental Botany* 44: 815–820.
- [161] Przybyla, A. E., J. Robbins, N. Menon und H. D. Peck, Jr. 1992. Structure-function relationships among the nickel-containing hydrogenases. *FEMS Microbiol. Rev.* 88: 109–136.
- [162] Purdy, K. J., T. M. Embley, S. Takii und D. B. Nedwell. 1996. Rapid and efficient extraction of DNA and RNA from sediments using novel hydroxyapatite spin-column method. *Appl. Environ. Microbiol.* (eingereicht)

- [163] Rabus, R., R. Nordhaus, W. Ludwig und F. Widdel. 1993. Complete oxidation of toluene under strictly anoxic conditions by a new sulfate-reducing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1441-1451.
- [164] Rabus, R. 1995. Anaerober Abbau von Alkylbenzolen und Rohöl durch nitratreduzierende und sulfatreduzierende Bakterien. Dissertation, Universität Bremen. Verlag Mainz, Aachen (ISBN 3-930911-89-2), pp. 117-129.
- [165] Rajendran, N., O. Matsuda, Y. Urushigawa und U. Simidu. 1994. Characterization of microbial community structure in the surface sediment of Osaka Bay, Japan, by phospholipid fatty acid analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 248-257.
- [166] Ramsing, N. B., M. Kühl und B. B. Jørgensen. 1993. Distribution of sulfate-reducing bacteria, O₂, and H₂S in photosynthetic biofilms determined by oligonucleotide probes and microelectrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 3840-3849.
- [167] Ramsing, N. B., H. Fossing, T. G. Ferdelman, F. Andersen und B. Thamdrup. 1996. Distribution of bacterial populations in a stratified fjord (Mariager Fjord, Denmark) quantified by *in situ* hybridization and related to chemical gradients in the water column. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1391-1404.
- [168] Redburn, A. C. und B. K. C. Patel. 1994. *Desulfovibrio longreachii* sp. nov., a new sulfate-reducing bacterium isolated from the Great Artesian Basin of Australia. *FEMS Microbiol. Lett.* 115: 33-38.
- [169] Rees, G. N., G. S. Grassia, A. J. Sheehy, P. P. Dwivedi und B. K. C. Patel. 1995. *Desulfacinum infernum* gen. nov., sp. nov., a thermophilic sulfate-reducing bacterium from a petroleum reservoir. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 85-89.
- [170] Revsbech, N. P. 1994. Analysis of microbial mats by use of electrochemical micro-sensors: Recent advances. In: L. J. Stal und P. Caumette (eds.). *Microbial mats*. NATO ASI Series, Vol. G 35, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 135-147.
- [171] Reyensbach, A.-L., L. J. Giver, G. S. Wickham und N. R. Pace. 1992. Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3417-3418.
- [172] Rheinheimer, G. 1991. *Mikrobiologie der Gewässer*. 5. Auflage. Gustav Fischer Verlag, Jena.
- [173] Richards, F. A., J. J. Anderson und J. D. Cline. 1971. Chemical and physical observations in Golfo Dulce, an anoxic basin on the Pacific coast of Costa Rica. *Limnol. Oceanogr.* 16: 43-50.
- [174] Riederer-Henderson, M. und P. W. Wilson. 1970. Nitrogen fixation by sulphate-reducing bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 61: 27-31.
- [175] Risatti, B., W. C. Capman und D. A. Stahl. 1994. Community structure of a microbial mat: The phylogenetic dimension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 10173-10177.

- [176] Rohde, M., U. Fürstenau, F. Mayer, A. E. Przybyla, H. D. Peck, Jr., J. Le-Gall, E. S. Choi und N. K. Menon. 1990. Localization of membrane-associated [NiFe] und [NiFeSe] hydrogenases of *Desulfovibrio vulgaris* using immunoelectron microscopic procedures. *Eur. J. Biochem.* 191: 389–396.
- [177] Rölleke, S., G. Muyzer, C. Wawer, G. Wanner und W. Lubitz. 1996. Identification of bacteria in a biodegraded wall painting by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2059–2065.
- [178] Rosenbaum, V. und D. Riesner. 1987. Temperature-gradient gel electrophoresis; thermodynamic analysis of nucleic acids and proteins in purified form and in cellular extracts. *Biophys. Chem.* 26: 235–246.
- [179] Rosset, R., J. Julien und R. Monier. 1966. Ribonucleic acid composition of bacteria as a function of growth rate. *J. Mol. Biol.* 18: 308–320.
- [180] Rousset, M., Z. Dermoun, C. E. Hatchikian und J. P. Bélaich. 1990. Cloning and sequencing of the locus encoding the large and small subunit genes of the periplasmic [NiFe] hydrogenase of *Desulfovibrio fructosovorans*. *Gene* 94: 95–101.
- [181] Rousset, M., Z. Dermoun, M. Chippaux und J. P. Bélaich. 1991. Markerexchange mutagenesis of the *hydN* genes in *Desulfovibrio fructosovorans*. *Mol. Microbiol.* 5: 1735–1740.
- [182] Rousset, M., Z. Dermoun, J. D. Wall und J.-P. Bélaich. 1993. Analysis of the periplasmic [NiFe] hydrogenase transcription unit from *Desulfovibrio fructosovorans*. *J. Bacteriol.* 175: 3388–3393.
- [183] Rueter, P., R. Rabus, H. Wilkes, F. Aeckersberg, F. A. Rainey, H. W. Jannasch und F. Widdel. 1994. Anaerobic oxidation of hydrocarbons in crude oil by new types of sulphate-reducing bacteria. *Nature* 372: 455–458.
- [184] Ruimy, R., V. Breittmayer, V. Boivin und R. Christen. 1994. Assessment of the state of activity of individual bacterial cells by hybridization with a ribosomal RNA targeted fluorescently labelled oligonucleotidic probe. *FEMS Microbiol. Ecol.* 15: 207–214.
- [185] Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis und H. A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487–491.
- [186] Sambrook, J., E. F. Fritsch und T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2. Auflage. Cold Spring Harbor, New York.
- [187] Sanger, F., C. Nicklen und A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74: 5463–5467.

- [188] Sayler, G. S. und A. C. Layton. 1990. Environmental application of nucleic acid hybridization. *Ann. Rev. Microbiol.* 44: 625–648.
- [189] Schauderer, R., B. Eikmanns, R. K. Thauer, F. Widdel und G. Fuchs. 1986. Acetate oxidation to CO₂ in anaerobic bacteria via a novel pathway not involving reactions of the citric acid cycle. *Arch. Microbiol.* 145: 162–172.
- [190] Schmidt, T. M., E. F. DeLong und N. R. Pace. 1991. Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. *J. Bacteriol.* 173: 4371–4378.
- [191] Seitz, H.-J. und H. Cypionka. 1986. Chemolithotrophic growth of *Desulfovibrio desulfuricans* with hydrogen coupled to ammonification of nitrate and nitrite. *Arch. Microbiol.* 146: 63–67.
- [192] Sharp, P. M. 1991. Determinants of DNA sequence divergence between *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Codon usage, map position, and concerted evolution. *J. Mol. Evol.* 33: 23–33.
- [193] Sharp, P. M., N. C. Nolan, N. ni Cholmain und K. M. Devine. 1992. DNA sequence variability at the *rplX* locus of *Bacillus subtilis*. *J. General Microbiol.* 138: 39–45.
- [194] Sharp, P. M., N. C. Nolan und K. M. Devine. 1995. Evolution of gene sequences between and within species of *Bacillus*. In: S. Baumberg, J. P. W. Young, S. R. Saunders und E. M. H. Wellington (eds.). *Society for general microbiology, Symposium 52*, Cambridge University Press, pp. 111–126.
- [195] Sheffield, V. C., D. R. Cox, L. S. Lerman und R. M. Myers. 1987. Attachment of a 40-base pair G+C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 232–236.
- [196] Sieburth, J. M. 1993. C₁ bacteria in the water column of Chesapeake Bay, USA. I. Distribution of subpopulations of O₂-tolerant, obligately anaerobic, methylotrophic methanogens that occur in microniches reduced by their bacterial consorts. *Marine Ecology Progress Series* 95: 67–80.
- [197] Sinigalliano, C. D., D. N. Kuhn und R. D. Jones. 1995. Amplification of *amoA* gene from diverse species of ammonium-oxidizing bacteria and from an indigenous bacterial population from seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2702–2706.
- [198] Smith, G. B. und J. M. Tiedje. 1992. Isolation and characterization of a nitrite reductase gene and its use as a probe for denitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 376–384.
- [199] Smith, D. W. 1993. Ecological actions of sulfate-reducing bacteria. In: J. M. Odom und R. Singleton, Jr. (eds.). *The sulfate-reducing bacteria: Contemporary perspectives*. Springer-Verlag, New York, pp. 161–188.

