

Entwicklung eines Datenbank-gestützten Computerprogramms zur  
taxonomischen Identifizierung von mikrobiellen Populationen auf  
molekularbiologischer Basis

*Anwendung dieses Programms auf die Charakterisierung  
der Diversität stickstofffixierender und denitrifizierender  
Mikroorganismen in Abhängigkeit einer Stickstoffdüngung*

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von  
Christopher Rösch  
aus München

Hundt Druck  
Köln, 2005

Berichtersteller: Prof. Dr. H. Bothe

Prof. Dr. D. Schomburg

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Juli 2005

*Meinen Eltern*

The present work aimed at developing a novel method which allows to characterize microbial communities from environmental samples in a comprehensive and rapid way. Approaches tried so far either supplied information about the identity of a small fraction of organisms within the total community (e. g. by sequencing of clone libraries), or demonstrated the diversity of organisms without identifying them (e. g. community profiling). In the approach presented here, a method for determining such profiles (by tRFLP analysis) was combined with an automatic analysis by a computer program (TReFID) newly developed for the current study. For the characterization of microorganisms, three different data bases have been constructed:

- (1) for denitrifying bacteria: a *nosZ* data base with 607 entries
- (2) for dinitrogen fixing bacteria: a *nifH* data base with 1,318 entries
- (3) for bacteria in general: a 16S rDNA data base with 22,145 entries

Thus a comprehensive data set has been developed particularly for the 16S rRNA gene. The use of the TReFID program now allows investigators to characterize bacterial communities from any environmental sample in a rather comprehensive way. Several control analyses showed that the TReFID program is suited for the analysis of environmental samples. TReFID was also used to assess the effect of nitrogen fertilizations on the composition of the microbial community in a N-limited forest soil in the vicinity of Cologne (Dünnwald). One plot was fertilized several times with ammonium nitrate, whereas the other plot was left undisturbed as a control. Soil samples were taken at different time intervals and analyzed for the bacterial composition with respect to total bacteria (16S rRNA gene), denitrifying and N<sub>2</sub>-fixing bacteria (*nifH* and *nosZ*, respectively).

The following results emerged from this study

- a) the diversity of N<sub>2</sub>-fixing bacteria (assessed by the *nifH* gene) was about the same in both plots at the beginning of the study, but – surprisingly – decreased in the control plot while the fertilized plot remained unaffected.
- b) The total bacterial community (16S rRNA gene) was more diverse in the fertilized plot than in control prior to the start of the fertilization. Fertilization decreased diversity.
- c) The data set for denitrification (*nosZ*) was too small to draw definitive conclusions due to the limited number of entries for this gene in TReFID.

Despite the fact that the present study is seemingly the first attempt to comprehensively characterize the bacterial community in a forest soil, the obtained data set is not yet sufficient for general conclusions, since the data obtained cannot be referred to results by others due to the lack of comparable studies in the literature. In the meantime, the TReFID program has successfully been applied to characterize the microbial community along a salt gradient at an inland salt habitat (S. Eilmus, diploma thesis, 2005).

---

Im Vordergrund dieser Arbeit stand die Entwicklung einer neuartigen Methode, um mikrobielle Gemeinschaften aus Umweltproben schnell und umfassend charakterisieren zu können. Die bisherigen methodischen Ansätze lieferten entweder Informationen über die Identität der Organismen in einer kleinen Stichprobe (z. B. Sequenzieren von Klonbibliotheken), oder sie demonstrieren die Diversität, ohne dass die Organismen identifiziert werden können (z. B. Erstellen von Profilen). In dem hier vorgestellten Ansatz wurde eine Methode zur Erstellung solcher Profile (tRFLP) mit einer automatisierten Auswertung über das hierfür entwickelte Computerprogramm (TReFID) verbunden. In der Auswertung werden die experimentell erhaltenen Profile mit eigens erstellten Datenbanken abgeglichen, um Organismenlisten von untersuchten Proben zu erstellen. Es wurden drei Datenbanken erstellt:

- (1) zur Charakterisierung denitrifizierender Mikroorganismen: *nosZ*-Datenbank (607 Einträge)
- (2) zur Charakterisierung stickstofffixierender Mikroorganismen: *nifH*-Datenbank (1318 Einträge)
- (3) zur Charakterisierung der bakteriellen Gemeinschaft: 16S rDNA-Datenbank (22145 Einträge)

Speziell für das 16S rRNA-Gen wurde somit einumfangreicher Datensatz erarbeitet. Damit ist es jetzt unter Verwendung der TReFID-Programms möglich geworden, mikrobielle Lebensgemeinschaften von beliebigen Standorten umfassend zu charakterisieren. Eine Evaluierung der TReFID-Methode anhand verschiedener Kontrollen zeigte, dass die Methode zur Analyse von (Umwelt-)Gemeinschaften geeignet ist. Die TReFID-Methode wurde exemplarisch auf einen Waldboden angewandt, um dort den Effekt von Stickstoffdüngung auf die mikrobielle Gemeinschaft zu untersuchen. Hierfür wurden zwei Versuchsfelder im Dünnwald (Köln) ausgewählt, dessen Boden Stickstoff-limitiert war. Eine der beiden Versuchsfelder wurde mehrfach gedüngt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde Bodenproben entnommen und analysiert. Mit der TReFID-Methode wurde der Effekt der Düngung auf die bakterielle Gesamtgemeinschaft und auf die Teilgemeinschaften stickstofffixierender und denitrifizierender Mikroorganismen untersucht.

Die Anwendung auf den Dünnwaldboden ergab unerwartete Befunde:

Die *nifH*-Diversität war in beiden Versuchsfeldern anfangs gleich; doch nach der Düngung war die Diversität in der Kontrollfläche herabgesetzt und in der gedüngten Fläche unverändert. Im Falle der 16S rDNA wies die später gedüngte Fläche anfangs eine wesentlich höhere Diversität auf, aber infolge der Düngung sank diese auf das Niveau der Kontrollfläche. Zur Charakterisierung der Diversität von Denitrifikanten war die TReFID-Methode nur eingeschränkt geeignet, da zu wenige Sequenzen dieses Gens bekannt sind und die Datengrundlage für TReFID entsprechend klein war.

Da jedoch bisher keine vergleichbaren Untersuchungen durchgeführt wurden, ist eine objektive Bewertung dieser Befunde nicht möglich. Die vorliegende Arbeit ist ein erster Versuch, aus der Kombination von tRFLP-Profilen mit Datenbanken die Gemeinschaft denitrifizierender oder N<sub>2</sub>-fixierender Mikroorganismen eines Umweltstandortes zu beschreiben. Das TReFID-Verfahren wurde inzwischen mit Erfolg zur Charakterisierung der mikrobiellen Gemeinschaft im Salzgradienten einer Binnensalzstelle angewandt (Diplomarbeit S. Eilmus, 2005).

---

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	<b>Diversität und Ökologische Bedeutung von Bakterien</b> .....	<b>1</b>
1.1.1	Diversität von Bodenbakterien .....	1
1.1.2	Systematik und Artbegriff bei Bakterien.....	2
1.1.3	„Unkultivierbarkeit“ bei Umweltbakterien .....	2
1.2	<b>Der Stickstoffkreislauf und daran beteiligte Prokaryoten</b> .....	<b>3</b>
1.2.1	Stickstofffixierung.....	4
1.2.2	Nitrifikation.....	6
1.2.3	Denitrifikation.....	6
1.3	<b>Anlass und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit</b> .....	<b>7</b>
1.4	<b>Zusammenfassung des experimentellen Ansatzes</b> .....	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>10</b>
2.1	<b>Laborkulturen von Bakterien für Kontrollversuche</b> .....	<b>10</b>
2.1.1	Verwendete Bakterienstämme und ihre Herkunft .....	10
2.1.2	Kultivierungsbedingungen für Laborstämme von Bakterien.....	11
2.1.3	Anlegen von Dauerkulturen zur Aufbewahrung von Bakterienstämmen .....	12
2.2	<b>Standort für die Untersuchung der Bakteriengemeinschaft</b> .....	<b>12</b>
2.2.1	Der Standort Dünnwald und Beschreibung der Versuchsflächen.....	12
2.2.2	Entnahme, Aufarbeitung und Lagerung der Bodenproben .....	15
2.3	<b>Bodenanalysen von Dünnwaldproben</b> .....	<b>16</b>
2.3.1	Messung der Bodenazidität .....	16
2.3.2	Bestimmung des Wassergehalts von Bodenproben aus dem Dünnwald.....	16
2.3.3	Bestimmung der Bodenart durch Ermittlung der Kornfraktionen .....	16
2.3.4	Elementaranalysen von Bodenproben .....	16
2.4	<b>Extraktion von Boden-DNA als Ausgangsmaterial für molekularbiologische Versuche</b> .....	<b>17</b>
2.5	<b>Polymerase-Kettenreaktion zur Vervielfältigung von DNA</b> .....	<b>17</b>
2.6	<b>Agarosegel-Elektrophorese von DNA-Fragmenten</b> .....	<b>19</b>
2.7	<b>Aufreinigung von DNA-Proben für Klonierungen und zum Einsatz in PCR-Reaktionen</b> .....	<b>19</b>
2.7.1	Ausfällung von DNA aus wässriger Lösung .....	19
2.7.2	Elution von DNA aus Agarosegelen .....	19
2.8	<b>Klonbibliotheken als Grundlage zur Erfassung der Diversität von Bodenbakterien</b> .....	<b>20</b>
2.8.1	Erzeugung Transformations-kompetenter Zellen .....	20
2.8.2	Ligation aufgereinigter PCR-Produkte in Klonierungsvektoren .....	21
2.8.3	Transformierung kompetenter Bakterien.....	21
2.8.4	Blau-Weiß-Selektion von transformierten Bakterien .....	21
2.8.5	Plasmid-Minipräparation.....	22
2.8.6	Kontrolle der Insertgröße .....	22
2.9	<b>Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP)</b> .....	<b>23</b>
2.10	<b>DNA-Sequenzierung nach dem Kettenabbruchverfahren</b> .....	<b>23</b>
2.10.1	Sequenzier-PCR.....	23
2.10.2	Manuelle Korrektur automatisch erstellter Sequenzen .....	23
2.10.3	Test auf chimäre Sequenzen .....	24
2.11	<b>Zusammenfassung nahezu identischer Sequenzen zu Operational Taxonomic Units (OTUs)</b> .	<b>24</b>
2.12	<b>Verwandtschaftsanalysen von Sequenz- oder tRFLP-Daten aus dem Dünnwaldboden</b> .....	<b>25</b>
2.12.1	Taxonomische Einordnung von Dünnwald-Sequenzen .....	25
2.12.2	Phylogenetische Auswertung von DNA-Sequenzen .....	26
2.12.3	Cluster-Analyse .....	26

---

<b>2.13</b>	<b>Methoden zur Beschreibung von Diversität .....</b>	<b>27</b>
2.13.1	Diversitätsindex nach SHANNON .....	27
2.13.2	Rarefaction-Analyse von Klonbibliotheken .....	27
<b>2.14</b>	<b>Terminaler Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus .....</b>	<b>28</b>
2.14.1	PCR mit Fluorochrom-markierten Primern .....	28
2.14.2	Aufreinigung Fluorochrom-markierter PCR-Produkte .....	28
2.14.3	Restriktionsendonukleasen für tRFLP-Experimente .....	29
2.14.4	Restriktionsverdau der Fluorochrom-markierten Fragmente .....	29
2.14.5	Fragment-Analyse zur Erstellung von tRFLP-Profilen .....	29
2.14.6	Kontrollversuche für die tRFLP .....	30
<b>2.15</b>	<b>TReFID-Programm zur Auswertung von tRFLP-Daten .....</b>	<b>30</b>
2.15.1	Prinzip der TReFID-Auswertung .....	30
2.15.2	Programmierung des TReFID-Computerprogramms .....	33
2.15.3	Erstellung der Datenbanken für die TReFID-Auswertung .....	34
2.15.4	Eingabedaten für die TReFID-Analyse und Erstellung der Projektdateien .....	35
2.15.5	TReFID-Homepage .....	35
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>36</b>
<b>3.1</b>	<b>Ergebnisse der Bodenanalysen von Dünnwaldproben .....</b>	<b>36</b>
3.1.1	Azidität des Dünnwaldbodens .....	36
3.1.2	Wassergehalt der Bodenproben aus dem Dünnwald .....	36
3.1.3	Kornfraktionen des Dünnwaldbodens .....	38
3.1.4	Elementaranalysen: CNSH-Analyse .....	39
3.1.5	Ergebnisse der Elementaranalysen für die lösliche Fraktion .....	39
<b>3.2</b>	<b>Ergebnisse der Auswertung von Klonbibliotheken für den Dünnwaldboden .....</b>	<b>42</b>
3.2.1	Ergebnisse zur Diversität von Denitrifikanten im Dünnwaldboden .....	43
3.2.1.1	Rarefaction-Analyse der <i>nosZ</i> -Klonbibliotheken für den Dünnwaldboden .....	45
3.2.1.2	Cluster-Analyse der <i>nosZ</i> -Klonbibliotheken für den Dünnwaldboden .....	45
3.2.1.3	Phylogenetische Auswertung partieller <i>nosZ</i> -Sequenzen aus dem Dünnwaldboden .....	45
3.2.2	Ergebnisse zur Diversität von stickstofffixierenden Mikroorganismen im Dünnwaldboden .....	48
3.2.2.1	Rarefaction-Analyse der <i>nifH</i> -Klonbibliotheken für den Dünnwaldboden .....	48
3.2.2.2	Cluster-Analyse der <i>nifH</i> -Klonbibliotheken für den Dünnwaldboden .....	50
3.2.2.3	Phylogenetische Auswertung partieller <i>nifH</i> -Sequenzen aus dem Dünnwaldboden .....	50
3.2.3	Ergebnisse zur bakteriellen Gesamtdiversität im Dünnwaldboden .....	52
3.2.3.1	Rarefaction-Analyse der 16S rDNA-Klonbibliotheken .....	53
3.2.3.2	Cluster-Analyse der 16S rDNA-Klonbibliotheken für den Dünnwaldboden .....	54
3.2.3.3	Vergleich der mit den drei 16S rDNA-Primerpaaren erzielten Ergebnisse .....	55
3.2.3.4	Phylogenetische Auswertung partieller 16S rDNA-Sequenzen aus dem Dünnwaldboden .....	56
3.2.3.5	Selektive Erfassung von „Azospirillen“ und „Rhizobien“ .....	63
<b>3.3</b>	<b>Ergebnisse zum TReFID-Verfahren .....</b>	<b>65</b>
3.3.1	TReFID-Datenbanken zur Auswertung von tRF-Daten aus dem Dünnwaldboden .....	65
3.3.1.1	TReFID-Datenbank zur Untersuchung der Gemeinschaft diazotropher Mikroorganismen .....	66
3.3.1.2	TReFID-Datenbank zur Untersuchung der Gemeinschaft denitrifizierender Mikroorganismen .....	67
3.3.1.3	TReFID-Datenbank zur Untersuchung der bakteriellen Gesamtgemeinschaft .....	71
3.3.2	Kontrollversuche zur TReFID-Analyse von tRF-Daten .....	73
3.3.2.1	TReFID-Kontrolle A (Ergebnisanteile von GenBank- und Dünnwald-Sequenzen) .....	73
3.3.2.2	TReFID-Kontrolle B (synthetische tRFLP-Profile) .....	73
3.3.2.3	TReFID-Kontrolle C (TReFID-Auswertung einer artifiziellen tRFLP) .....	76
3.3.2.4	TReFID-Kontrolle D (verschiedene Kombinationen von tRF-Daten und Datenbanken) .....	76
3.3.3	Ergebnisse der tRFLP-Experimente für den Dünnwaldboden .....	79
3.3.3.1	Auswertung der tRFLP-Experimente zu <i>nifH</i> im Dünnwaldboden .....	79
3.3.3.2	TReFID-Auswertung der tRFLP-Experimente zu <i>nosZ</i> im Dünnwaldboden .....	83
3.3.3.3	Auswertung der tRFLP-Experimente zum 16S rRNA-Gen im Dünnwaldboden .....	86
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>94</b>
<b>4.1</b>	<b>Bodenanalysen und Effekt der Stickstoffdüngung .....</b>	<b>94</b>
4.1.1	Azidität des Dünnwaldbodens (pH-Wert) .....	94
4.1.2	Wassergehalt der Bodenproben aus dem Dünnwald .....	94