- [200] Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503–517.
- [201] Stackebrandt, E., D. A. Stahl und R. Devereux. 1995. Taxonomic relationships. In: L. L. Barton (ed.). *Sulfate-reducing bacteria*. Plenum Press, New York, pp. 49–87.
- [202] Stahl, D. A. und R. Amann. 1991. Development and application of nucleic acid probes. In: E. Stackebrandt und M. Goodfellow (eds.). *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons, Chichester, England, pp. 205–248.
- [203] Stal, L. J. 1993. Mikrobielle Matten. In: L.-A. Reil und M. Köster (eds.). *Mikrobiologie des Meeresboden*. Gustav Fischer Verlag, Jena, pp. 196–220.
- [204] Steffan, R. J. und R. M. Atlas. 1988. DNA amplification to enhance detection of genetically engineered bacteria in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2185–2191.
- [205] Steffan, R. J. und R. M. Atlas. 1991. Polymerase chain reaction: Applications in environmental microbiology. *Ann. Rev. Microbiol.* 45: 137–161.
- [206] Stokkermans, J., W. van Dongen, A. Kaan, W. van den Berg und C. Veeger. 1989. *hydγ*, a gene from *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough) encodes a polypeptide homologous to the periplasmic hydrogenase. *FEMS Microbiol. Lett.* 49: 217–222.
- [207] Studier, F. W. 1965. Sedimentation studies of the size and shape of DNA. *J. Mol. Biol.* 11: 379–390.
- [208] Suzuki, M. T. und S. J. Giovannoni. 1996. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 625–630.
- [209] Swofford, D. L. 1991. PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony. Illinois Natural History Survey, Champaign.
- [210] Taylor, J. und R. J. Parkes. 1985. The application of cellular fatty acids to identify different types of sulphate-reducing bacteria within marine sediment systems. *J. Gen. Microbiol.* 131: 631–642.
- [211] Telang, A. J., G. Voordouw, S. Ebert, N. Sifeldeen, J. M. Foght, P. M. Fedorak und D. W. S. Westlake. 1994. Characterization of the diversity of sulfate-reducing bacteria in soil and waste water environments by nucleic acid hybridization techniques. *Can. J. Microbiol.* 40: 955–964.
- [212] Teske, A., C. Wawer, G. Muyzer und N. B. Ramsing. 1996. Distribution of sulfate-reducing bacteria in a stratified fjord (Mariager Fjord, Denmark) as evaluated by most-probable-number counts and denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified ribosomal DNA fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1405–1415.

- [213] Teske, A., P. Sigalevich, Y. Cohen und G. Muyzer. 1996. Molecular identification of bacteria from a co-culture by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S ribosomal DNA fragments as a tool for isolation in pure cultures. In: A. Teske. Phylogenetische und ökologische Untersuchungen an Bakterien des oxidativen und reduktiven marinen Schwefelkreislaufs mittels ribosomaler RNA, Berichte, Fachbereich Geowissenschaften, Universität Bremen, Nr. 72, Bremen (ISSN 0931-0800), pp. 27–42.
- [214] Teske, A., N. B. Ramsing, M. Fukui und Y. Cohen. 1996. Molecular and microbiological analysis of sulfate-reducing bacterial populations in the surface layer of a hypersaline cyanobacterial mat of Solar Lake, Sinai. In: A. Teske. Phylogenetische und ökologische Untersuchungen an Bakterien des oxidativen und reduktiven marinen Schwefelkreislaufs mittels ribosomaler RNA, Berichte, Fachbereich Geowissenschaften, Universität Bremen, Nr. 72, Bremen (ISSN 0931-0800), pp. 55–76.
- [215] Thampdrup, B., D. E. Canfield, T. G. Ferdelman, R. N. Glud und J. K. Gundersen. 1996. A biogeochemical survey of the anoxic basin Golfo Dulce, Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* (im Druck)
- [216] Torres, V., A. Ballesteros und V. M. Fernandez. 1986. Expression of hydrogenase activity in Barley (*Hordeum vulgare* L.) after anaerobic stress. *Arch. Biochem. Biophys.* 245: 174–178.
- [217] Traore, A. S., C. E. Hatchikian, J.-P. Bélaïch und J. LeGall. 1981. Microcalorimetric studies of the growth of sulfate-reducing bacteria: Energetics of *Desulfovibrio vulgaris* growth. *J. Bacteriol.* 145: 191–199.
- [218] Tsai, Y.-L. und B. H. Olson. 1991. Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1070–1074.
- [219] Tsai, Y.-L., M. J. Park und B. H. Olson. 1991. Rapid method for direct extraction of mRNA from seeded soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 765–768.
- [220] Ueda, T., Y. Suga, N. Yahiro und T. Matsuguchi. 1995. Genetic diversity of N₂-fixing bacteria associated with rice roots by molecular evolutionary analysis of a *nifD* library. *Can. J. Microbiol.* 41: 235–240.
- [221] Uffen, R. L., A. Colbeau, P. Richaud und P. M. Vignais. 1990. Cloning and sequencing the genes encoding hydrogenase subunits of *Rhodocyclus gelatinosus*. *Mol. Gen. Genet.* 221: 49–58.
- [222] Van de Graaf, A. A., A. Mulder, P. de Bruijn, M. S. M. Jetten, L. A. Robertson und J. G. Kuenen. 1995. Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1246–1251.

- [223] Van den Berg, W. A. M., W. M. A. M. van Dongen und C. Veeger. 1991. Reduction of the amount of periplasmic hydrogenase in *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough) with antisense RNA: Direct evidence for an important role of this hydrogenase in lactate metabolism. *J. Bacteriol.* 173: 3688-3694.
- [224] Van den Berg, W. A. M., J. P. W. G. Stokkermans und W. M. A. M. van Dongen. 1993. The operon for the Fe-hydrogenase in *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough): Mapping of the transcript and regulation of expression. *FEMS Microbiol. Lett.* 110: 85-90.
- [225] Van Dongen, W. W. Hagen, W. van den Berg und C. Veeger. 1988. Evidence for an unusual mechanism of membrane translocation of the periplasmic hydrogenase of *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough), as derived from expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 50: 5-9.
- [226] Veres, G., R. A. Gibbs, S. E. Scherer und C. T. Caskey. 1987. The molecular basis of sparse fur mouse mutation. *Science* 237: 415-417.
- [227] Visscher, P. T., R. A. Prins und H. van Gemerden. 1992. Rates of sulfate reduction and thiosulfate consumption in a marine microbial mat. *FEMS Microbiol. Ecol.* 86: 283-294.
- [228] Voordouw, G., J. E. Walker und S. Brenner. 1985. Cloning of the gene encoding the hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough) and determination of the NH₂-terminal sequence. *Eur. J. Biochem.* 148: 509-514.
- [229] Voordouw, G. und S. Brenner. 1985. Nucleotide sequence of the gene encoding the hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough). *Eur. J. Biochem.* 148: 515-520.
- [230] Voordouw, G., J. D. Strang und F. R. Wilson. 1989. Organization of the genes encoding [Fe] hydrogenase in *Desulfovibrio vulgaris* susp. *oxamicus* Monticello. *J. Bacteriol.* 171: 3881-3889.
- [231] Voordouw, G., N. K. Menon, J. LeGall, E.-S. Choi, H. D. Peck, Jr. und A. E. Przybyla. 1989. Analysis and comparison of nucleotide sequences encoding the genes for [NiFe] and [NiFeSe] hydrogenase from *Desulfovibrio gigas* and *Desulfovibrio baculatus*. *J. Bacteriol.* 171: 2894-2899.
- [232] Voordouw, G., V. Niviere, F. G. Ferris, P. M. Fedorak und D. W. S. Westlake. 1990. Distribution of hydrogenase genes in *Desulfovibrio* spp. and their use in identification of species from the oil field environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 3748-3754.
- [233] Voordouw, G. 1990. Hydrogenase genes in *Desulfovibrio*. In: J.-P. Bélaich, M. Bruschi, J.-L. Garcia (eds.). *Microbiology and biochemistry of strict anaerobes involved in interspecies hydrogen transfer*. Plenum Press, New York, pp. 37-72.