4.1.3	Korngrößenfraktionen für den Dünnwaldboden.....	95
4.1.4	Elementaranalysen: CNHS-Analyse und C/N-Verhältnis im Dünnwaldboden.....	95
4.1.5	Elementaranalysen: lösliche Fraktion in den Dünnwald-Bodensuspensionen.....	96
<b>4.2</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse zu den Klonbibliotheken.....</b>	<b>98</b>
4.2.1	Erstellung von Klonbibliotheken zur Untersuchung der Diversität von Mikroorganismen im Dünnwaldb... ..	98
4.2.2	Allgemeine Diskussion der Auswertung von partiellen Gensequenzen aus dem Dünnwaldboden.....	100
4.2.3	Zusammenfassung von Sequenzen zu OTUs.....	101
4.2.4	Rarefaction-Analysen für die Dünnwald-Klonbibliotheken von <i>nosZ</i> , <i>nifH</i> und der 16S rDNA.....	102
4.2.5	Vergleichende Diskussion der Cluster-Analysen zu den drei Genen ( <i>nosZ</i> , <i>nifH</i> und 16S rDNA).....	102
4.2.6	Allgemeine Diskussion des TReFID-Verfahrens und der TReFID-Ergebnisse.....	103
4.2.6.1	Bewertung des TReFID-Verfahrens aufgrund von Kontrollversuchen.....	105
4.2.6.2	Beurteilung der TReFID-Datenbanken.....	108
4.2.6.3	Allgemeine Diskussion der TReFID-Ergebnisse zum Dünnwaldboden.....	111
4.2.7	Denitrifizierende Mikroorganismen im Dünnwaldboden.....	113
4.2.7.1	Zusammensetzung der Denitrifikanten-Gemeinschaft im Dünnwaldboden.....	114
4.2.7.2	Vergleich der Denitrifikanten-Gemeinschaften aus dem Dünnwaldboden und anderen Standorten..	117
4.2.7.3	Effekt der Stickstoffdüngung auf die Denitrifikanten-Gemeinschaft im Dünnwaldboden.....	119
4.2.8	Stickstofffixierende Mikroorganismen im Dünnwaldboden.....	120
4.2.8.1	Zusammensetzung der Gemeinschaft stickstofffixierender Mikroorganismen im Dünnwaldboden..	121
4.2.8.2	Effekt der Stickstoff-Düngung auf die Gemeinschaft stickstofffixierender Mikroorganismen.....	128
4.2.9	Bakterielle Gesamtdiversität im Dünnwaldboden.....	130
4.2.9.1	Diskussion der verwendeten PCR-Primer zur partiellen Amplifizierung des 16S rRNA-Gens.....	130
4.2.9.2	Zusammensetzung der bakteriellen Gesamtdiversität im Dünnwaldboden.....	132
4.2.9.3	Effekt der Stickstoffdüngung auf die Zusammensetzung der bakteriellen Gesamtgemeinschaft.....	138
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>141</b>
<b>6</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>142</b>
	<b>Anhang.....</b>	<b>I bis XXIV</b>

---

---

Bild 1:	Übersicht des biologischen Stickstoffkreislaufs .....	4
Bild 2:	Geographische Lage der Versuchsfläche.....	13
Bild 3:	Versuchsflächen im Dünwald.....	13
Bild 4:	Raster der Entnahme von Bodenproben aus den Dünwald-Versuchsflächen.....	15
Bild 5:	Schema des bei der TReFID-Auswertung angewandten Algorithmus .....	31
Bild 6:	Veranschaulichung von TReFID-Datensätzen in einem „Spinnennetz-Graphen“ .....	33
Bild 7:	pH-Wert der Bodenproben aus dem Dünwald.....	37
Bild 8:	Wassergehalt der Bodenproben aus dem Dünwald.....	37
Bild 9:	Korngrößenverteilung in den Dünwaldbodenproben.....	38
Bild 10:	Ergebnisse der Elementaranalysen (CNSH) von Dünwaldbodenproben .....	40
Bild 11:	C/N-Verhältnis im Dünwaldboden .....	40
Bild 12:	Elementaranalysen der löslichen Fraktion aus den Dünwaldbodenproben.....	41
Bild 13:	Verteilung der 363 <i>nosZ</i> -Sequenzen aus dem Dünwaldboden auf die 49 OTUs .....	44
Bild 14:	Rarefaction-Analyse von <i>nosZ</i> -Klonbibliotheken für den Dünwaldboden .....	44
Bild 15:	Cluster-Analyse von zehn <i>nosZ</i> -Klonbibliotheken aus dem Dünwaldboden.....	45
Bild 16:	Phylogramm zur Einordnung der 49 <i>nosZ</i> -OTUs aus dem Dünwaldboden.....	47
Bild 17:	Verteilung der 500 <i>nifH</i> -Sequenzen aus dem Dünwaldboden auf die 47 OTUs.....	49
Bild 18:	Rarefaction-Analyse von <i>nifH</i> -Klonbibliotheken für den Dünwaldboden.....	49
Bild 19:	Cluster-Analyse von zehn <i>nifH</i> -Klonbibliotheken aus dem Dünwaldboden.....	50
Bild 20:	Phylogramm zur Einordnung der 47 <i>nifH</i> -OTUs aus dem Dünwaldboden.....	51
Bild 21:	Verteilung der 16S rDNA-Sequenzen aus dem Dünwaldboden auf die OTUs.....	53
Bild 22:	Rarefaction-Analyse der 16S rDNA-Klonbibliothek aus dem Dünwaldboden.....	54
Bild 23:	Cluster-Analyse von acht 16S rDNA-Klonbibliotheken aus dem Dünwaldboden .....	55
Bild 24:	Verteilung der 16S rDNA-OTUs auf die verwendeten PCR-Primer .....	55
Bild 25:	Phylogramm zur Einordnung der 16S rDNA-OTUs aus dem Dünwald .....	56
Bild 26:	Verteilung der 211 16S rDNA-OTUs aus dem Dünwald auf bakterielle Klassen .....	64
Bild 27:	Graphische Repräsentation der <i>nifH</i> -TReFID-Datenbank für zwei Enzyme .....	68
Bild 28:	TReFID-Kontrolle A (Ergebnisanteile von GenBank- und Dünwaldsequenzen) .....	74
Bild 29:	TReFID-Kontrolle B (synthetische tRFLP-Profile).....	75
Bild 30:	TReFID-Kontrolle C (TReFID-Auswertung einer artifiziellen tRFLP).....	77
Bild 31:	Cluster-Analyse von <i>nifH</i> -tRF-Daten aus 25 tRFLP-Experimenten .....	80
Bild 32:	Ergebnisse der TReFID-Auswertung von <i>nifH</i> -tRFLPs mit DNA des Dünwaldbodens von drei verschiedenen Zeitpunkten .....	82
Bild 33:	Graphische Auswertung der TReFID-Ergebnisse zu <i>nosZ</i> im Dünwaldboden .....	85
Bild 34:	Cluster-Analyse von 16S rDNA-tRF-Daten aus 14 tRFLP-Experimenten .....	87
Bild 35:	Taxonomische Gruppen aus der TReFID-Auswertung von 16S rDNA-tRFLPs mit DNA des Dünwaldbodens – Vergleich der Zeitpunkte DUN1 und DUN7.....	91
Bild 36:	Verteilung der tRF-Muster von Dünwald-Sequenzen auf die Proben zu DUN1 und DUN7 im Vergleich zur Verteilung der tRF-Muster anderer Sequenzen.....	93
Bild 37:	Phylogramm von 16S rDNA-Sequenzen – Gruppe I: Alphaproteobacteria, Pt. A .....	4
Bild 41:	Phylogramm von 16S rDNA-Sequenzen – Gruppe IV: Actinobacteria/Firmicutes.....	8
Bild 37:	Phylogramm von 16S rDNA-Sequenzen – Gruppe I: Alphaproteobacteria, Pt. A .....	IV
Bild 38:	Phylogramm von 16S rDNA-Sequenzen – Gruppe I: Alphaproteobacteria, Pt. B.....	V
Bild 39:	Phylogramm von 16S rDNA-Sequenzen – Gruppe II: Beta- u. Gammaproteobacteria.....	VI
Bild 40:	Phylogramm von 16S rDNA-Sequenzen – Gruppe III: Acidobacteria .....	VII
Bild 41:	Phylogramm von 16S rDNA-Sequenzen – Gruppe IV: Actinobacteria/Firmicutes.....	VIII
Bild 42:	Phylogramm von 16S rDNA-Sequenzen – Gruppe V: diverse Kleingruppen .....	IX
Bild 43:	Phylogramm von 16S rDNA-Sequenzen aus dem Dünwaldboden, die mit Azospirillen- bzw. Rhizobien-selektiven Primern erhalten wurden .....	X

---

## Tabellenverzeichnis

---

Tabelle 1:	Übersicht der verwendeten Bakterienstämme .....	10
Tabelle 2:	Dünnwald: Kontrollfläche und gedüngte Fläche im Vergleich .....	14
Tabelle 3:	Übersicht der verwendeten PCR-Primer .....	18
Tabelle 4:	Übersicht zu Umfang und Diversität der Dünnwald-Klonbibliotheken .....	42
Tabelle 5:	Übersicht der <i>nosZ</i> -Klonbibliotheken aus dem Dünnwaldboden .....	43
Tabelle 6:	Übersicht der <i>nifH</i> -Klonbibliotheken aus dem Dünnwaldboden.....	48
Tabelle 7:	Übersicht der 16S rDNA-Klonbibliotheken aus dem Dünnwaldboden.....	52
Tabelle 8:	Einträge in den TReFID-Datenbanken für <i>nosZ</i> , <i>nifH</i> und die 16S rDNA.....	65
Tabelle 9:	Übersicht der Gesamtanzahl von tRFs für die TReFID-Auswertung.....	66
Tabelle 10:	Übersicht der TReFID-Datenbank für <i>nifH</i> (GenBank-Sequenzen).....	69
Tabelle 11:	Übersicht der TReFID-Datenbanken für <i>nosZ</i> und die 16S rDNA (GenBank-Seq.).....	70
Tabelle 12:	Taxonomische Gruppen in der TReFID-Datenbank für das 16S rRNA-Gen.....	72
Tabelle 13:	Vergleich von rekonstruierten und realen tRFLP-Profilen.....	75
Tabelle 14:	Übersicht der tRFs der drei Kontrollstämme und der Artefakte (Kontrolle C) .....	78
Tabelle 15:	TReFID-Ergebnisse für alle Kombinationen von tRF-Daten und Datenbanken .....	78
Tabelle 16:	Anzahl von <i>nifH</i> tRFLP-Experimenten mit DNA aus dem Dünnwaldboden.....	80
Tabelle 17:	Anzahl der <i>nifH</i> -tRFs pro Restriktionsenzym für die TReFID-Auswertung.....	80
Tabelle 18:	Kennzahlen der TReFID-Ergebnisse zu den Dünnwaldproben ( <i>nifH</i> ) .....	81
Tabelle 19:	Statistische Kennzahlen der TReFID-Ergebnisse zu den Dünnwaldproben ( <i>nosZ</i> ) .....	84
Tabelle 20:	Anzahl von tRFLP-Experimenten zum 16S rRNA-Gen im Dünnwaldboden .....	87
Tabelle 21:	Anzahl der 16S rDNA-tRFs pro Restriktionsenzym für die TReFID-Auswertung.....	87
Tabelle 22:	Kenngrößen für die TReFID-Ergebnisse zu den Dünnwaldproben (16S rDNA).....	87
Tabelle 23:	Taxonomische Einordnung der tRF-Muster aus den TReFID-Auswertungen (16S rDNA) und deren Verteilung auf die verschiedenen Flächen.....	89
Tabelle 24:	Anzahl von Dünnwald-OTUs bei unterschiedlicher OTU-Definition.....	102
Tabelle 25:	Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft im Dünnwaldboden im Vergleich mit anderen Böden (Literaturdaten) .....	136
Tabelle 26:	Übersicht der <i>nosZ</i> -OTUs aus dem Dünnwaldboden .....	II
Tabelle 27:	Übersicht der <i>nifH</i> -OTUs aus dem Dünnwaldboden.....	III
Tabelle 28:	Übersicht der 16S rDNA-OTUs aus dem Dünnwaldboden.....	XI
Tabelle 29:	Übersicht der Klassifizierung von Dünnwald-OTUs mit dem RDP II Classifier.....	XXIV