- [234] Voordouw, G., J. K. Voordouw, R. R. Karkhoff-Schweizer, P. M. Fedorak und D. W. S. Westlake. 1991. Reverse sample genome probing, a new technique for identification of bacteria in environmental samples by DNA hybridization, and its application to the identification of sulfate-reducing bacteria in oil field samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3070-3078.
- [235] Voordouw, G., J. K. Voordouw, T. R. Jack, J. Foght, P. M. Fedorak, and D. W. S. Westlake. 1992. Identification of distinct communities of sulfate-reducing bacteria in oil fields by reverse sample genome probing. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3542-3552.
- [236] Voordouw, G. 1992. Evolution of hydrogenase genes. *Adv. Inorg. Chem.* 38: 397-422.
- [237] Voordouw, G., Y. Shen, C. S. Harrington, A. J. Telang, T. R. Jack, and D. W. S. Westlake. 1993. Quantitative reverse sample genome probing of microbial communities and its application to oil field production waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 4101-4114.
- [238] Voordouw, G. 1993. Molecular biology of the sulfate-reducing bacteria. In: J. M. Odom und R. Singleton, Jr. (eds.). *The sulfate-reducing bacteria: Contemporary perspectives*. Springer-Verlag, New York, pp. 88-130.
- [239] Voordouw, G. und J. D. Wall. 1993. Genetics and molecular biology of sulfate-reducing bacteria. In: M. Sebald (ed.). *Genetics and molecular biology of anaerobic bacteria*, Springer Verlag, New York, pp. 456-473.
- [240] Voordouw, G. 1995. The genus *Desulfovibrio*: The centennial. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2813-2819.
- [241] Wagner, M., R. Amann, H. Lemmer und K.-H. Schleifer. 1993. Probing activated sludge with oligonucleotides specific for the Proteobacteria: Inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1520-1525.
- [242] Walker, J. M. und W. Gaastra. 1988. Detection of protein blots using enzyme linked second antibodies or protein A. In: J. M. Walker (ed.). *Methods in molecular biology. Vol. III. New protein techniques*. Humana Press. Clifton, New Jersey, pp. 427-440.
- [243] Ward, D. M., R. Weller und M. M. Bateson. 1990. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature* 344: 63-65.
- [244] Ward, D. M., M. M. Bateson, R. Weller und A. L. Ruff-Roberts. 1992. Ribosomal RNA analysis of microorganisms as they occur in nature. *Adv. Microbiol. Ecol.* 12: 219-286.

- [245] Wawer, C. und G. Muyzer. 1995. Genetic diversity of *Desulfovibrio* spp. in environmental samples analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis of [NiFe] hydrogenase gene fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2203–2210.
- [246] Wawer, C., H. Rüggeberg, G. Meyer und G. Muyzer. 1995. A simple and rapid electrophoresis method to detect sequence variation in PCR-amplified DNA fragments. *Nucleic Acids Res.* 23: 4928–4929.
- [247] Wayne, L. G., D. J. Brenner, R. R. Colewell, P. A. D. Grimont, O. Kandler, M. I. Krichevsky, L. H. Moore, W. E. C. Moore, R. G. E. Murray, E. Stackebrandt, M. P. Starr und H. G. Trüper. 1987. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37: 463–464.
- [248] Widdel, F. 1980. Anaerober Abbau von Fettsäuren und Benzoesäure durch neu isolierte Arten sulfatreduzierender Bakterien. Dissertation, Universität Göttingen.
- [249] Widdel, F. und N. Pfennig. 1984. Dissimilatory sulfate- or sulfur-reducing bacteria. In: N. R. Krieg und J. G. Holt. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 8. Auflage. Williams & Wilkins, Baltimore, USA, pp. 663–679.
- [250] Widdel, F. 1988. Microbiology and Ecology of sulfate- and sulfur-reducing bacteria. In: A. J. B. Zehnder (ed.). *Biology of anaerobic microorganisms*. John Wiley & Sons, New York, pp. 469–585.
- [251] Widdel, F. und F. Bak. 1992. Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria. In: A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder und K. H. Schleifer (eds.). *The Prokaryotes*. Second Edition Volume IV. Springer Verlag, New York, pp. 3352–3378.
- [252] Widdel, F. und T. A. Hansen. 1991. The dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing bacteria. In: A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder und K. H. Schleifer (eds.). *The Prokaryotes*. Second Edition Volume I. Springer Verlag, New York, pp. 583–624.
- [253] Woese, C. R., R. Gutell, R. Gupta und H. F. Noller. 1983. Detailed analysis of the higher-order structure of 16S-like ribonucleic acids. *Microbiol. Rev.* 47: 621–669.
- [254] Woese, C. R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51: 221–271.
- [255] Wu, L.-F. und M. A. Mandrand. 1993. Microbial hydrogenases: Primary structure, classification, signatures and phylogeny. *FEMS Microbiol. Rev.* 104: 243–270.
- [256] Wyman, M., J. P. Zehr und D. G. Capone. 1996. Temporal variability in nitrogenase gene expression in natural populations of the marine cyanobacterium *Trichodesmium thiebautii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1073–1075.

- [257] Yamamoto, S. und S. Harayama. 1995. PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. Appl. Environ. Microbiol. 61: 1104-1109.

Anhang A

A.1 Abkürzungen

A	Adenin
A.	<i>Alcaligenes</i>
AA	Acrylamid
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintri-phosphat
b	Basen
BAC	N,N'-bis-Acrylylcystamin
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	komplementäre/copy DNA
CSPD	disodium 3-(4-methoxy-1,2-dioxetane-3,2'- (5'-chloro)tricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]decan}-4-yl)phenyl phosphate
CTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
D.	<i>Desulfovibrio</i> bzw. <i>Desulfobacterium</i>
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindole
dATP	Desoxyadenosintri-phosphat
dCTP	Desoxycytidintri-phosphat
ddNTP	Didesoxynukleosidtri-phosphate
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DGGE	Denaturierende Gradientengelelektrophorese
dGTP	Desoxyguanosintri-phosphat
d. h.	das heißt
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtri-phosphate

DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
E.	<i>Escherichia</i>
ed.	editor (Herausgeber)
eds.	editors
EDTA	(Dinatriumsalz der) Ethylendiamintetraessigsäure
EMBL	European molecular biology laboratory
f	femto-
et al.	et alii
g	Gramm
<i>g</i>	Fallbeschleunigung
G	Guanin
IgG	Immunglobulin G
kbp	Kilobasenpaare
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
λ	Bakteriophage Lambda
l	Liter
log	Logarithmus
LSU	large subunit
μ	mikro-
m	milli; Meter
M	Molar
mA	Milliampere
M-MLV H ⁻ RT	Moloney Murine Leukemia Virus RNase H ⁻ Reverse Transkriptase
MOPS	Morpholinopropan sulfonsäure
MPN	most-probable-number
mRNA	messenger RNA
n	nano-
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumsals
OD	optische Dichte
p	pico-
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PEG	Polyethylenglykoll
PFLA	Phospholipidfettsäureanalyse
pp.	Seiten
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidon
rDNA	rRNA-codierende Gene

RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse Transkription/Transkriptase
S	Sedimentationskonstante
SDS	Natriumdodecylsulfat
spp.	species
SSC	salt-sodiumcitrate (Natriumchlorid-Natriumcitrat)
SSCP	single-strand conformation polymorphism
SSU	small subunit
STE	salt-Tris-EDTA
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-buffered EDTA
TBS	Tris-buffered saline
TE	Tris-EDTA
Temed	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGGE	temperature gradient gel electrophoresis
T_m	mittlere Schmelztemperatur doppelsträngiger DNA
Tris	Trishydroxymethylaminoethan
U	unit (Einheit)
u. a.	unter anderem
UV	Ultraviolettlicht
V	Volt
Vol.	Volumen
(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	Gewicht pro Volumen
X-Phosphat	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
z. B.	zum Beispiel

A.2 Aminosäurecode

A	Alanin (Ala)	L	Leucin (Leu)
R	Arginin (Arg)	K	Lysin (Lys)
N	Asparagin (Asn)	M	Methionin (Met)
D	Asparaginsäure (Asp)	F	Phenylalanin (Phe)
C	Cystein (Cys)	P	Prolin (Pro)
Q	Glutamin (Gln)	S	Serin (Ser)
E	Glutaminsäure (Glu)	T	Threonin (Thr)
G	Glycin (Gly)	W	Tryptophan (Trp)
H	Histidin (His)	Y	Tyrosin (Tyr)
I	Isoleucin (Ile)	V	Valin (Val)

A.3 Nukleinsäurecode

Base	Code	Komplement	Code	Base	Code	Base
Adenin	A	T	R	A, G	H	A, T, C
Cytosin	C	G	Y	C, T	B	G, T, C
Guanin	G	C	M	A, C	V	G, A, T
Thymin	T	A	K	G, T	D	G, A, T
Uracil	U	A	S	G, C	N	G, A, T, C
			W	A, T		

A.4 Sequenzdaten

Im folgenden sind die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Nukleotid- und die abgeleiteten Aminosäuresequenzen des [NiFe] Hydrogenase-Genfragments aufgeführt. Die "alignments" enthalten zusätzlich die Sequenzen von *Desulfovibrio gigas*, *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki, *Desulfovibrio fructosovorans* und *Escherichia coli*, die der EMBL Datenbank entnommen wurden. Die Gattungsnamen wurden folgendermaßen abgekürzt: *D.*, *Desulfovibrio*; *E.*, *Escherichia*. Sequenzbezeichnungen beginnend mit K6, K5 oder MM stehen für DNA-Fragmente, die aus Nukleinsäuren eines experimentellen methanogenen Bioreaktors (K5), eines denitrifizierenden Bioreaktors (K6) sowie aus einer mikrobiellen Matte (Texel, Holland) amplifiziert wurden.