---

Amp	Ampicillin
bp	Basenpaar(e)
DUN	Dünnwald, in dieser Arbeit untersuchter Standort bei Köln
DUNn	~ bezogen auf den n-ten Zeitpunkt der Probennahme (n = 1 bis 7)
DUN-n	~ bezogen auf die ungedüngte Kontrollfläche zum n-ten Zeitpunkt der Probennahme
DUN+n	~ bezogen auf die gedüngte Fläche zum n-ten Zeitpunkt der Probennahme
EDTA	Ethylendiamin-tetra-Essigsäure (-Acetat)
$E_S$	SHANNON-Ebenmäßigkeitsexponent ( <i>evenness</i> )
h	Stunde(n)
$H_S$	SHANNON-Diversitätsindex oder -Entropie
Indel	Insertion/Deletion
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
kbp	Kilobasenpaar (1000 bp)
min	Minute(n)
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
nt	Nukleotid(e)
pH	Säurestärke ( <i>potentia hydrogenii</i> )
OTU	<i>operational taxonomic unit</i> (zusammengefasste Sequenzen mit $\geq 98$ % Homologie)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
rfu	relative Stärke eines Fluoreszenzsignales ( <i>relative fluorescence units</i> )
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>revolutions per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
TReFID	<i>terminal restriction fragment identifying program</i>
tRFLP	terminaler Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
tRF	terminales Restriktionsfragment
Tris·HCl	Tris (hydroxymethyl) aminomethan-hydrochlorid
U	Unit (Einheit für Enzymaktivität; exakte Definition variabel)
w/v	Volumenprozent ( <i>weight per volume</i> )
w/w	Massenprozent ( <i>weight per weight</i> )
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactosid

---



# 1 Einleitung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Diversität der Mikroorganismengemeinschaft in einem Waldboden des Kölner Stadtgebietes mit molekularbiologischen Methoden untersucht. Neben der bakteriellen Gesamtgemeinschaft wurden die Untergruppen der stickstofffixierenden und denitrifizierenden Mikroorganismen untersucht, da diese ökologische Schlüsselrollen einnehmen. Durch den Vergleich einer gedüngten mit einer naturbelassenen Fläche wurde der Einfluß von Stickstoffeintrag auf die Gemeinschaften im Verlauf eines Jahres bewertet.

## 1.1 Diversität und ökologische Bedeutung von Bakterien

Mikroorganismen sind ein essentieller Bestandteil aller Ökosysteme und finden doch bei Biomasseabschätzungen oder Nährstoffbilanzen meist nur wenig Beachtung (Staley 2002). Bakterien und Archaeen sollen etwa die Hälfte der globalen Biomasse stellen (Whitman *et al.* 1998). Sie enthalten nahezu ebenso viel Kohlenstoff wie alle terrestrischen Pflanzen zusammen – und um ein Vielfaches mehr an Stickstoff und Phosphor (Buckley und Schmidt 2002). Schon dies verdeutlicht die zentrale Stellung von Prokaryoten in der Biosphäre. Hinzu kommt, dass das Recycling essentieller Elemente wie Stickstoff und Schwefel gänzlich von Prokaryoten abhängig ist (Staley 2002) (1.2).

Bakterien sind seit über einem Jahrhundert Gegenstand der medizinisch-mikrobiologischen Forschung, doch nur wenige Modellorganismen – darunter vor allem Pathogene – sind gründlich erforscht (Woese 2002). Die Ökologie freilebender Bakterien und deren Gemeinschaften, sowie deren Einfluß auf die Biosphäre sind dagegen in weiten Teilen unbekannt (Pace 1997; Maier *et al.* 2000). Selbst über den Artenreichtum oder die Zusammensetzung natürlicher Mikroorganismengemeinschaften liegen allenfalls Schätzungen vor (Staley 2002; Schloss und Handelsman 2004).

### 1.1.1 Diversität von Bodenbakterien

Die Erfassung der Diversität von Bodenbakterien wird durch hohe Zelldichten und den extremen Artenreichtum erschwert. Je nach Bodentyp, Tiefe und Vegetation kommen in 1 g Boden  $10^9$  bis über  $10^{10}$  Zellen vor, die um  $10^4$  verschiedene „Arten“ (1.1.2) repräsentieren (Torsvik *et al.* 1990; Chatzinotas *et al.* 1998). In spezialisierten Habitaten können höhere Zelldichten als im Boden erreicht werden, etwa in Wurzelknöllchen der „Leguminosen“, doch sind diese Habitate wesentlich artenärmer. Nach den Extrapolationen von Dykhuizen (1998) und Curtis *et al.* (2002) liegt die bakterielle Diversität in 1 g Boden bei 6400 - 38.000 Taxa, in 30 g bei 40.000 - 500.000, in 100 g bei  $10^5$  -  $10^6$  und in 1 t Boden bei  $4 \cdot 10^6$  Taxa. Im Vergleich hierzu wird die bakterielle Gesamtdiversität in allen Ozeanen nur auf  $2 \cdot 10^6$  Taxa geschätzt und die Gesamtzahl der Bakterienarten soll weltweit bei etwa  $10^7$  -  $10^9$  liegen (Dykhuizen 1998; Curtis *et al.* 2002). Die extrem hohe Diversität in Böden ist durch die Vielzahl von Mikrohabitaten zu erklären, die Bakterien mit den unterschiedlichsten Anforderungen eine Koexistenz erlauben. Ungeachtet der hohen Diversität in

einzelnen Böden ist bislang nicht geklärt, welchen Anteil ubiquitär verbreitete Bakterien stellen (Curtis *et al.* 2002). Doch bisher werden in jedem untersuchten Boden fast ausschließlich zuvor unbekannte Bakterien gefunden (Buckley und Schmidt 2002).

### 1.1.2 Systematik und Artbegriff bei Bakterien

Die ursprüngliche Systematik der Bakterien beruhte auf der Einteilung nach Zellformen und beobachtbaren Koloniereigenschaften. Später wurden Färbemethoden und biochemische Charakterisierungen nach Substratanforderungen und Stoffwechselprodukten als Kriterien hinzugenommen. Voraussetzung hierfür waren jedoch immer Reinkulturen der zu beschreibenden Bakterien. In den 1980er Jahren führte C. Woese die moderne Systematik der Prokaryoten ein und teilte die damals bekannten Bakterien nach der Analyse des 16S rRNA-Gens, das die RNA der kleinen Ribosomenuntereinheit codiert in 10 Phyla ein (Woese 1987). Dies ermöglicht die taxonomische Einordnung unkultivierter Bakterien, sofern deren 16S rDNA-Sequenzen bekannt sind, auch wenn die systematische Beschreibung nach wie vor Reinkulturen erfordert (Brenner *et al.* 2001).

Besonders im letzten Jahrzehnt ist die Zahl bekannter Phyla stark angewachsen, was primär im Einsatz molekularbiologischer Methoden, aber auch in der intensiven Erforschung von Extremstandorten begründet liegt. So werden derzeit 50 - 52 bakterielle Abstammungslinien im Range eines Phylums unterschieden (Rappe und Giovannoni 2003; Schloss und Handelsman 2004). Die Hälfte dieser Phyla ist allerdings allein auf der Basis von DNA-Sequenzen definiert worden und beinhaltet bislang keine kultivierten Vertreter (Hugenholtz *et al.* 1998).

Bakterien eines Phylums werden in Klassen, Ordnungen, Familien, Gattungen und Arten untergliedert. Doch diese Kategorien sind in der Regel weiter gefasst, als in der botanischen oder zoologischen Systematik und werden nicht einheitlich verwendet (Stackebrandt und Goebel 1994; Brenner *et al.* 2001; Garrity *et al.* 2004). Zudem fehlt in der Bakteriologie ein biologisch begründeter Artbegriff, da die übliche Definition über Fortpflanzungsgemeinschaften bei den sich klonal fortpflanzenden Bakterien nicht greift. Statt dessen wurde als zentrales Kriterium ein DNA-DNA-Reassoziationswert von 70 % festgelegt (Stackebrandt und Goebel 1994), der in vielen Fällen einer mindestens 97,5 %igen Ähnlichkeit von 16S rDNA-Sequenzen entspricht. Daher werden umgekehrt 16S rDNA-Sequenzen, die um mehr als 2,5 % divergieren, oft verschiedenen Bakterienarten zugerechnet.

### 1.1.3 „Unkultivierbarkeit“ bei Umweltbakterien

Die bislang 3000 - 7000 systematisch beschriebenen Bakterienarten (Wilson 1992; Colwell 1996; Brenner *et al.* 2001; Staley 2002) stellen wahrscheinlich einen Anteil von weniger als 0,5 % der weltweit vorkommenden Arten (1.1.1). Demgegenüber sind in Datenbanken über 150.000, teilweise redundante, bakterielle 16S rDNA-Sequenzen publiziert worden (für Details siehe Tabelle 12, S. 72), von denen der überwiegende Teil nicht aus kultivierten Laborstämmen, sondern direkt aus Umweltproben gewonnen wurde. Diese Diskrepanz ist vor allem auf den großen Aufwand bei

der Isolierung von Umweltbakterien und die im Gegensatz dazu relativ leichte Klonierung von Genfragmenten zurückzuführen.

Der Begriff „nonculturable“ wurde von Xu *et al.* (1982) für *Escherichia coli* und *Vibrio cholerae* eingeführt, die unter ungünstigen Bedingungen überleben konnten, sich aber vorübergehend nicht mehr kultivieren ließen. Später wurde deutlich, dass diese „Unkultivierbarkeit“ für Bakterien aus Umweltproben die Regel ist. Obwohl nur 0,1 - 5 % der Bodenbakterien kultivierbar sein sollen (Olsen und Bakken 1987; Amann *et al.* 1995), lassen sich mit gezielten Kultivierungsversuchen dennoch viele Bakterien isolieren, die zuvor als „unkultivierbar“ galten (McCaig *et al.* 2001; Joseph *et al.* 2003). Tatsächlich dürfte die mangelnde Kenntnis über die Wachstumsanforderungen von Bodenbakterien das Haupthindernis bei der Kultivierung sein. Bodenbakterien in Reinkultur zu gewinnen ist aber in jedem Fall sehr aufwendig und langwierig, obwohl Reinkulturen zur systematischen Beschreibung unbekannter Bakterienarten unbedingt erforderlich sind. Doch bei einer angenommenen Diversität von  $10^4$  Arten pro Gramm in einem Boden ist auch mit größtem Aufwand nur ein Bruchteil der Gesamtgemeinschaft über Kultivierungen zu erfassen. Daher werden zur Erforschung der bakteriellen Diversität in Umweltproben nun überwiegend molekularbiologische Methoden eingesetzt (Rappe und Giovannoni 2003), auch wenn dies zur Folge hat, dass der größte Teil der „bekannten“ Bakterien nur in Form von *virtual computer bacteroids* (Guest 1999) in Datenbanken vorliegt. Über einen kultivierungsunabhängigen Ansatz wird allerdings eine andere – wenn auch wesentlich diversere und repräsentativere – Subgruppe erfasst als über die Isolierung von Umweltbakterien mit herkömmlichen mikrobiologischen Methoden (Vasquez *et al.* 2002). Daher gibt es parallel gezielte Versuche, Vertreter aus Gruppen zu kultivieren, die bislang allein über Sequenzdaten definiert worden sind (Sait *et al.* 2002; Zengler *et al.* 2002).

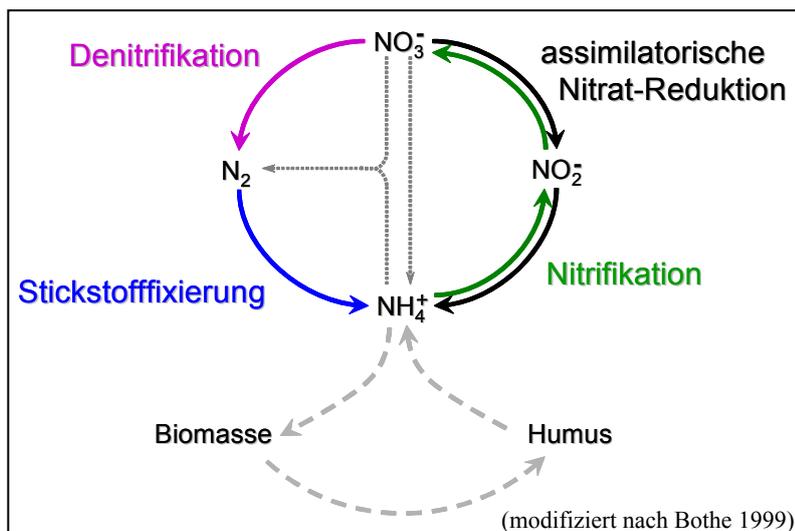
## 1.2 Der Stickstoffkreislauf und daran beteiligte Prokaryoten

Stickstoff (N) ist als Bestandteil von Aminosäuren, Nukleinsäuren und anderen Verbindungen essentiell, aber für viele Ökosysteme auch ein limitierender Faktor. Dabei ist molekularer Stickstoff ( $N_2$ ) mit einem Volumenanteil von 78 % und einer Masse von  $3,9 \cdot 10^{21}$  g das häufigste Gas in der Atmosphäre und auch in den Ozeanen mit  $2,0 \cdot 10^{19}$  g in großen Mengen gelöst (Maier *et al.* 2000). Zusätzlich stellt die Erdkruste mit  $7,7 \cdot 10^{20}$  g ein großes N-Reservoir dar (Maier *et al.* 2000). Die N-Limitation in Ökosystemen beruht daher nicht darauf, dass N zu selten wäre, sondern auf der mangelnden Verfügbarkeit biologisch nutzbarer N-Verbindungen. Denn Pflanzen sind auf Nitrat ( $NO_3^-$ ) oder Ammonium ( $NH_4^+$ ) angewiesen und Tiere können ausschließlich organische N-Verbindungen nutzen. Über abiotische Prozesse gelangen jährlich  $8 \cdot 10^{13}$  g atmosphärischer N in Form von  $NO_3^-$  in die Böden und Ozeane, doch die  $NH_3$ -Verflüchtigung im selben Zeitraum übersteigt mit  $1 \cdot 10^{14}$  g N den Eintrag (Fritsche 1998). Demgegenüber werden über die biologische  $N_2$ -Fixierung jährlich  $1,7 \cdot 10^{14}$  g N gebunden. Allerdings wird gebundener N biogen in fast dem gleichen Umfang ( $1,6 \cdot 10^{14}$  g N) auch wieder in die Atmosphäre freigesetzt (Fritsche 1998). Der größere Teil des globalen N-Umsatzes geht somit auf biologische Aktivität zurück.

Der biologische N-Kreislauf umfasst verschiedene Transformationen anorganischer N-Verbindungen (Bild 1). Die drei wichtigsten Reaktionsfolgen, die N<sub>2</sub>-Fixierung (N<sub>2</sub> → NH<sub>3</sub>), die Nitrifikation (NH<sub>3</sub> → NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) und die Denitrifikation (NO<sub>3</sub><sup>-</sup> → N<sub>2</sub>) können einzig von Prokaryoten katalysiert werden. Zur NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Assimilation (NO<sub>3</sub><sup>-</sup> → NH<sub>3</sub>) sind zusätzlich Pflanzen und Pilze fähig. Bei der N<sub>2</sub>-Fixierung wird atmosphärischer Stickstoff zu NH<sub>3</sub> reduziert und kann dann über Glutaminsynthetase und Glutamat-Synthase (GS/GOGAT) inkorporiert werden. Beim Abbau von Biomasse wird wieder NH<sub>3</sub> frei, das als Substrat für nitrifizierende Bakterien dient. Deren Produkt, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, wird von denitrifizierenden Bakterien zu N<sub>2</sub> veratmet, wodurch sich der N-Kreislauf schließt. Die einzelnen Schritte im biologischen N-Kreislauf sind allerdings nicht so strikt voneinander getrennt, wie es Bild 1 impliziert (Mohan *et al.* 2004). Zum Beispiel können viele Bakterien je nach äußeren Bedingungen sowohl denitrifizieren als auch Stickstoff fixieren (Rösch *et al.* 2002), während andere denitrifizieren und nitrifizieren können (Schmidt *et al.* 2002).

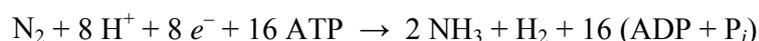
In der vorliegenden Arbeit wurde die Diversität stickstofffixierender und denitrifizierender Mikroorganismen in einem Waldboden bestimmt, so dass auf diese beiden Schritte im folgenden detaillierter als auf die Nitrifikation eingegangen wird.

**Bild 1: Übersicht des biologischen Stickstoffkreislaufs**



### 1.2.1 Stickstofffixierung

Bei der biologischen Stickstofffixierung wird N<sub>2</sub> in einer einstufigen Reaktion zu NH<sub>3</sub> reduziert:



Das gebildete NH<sub>3</sub> wird anschließend über das GS/GOGAT-System (s. o.) inkorporiert. Wegen des hohen ATP- und Elektronenbedarfs erfolgt die N<sub>2</sub>-Fixierung nur, wenn keine alternativen N-Quellen verfügbar sind. Die Fähigkeit zur N<sub>2</sub>-Fixierung, auch als Diazotrophie bezeichnet, ist bei Bakterien – Proteobacteria (alle fünf Klassen), Cyanobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Spirochaetes und grünen Schwefelbakterien – und methanogenen Archaeen verbreitet, nicht aber bei

Eukaryoten (Young 1992; Leigh 2000; Zehr *et al.* 2003). Doch sind innerhalb eines Taxons selten alle Stämme diazotroph; häufig finden sich in derselben Gattung sowohl N-autotrophe als auch N-heterotrophe Stämme.

Ökologisch betrachtet sind vor allem die symbiontisch lebenden Diazotrophen von Bedeutung, da sie die höchsten N<sub>2</sub>-Fixierungsraten erreichen und das Wachstum ihrer Wirte durch N-Versorgung fördern. Rhizobien *sensu lato* (Sawada *et al.* 2003) können in einer Wurzelknöllchen-Symbiose mit „Leguminosen“ bis zu 300 kg N pro Hektar und Jahr fixieren (Fritsche 1998; Maier *et al.* 2000), was einzig dadurch möglich ist, dass die Rhizobien von ihrem pflanzlichen Partner bis zu 50 % seiner Assimilate erhalten (Lynch und Whipps 1990). Die als Actinorhiza bezeichnete Symbiose von *Frankia* mit Pflanzen verschiedener Familien, darunter der Erle, ist etwas weniger effektiv (Fritsche 1998). Diazotrophe Cyanobacteria können verschiedene Formen der Symbiose eingehen, z. B. mit Moosen, Farnen, Cycadeen, Pilzen (Flechten), Diatomeen oder Schwämmen (Adams 2000). Die N<sub>2</sub>-Fixierungsrate scheint aber bei der Symbiose zwischen *Anabaena azollae* und dem Wasserfarn *Azolla* am höchsten zu sein: 100 - 120 kg N/ha/a (Maier *et al.* 2000). Symbiontische N<sub>2</sub>-Fixierer sind aber auch im Darm von Termiten, anzutreffen (Ohkuma *et al.* 1996). Eine zweite wichtige Gruppe sind assoziative N<sub>2</sub>-Fixierer, die z. B. die Rhizoplane von Gräsern besiedeln und zwischen 2 und 90 kg N/ha/a fixieren können (Fritsche 1998). Die freilebenden Diazotrophen fixieren zwar nur 0,3 - 2,0 kg N/ha/a (Fritsche 1998; Maier *et al.* 2000) bilden aber eine viel diversere Gruppe, als die symbiontischen oder assoziativen N<sub>2</sub>-Fixierer. Ihre Bedeutung in Böden kann noch nicht abschließend eingeschätzt werden, da sie in der Forschung lange zugunsten symbiontischer N<sub>2</sub>-Fixierer vernachlässigt wurden. Gerade in den Wäldern gemäßigter Klimazonen dürften die freilebenden Bodenbakterien aber einen wesentlichen Anteil am N-Eintrag haben (Maier *et al.* 2000; Buckley und Schmidt 2002).

Das Enzym, das die Reduktion von N<sub>2</sub> zu NH<sub>3</sub> katalysiert, ist der Dinitrogenase-Komplex, der aus zwei Untereinheiten besteht: der Dinitrogenase-Reduktase (NifH) und der eigentlichen Dinitrogenase (NifDK), die einen Molybdän-Cofaktor („FeMoCo“) enthält. Homolog zu NifHDK sind die weniger verbreiteten alternativen Nitrogenasen, die anstelle von Molybdän entweder Vanadium (VnfHDGK) oder nur Eisen (AnfHDGK) im aktiven Zentrum enthalten. Einem anderen Mechanismus folgt die N<sub>2</sub>-Fixierung bei *Streptomyces thermoautotrophicus* (Ribbe *et al.* 1997). Dieser Ausnahmefall soll hier aber nicht behandelt werden, denn aufgrund der CO-Abhängigkeit dürfte diese Art der N<sub>2</sub>-Fixierung nur an wenigen Spezialstandorten und nicht in mesophilen Böden zu finden sein.

Das konservierte Gen der Dinitrogenase-Reduktasen (*nifH/anfH/vnfH*) ist zur Rekonstruktion der Phylogenie von diazotrophen Mikroorganismen geeignet und dient als molekularer Marker für Diazotrophie (Hennecke *et al.* 1985; Normand und Bousquet 1989; Zehr *et al.* 2003). Die rezente Verbreitung der Diazotrophie in paraphyletischen Gruppen erfordert, dass sich der Nitrogenase-Apparat entwickelte, bevor eine Aufspaltung in Bacteria und Archaea erfolgte, oder aber, dass wiederholte Ereignisse von horizontalem Gentransfer stattgefunden haben (Raymond *et al.* 2004).

### 1.2.2 Nitrifikation

Bei der autotrophen Nitrifikation wird  $\text{NH}_3$ , das primär aus dem Abbau von Biomasse stammt, in einem ersten Schritt aerob zu Hydroxylamin ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ) und weiter zu Nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) oxidiert. Katalysiert werden diese Reaktionen durch die Ammoniak-Monooxygenase (AMO) und die Hydroxylamin-Oxidoreduktase (HAO). Die hierzu fähigen Bakterien bilden (mit der Ausnahme von *Nitrosococcus*) eine monophyletische Abstammungslinie innerhalb der Betaproteobacteria und werden zusammenfassend als Nitrosobakterien bezeichnet. Die aerobe Oxidation von  $\text{NO}_2^-$  zu Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) erfolgt unabhängig durch Nitrobakterien (*Nitrobacter*). Beide Bakteriengruppen kommen aber vergesellschaftet vor und sorgen durch ihre hohen Stoffwechselaktivitäten – bedingt durch die geringe Energiebilanz der  $\text{NH}_3$ - bzw.  $\text{NO}_2^-$ -Oxidation – dafür, dass der Ammoniumgehalt in Böden meist gering und Nitrit nicht nachweisbar ist. Die Oxidation von  $\text{NH}_3$  bzw.  $\text{NO}_2^-$  ist für Nitrifikanten die einzige Energie- und Elektronen-Quelle. Allerdings benötigen die Nitrifikanten einen Großteil der gewonnenen ATP und Reduktionsäquivalente zur  $\text{CO}_2$ -Fixierung, so dass ihre Generationszeiten extrem lang sind.

Die Nitrifikation kann zur Auswaschung von N aus Böden führen, da  $\text{NO}_3^-$  im Gegensatz zu  $\text{NH}_4^+$  kaum an die als Kationenaustauscher wirkenden Bodenpartikeln binden kann. Dieser Prozess ist besonders in der Landwirtschaft von Bedeutung, da auf diese Weise ein großer Teil des bei der (Gülle-)Düngung eingesetzten N ins Grundwasser gelangen kann. Die ökologische Rolle der „heterotrophen Nitrifikation“ bei Bakterien und Pilzen ist umstritten (Myrold 1998; Bothe *et al.* 2000). Wahrscheinlich wird  $\text{NH}_3$  heterotroph nur co-metabolisiert, also unspezifisch durch andere Enzyme oxidiert, ähnlich wie die  $\text{CH}_4$ -Oxidation durch die AMO bei autotrophen Nitrifikanten. Der  $\text{NH}_3$ -Umsatz der heterotrophen Nitrifikation beträgt vermutlich nur ein Bruchteil des Umsatzes der autotrophen Nitrifikation.

### 1.2.3 Denitrifikation

Die Denitrifikation ist in ihrer Vollständigkeit ein vierstufiger Prozess, in den die dissimilatorische Nitratreduktase (dNR:  $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$ ), die dissimilatorische Nitritreduktase (dNiR:  $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}$ ), die Stickstoffmonoxid-Reduktase ( $\text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O}$ ) und Distickstoffoxid-Reduktase ( $\text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ ) involviert sind (Bothe *et al.* 2000). Als Denitrifikanten werden die Organismen bezeichnet, die gebundenen N in gasförmige N-Verbindungen überführen können, also zumindest eine dNiR aufweisen (Bothe *et al.* 2000). *Escherichia coli* hat drei Typen von dNR (Bothe *et al.* 2000) und kann zusätzlich  $\text{N}_2\text{O}$  in  $\text{N}_2$  überführen (Kaldorf *et al.* 1993), ist aber nach der obigen Definition kein Denitrifikant, da eine dNiR fehlt. Bei manchen Denitrifikanten wiederum kann eine dNR oder die  $\text{N}_2\text{O}$ -Reduktase fehlen (Bothe *et al.* 2000; Spring *et al.* 2004). Daher, und aufgrund unvollständigen Substratumsatzes, werden bei der Denitrifikation NO und  $\text{N}_2\text{O}$  freigesetzt, beides Klimagase, die an der Entstehung von saurem Regen, dem Abbau stratosphärischen Ozons und dem Treibhauseffekt beteiligt sind. Die Denitrifikation kann auch zur N-Verarmung in Böden führen, da sie gebundenen N in die Atmosphäre entlässt und damit der  $\text{N}_2$ -Fixierung entgegenläuft. Aus

diesem Grund ist die Denitrifikation bei der Abwasseraufbereitung zur Eliminierung von N von zentraler Bedeutung.

Die Denitrifikation wird auch als „Nitrat-Atmung“ bezeichnet, da die oxidierten N-Verbindungen als terminale Elektronenakzeptoren für die Atmungskette genutzt werden. In der Regel sind Denitrifikanten aber fakultativ anaerob und veratmen unter oxischen Bedingungen wegen der günstigeren Energiebilanz  $O_2$  (Zumft 1997). Neben der anaeroben Denitrifikation wurden auch aerobe Denitrifikation und Corespiration von  $O_2$  und  $NO_3^-$  beschrieben (Robertson und Kuenen 1984).