A.4.1 Nukleotidsequenzen des [NiFe] Hydrogenase-Genfragments

```

K6S1 .....GTGTGCACCTACGTGcATGCCCTGG
K6S2 .....CGCTGCGGtGTGTGCACCTACGTGcATGCCCTGG
K6S4 .....GTGTGCACCTACGTGcACGCCCTGG
K6S8 .....GTGTGCACCTACGTcATGCCCTGG
K6S6 .....GCCTGCGGcGTGTGCACCTACGTGcATGCCCTGG
K5S18 .....TGGCGGcGTCTGCACCTACGTGcACGCCCTGG
K5S12/14 .....GTGCACCTACGTGcATGCCCTGG
K5S5 .....GTGCACCTACACccACGCCCTGG
K5TypA .....GGCGGcGTCTGCACGTACACccATGCTCTGG
K5TypB .....GCGGcGTCTGCGGTACACccATGCCCTGG
MM5 .....GCTTGGCGcGTGTGCACCTACGTGcACGCCCTGG
MM8 .....GCGGcGTGTGCACCTATGTcACGCCCTGG
MM10 .....GCGGYGTSTGCACCTACGTGcWCGCCCTGG
PIB2 .....TCCTGCGGcGTCTGCACCTACGTGcACGCTCTGG
D.baculatus .....GtGTCTGCACCTACACccATGCCCTGG
D.desulfuricans DSM 1924 .....GCGGcGTCTGCACATACACGcACGCCCTGG
D.desulfuricans DSM 1926 .....GGtGTGTGCACAAACGTcACCGCTTGG
D.desulfuricans Vosjan .....
D.longus .....TTGCACCTACACccACGCCCTGG

```

D. sulfodismutansGCGGcGTGTGCACCTACGTGcATGCCCTGG
D. vulgaris DSM 644ACCTGCGGcGTGTGCACCTACAGcATGCCCTGG
D. vulgaris DSM 1744GGtGTCTGCACCTACGTGcATGCCCTGG
D. vulgaris Miyazaki CGCGACGCCAGCACTTCACCCAGCGCACCTGCGGcGTGTGCACCTATAcATGCCCTGG
D. fructosovorans CGCGACGCCAGCACTTCACCCAGCGCGCTGCGGcGTGTGCACGTACGTcACGCCCTGG
D. gigas CGCGACGCCAGCACTTCACCCAGCGCGCTGCGGcGTGTGCACCTATGTGcATGCCCTGG
E. coli CGCGATGCGCGGGCTTCGTTGAACGTATCTGCGGcGTCTGTACTGGCGTAcACGCCCTGG

K6S1 CCTCcACCCGgTGCgTGGACAAcGCCGTCAAGGTc-----AACATCCCgGCCAAcGCCCG
K6S2 CCTCcACCCGgTGCgTGGACAAcGCCGTCAAGGTg-----AACATCCCgGCCAAcGCCCG
K6S4 CCTCcACCCGgTGCgTGGACAAcGCCGTCAAGGTG-----AACATCCCgGTCAAcGCCCG
K6S8 CCTCcACCCGgTGCgTGGATAAcGCCGTCAAGGTc-----AACATCCCgGCCAAcGCCCG
K6S6 CCTCcACCCGgTGCgTGGACAAcGCCGTCAAGGTc-----AACATCCCgGCCAAcGCCCG
K5S18 CCTCcACCCGgTGCgTGGACAAcGCCGTCAAGGTG-----AACATCCCgGCCAAcGCCCG
K5S12/12 CCTCcACCCGgTGCgTGGACAAcGCCGTCAAGGTc-----AACATCCCgGCCAAcGCCCG
K5S5 CCTCGACCCGgTGCgTGGACAAcGCCGTGCGGTGGACAAGAACCTGCCCGACAAcGCCCG
K5TypA CCTCcACCGCGTGCgTGGACAAcGCCGTGCGGTGGACAAGAACCTGCCCGACAAcGCCCG
K5TypB CCTCcACCGCGTGCgTGGACAAcGCCGTGCGGTGGACAAGAACCTGCCCGACAAcGCCCG
MM5 TTTCcACCCGgTGCgTGGACAAcGCCGTGCGGTG-----AAGTCCCCAACAAcGCCAC
MM8 CCTCcACCCGgTGCgTGGACAAcGCCGTGCGGTG-----AAGTCCCcGcGCCTGGCGGA
MM10 CCTCcACCCGgTGCgTGGACAAcGCCGTCAAGGTG-----AACATCCCgGAYAAcGCCCG
PIB2 GTTCAATCCGgTGCgTGGACAAcGCCGTGCGGTGGACAAGGTCTGCCcACAACGCCAC
D. baculatus CCTCcACCCGgTGCgTGGACAAcGCCGTGCGGTGGATGCGAACCTGCCCGACAAcGCCCG
D. desulfuricans DSM 1924 TTTCcACCCGgCACTTGAAGACGCCATCAAC-----AAGCCCATCCCgGCCAAcGCCAC
D. desulfuricans DSM 1926 CCTCTGTTGTTGCGTGGATGACGCGGTAGGGGTT-----TCCATTCCCgAAAACGCCAC
D. desulfuricans VosjanAGTT-----ACTATTCCCgAAAACGCCAC
D. longus CCTCcACCCGgTGCgTGGACAAcGCCGTGCGGTG-----AAGTCCCCAAGAACGCCAC
D. sulfodismutans CCTCcACCCGgTGCgTGGACAAcGCCGTCAAGGTc-----AACATCCCgGCCAAcGCCCG
D. vulgaris DSM 644 TTTCcACCGCGTGCgTGGACAAcGCCGTGCGGTG-----CATATCCCcAAGAATGCCAC
D. vulgaris DSM 1744 TTTCcGTCGGTCCGgTGGACAAcGCCGTGCGGGTTGACAAGGTCTGCCcACAACGCCAC
D. vulgaris Miyazaki CCTCcACCCGgTGCgTGGACAAcGCCGTGCGGTG-----CACATCCCcAAGAACGCCAC
D. fructosovorans CCTCcAGCCGgTGCgTGGATGACGCGGTCAAGGTc-----AGCATCCCgGCCAAcGCCCG
D. gigas CCTCcGTCGGCGCGTGGACAAcGCTGCGGTG-----AAGATTCCCgAAAACGCCAC
E. coli CTTGCGTTTAcGCCATCGAAGATGCTATCGGTATT-----AAAGTCCCgGACAAcGCCAA

K6S1 GATGATGCGCAACCTGGTCATGGGCGCCAGTATCTGCATGACCACATCGTGCAATTTCTAT
K6S2 GATGATGCGCAACCTGGTCATGGGCGCCAGTATCTGCATGACCACATCGTGCAATTTCTAT
K6S4 GTTGATGCGCAACCTGGTCATGGGCGCCAGTACCTGCATGACCACATCGTGCAATTTCTAC
K6S8 GATGATGCGCAACCTGGTCATGGCCTCCCAGTATCTGCATGACCACATCGTGCAATTTCTAT
K6S6 GATGATGCGCAACCTGGTCATGGCCTCCCAGTATCTGCATGACCACATCGTGCAATTTCTAT
K5S18 GATGATGCGCAACCTGGTCATGGCCTCCCAGTACCTGCATGACCACATCGTGCAATTTCTAC
K5S12/14 GATGATGCGCAACCTGGTCATGGCCTCCCAGTATCTGCATGACCACATCGTGCAATTTCTAT
K5S5 CCTCATCCGCAACCTcGTCTGGCCCGCGCAGTTCTCTGCATGACCACATCGTGCAATTTCTAC
K5TypA CCTCATCCGCAACCTcGTCTGGCCCGCGCAGTTCTCTGCATGACCACATCGTGCAATTTCTAT
K5TypB CCTCATCCGCAACCTcGTCTGGCCCGCGCAGTTCTCTGCATGACCACATCGTGCAATTTCTAT
MM5 CCTGATCCGCAACCTGGTCTGGCTcCCCAGTACATGCAcGACCACATCGTGCAATTTCTAT
MM8 GCTGGAACGCCAGCTcTGCACTGCCTCCCAGTACATGCAcGACCACATCGTGCAATTTCTAT
MM10 GCTGATGCGCAACCTGGTCATGGSCGCCAGTACHTGCATGACCACATCGTGCAATTTCTAC
PIB2 CATCATCCGCAATCTcGTGCTGGCATCCCAGTTCTATGCAcGACCACATCGTGCAATTTCTAT
D. baculatus CCTCATCCGCAACCTGGTCTGGCCCGCCAGTTCTCTGCATGACCACATCGTGCAATTTCTAT
D. desulfuricans DSM 1924 CTATATCCGCAACCTcGTTATGGCCATGCAAGTTCTATGCAcGACCACATCGTGCAATTTCTAT
D. desulfuricans DSM 1926 CATCTTCCGTAACCTcGTTATGGGTTGTcAGTACATGCAcGATCATCTGGTGCATTTTAT
D. desulfuricans Vosjan CCTTATCCGTAACCTcGTTATGGGTTGTcAGTACATGCAcGATCATCTGGTGCATTTTAT
D. longus CCTGATCCGCAACCTGGTCTGGCCCGCGCAGTTCTATGCAcGACCACATCGTGCAATTTCTAT