Anders als bei  $N_2$ -Fixierung und Nitrifikation können zumindest die ersten drei Schritte der Denitrifikation von verschiedenen Enzyme katalysiert werden (Bothe *et al.* 2000). Neben einer dNR an der Innenseite der Cytoplasmamembran (NarGHJI) können eine Membran-gebundene (NarZYWV) und/oder eine periplasmatische (NapAB) Nitratreduktase vorkommen. Insbesondere die NarG- und die Nap-NR sind häufig zusammen im gleichen Bakterium zu finden. Von der dNiR gibt es zwei nicht-homologe Formen mit Cu (NirK) oder Häm  $cd_1$  (NirS) im aktiven Zentrum. Ein bestimmtes Bakterium enthält entweder die Cu-dNiR oder die  $cd_1$ -NiR, aber nie beide Enzyme zusammen. Bei verschiedenen Stämmen der gleichen Gattung können jedoch beide Formen vorkommen (Kloos *et al.* 2001). Von der NO-Reduktase sind bislang drei verschiedene Formen beschrieben worden, darunter *norBC*, doch ist über deren Verbreitung noch wenig bekannt (Watmough *et al.* 1999; Suharti *et al.* 2001). Die  $N_2O$ -Reduktase, die von dem Gen *nosZ* codiert wird und Cu im aktiven Zentrum enthält, ist wie die dissimilatorischen Nitrat- und Nitritreduktasen recht gut charakterisiert (Bothe *et al.* 2000).

Die Denitrifikation ist bei Bakterien verschiedener Abstammungslinien verbreitet (Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Flavobacteria, *Aquifex*), obwohl vermutlich der größte Teil der Denitrifikanten in Böden zu den Proteobacteria gehört (Zumft 1997; Suharti und de Vries 2005). Zur Denitrifikation fähig sind darüber hinaus einige Haloarchaea und *Pyrobaculum*, ein hyperthermophiles Archaeon (Philippot 2002; Cabello *et al.* 2004; Lledo *et al.* 2004), sowie einige Pilze, darunter *Fusarium oxysporum* und *Trichosporon cutaneum* (Shoun *et al.* 1992; Zhang *et al.* 2001). Die DNA-Sequenzen von *narG*, *nirS*, *nirK* oder *nosZ* lassen allerdings im Gegensatz zur 16S rDNA und zu *nifH* (siehe oben) kaum Rückschlüsse auf die taxonomische Stellung der Herkunftsorganismen zu (Bothe *et al.* 2000).

### 1.3 Anlass und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Böden stellen das weltweit wichtigste Substrat dar. Die Beschreibung der Vorgänge in Böden ist dank geologischer oder physikalisch-chemischer Methoden möglich. So kann der Gasaustausch eines Bodens – etwa die Freisetzung von Treibhausgasen wie  $N_2O$  und  $CH_4$  – gaschromatographisch gemessen werden. Auch kann der Einfluß äußerer Faktoren auf den Bodens beschrieben werden, z. B. die Veränderung der Stickstoffverfügbarkeit in staunassen Böden. Mikroorganismen haben aber an allen N-Umsätzen in Böden entscheidenden Anteil. Über die Kontrolle der N-Verfügbarkeit fördern oder inhibieren Bodenmikroorganismen indirekt oder direkt das Pflanzenwachs-

tum (vergleiche 1.2). Doch noch immer ist kaum bekannt, welche Mikroorganismen in gewöhnlichen Böden vorkommen und wie sich Veränderungen der Umwelt auf die Zusammensetzung der Gemeinschaft auswirken. Für funktionelle Analysen von Mikroorganismengemeinschaften und damit zum Verständnis des Ökosystems Boden ist dies aber die Voraussetzung. Ohne dieses Kenntnis lassen sich die Vorgänge in Böden nur beschreiben, aber nicht zuverlässig modellieren oder vorhersagen.

Die meisten Untersuchungen zur Diversität von Umweltbakterien wurden an Wasser- oder Sedimentproben durchgeführt, da diese im Vergleich zu Böden homogener und molekularbiologischen Ansätzen zugänglicher sind (z. B. Rappe *et al.* 1997; Scala und Kerkhof 1999; Braker *et al.* 2000; Edwards *et al.* 2001; Bakermans und Madsen 2002; Nogales *et al.* 2002; Gregory *et al.* 2003). Für Böden, darunter vor allem landwirtschaftlich genutzte, liegen einige Veröffentlichungen zur bakteriellen Diversität vor: meist wurde nur das 16S rRNA-Gen untersucht, in der Regel in Form von Klonbibliotheken (Borneman *et al.* 1996; Borneman und Triplett 1997; Kuske *et al.* 1997; McCaig *et al.* 1999; Nogales *et al.* 2001; Smalla *et al.* 2001; Axelrood *et al.* 2002a und Axelrood *et al.* 2002b; Dunbar *et al.* 2002; Norris *et al.* 2002; Sait *et al.* 2002), was zur Beschreibung der Gesamtdiversität in den Böden geeignet ist, aber kaum Rückschlüsse auf ökologisch wichtige Gruppen wie Denitrifikanten zulässt. In anderen Böden wurden ein oder mehrere funktionelle Gruppen aus dem Stickstoffkreislauf über selektive Kultivierungen oder mithilfe von Klonbibliotheken untersucht (Ueda *et al.* 1995a; Ueda *et al.* 1995b; Bagwell *et al.* 1998; Widmer *et al.* 1999; Shaffer *et al.* 2000; Poly *et al.* 2001; Philippot *et al.* 2002; Prieme *et al.* 2002; Rich *et al.* 2003; Chèneby *et al.* 2004; Mounier *et al.* 2004; Stres *et al.* 2004; Roussel-Delif *et al.* 2005). Doch nur für sehr wenige Böden wurden sowohl die bakterielle Gesamtgemeinschaft als auch funktionelle Gruppen aus dem Stickstoffkreislauf erforscht (Rösch *et al.* 2002; Demba Diallo *et al.* 2004a in Verbindung mit Demba Diallo *et al.* 2004b; Wang und Skipper 2004); in ähnlichen Untersuchungen wurden Gensonden eingesetzt, um die relativen Anteile solcher Gruppen an der Gesamtgemeinschaft zu bestimmen (Mergel *et al.* 2001a; Mergel *et al.* 2001b).

Bisher scheint es keine Veröffentlichungen zum Einfluß von Stickstoffeintrag auf die Diversität der Bodenbakteriengemeinschaft in einem nicht-intensiv genutzten Boden zu geben. Aber gerade in Ballungsräumen sind Stickstoffimmissionen durch Industrie, Verkehr und Landwirtschaft nicht zu unterschätzen (Rösch *et al.* 2002). Die vorliegende Arbeit soll erstens dazu beitragen, das Wissen über die natürliche Bakteriengemeinschaft eines Waldbodens durch die Beschreibung der Diversität der Gesamtgemeinschaft, sowie der denitrifizierenden und der stickstofffixierenden Teilgemeinschaften zu mehren. Zu diesem Zweck war eine neuartige Methode zu entwickeln, mit der die Diversität in den einzelnen Bodenproben möglichst schnell, detailliert und umfassend dargestellt werden kann. Zweitens soll der Einfluß von Stickstoffeintrag auf die Diversität der Gemeinschaften durch den Einsatz von Mineraldünger bewertet werden. Die Ausgangshypothese war, dass denitrifizierende Mikroorganismen eventuell durch ein erhöhtes Nitratangebot einen selektiven Vorteil haben könnten, während stickstofffixierende Mikroorganismen durch einen Stickstoffüberschuß im Boden ihren Vorteil verlieren könnten. Es wurde erwartet, dass sich dies

auf die Zusammensetzung der Gemeinschaften auswirken würde. In dieser Arbeit ging es nicht darum, die Stoffwechselaktivitäten dieser Bakteriengruppen zu erfassen, da dies keinen Aufschluß auf Veränderungen in den Gemeinschaftsstrukturen erbracht hätte.

## 1.4 Zusammenfassung des experimentellen Ansatzes

Als Standort des Projektes wurde ein relativ ungestörter und naturbelassener Wald im Kölner Stadtgebiet ausgewählt (Dünnwald), dessen Boden Stickstoff-limitiert und damit für einen Düngungsversuch geeignet war. Es wurden zwei vergleichbare Flächen in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander definiert, von denen die eine anfangs mehrfach gedüngt wurde, während die andere als Kontrollfläche ungedüngt blieb. Im Verlauf eines Jahres wurden zu sieben Zeitpunkten Bodenproben entnommen und charakterisiert. Die Diversität der bakteriellen Gesamtgemeinschaft, der denitrifizierenden und der stickstofffixierenden Mikroorganismen in den Bodenproben wurde mit molekularbiologischen Methoden untersucht. Mithilfe extrahierter Boden-DNA und degenerierter PCR-Primer für das 16S rRNA-Gen (Gesamtgemeinschaft), für *nifH* (Stickstofffixierer) und *nosZ* (Denitrifikanten) wurden Klonbibliotheken erstellt und anschließend statistisch und phylogenetisch ausgewertet. Aufgrund der hohen Artenzahlen und der geringen bzw. selektiven Kultivierbarkeit von Bodenbakterien (1.1) wurde auf Kultivierungsversuche vollständig verzichtet. Da die Bodenproben der gedüngten und ungedüngten Fläche zu verschiedenen Zeitpunkten miteinander verglichen werden sollten, um einen möglichen Düngungseffekt zu dokumentieren, waren pro Bodenprobe möglichst viele Daten über die vorhandenen Bakterien zu gewinnen. Hierfür wurde ein neuartiges Verfahren entwickelt, das auf der Methode des terminalen Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (tRFLP; Liu *et al.* 1997) beruht. Mittels der tRFLP-Methode können genetische Profile von Gemeinschaften erstellt werden, indem PCR-Produkte mit Restriktionsenzymen fragmentiert und die Fragmentgemische auf einem Sequenzierautomaten analysiert werden. Einzelne Fragmente können dann bekannten Sequenzen zugeordnet werden, doch bei einer Gemeinschaft mit vielen Spezies ist dies selten eindeutig möglich. In der vorliegenden Arbeit wurden daher tRFLP-Profile von bis zu 13 Restriktionsenzymen mit dem eigens hierfür entworfenen Computerprogramm TReFID parallel ausgewertet und dienten in der Kombination mit umfangreichen Datenbanken zu den drei untersuchten Genen 16S rDNA, *nifH* und *nosZ* dazu, „Artenlisten“ für die einzelnen Bodenproben zu erstellen. Ziel der Entwicklung des TReFID-Verfahrens war, die langwierige Erstellung von Klonbibliotheken zu umgehen und gleichzeitig umfangreichere Daten über die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft einer Umweltprobe zu erhalten, als mit bisherigen Methoden möglich. Nicht zuletzt sollte auf diese Weise verhindert werden, dass das stichprobenartige Sequenzieren einiger klonierter PCR-Produkte zu falschen Schlüssen bezüglich der Gesamtdiversität führt. Der Vergleich von TReFID-Ergebnissen zu den drei Genen untereinander, sowie zu den Klonbibliotheken ermöglichte eine zusätzliche Absicherung der Ergebnisse.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Laborkulturen von Bakterien für Kontrollversuche

#### 2.1.1 Verwendete Bakterienstämme und ihre Herkunft

Laborkulturen verschiedener Bakterienstämme lieferten Material für die Evaluierung von PCR-Primern (Tabelle 3, S. 18) und für Positiv- bzw. Negativkontrollen bei PCR-Experimenten (2.5). In Plasmide klonierte Genfragmente dieser Stämme dienten außerdem bei RFLP (2.9) und tRFLP (2.14) als Kontrolle. Die in Tabelle 1 aufgeführten Stämme wurden in Flüssigmedien und/oder auf Nährböden kultiviert (2.1.2).

**Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Bakterienstämme**

Organismus	Stammbezeichnung
<i>Achromobacter ruhlandii</i> (= <i>Alcaligenes ruhlandii</i> )	DSM 653 <sup>T</sup>
<i>Aquaspirillum autotrophicum</i>	SA32 = DSM 732 <sup>T</sup>
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	ORS 571 = DSM 5975 <sup>T</sup>
<i>Azospirillum brasilense</i>	Sp 7 = DSM 1690 <sup>T</sup>
<i>Azospirillum irakense</i>	KBC1 = DSM 11586 <sup>T</sup>
<i>Azospirillum lipoferum</i>	Sp 59b = DSM 1691 <sup>T</sup>
<i>Azospirillum</i> sp.	Sp A1-3 = DSM 1726
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	505 = LMG 6137
<i>Ensifer meliloti</i> (= <i>Sinorhizobium meliloti</i> )	Rm1021 (← J. Vanderleyden)
<i>Escherichia coli</i>	K12 = DSM 498
<i>Frateuria aurantia</i>	DSM 6220 <sup>T</sup>
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	PAL 3 (← A. Hartmann)
<i>Herbaspirillum frisingense</i>	GSF 30 = DSM 13128 <sup>T</sup>
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	Z67 = DSM 6645 <sup>T</sup>
<i>Kocuria varians</i> (= <i>Micrococcus varians</i> )	LTH 1429 (← W. P. Hammes)
<i>Micrococcus luteus</i> (= <i>M. lysodeikticus</i> )	DSM 20030 <sup>T</sup>
<i>Nocardioides simplex</i> (= <i>Arthrobacter simplex</i> )	DSM 20130 <sup>T</sup> (← H. Papen)
<i>Paenibacillus validus</i> (= <i>Bacillus validus</i> )	DSM 3037 <sup>T</sup>
<i>Paracoccus denitrificans</i>	Pd1222
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> (= <i>P. aureofaciens</i> )	DSM 6698
<i>Pseudomonas stutzeri</i> (= <i>P. perfectomarinus</i> )	ZoBell 632 (← W. G. Zumft)
<i>Pseudomonas stutzeri</i> (= <i>Alcaligenes faecalis</i> )	A15
<i>Ralstonia eutropha</i> (= <i>Alcaligenes eutrophus</i> )	H16 (← H. Papen)
<i>Rhizobium trifolii</i>	ANV 843 (← J. Vanderleyden)
<i>Rhizobium tropici</i> (= <i>Rhizobium phaseoli</i> )	CIAT 899 (← C. Elmerich)
<i>Staphylococcus carnosus</i>	LTH 55 (← W. P. Hammes)

*Legende zu Tabelle 1:* Die Artnamen entsprechen der aktuellen bakteriellen Nomenklatur (DSMZ 2004); gängige Basonyme sind in Klammern angegeben. Unter der Stammbezeichnung ist neben der gebräuchlichen Kurzbezeichnung die DSM-Nummer (DSMZ 2001) aufgeführt, sofern der jeweilige Stamm in dieser Sammlung geführt wird. Falls Kulturen direkt von einzelnen Personen und nicht aus Sammlungen bezogen wurden, ist dies mit einem Pfeil (←) gekennzeichnet und der entsprechende Name angegeben. Details der Kultivierung sind in Kapitel 2.1.2 angegeben.