<i>D. sulfodismutans</i>	CATGATGCGCAACCTGGTCATGGCCGCCAGTATCTGCATGACCACATCGTGCACTTCTAT
<i>D. vulgaris</i> DSM 644	ATACATCCGCAACCTcGTTCTGGGTGCGCAGTATCTGCAcGACCACATCGTGCACTTCTAC
<i>D. vulgaris</i> DSM 1744	CATCATCCGTAACCTGGTGTATGGCCGCGCAGTTCATGCAcGACCACATCGTGCACTTCTAT
<i>D. vulgaris</i> Miyazaki	CTACATCCGCAACCTGGTGTCTGGGCGCGCAGTACCTGCAcGACCACATCGTGCACTTCTAC
<i>D. fructosovorans</i>	CATGATGCGCAACCTGGTCATGGCCTCCAGTATCTCCATGACCACCTCGTCCACTTCTAT
<i>D. gigas</i>	TCTCATGCGCAACCTcACCATGGGCGCGCAATACATGCAcGACCCTTGGTGCACTTCTAC
<i>E. coli</i>	TATCATCCGCAACATTATGCTGGCAACCGCTCTGGTGCCAcGATCATCTGGTGCACTTCTAT
K6S1	CACCTGCACGCCCTGGACTGGGTGCGAGTGAACCAACGCCCTCAAGGCCGACCCCCAGAAGG
K6S2	CACCTGCACGCCCTGGACTGGGTGCGAGTGAACCAACGCCCTCAAGGCCGACCCCGAGAAGG
K6S4	CACCTGCACGCCCTGGACTGGGTGCGAGTGAACCAACGCCCTCAAGGCCGACCCCGAGAAGG
K6S8	CACCTCCATGCCCTGGACTGGGTGCGAGTGAACCAACGCCCTCAAGGCCGACCCCGAGAAGG
K6S6	CACCTGCACGCCCTGGACTGGGTGCGAGTGAACCAACGCCCTCAAGGCCGACCCCCAGAAGG
K5S18	CACCTGCACGCCCTGGACTGGGTGCGAGTGAACCAACGCCCTCAAGGCCGACCCCGAGAAGG
K5S12/14	CACCTGCACGCCCTGGACTGGGTGCGAGTGAACCAACGCCCTCAAGGCCGACCCCCAGAAGG
K5S5	CACCTGCACGCCCTGGACTGGGTGCGAGTGAACCAACGCCCTCAAGGCCGACCCCGAGAAGG
K5TypA	CATCTGCACGCCCTGGACTGGGTGCGAGTGAACCAACGCCCTCAAGGCCGACCCCGAGAAGG
K5TypB	CATCTGCACGCCCTGGACTGGGTGCGAGTGAACCAACGCCCTCAAGGCCGACCCCGAGAAGG
MM5	CACCTGCACGCCCTGGACTGGGTGCGAGTGAACCAACGCCCTCAAGGCCGACCCCGAGAAGG
MM8	CATCTCCATGCCCTGGACTGGGTGCGAGTGAACCAACGCCCTCAAGGCCGACCCCAACAAGG
MM10	CACCTGCACGCCCTGGACTGGGTGCGAGTGAACCAACGCCCTCAAGGCCGAYCCGSAGAAGG
PIB2	CACCTGCACGCTCTGGACTTGGTCAACGTCGCCAACGCTCTGAAcGCCGACGTGAACACCG
<i>D. baculatus</i>	CATCTGCACGCCCTGGACTGGGTGCGAGTGAACCAACGCCCTCAAGGCCGACCCCAAAAAGG
<i>D. desulfuricans</i> DSM 1924	CACCTGCACGCCCTGGACTTGGTGAACGTCGCCAACGCTCTGAAcGCCGACCCCGGCAAGG
<i>D. desulfuricans</i> DSM 1926	CATCTGCACGCTCTGGACTGGGTGCGAGTGGTCAGCGCCCTTCCGCTGATCCCAAAAAGG
<i>D. desulfuricans</i> Vosjan	CATCTCTGTGGATTGGATTGGATCGAGTGAACCAACGCCCTCAAAAGCAGACCCCTAAAAAAG
<i>D. longus</i>	CACCTGCACGCCCTGGACTGGGTGCGAGTGAACCAACGCCCTCAAGGCCGACCCCGAGAAGG
<i>D. sulfodismutans</i>	CACCTGCACGCCCTGGACTGGGTGCGAGTGAACCAACGCCCTCAAGGCCGACCCCCAGAAGG
<i>D. vulgaris</i> DSM 644	CACCTGCACGCCCTGGACTTGGTGAACGTCGCCAACGCTCTGAAcGCCGACCCCGGCAAGG
<i>D. vulgaris</i> DSM 1744	CACCTGCACGCCCTGGACTTGGTGAACGTCGCCAACGCTCTGAAcGCCGACCCCGGCAAGG
<i>D. vulgaris</i> Miyazaki	CACCTGCACGCCCTGGACTTGGTGAACGTCGCCAACGCTCTGAAcGCCGACCCCGGCAAGG
<i>D. fructosovorans</i>	CACCTGCACGCCCTGGACTGGGTGCGAGTGAACCAACGCCCTCAAGGCCGATCCCAACAAGG
<i>D. gigas</i>	CACCTGCATGCCCTTGACTGGGTGAACGTCGCCAACGCTCTGAAcGCCGATCCCGGCAAGG
<i>E. coli</i>	CAGCTTGC CGGGATGGACTGGATCGATGTGTTAGATGCGCTGAAAGCCGACCCCGGAAAG
K6S1	CGGCCAAACTGGCCGCCAACATC-----GCCCGGCCCGTCCGGAgAACAC
K6S2	CGGCCAAACTGGCCGCCAACATC-----GCCCGGCCCGTCCCGAgAACAG
K6S4	CGGCCAAACTGGCCGCCAACATC-----GCCCGGCCCGTCCCGAgAACAG
K6S8	CGGCCAAACTGGCCGCCAACATC-----GCCCGGCCCGTCCCGGAgAACTC
K6S6	CGGCCAAACTGGCCGCCAACATC-----GCCCGGCCCGTCCCGGCAACTC
K5S18	CGGCCAAACTGGCCGCCAACATC-----GCCCGGCCCGTCCCGGAgAACAG
K5S12/14	CGGCCAAACTGGCCGCCAACATC-----GCCCGGCCCGTCCCGGCAACTC
K5S5	CGCGTCCATCGCCAACTCCATC-----TCCACCCGCCAGACC-----AA
K5TypA	CGCGTCCATCGCCAACTCCATC-----TCCGCCCCCAGACC-----AA
K5TypB	CGCGTCCATCGCCAACTCCATC-----TCCGCCCCCAGACC-----AA
MM5	CGGCCAAGATCGCCAAACATC-----TCCCGCCGCAAGACCA
MM8	CGGCCAAGATCGCCGACAGCATT-----TCGCCCCGGCGCC-----AA
MM10	CGGCCAARMTSGCCRHRCATC-----KSCCGGGCCSKCCCRAgAACAG
PIB2	CAGCGGAGATGGCCAAAGCCAACTACAAGATGGTGAAcAAGGACTCCTCCCGAGTCAAGCAC
<i>D. baculatus</i>	CGCATCCATCGCCAACTCCATC-----TCGCCCCGGTGACC-----AA
<i>D. desulfuricans</i> DSM 1924	CAGCCAAAGCTGGCCAGTCCATT-----TCGCGCGTCCGGCC-----AA
<i>D. desulfuricans</i> DSM 1926	CTGCTCAGCTTGCCAAATGAGATC-----TCGCCCCAACGTAAGACT---AC
<i>D. desulfuricans</i> Vosjan	CTGCTGCCATTGCTAAATTAATC-----TCACACGCAAGACC-----AA
<i>D. longus</i>	CTGCTCCCTGTCGAAcAGCCTG-----AACGAGAACCAGGAA---AG