Stammsammlungen: DSM: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig – CIAT: Rhizobia Collection, Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia – LMG: Laboratorium of Microbiology Gent Culture Collection – LTH: Institut für Lebensmitteltechnologie, Universität Stuttgart-Hohenheim.

## 2.1.2 Kultivierungsbedingungen für Laborstämme von Bakterien

Alle verwendeten Bakterienstämme ließen sich bei 30 °C aerob und heterotroph mit dem Medium YEM<sup>+</sup> (2.1.2.1) kultivieren. Transgene *E. coli*-Linien wurden aber mit LB-Medium (2.1.2.2) bei 37 °C kultiviert. Flüssigkulturen wurden entweder in Reagenzgläsern (3 mL Medium) oder in Erlenmeyerkolben (50 mL Medium) angelegt und auf Rundschüttlern (300 rpm) inkubiert. Für Nährböden wurden runde oder quadratische Petrischalen (20 mL bzw. 40 mL Medium) verwendet. Das Medium wurde mit Agar oder Gellan verfestigt. Nährmedien wurden unmittelbar nach der Zubereitung durch Autoklavieren (20 min, 121 °C) sterilisiert. Für Nährböden wurde der heiße Agar zum Aushärten in die Petrischalen gefüllt. Die verwendeten Medienbestandteile stammten von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe; Gelrite), Sigma (Deisenhofen; Agar) oder Difco (Detroit, USA; Hefeextrakt und BactoTrypton).

### 2.1.2.1 YEM<sup>+</sup>-Medium

Mannit	8000 mg
Glucose	2000 mg
BactoTrypton	400 mg
Hefeextrakt	400 mg
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	500 mg
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	400 mg
NaCl	100 mg
Spurenelemente SL-8 ( <i>siehe unten</i> )	1 mL
H <sub>2</sub> O (Millipore)	1000 mL

Der pH-Wert des YEM<sup>+</sup>-Mediums wurde auf 7,0 eingestellt. Für feste Nährböden wurden 10 g/L Gellan und außerdem 600 mg/L MgSO<sub>4</sub> hinzugefügt, da die Gellan-Gelstärke von der Konzentration bivalenter Kationen abhängt. Dieses Medium ist eine Modifikation des originalen YEM-Mediums (Vincent 1971).

#### *Spurenelemente-Lösung SL-8:*

Na <sub>2</sub> -EDTA · 2 H <sub>2</sub> O	5200 mg
FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	2000 mg
CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	190 mg
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	150 mg
MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	100 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	62 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	36 mg
NiCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	24 mg
CuCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	17 mg
H <sub>2</sub> O (demin.)	1000 mL

Die Stammlösung der Spurenelemente-Lösung SL-8 (Pfennig und Trüper 1981) wurde in 15 mL-Aliquots luftdicht verschlossen bei 4 °C gelagert. Angebrochene Aliquots konnten bis zum Farbumschlag von violett nach gelb (durch Oxidationsreaktionen) verwendet werden.

### 2.1.2.2 LB-Medium (Luria-Bertani Broth)

BactoTrypton	10 g
NaCl	10 g
Hefeextrakt	5 g
H <sub>2</sub> O (demin.)	1000 mL

Für feste LB-Nährböden wurde dem Medium vor dem Autoklavieren 15 g/L Agar beigegefügt.

### 2.1.3 Anlegen von Dauerkulturen zur Aufbewahrung von Bakterienstämmen

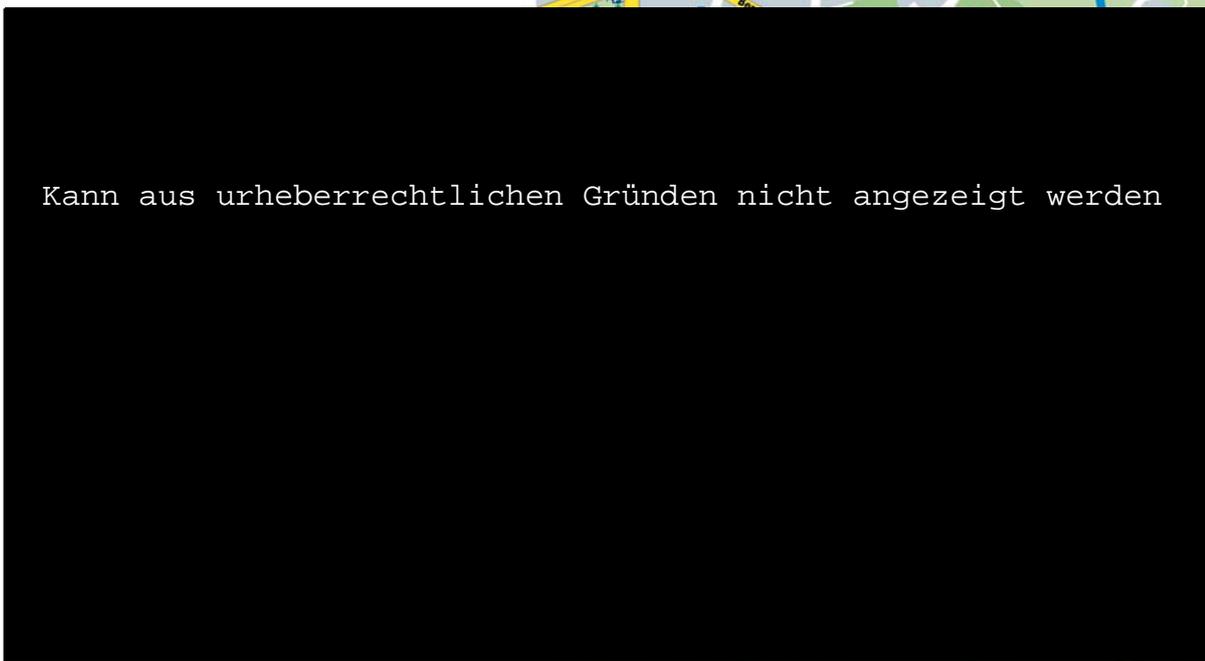
Von allen kultivierten Bakterienstämmen (Tabelle 1, S. 10) wurden Glycerin-Dauerkulturen angelegt. Hierzu wurden einzelne Klone der jeweiligen Stämme von Nährboden-Kulturen mit einer Impföse in Reagenzgläser mit 3 mL Medium überführt und über Nacht inkubiert (2.1.2). Von dieser Kultur wurden je 750 µL in drei 2 mL-Schraubdeckelgefäße pipettiert und nach Mischen mit 750 µL autoklaviertem Glycerin bei -80 °C eingefroren. Einmal pro Jahr wurde eine der Glycerinkulturen in Flüssigmedium reaktiviert und auf frischen Nährböden ausgestrichen. Von diesen Kulturen wurden dann erneut Glycerinkulturen angelegt, um den Erhalt der Stämme in der Kultursammlung zu sichern.

## 2.2 Standort für die Untersuchung der Bakteriengemeinschaft

### 2.2.1 Der Standort Dünnwald und Beschreibung der Versuchsflächen

Zur Untersuchung der Bakteriengemeinschaft wurde der Standort Dünnwald ausgewählt, ein Forst an der nordöstlichen Grenze des Kölner Stadtgebietes (Bild 2). Geologisch gehört der Standort zur Mittelterrasse des Rheins. Es wurden zwei vergleichbare, 4 m<sup>2</sup> große Flächen im Abstand von etwa 10 m abgesteckt (Bild 3), aus denen im Verlauf eines Jahres siebenmal Bodenproben entnommen wurden (2.2.2). Eine der beiden Flächen wurde mehrfach gedüngt (s. u.), während die andere naturbelassen war.

Der Dünnwald ist ein Fichten-/Kiefernforst mit Einsprengungen von Hainbuche (*Carpinus betulus*) und Bergahorn (*Acer pseudoplatanus*), seltener auch Stieleiche (*Quercus robur*). In der näheren Umgebung der ausgewählten Flächen traten Bestände von Adlerfarn (*Pteridium aquilinum*) auf, die bis zu 100 % deckend waren (Bild 3). Für beide beprobten Flächen wurden Vegetationsaufnahmen erstellt (Braun-Blanquet 1964). Neben den in Tabelle 2 aufgeführten Arten kam außerhalb der Versuchsflächen das Maiglöckchen (*Convallaria majalis*) vor, das in der Regel Lehmböden anzeigt. Die Streuschicht hatte eine Mächtigkeit von etwa 5 cm und bestand größtenteils aus Nadelblättern. Bis in eine Tiefe von mehr als 25 cm war der Boden von einheitlicher Struktur. Aufgrund der Korngrößenverteilung (2.3.3) handelte es sich um lehmigen Sandboden (Flusssand). Der Boden gehörte in die Mineralgruppe Quarz und war sehr carbonatarm bis carbonatfrei (0 bis 0,5 % CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>). Der Humusgehalt wurde anhand der schwarz-braunen Bodenfärbung auf 4 bis 6 % geschätzt (Schroeder 1992; Scheffer und Schachtschnabel 2002).

**Bild 2: Geographische Lage der Versuchsfläche**

*Legende zu Bild 2:* Der Dünnwald ist ein im Nordosten von Köln gelegener Forst. Auf der Deutschlandkarte (a) ist die ungefähre Lage des Dünnwalds mit einem rot umrandeten Kreis gekennzeichnet. Der rote Ring in (b) markiert die exakte Lage der Versuchsfläche (51° 01' 00" N, 07° 03' 47" O). Der Maßstab beträgt im linken Teilbild etwa 1 : 10.800.000, im rechten 1 : 30.000; die Kantenlänge des Ausschnitts ist 2,5 km (Quelle der Karten: [www.stadtplandienst.de](http://www.stadtplandienst.de)).

**Bild 3: Versuchsflächen im Dünnwald**

(a) gedüngte Fläche



(b) Kontrollfläche



*Legende zu Bild 3:* Die beiden Photos zeigen die gewählten Versuchsflächen. Die mit  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  gedüngte Fläche befand sich im Zentrum von (a). Im Hintergrund ist ein charakteristischer Ausschnitt des Dünnwaldes zu sehen. Das Photo wurde im Juli 2003 aufgenommen. In (b) ist die Kontrollfläche Anfang Oktober 2003 gezeigt. Die gedüngte Fläche war etwa 10 m vom Rasterpunkt vorn links entfernt. Die Bodenproben wurden an den Knotenpunkten des Rasters entnommen; für weitere Erklärungen hierzu siehe Bild 4 (der linke vordere Punkt in Bild 3b ist der Rasterpunkt 4C).

**Tabelle 2: Dünnwald: Kontrollfläche und gedüngte Fläche im Vergleich**

	(I) gedüngte Fläche	(II) ungedüngte Kontrollfläche
Größe:	2 m · 2 m (Düngung auf 4 m · 4 m)	2 m · 2 m
Hangneigung:	ca. 2 % (SSW exponiert)	ca. 2 % (SSO exponiert)
Düngung:	5 mol N / m <sup>2</sup> (total, siehe Text)	keine
Vegetation:		
- Baumschicht	(am Rand außerhalb der Fläche) Gemeine Fichte ( <i>Picea abies</i> ) Waldkiefer ( <i>Pinus sylvestris</i> ) Hainbuche ( <i>Carpinus betulus</i> )	(am Rand außerhalb der Fläche) Gemeine Fichte ( <i>Picea abies</i> )
- Krautschicht	Bedeckung ca. 2 % r Gemeine Fichte, juv. ( <i>Picea abies</i> , <i>Pinaceae</i> ) r Waldkiefer, juv. ( <i>Pinus sylvestris</i> , <i>Pinaceae</i> ) r Eberesche, juv. ( <i>Sorbus aucuparia</i> , <i>Rosaceae</i> ) r Stechpalme, juv. ( <i>Ilex aquifolium</i> , <i>Aquifoliaceae</i> ) r Brombeere, juv. ( <i>Rubus fruticosus</i> agg., <i>Rosaceae</i> ) r Himbeere, juv. ( <i>Rubus idaeus</i> , <i>Rosaceae</i> ) r Drahtschmiele ( <i>Deschampsia flexuosa</i> , <i>Poaceae</i> ) r Adlerfarn ( <i>Pteridium aquilinum</i> , <i>Dennstaedtiaceae</i> ) r Faulbaum, juv. ( <i>Rhamnus frangula</i> , <i>Rhamnaceae</i> ) r Vielblütige Weißwurz ( <i>Polygonatum multiflorum</i> , <i>Liliaceae</i> ) r Dorniger Wurmfarne ( <i>Dryopteris carthusiana</i> , <i>Dryopteridaceae</i> )	Bedeckung ca. 5 % r Gemeine Fichte, juv. ( <i>Picea abies</i> , <i>Pinaceae</i> ) r Waldkiefer, juv. ( <i>Pinus sylvestris</i> , <i>Pinaceae</i> ) r Eberesche, juv. ( <i>Sorbus aucuparia</i> , <i>Rosaceae</i> ) r Stechpalme, juv. ( <i>Ilex aquifolium</i> , <i>Aquifoliaceae</i> ) r Brombeere, juv. ( <i>Rubus fruticosus</i> agg., <i>Rosaceae</i> ) r Himbeere, juv. ( <i>Rubus idaeus</i> , <i>Rosaceae</i> ) r Drahtschmiele ( <i>Deschampsia flexuosa</i> , <i>Poaceae</i> ) r Wald-Geißblatt ( <i>Lonicera periclymenum</i> , <i>Caprifoliaceae</i> ) r Wald-Sauerklee ( <i>Oxalis acetosella</i> , <i>Oxalidaceae</i> ) + Zweiblättrige Schattenblume ( <i>Maianthemum bifolium</i> , <i>Liliaceae</i> ) r Salbeigamander ( <i>Teucrium scorodonia</i> , <i>Lamiaceae</i> ) r Efeu ( <i>Hedera helix</i> , <i>Araliaceae</i> )
- Moosschicht	uneinheitlich, ca. 40 % deckend 2 <i>Scleropodium purum</i> ( <i>Brachytheciaceae</i> ) 2 <i>Eurhynchium praelongum</i> ( <i>Brachytheciaceae</i> ) + <i>Polytrichum</i> cf. <i>pilosum</i> ( <i>Polytrichaceae</i> )	einheitlich, ca. 70 % deckend 4 <i>Scleropodium purum</i> ( <i>Brachytheciaceae</i> )

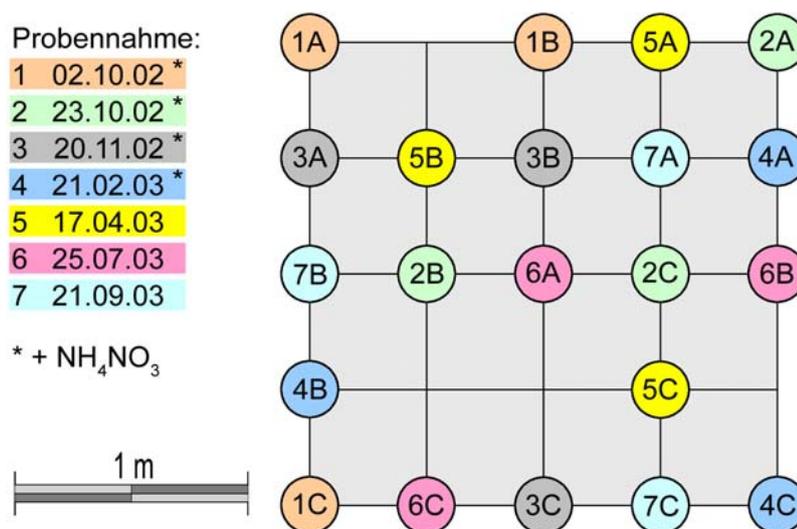
**Legende zu Tabelle 2:** Als Versuchsflächen wurden zwei vergleichbare ebene Parzellen ohne Baumbestand ausgewählt (10 m Distanz zwischen den Flächen). Die Artenlisten wurden aus zwei Vegetationsaufnahmen am 02. Oktober 2002 und am 17. April 2003 kombiniert. Die Vegetation beider Flächen war – abgesehen von der Moosschicht – fast identisch. Für jede Art ist die geschätzte Mächtigkeit mit Symbolen der siebenstufigen Skala nach BRAUN-BLANQUET angegeben: **r** = sehr selten (1 - 5 Exemplare), **+** = spärlich mit geringem Deckungsgrad (< 1 %), **2** = Deckungsgrad 5 - 24 %, **4** = Deckungsgrad 50 - 75 %. Die als Düngung angegebene Menge Stickstoff wurde auf vier Zeitpunkte verteilt in Form von NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>-Pulver ausgebracht (siehe Text).

Eine Versuchsfläche (Bild 3a) wurde zu vier verschiedenen Zeitpunkten (02. Oktober, 23. Oktober, 20. November 2002 und 21. Februar 2003) gedüngt. Bei jeder Düngung wurden 625 mmol pulverförmiges Ammoniumnitrat ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) pro  $\text{m}^2$  ausgestreut, so dass die Gesamtmenge des eingebrachten Stickstoffs bei  $5 \text{ mol N pro m}^2$  lag (entspricht  $700 \text{ kg N} \cdot \text{ha}^{-1}$ ). Um Randeffekte auszuschließen, wurden insgesamt  $16 \text{ m}^2$  gedüngt, wobei die zentralen  $4 \text{ m}^2$  die Versuchsfläche darstellten. Gedüngt wurde jeweils unmittelbar nach Entnahme der Bodenproben.

## 2.2.2 Entnahme, Aufarbeitung und Lagerung der Bodenproben

Von beiden Versuchsflächen wurden Dreifachproben zu je sieben Zeitpunkten im Verlauf eines Jahres genommen (Bild 4). Für die Entnahme der Bodenproben wurde die Streuschicht am betreffenden Punkt entfernt. Dann wurden mit PVC-Rohren (Länge 25 cm, 2 cm Innendurchmesser) Bohrkern für molekularbiologische Experimente (ab Kapitel 2.4) und andere Analysen (2.3.1 bis 2.3.3) entnommen. Für Elementaranalysen (2.3.4) wurde aus dem gleichen Bereich jeweils ca.  $\frac{1}{4} \text{ L}$  Boden in PE-Tüten abgefüllt – allerdings aus einer Fläche von etwa  $5 \times 10 \text{ cm}^2$ , um ausreichend Boden der oberen 20 cm zu erhalten. Die Bodenproben wurden in einer Thermobox gekühlt ins Labor transportiert, wo die Proben für die Elementaranalysen bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  eingefroren wurden; der Versand dieser Proben zum Analyzelabor erfolgte auf Trockeneis. Die Bohrkern wurden zuerst homogenisiert, wobei gröbere Wurzel- und Blattreste manuell entfernt wurden. Ein Drittel dieser Proben wurde für spätere DNA-Extraktionen eingefroren ( $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ ), während der Rest zur Bestimmung von Wassergehalt, Dichte und pH-Wert des Bodens, sowie zur Korngrößenanalyse diente.

**Bild 4:** Raster der Entnahme von Bodenproben aus den Dünnwald-Versuchsflächen



*Legende zu Bild 4:* Schematische Darstellung der Probenfläche im Dünnwald. Die Bodenproben wurden an den Schnittpunkten des Rasters entnommen. Die Nummern in den Kreisen beziehen sich auf die Zeitpunkte der Probennahme wie links aufgeführt; die Dreifachproben wurden mit den Buchstaben A, B und C bezeichnet. Zu den ersten vier Zeitpunkten wurde eine Fläche nach Probenentnahme gedüngt, während die Kontrollfläche für alle Zeitpunkte ungedüngt blieb.

## 2.3 Bodenanalysen von Dünnwaldproben

### 2.3.1 Messung der Bodenazidität

Der pH-Wert wurde aus einer wässrigen Bodensuspension gemessen (PHM 61 Laboratory pH Meter, Radiometer, Kopenhagen). Hierfür wurden 2,0 g einer Bodenprobe in ein Szintillationsröhrchen eingewogen und mit 5 mL H<sub>2</sub>O (demin.) auf einem Schüttler aufgeschlämmt. Der pH wurde als Mittelwert der zu fünf verschiedenen Zeitpunkten gemessenen Werte berechnet: ¼, 1, 4, 24 und 48 h nach der Aufschlämmung. Die pH-Werte der Dreifachproben A, B und C (Bild 4) wurden separat gemessen, für die Auswertung aber gemittelt. Der Ablesefehler einer Einzelmessung betrug  $\pm 0,02$ .

### 2.3.2 Bestimmung des Wassergehalts von Bodenproben aus dem Dünnwald

Der Wassergehalt jeder Dreifachbodenprobe (A, B und C) wurde aus dem Massenverlust von 50 g frischem Boden nach Trocknung in einem Alutiegel (48 h, 105 °C) bestimmt. Die Masse wurde mit einer Analysenwaage (BL 150 S, Sartorius, Göttingen) auf  $\pm 0,01$  g genau bestimmt.

### 2.3.3 Bestimmung der Bodenart durch Ermittlung der Kornfraktionen

Die relativen Anteile verschiedener Korngrößenfraktionen wurden ermittelt, um die Bodenart zu bestimmen. Es wurde eine Kolonne aus vier Sieben mit Maschenweiten von 1000  $\mu\text{m}$ , 500  $\mu\text{m}$ , 80  $\mu\text{m}$  und 45  $\mu\text{m}$  verwendet. Zusätzlich wurde der Skelettanteil (mineralische Partikel > 2 mm) bestimmt. Der Anteil von Partikeln < 45  $\mu\text{m}$  konnte aus der Massendifferenz der eingesetzten Bodenmenge und der Summe der einzelnen Fraktionen abgeleitet werden. Es wurden etwa 45 g einer getrockneten Bodenprobe (2.3.2) auf die Siebkolonne gegeben. Nach Auswaschen mit Wasser wurden die einzelnen Fraktionen komplett in Aluminium-Tiegel bekannter Masse gefüllt. Die Fraktionen wurden getrocknet (48 h, 105 °C) und anschließend gewogen. Der Wägefehler lag für jede Messung bei  $\pm 0,01$  g (BL 150 S, Sartorius).

### 2.3.4 Elementaranalysen von Bodenproben

Die Elementaranalytik wurde extern am Forschungszentrum Jülich unter der Leitung von Dr. A. Kuhn (Institut für Phytosphäre III) ausgeführt. Der Gesamtgehalt an C, N, S und H wurde durch vollständige Verbrennung einer Bodenprobe bei 1150 °C bestimmt. Die im Sauerstoffstrom entstandenen Gase CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> und SO<sub>2</sub> wurden mit einem Wärmeleitfähigkeitsdetektor quantifiziert. Zur CNSH-Analyse wurden gleiche Teile jeder der drei Dreifachproben (vergleiche Bild 4, S. 15) gemischt und homogenisiert. Daher lag pro Zeitpunkt und pro Fläche nur ein Wert für den Gehalt der vier Elemente vor. Zur Berechnung des molaren Kohlenstoff-zu-Stickstoff-(C/N-)Verhältnisses wurde der Massenanteil an C mit 14/12 multipliziert und durch den Massenanteil an N geteilt. Das C/N-Verhältnis diente als Maß für die Verfügbarkeit von N im Boden; denn je niedriger der Wert ist, desto stickstoffreicher ist ein Boden.

Aus der zentrifugierten Bodenlösung von 10 g Boden wurde die Konzentration von  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  und  $\text{NH}_4^+$  mit einem relativen Fehler von  $\pm 3\%$  bestimmt. Zusätzlich wurde aus der Bodenlösung über Induktiv-gekoppelte-Plasma/Atom-Emissions-Spektroskopie (ICP-AES) die Konzentration von Na, K, Mg, Ca, Al, P, S, Mn und Fe bestimmt. Die Detektionsgrenzen lagen für Ca und Mg bei unter 1 ppb, für Na, Al, Mn und Fe bei unter 10 ppb.

## 2.4 Extraktion von Boden-DNA als Ausgangsmaterial für molekularbiologische Versuche

Die Gesamt-DNA aus einer Bodenprobe wurde mit dem UltraClean Soil DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories, Solana Beach, USA) extrahiert. Vom Protokoll des Herstellers abweichend wurden 50 mg statt bis zu 500 mg einer homogenisierten Bodenprobe eingesetzt. Der Boden wurde zusammen mit 60  $\mu\text{L}$  S1 und 200  $\mu\text{L}$  IRS-Lösung (beide MoBio Labs.) in die mitgelieferten Reaktionsgefäße für den Zellaufschluß gegeben. Der Zellaufschluß folgte dem alternativen Protokoll des Herstellers: 10 min Inkubation bei 70 °C mit gelegentlichem Durchmischen auf einem Vortex-Gerät. Nach Zentrifugieren (1 min 10.000 g, Sigma 2K15) wurde der Überstand abgenommen, mit 250  $\mu\text{L}$  S2 (MoBio Labs.) vermischt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Ausfällungen wurden durch eine Zentrifugation (30 min bei 18.300 g; Sigma 2K15) sedimentiert. Die DNA aus 450  $\mu\text{L}$  des Überstandes wurde nach Protokoll an Membranfilter gebunden, gewaschen und in 50  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  (Millipore) eluiert. Das Ergebnis der Extraktion wurde auf einem 0,7 %igen Agarosegel überprüft (2.6).

## 2.5 Polymerase-Kettenreaktion zur Vervielfältigung von DNA

Die Polymerase-Kettenreaktion oder PCR diente der selektiven Vervielfältigung von Genabschnitten. Diese Technik war Grundlage zur Erstellung von Klonbibliotheken (2.8), bei der DNA-Sequenzierung (2.10) und bei RFLP (2.9) und tRFLP (2.14). Zur Erstellung von Klonbibliotheken und für RFLP-Experimente wurde die PCR auf einem Personal Cycler (Biometra, Göttingen) als *hot start* PCR (Chou *et al.* 1992) durchgeführt, bei der die Reaktionsansätze vor Zugabe von 2 U *Taq*-DNA-Polymerase (aus dem MasterTaq Kit von Eppendorf, Hamburg) für 4 min bei 97 °C denaturiert wurden. In einem PCR-Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 25  $\mu\text{L}$  befanden sich neben 10,0  $\mu\text{L}$  TaqMaster (Eppendorf) und 7,5  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  (Millipore): 2,5  $\mu\text{L}$  TaqPuffer (Eppendorf), 2,0  $\mu\text{L}$  dNTP-Mix ( $4 \times 2,5$  mM; Eppendorf), je 1,0  $\mu\text{L}$  Forward- und Reverseprimer (50  $\mu\text{M}$ ; Sigma-Ark, Darmstadt) und 1,0  $\mu\text{L}$  Template-DNA (10 - 50 pg für Plasmide, > 500 ng für Boden-DNA). Von den beiden Zeit-Temperatur-Programmen (siehe unten) fand das eine (Pr. A) zur partiellen Amplifizierung von *nifH* und *nosZ*, das andere (Pr. B) für das 16S rRNA-Gen Verwendung. Bei beiden Programmen wurde die Temperatur für die Primerbindung (*annealing*) nach dem *touch down*-Prinzip (Don *et al.* 1991) zyklweise gesenkt:

Programm Nr. A (*nifH*, *nosZ*)

1 Zyklus 20 s 96 °C, 30 s 65 °C, 30 s 72 °C  
 2 Zyklen 20 s 96 °C, 30 s 62 °C, 35 s 72 °C  
 3 Zyklen 20 s 96 °C, 30 s 59 °C, 40 s 72 °C  
 4 Zyklen 20 s 96 °C, 30 s 56 °C, 45 s 72 °C  
 5 Zyklen 20 s 96 °C, 30 s 53 °C, 50 s 72 °C  
 25 Zyklen 20 s 94 °C, 45 s 50 °C, 60 s 72 °C  
 10 min 72 °C (Endelongation)

Programm Nr. B (16S rDNA)

1 Zyklus 20 s 94 °C, 30 s 66 °C, 30 s 72 °C  
 2 Zyklen 20 s 94 °C, 30 s 64 °C, 35 s 72 °C  
 3 Zyklen 20 s 94 °C, 30 s 62 °C, 40 s 72 °C  
 6 Zyklen 20 s 94 °C, 30 s 60 °C, 45 s 72 °C  
 28 Zyklen 30 s 94 °C, 40 s 56 °C, 60 s 72 °C  
 15 min 72 °C (Endelongation)

Die Details zu den PCR-Primern sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Die Primer für das bakterielle 16S rRNA-Gen wurden in den Kombinationen 27F/1495R, 63f/1387r und 63f/778R eingesetzt. Die Länge der PCR-Produkte betrug etwa 1500, 1300 bzw. 700 bp; die exakten Produktgrößen schwankten je nach Bakterienstamm. Die für die DNA-Sequenzierung und die tRFLP durchgeführten PCR-Reaktionen sind in 2.10.1 bzw. 2.14.1 beschrieben.