<i>D.sulfodismutans</i>	CCGCCAAACTGGCCGCCAACATC-----GCCCGTCCC GCCCGGGCAACTC
<i>D.vulgaris</i> DSM 644	CTGCGAAGATCGCGTCATCCATA-----TCGCCCCGAAAGACA-----AC
<i>D.vulgaris</i> DSM 1744	CCGCTGAAATCGCCGCGCGTCCGCAAGACCGTGGTCCGAATCCGAAGATCGTCTCCTC
<i>D.vulgaris</i> Miyazaki	CCGCCAAGGTGGCCTCGTCCATC-----TCGCCCCGAAAGACC-----AC
<i>D.fructosovorans</i>	CCGCCAAACTGGCAGCCTCCATC-----GACACGGCTCGGACCGGCAACTC
<i>D.gigas</i>	CTGCCCGCTGGCCAACGATCTC-----TCCCCCGCAAACC-----AC
<i>E.coli</i>	CCTCCGAACCTGGCGCAAAGTCTC-----TCC---TCTGGCCGAAATCATC
K6S1	CGCCGAATCCTTGAAG--GCCGTCCAGGATCGCCTGAAAGCCTTCGTGGAGACCGGcCAG
K6S2	CGCCGAATCCCTCAAG--GCCGTCCAGGATCGTCTGAAAGCCTTCGTGGACACCGGcCAG
K6S4	CGCCGAATCCCTCAAG--GCCGTCCAGGACCGCCTGAAAGCCTTCGTGGACACCGGcCAG
K6S8	TGCCGAATCGTTGAAG--GCCGTGCAGGATCGCCTCAAAGCCTTCGTGAGACCGGACAG
K6S6	CGCCGAATCCTTGAAG--GCCGTGCAGGATCGCCTGAAAGCCTTCGTGGAGACCGGACAG
K5S18	CGCCGAGTCCCTCAAG--GCCGTCCAGGACCGTCTGAAAGCCTTCGTGGACACCGGcCAG
K5S12/14	CGCCGAATCCTTGAAG--GCCGTGCAGGATCGCCTGAAAGCCTTCGTGGAGACCGGACAG
K5S5	GGTCGAGGACCTCAAG--GCCGTGCAGGACAAAGTCAAAGCCTTCGTGGACTCCGGcCAG
K5TypA	GGCCGAAGACCTGAAA--GCCGTTCAAGGACAAAGTCAAAGGCCTTCGTGGATTCCGGACAG
K5TypB	GGCCGAAGACCTGAAA--GCCGTTCAAGGACAAAGTCAAAGGCCTTCGTGGATTCCGGcCAG
MM5
MM8	GGCAGACGACCTCAAG...GCCGTGCAGGACAAACTCAAAGCCTTCGTGGAGGCCG... . . .
MM10	SGCCGWTGTCSTCAAS--GASGWCHAGGACCGCCTGAWRYSWTGKGRWCCKKcCAG
PIB2	TCCCGCAGATCTGCAG--AAGGTCAAAGGACACCATCAAAGGAAATCATCGATTCCGGcCGC
<i>D.baculatus</i>	GGCCGAAGACCTCAAA--GCAGTACAGGACAAAGTCAAAGGCTTCGTGGATTCCGGcCAG
<i>D.desulfuricans</i> DSM 1924	GGCAGAAGACTTTGtC--GCCGTGCAGGcCAAACCTGAAAGCCTTATCGAAAAGCGGcCAG
<i>D.desulfuricans</i> DSM 1926	TGCTGCCAGCTCAAA--GCAGTTCAGGACAAACTGAAAGCCTTCGTTGAATCTGGTCAG
<i>D.desulfuricans</i> Vosjan	AGCTGAAGACCTCAAG--GCTGTTCAAGcCACACTTAAGAAGTTGTAGATAGCGGTTCAG
<i>D.longus</i>	CGCCGCGACCTTCGCG--GCCGTCAAGGACACCGTCAAAGCCTTCATCGAGTCCGGcCAG
<i>D.sulfodismutans</i>	CGCCGAATCCTTGAAG--GCCGTGCAGGACCGCCTGAAAGCCTTCGTGGAGACCGGACAG
<i>D.vulgaris</i> DSM 644	GGCGCCGACCTCAAG--GCCGTACAGGACAAAGCTCAAAGCCTTCGTGGCCACGGGGCAA
<i>D.vulgaris</i> DSM 1744	CGAGGCGACCTTCAG--AAGACCAAGGACACCGTCAAAGGCATCGTGGACTCCGGcCGT
<i>D.vulgaris</i> Miyazaki	GGCGGGGACCTGAAAG--GCCGTGCAGGACAAAGTCAAAGCCTTCGTGGAAAACGGGCAG
<i>D.fructosovorans</i>	GGAAAAGGCCCTCAAG--GCAGTCCAGGACAAAGCTGAAAGCCTTCGTGAGTCCGGACAG
<i>D.gigas</i>	CACGAAAAGCCTCAAG--GCCGTGCAGGcCAAAGTCAAAGCCTTCGTGGAAAAGCGGcCAG
<i>E.coli</i>	CCCTGGCTATTTc---TTCGACGTACAAAACCGCCTGAAAAAATTGTTGAAGCGGGCCAG
K6S1	CTCGGCATCTTCAACACGCCTACTTCCTG-----GGCGGACATcCGGCCTACTACCTGC
K6S2	CTCGGCATCTTCAACACGCCTACTTCCTG-----GGCGGACATcCGGCCTACTACCTGC
K6S4	CTCGGCATCTTCAACACGCCTACTTCCTG-----GGCGGACATcCGGCCTACTACCTGC
K6S8	CTtGGCATCTTCAACACGCCTACTTCCTG-----GGtGGACACAAGGCCTACTACCTGC
K6S6	CTCGGCATCTTCAACACGCCTACTTCCTG-----GGCGGACATcCGGCCTACTACCTGC
K5S18	CTCGGCATCTTCAACACGCCTACTTCCTG-----GGCGGACATcCGGCCTACTACCTGC
K5S12/14	CTCGGCATCTTCAACACGCCTACTTCCTG-----GGCGGACATcCGGCCTACTACCTGC
K5S5	CTCGGCATCTTCAACACGCCTACTTCCTC-----GGCGGCCACGACGCGTACTACCTGC
K5TypA	CTCGGCATCTTCAACACGCCTACTTCCTG-----GGCGGGCACGAGGCCTACTACCTGC
K5TypB	CTCGGCATCTTCAACACGCCTACTTCCTG-----GGCGGGCACGATGCCTACTACCTGC
MM5
MM8
MM10	ATCRGCATCTTCAACACKYCTASTTCCT.....
PIB2	CTCGGCATCTTCAACACGCCTACTTCCTGAAAGCCCGGGCACACcCCGCATACAAGCTGA
<i>D.baculatus</i>	CTCGGCATCTTCAACACGCCTACTTCCTG-----GGCGGACACAAGGcTACTACTCTG.
<i>D.desulfuricans</i> DSM 1924	CTtGATCCCTTCAACACGCCTACTTCCTG-----GGCGGCCAcCGAGTACTACTCTGG
<i>D.desulfuricans</i> DSM 1926	CTtGGCATCTTCAACACGCCTACTTCCTG-----GGCGGCCCGAT.....
<i>D.desulfuricans</i> Vosjan	CTtGGTCCATCTTCAACACGCCTACTTCCTC.....
<i>D.longus</i>	CTGGCCCCGTTCAACACGCCTACTTCCTGCGTGAAGGGGCCACGACGCTACTACCTGC

<i>D.sulfodismutans</i>	CTGGGCATCTTCACCAACGCCTACTTCCT.....
<i>D.vulgaris</i> DSM 644	CTGGCCCTTCACCAACGCCTACTTC.....
<i>D.vulgaris</i> DSM 1744	CTCGGCATCTTCACCAACGCCTATTTCCTC-----GGCGGCCACcCGGCTTACGTCC...
<i>D.vulgaris</i> Miyazaki	CTCGGCCGTTTACCAATGCCTACTTCCTG-----GGCGGCCACcCGGCTACTACCTGG
<i>D.fructosovorans</i>	CTGGGCATCTTCACCAACGCCTACTTCCTC-----GGCGGCCACAAAAGCCTACTACCTGC
<i>D.gigas</i>	CTGGGCATCTTCACCAACGCCTACTTCCTG-----GGCGGCCACcCGGCTATGTGCTGC
<i>E.coli</i>	TTGGGGATCTTCGCAATGGCTACTGG-----GGGCACcCGCAGTACAAAATGC
K6S1	CGCCCGAGGT.....
K6S2	CGCCCGAGGTGGAC.....
K6S4	CGCCCGAGGTGGAC.....
K6S8	CGCCCGA.....
K6S6	CGCCCGAGGTGCAC.....
K5S18	CGCCCGAGTGGAC.....
K5S12/14	CGCCCGAGGTGCAC.....
K5S5	CGCCCGAAGTCAAA.....
K5TypA	CGGCTGAAGTCAAA.....
K5TypB	CGCCCGAAGTCAAA.....
MM5
MM8
MM10
PIB2
<i>D.baculatus</i>
<i>D.desulfuricans</i> DSM 1924	AGCCCGAAGCCAAC.....
<i>D.desulfuricans</i> DSM 1926
<i>D.desulfuricans</i> Vosjan
<i>D.longus</i>	CCGCCGAG.....
<i>D.sulfodismutans</i>
<i>D.vulgaris</i> DSM 644
<i>D.vulgaris</i> DSM 1744
<i>D.vulgaris</i> Miyazaki	ATCCGGAAACCAACCTCATCGCcaaccGCcCACTACCTGGAAGCCCTGC
<i>D.fructosovorans</i>	CGCCCGAGGTCAACCTCATCGCcaaccGCcCACTACCTGGAAGCCCTGC
<i>D.gigas</i>	CGCCCGAAGTGGACCTCATCGCcaaccGCcCACTACCTGGAAGCCCTGC
<i>E.coli</i>	CGCCAGAAGCTAACCTGATGGGcTTTGGcCACTATCTCGAAGCTCTGC

A.4.2 Abgeleitete Aminosäuresequenzen des [NiFe] Hydrogenase-Genfragments

K6S1VCTYVHALASTRCVDNAVKV--NIPANARMMRNLVHGAQYLHDHIVHVFY
K6S2RCGVCTYVHALASTRCVDNAVKV--NIPANARMMRNLVHGAQYLHDHIVHVFY
K6S4VCTYVHALASTRCVDNAVKV--NIPVNARLHRNLVHGAQYLHDHIVHVFY
K6S8VCTYVHALASTRCVDNAVKV--NIPANARMMRNLVHASQYLHDHIVHVFY
K6S6ACGVCTYVHALASTRCVDNAVKV--NIPANARMMRNLVMAAQYLHDHIVHVFY
K5S18GGVCTYVHALASTRCVDNAVKV--NIPANARMMRNLVMAAQYLHDHIVHVFY
K5S12/14CTYVHALASTRCVDNAVKV--NIPANARMMRNLVMAAQYLHDHIVHVFY
K5S5CTYTHALASTRCVDNAVGVDKNLPDNARLIRNLVLAQAFLHDHIVHVFY
K5TypAGGVCTYTHALASTRCVDNAVGVDKNLPDNARLIRNLVLAQAFLHDHIVHVFY
K5TypBGVCAYTHALASTRCVDNAVGV--KIPNATLIRNLVLAQAFLHDHIVHVFY
MM5ACGVCTYVHALASTRCVDNAVGV--KIPNATLIRNLVLAQAFLHDHIVHVFY
MM8GVCTYVHALASTRCVDNAVGV--KVPRLGELERQLCIASQYHHDHIVHVFY
PIB2SCGVCTYVHALGSIKRCVDNITGVGDKVLPNHATIIRNLVLAQAFLHDHIVHVFY

D. baculatus VCTYTHALASTRCVDNAVGDANLDPNARLIRNLVLAQAQFLHDHIVHFY
D. desulfuricans DSM 1924 GVCTYTHALASTRALEDAIN--KPIPANATYIRNLVMAHQFMHDHVVFHY
D. desulfuricans DSM 1926 GVCTNVHALASVRCVDDAVGV--SIPENATIFRNLVLAQQFLHDHIVHFY
D. desulfuricans Vosjan V--TIPENATLIRNLVHGQCYMHDLVHFY
D. longus CTYTHALASTRCVDNAVGV--KIPKNATLIRNLVLAQAQFMHDHIVHFY
D. sulfodismutans GVCTYVHALASTRCVDNAVKV--NIPANARMRNLVMAQAQYLHDHIVHFY
D. vulgaris DSM 644 TCGVCTYTHALASTRCVDNAVGV--HIPKNATYIRNLVLAQAQYLHDHIVHFY
D. vulgaris DSM 1744 GVCTYVHALASVRSVDNAVGVDKVLPHNATIIRNLVMAQAQFMHDHIVHFY
D. vulgaris Miyazaki RDAQHFTQRTCGVCTYTHALASTRCVDNAVGV--HIPKNATYIRNLVLAQAQYLHDHIVHFY
D. fructosovorans RDAQHFTQRACGVCTYVHALASSRCVDDAVKV--SIPANARMRNLVMAQAQYLHDHIVHFY
D. gigas GVCTYVHALASVRAVDNCGV--KIPENATLMRNLTMGAQYMHDLVHFY
E. coli RDAARAFVERICGVCTGVHALASVYAIEDAIGI--KVPDNANIIRNIMLATLWCHDLVHFY

K6S1 HLHALDWDVDTNALKADPKAAKLAANI-----APARPENTAESLK-AVQDRLKAQVETGQ
K6S2 HLHALDWDVDTNALKADPKAAKLAANI-----APARPENSAESLK-AVQDRLKAQVDTGQ
K6S4 HLHALDWDVDTNALKADPKAAKLAANI-----APARPENSAESLK-AVQDRLKAQVDTGQ
K6S8 HLHALDWDVDTNALKADPKAAKLADTI-----APARPGNSAESLK-AVQDRLKAQVETGQ
K6S6 HLHALDWDVDTNALKADPKAAKLAANI-----APARPGNSAESLK-AVQDRLKAQVETGQ
K5S18 HLHALDWDVDTNALKADPKAAKLAANI-----APARPENSAESLK-AVQDRLKAQVDTGQ
K5S12/14 HLHALDWDVDTNALKADPKAAKLAANI-----APARPGNSAESLK-AVQDRLKAQVETGQ
K5S5 HLHALDWDVDTAALTADPKAAASIANSI-----STRQT--KVEDLK-AVQDKVKSLVDSGQ
K5TypA HLHALDWDVDTGALTADPKAAASIANSI-----SARQT--KAEDLK-AVQDKVKSLVDSGQ
K5TypB HLHALDWDVDTGALTADPKAAASIANSI-----SARQT--KAEDLK-AVQDKVKSLVDSGQ
MM5 HLHALDCVDVASALKADPKAAKIANNI-----SPRKT
MM8 HLHALDWDVDTSALAADPNKAAKIADSI-----SPRGA--KADDLK-AVQDKLKAQVFA . . .
PIB2 HLHALDFVNVANVLNADVNTAAEMANANYKHNKDSRVSTPADLQ-KVKDTIKGII DSGR
D. baculatus HLHALDWDVDTGALTADPKAAASIANSI-----SSRVT--KAEDLK-AVQDKVKSLVDSGQ
D. desulfuricans DSM 1924 HLHALDFVDVANALQADPKAAKLAQSI-----SPRPA--KAEDFV-AVQAKLKTPI ESGQ
D. desulfuricans DSM 1926 HLHALDWDVDSGLSADPKAAQLANEI-----SPNRKT-TAAQLK-AVQDKLKAQVESGQ
D. desulfuricans Vosjan HLCGLDWIDVAGALKADPKAAAIANSI-----SPRKT--KAEDLK-AVQATLKKPVDSSGQ
D. longus HLHALDWDVNVANVLNADPKAAASLSNSL-----NENRKE-SAADFA-AVKDTVKALI ESGQ
D. sulfodismutans HLHALDWDVDTNALKADPKAAKLAANI-----APSRPGNSAESLK-AVQDRLKAQVETGQ
D. vulgaris DSM 644 HLHALDFVDVDTNALKADPKAAKIASI-----SPRKT--TAADLK-AVQDKLKAQVAVSGQ
D. vulgaris DSM 1744 HLHALDFVDVAGLSADVKKTAIEIAAAVAKTVRPNPKIVSSEADLQ-KTKDVTVKIGIVDSGR
D. vulgaris Miyazaki HLHALDFVDVTAALKADPKAAKVAASSI-----SPRKT--TAADLK-AVQDKLKTQVETGQ
D. fructosovorans HLHALDWDVDTAALKADPNKAAKLAASI-----DTARTGNSSEKALK-AVQDKLKAQVESGQ
D. gigas HLHALDWDVNVANALNADPKAAARLANDL-----SPRKT--TTESLK-AVQAKVKALVESGQ
E. coli QLAGMDWIDVLDLALKADPRKTSBLAQLS-----S-SWPKSSPGYF-FDVQNRLLKQVVEGGQ

K6S1 LGIFTNAYFL--GGHPAYYLPPE
K6S2 LGIFTNAYFL--GGHPAYYLPPEVD
K6S4 LGIFTNAYFL--GGHPAYYLPPEVD
K6S8 LGIFTNAYFL--GGHKAYYLP
K6S6 LGIFTNAYFL--GGHAAYYLPPEVD
K5S18 LGIFTNAYFL--GGHPAYYLPPEVD
K5S12/14 LGIFTNAYFL--GGHAAYYLPPEVD
K5S5 LGIFTNAYFL--GGHDAYYLPPEVK
K5TypA LGIFTNAYFL--GGHEAYYLPPEVK
K5TypB LGIFTNAYFL--GGHDAYYLPPEVK
MM5
MM8
PIB2 LGIFNNAYFLKPGGHPAYKL
D. baculatus LGIFTNAYFL--GGHKGYL
D. desulfuricans DSM 1924 LDPFTNAYFL--GGHPSYYLEPEAN

<i>D. desulfuricans</i> DSM 1926	LGIFTNTYFL--GGPD.....
<i>D. desulfuricans</i> Vosjan	LGPFTNAYS.....
<i>D. longus</i>	LGPFTNAYFLREGGHDAYLPAE.....
<i>D. sulfodismutans</i>	LGIFTNAYF.....
<i>D. vulgaris</i> DSM 644	LGPFTNAYF.....
<i>D. vulgaris</i> DSM 1744	LGIFTNAYFL--GGHPAYV.....
<i>D. vulgaris</i> Miyazaki	LGPFTNAYFL--GGHPAYYLDPETNLIATAHYLEAL
<i>D. fructosovorans</i>	LGIFTNAYFL--GGHKAYYLPPEVNLIATAHYLEAL
<i>D. gigas</i>	LGIFTNAYFL--GGHPAYVLPPEVDLIATAHYLEAL
<i>E. coli</i>	LGIFRNGYW---GHPQYKLPPEANLMGF AHYLEAL

Danksagung

Herrn Prof. Dr. F. Widdel und Prof. Dr. B. B. Jørgensen danke ich für die freundliche Aufnahme in das Max-Planck-Institut für Marine Mikrobiologie, die Überlassung des Themas und die interessante internationale Atmosphäre im Institut.

Ganz besonderer Dank gebührt Dr. Gerard Muyzer für die Betreuung dieser Arbeit, das rege Interesse an dem Thema, die tatkräftige Unterstützung und viele anspornende und aufmunternde Worte. Große Freude bereitete mir die Teilnahme an wissenschaftlichen Tagungen und die sich daraus ergebenden Anregungen und Denkanstöße. Danke auch für die Einführung in die Computergraphik zur Visualisierung wissenschaftlicher Ergebnisse.

Mein herzlicher Dank gilt allen ehemaligen und jetzigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Molekularökologie für das angenehme, oft amüsante Arbeitsklima, die große Hilfsbereitschaft und eine gute, freundschaftliche Zusammenarbeit. Im besonderen möchte ich mich bei Dr. Andreas Teske bedanken, der das Doktorandenschicksal mit mir teilte, mich in die Geheimnisse des Sequenzierens einführte und mir DNA von PIB2 und LTK4 sowie Mattenproben vom Solar Lake zur Verfügung stellte; bei Dr. Niels B. Ramsing, dem ich die Teilnahme an den Ausfahrten zum Mariager Fjord und nach Costa Rica zu verdanken habe, für die Bearbeitung der Bilder vom Mariager Fjord und anregende Diskussionen; bei Dr. Rolf Lillebæk, der die Kultursammlung sulfatreduzierender Bakterien der Arbeitsgruppe anlegte; bei Sabine Hottenträger und Birgit Rattunde, die stets für ein gut organisiertes, aufgeräumtes Labor sorgten; und ganz besonders bei Dr. Berit Cleven für die Bestimmung von Bakterienzellzahlen, hilfreiche und konstruktive Diskussionen und das gewissenhafte Korrekturlesen des Manuskripts.

Dr. Sabine Lechner (damals Max-Planck-Institut für Terrestrische Mikrobiologie, Marburg), Dr. Armin Ehrenreich und Kirsten Habicht danke ich für diverse Bakterienkulturen. Dr. Claude E. Hatchikian (CNRS Marseille, Frankreich) danke ich für die Bereitstellung der [NiFe] Hydrogenase-Antikörper. Dr. Mike Jetten (TU Delft, Holland) gilt mein Dank für das Probenmaterial aus den anaeroben Bioreaktoren. Dr. Rolf Nymzik danke ich für die Durchführung der Sequenzierungen an der Universität Bremen. Dr. Hermann Rüggeberg und Dr. Georg Meyer (Hanse Analytik GmbH) danke ich für etliche Tassen Kaffee in der Hanse und eine fruchtbare Zusammenarbeit, die zur erneuten Einführung der Agarosegelelektrophorese mit basensequenzspezifischen DNA-Liganden in die Molekularbiologie führte. Sabine Rölleke (Universität Wien, Österreich) danke ich für ihre langjährige Freundschaft und das "Händchenhalten" bei meinen Vorträgen.

Allen Mitgliedern des Instituts, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich meinen Dank aussprechen. Den Teilnehmern der Ausfahrten zum Mariager Fjord und nach Costa Rica danke ich für eine nette Atmosphäre an Bord und die Unterstützung bei der Auswertung der Ergebnisse. Dr. Petra Ehrenreich und Dr. Ralf Rabus danke ich für die technischen Tips bei der Kultivierung anaerober Sulfatreduzierer und Kristina Straub für das Picken der Bakterienkolonien aus Agarverdünnungsreihen, das doch mehr Geschick und Erfahrung voraussetzte, als ich zunächst dachte.

Den Mitgliedern des Betriebsrates danke ich für eine interessante Zusammenarbeit, die mir Einblicke in Probleme ganz anderer Art gewährte, als ich bis dahin kannte. Bei Christine Pranz bedanke ich mich für die prompte Lösung aller "Computerprobleme" und die Beratung beim Kauf eines eigenen Macintosh-Rechners.

Meinen Eltern, meinen Schwestern und meinem Großvater danke ich dafür, daß sie mich immer unterstützt haben. Vielen Dank auch an meinen Freund Jens, der stets ein offenes Ohr und Verständnis für Probleme mit der PCR, den Sequenzen, den Bakterien etc. hatte und mir viel Toleranz entgegenbrachte, als ich außer dieser Arbeit nichts anderes im Sinn hatte.

Zuletzt möchte ich mich bei den Lesern dieser Arbeit bedanken, in der Hoffnung, daß die Mühe des Schreibens nicht vergeblich war.

Abstracts und Publikationen

Wawer, C. und G. Muyzer. 1994. Detection of *Desulfovibrio* spp. by enzymatic amplification of the [NiFe] hydrogenase gene. Frühjahrstagung der VAAM, Hannover; International conference on the molecular biology of hydrogenases, Noordwijkerhout, Holland; International workshop on new approaches in microbial ecology, Helsingør, Dänemark.

Muyzer, G., C. Wawer und A. Teske. 1994. Determination of the complexity of microbial populations by DGGE and TGGE. ANALYTICA Conference, München.

Wawer, C. und G. Muyzer. 1995. Molecular detection of active *Desulfovibrio* spp. in environmental samples using the [NiFe] hydrogenase gene. Frühjahrstagung der VAAM, Stuttgart.

Wawer, C., M. Jetten und G. Muyzer. 1995. Genetic diversity and gene expression of *Desulfovibrio* species in natural populations. Workshop on application of DGGE and TGGE in microbial ecology, Braunschweig.

Teske, A., C. Wawer, G. Muyzer und N. B. Ramsing. 1995. Distribution of sulfate-reducing bacteria in a permanently stratified water column as evaluated by microbiological and molecular methods in parallel. International Symposium: Exploration of microbial diversity, Goslar.

Wawer, C. und G. Muyzer. 1995. Genetic diversity of *Desulfovibrio* spp. in environmental samples analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis of [NiFe] hydrogenase gene fragments. Appl. Environ. Microbiol. 61: 2203-2210.

Wawer, C., H. Rüggeberg, G. Meyer und G. Muyzer. 1995. A simple and rapid electrophoresis method to detect sequence variation in PCR-amplified DNA fragments. Nucleic Acids Res. 23: 4928-4929.

Muyzer, G., S. Hottenträger, A. Teske und C. Wawer. 1996. Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA - A new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities. In: A. D. L. Akkermans, J. D. van Elsas und F. J. de Bruijn (eds.). Molecular microbial ecology manual. 2. Auflage. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 3.4.4.1-3.4.4.23.

Teske, A., C. Wawer, G. Muyzer und N. B. Ramsing. 1996. Distribution of sulfate-reducing bacteria in a stratified fjord (Mariager Fjord, Denmark) as evaluated by most-probable-number counts and denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified ribosomal DNA fragments. Appl. Environ. Microbiol. 62: 1405-1415.

Rölleke, S., G. Muyzer, C. Wawer, G. Wanner und W. Lubitz. 1996. Identification of bacteria in a biodegraded wall painting by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 62: 2059-2065.

Kuever, J., C. Wawer und R. Lillebæk. 1996. Microbiological observations in the anoxic basin Golfo Dulce, Costa Rica. Rev. Biol. Trop. (im Druck)

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt habe, keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Bremen, im August 1996