**Tabelle 3: Übersicht der verwendeten PCR-Primer**

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	T <sub>m</sub> , calc.	Bindestelle	Ref.
<b>bakterielles 16S rRNA-Gen</b>				
27F	gag agt ttg atc ctg gct cag	54 °C	7-27 Ec	(1)
1495R	cta cgg cta cct tgt tac ga	52 °C	1495-1514 Ec	(1)
63f	cag gcc taa cac atg caa gtc	54 °C	43-63 Ec	(2)
1387r	ggg cgg Wgt gta caa ggc	51 °C	1385-1402 Ec	(2)
685F	gta gcg gtg aaa tgc gta ga	53 °C	685-704 Ec	(6)
778R	agg gta tct aat cct gtt tgc	50 °C	778-798 Ec	(6)
GENER-F	cag cag tgg gga ata tgg gac aat ggg	61 °C	305-331 Ab, 318-344 Sm	(4)
AZOSP-R	cgg ctt gtc acc ggc Rgt tYc Rcc	58-65 °C	1078-1101 Ab	(4)
RHIZO-R	tcg gct tat cac cgg cag tcc ctt t	62 °C	1094-1118 Sm	(4)
<b><i>nifH</i></b>				
nifH-F	aaa ggY ggW atc ggY aaR tcc acc ac	58-62 °C	31-56 Av	(3)
nifH-R	ttg ttS gcS gcR tac atS gcc atc at	58-64 °C	466-491 Av	(3)
nifH-Rb	tgW gcY ttg tcY tcR cgg atB ggc at	60-67 °C	412-437 Av	(6)
nifH-Rc	tgg gcY ttg ttY tcR cgg atY ggc at	60-65 °C	412-437 Av	(6)
<b><i>nosZ</i></b>				
nosZ-F	cgY tgt tcM tcg aca gcc ag	56-59 °C	1211-1230 Pd	(3)
nosZ-R	cat gtg cag Ngc Rtg gca gaa	55-61 °C	1897-1917 Pd	(3)
nosZ-Fb	aac gcc taY acS acS ctg ttc	46-56 °C	1198-1218 Pd	(5)
nosZ-Rb	tcc atg tgc agN gcR tgg cag aa	58-63 °C	1897-1919 Pd	(5)

*Legende zu Tabelle 3:* In der Primerbezeichnung ist mit „F“ bzw. „R“ angegeben, ob es sich um einen Forward- oder Reverseprimer handelt. Die Sequenz aller Primer ist in der Richtung 5'→3' angegeben. (M = a oder c, N = a, c, g oder t, R = a oder g, S = c oder g, V = a, c oder g, W = a oder t, Y = c oder t). Die Schmelztemperatur T<sub>m</sub> der Primer wurde per *Nearest Neighbor*-Methode unter Berücksichtigung der degenerierten Positionen für eine Salzkonzentration von 50 mM Na<sup>+</sup> berechnet (<http://www.basic.nwu.edu/biotools/oligocalc.html>). Die Position, an der der Primer im Gen bindet, ist beispielhaft für jeweils eine Sequenz angegeben: für das 16S rRNA-Gen Ab *Azospirillum brasilense* (X79739), Sm *Sinorhizobium meliloti* (NC\_003047), Ec *Escherichia coli* (NC\_000913, *rrsD*-Gen); Av *Azotobacter vinelandii* (X13519) für *nifH* und Pd *Paracoccus denitrificans* (X74792) für für *nosZ*. Referenz: (1) Weisburg *et al.* 1991, (2) Marchesi *et al.* 1998, (3) Rösch *et al.* 2002, (4) Rösch 2001, (5) Eilmus 2005. (6) diese Arbeit.

## 2.6 Agarosegel-Elektrophorese von DNA-Fragmenten

Die Länge von DNA-Fragmenten wurde elektrophoretisch auf Agarosegelen bestimmt. Zudem konnten mit dieser Methode unterschiedlich große Fragmente innerhalb einer Probe getrennt werden. Solche Proben waren PCR-Produkte (2.5), Produkte aus einem Restriktionsverdau (2.8.6 oder 2.9) oder extrahierte Boden-DNA (2.4). Als Elektrophoresepuffer diente TAE-Puffer, der als 50fach konzentrierte Stammlösung (2 M Tris, 50 mM Na<sub>2</sub>-EDTA, pH 8,0 Eisessig) angesetzt wurde. Für den Fluoreszenz-Nachweis von DNA wurde dem heißen Gel vor dem Gießen in die Gelträger der Farbstoff Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5 µg/mL hinzugegeben. Die verwendeten Gelträger waren für 50 mL-Gele ausgelegt, die entsprechenden Kämme für ein Auftragsvolumen von 20 µL pro Spur. Die Probe wurde mit Auftragspuffer (50 % Glycerin v/v, 0,1 % Bromphenolblau w/v) im Verhältnis 4+1 versetzt und in eine Tasche des verfestigten Gels gegeben. Die Elektrophorese wurde bei einer Feldstärke von 10 V/cm durchgeführt (bei RFLP-Gelen 3 V/cm). Als Längenstandards fanden der GeneRuler 1 kb DNA Ladder und der GeneRuler 100 bp DNA Ladder (beide Fermentas, St. Leon-Rot) Verwendung. Für DNA-Mengenabschätzungen wurde der MassRuler Low Range DNA Ladder (Fermentas) eingesetzt. Die Dokumentation der Gele erfolgte mit dem Gel Jet Imager 2000 (Intas, Göttingen).

## 2.7 Aufreinigung von DNA-Proben für Klonierungen und zum Einsatz in PCR-Reaktionen

### 2.7.1 Ausfällung von DNA aus wässriger Lösung

Zur Entfernung von Kontaminanten wurde DNA aus wässriger Lösung mithilfe von Ethanol (Rotisol, Roth) oder Isopropanol (Roth) gefällt. Hierzu wurden ein Zehntel Volumen Kaliumacetat (3 M, pH 4,8) und nach Mischen 0,7 Volumen Isopropanol bzw. 2,5 Volumen Rotisol in die DNA-Lösung gegeben. Nach ein bis zwei Stunden Inkubation bei -20 °C wurde die DNA durch 1 h Zentrifugieren (4 °C, 18.300 g, Sigma 2K15) pelletiert und dann nochmals mit 500 µL 70 % Rotisol gewaschen (10 min 18.300 g, Sigma 2K15). Die Trocknung zur Entfernung von Alkoholresten erfolgte in einer SC100-Vakuumentrifuge (Savant, Farmingdale, USA). Durch Hinzufügen von 50 µL H<sub>2</sub>O (steril) konnte die trockene DNA innerhalb weniger Minuten wieder gelöst werden. Die Alkoholfällung wurde auch zur Konzentrierung von DNA angewandt, um die DNA nach der Fällung in einem kleineren als dem Ausgangsvolumen zu lösen.

### 2.7.2 Elution von DNA aus Agarosegelen

DNA aus Agarosegelen wurde mit dem QiaQuick oder dem MinElute Gel Extraction Kit (beide Qiagen, Hilden) nach dem Protokoll des Herstellers eluiert. Die Banden, die die DNA-Proben enthielten, wurden auf einem UV-Tisch (312 nm) mit einem Skalpell ausgeschnitten. Alle PCR-Produkte wurden vor der Klonierung, vor RFLP- und tRFLP-Experimenten derart aufgereinigt.

Alternativ wurden Ultrafree-MC 0,65  $\mu\text{m}$  Filter (Millipore, Bedford, USA) zur Eluierung von DNA aus Gelen eingesetzt. Die Säulchen wurden mit den ausgeschnittenen Gelstücken beladen und 5 min bei 5000 g zentrifugiert (Sigma 2K15). Die Membran erlaubt nach dem Prinzip eines Molekularsiebes das Passieren von der DNA-/Pufferlösung, nicht aber von Agarose. Der DNA-enthaltende Durchfluß wurde aus dem Auffanggefäß abpipettiert und zur weiteren Verwendung gefällt (2.7.1). Nach Entfernung der Gelstücke mit einem Spatel und zweimaligem Waschen mit je 700  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  (Millipore) konnten die Säulchen wiederverwendet werden.

## 2.8 Erstellung von Klonbibliotheken als eine Grundlage zur Erfassung der Diversität von Bodenbakterien

### 2.8.1 Erzeugung Transformations-kompetenter Zellen

Die Erstellung von Klonbibliotheken erforderte Transformations-kompetente Zellen. Zur Erzeugung dieser wurde zunächst eine Vorkultur mit *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  in einem Reagenzglas mit 5 mL  $\Psi$ -Medium angelegt und über Nacht bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert. Von dieser Vorkultur wurde 1 mL abgenommen und in 100 mL auf 37 °C vorgewärmtem  $\Psi$ -Medium gegeben. Es wurde auf dem Rundschtüttler (37 °C, 300 rpm) inkubiert, bis die Kultur eine optische Dichte von  $\text{OD}_{550\text{ nm}} = 0,48$  erreicht hatte. Anschließend wurde die Kultur in auf 4 °C vorgekühlte SS34-Zentrifugenbecher überführt und bei 4 °C für 10 min bei 2000 g in einer Kühlzentrifuge (Hettich Rotixa KS) sedimentiert. Alle nachfolgenden Schritte wurden auf Eis in einem Kühlraum (4 °C) durchgeführt. Die sedimentierten Zellen wurden in 15 mL Tfb1 (s. u.) durch Schwenken resuspendiert und dann 2 h auf Eis inkubiert. Nach 5 min Zentrifugation (2000 g, 4 °C; Hettich Rotixa KS) wurde das Sediment in 2 mL Tfb2 resuspendiert und danach in 50  $\mu\text{L}$ -Aliquots auf 1,5 mL-Reaktionsgefäße verteilt. Die Aliquots mit den kompetenten Zellen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

$\Psi$ -Medium (zu autoklavieren):	BactoTrypton	20 g
	BactoHefeextrakt	5 g
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	4 g
	KCl (10 mM)	750 mg
	$\text{H}_2\text{O}$ (demin.)	ad 1000 mL
	pH 7,6 (KOH)	
Tfb1 (mit 0,2 $\mu\text{m}$ -Filter zu sterilisieren):	$\text{RbCl}_2$ (100 mM)	1210 mg
	$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ (50 mM)	990 mg
	Kaliumacetat (30 mM)	200 mg
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (10 mM)	150 mg
	Glycerin	15 mL
	$\text{H}_2\text{O}$ (demin.)	ad 100 mL
	pH 5,8 (0,2 M Essigsäure)	

TfB2 (mit 0,2 µm-Filter zu sterilisieren):	CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O (75 mM)	220 mg
	RbCl <sub>2</sub> (10 mM)	20 mg
	MOPS (10 mM)	40 mg
	Glycerin	3 mL
	H <sub>2</sub> O (demin.)	ad 20 mL
	pH 7,0	

### 2.8.2 Ligation aufgereinigter PCR-Produkte in Klonierungsvektoren

Als Klonierungsvektor diente pGEM<sup>T</sup>-Easy (Promega, Mannheim). Dieser 3 kbp-Vektor ist an der Klonierungsstelle innerhalb des β-Galactosidasegens linearisiert und durch einen 3'-T-Überhang modifiziert. Da die *Taq*-DNA-Polymerase am 3'-Ende der Produkte unspezifisch ein zusätzliches A anhängt (Hu 1993), konnten PCR-Produkte direkt in pGEM<sup>T</sup>-Easy inkloniert werden.

Die Konzentration des aufgereinigten PCR-Produktes wurde photometrisch bestimmt. Gemäß der Empfehlung des Herstellers wurde das zu klonierende PCR-Produkt im molaren Verhältnis von etwa 1+1 zum Vektor eingesetzt. Im Ligationsansatz befanden sich neben dem PCR-Produkt 1 µL (50 pmol) des Vektors, 5 µL eines doppelt konzentrierten Ligasepuffers (Promega) sowie 1 µL T4-Ligase (Promega). Das Gesamtvolumen wurde mit H<sub>2</sub>O (Millipore) auf 10 µL aufgefüllt. Vor der Transformation (2.8.3) wurde entweder 1 h bei RT inkubiert oder über Nacht bei 4 °C.

### 2.8.3 Transformierung kompetenter Bakterien

Von den nach Vorschrift 2.8.1 erzeugten transformations-kompetenten Zellen wurden 50 µL-Aliquots auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe des kompletten Ligationsansatzes (2.8.2) wurde für mehrere Stunden auf Eis inkubiert, um eine Anlagerung der Plasmide an die *E. coli*-Zellwände zu ermöglichen. Die Aufnahme des Plasmids wurde durch einen Hitzeschock (3 min 42 °C; Personal Cycler, Biometra) mit anschließendem Abkühlen auf Eis erreicht. Durch Zugabe von 950 µL LB-Medium und Inkubation bei 37 °C wurde das Wachstum der Kultur gestartet. Nach 1 h wurden 100 µL dieser Kultur auf Selektionsplatten ausgestrichen. Diese enthielten pro mL LB-Agar (2.1.2.2) 50 µg Ampicillin, 20 µg X-Gal und 40 µg IPTG; die Stammlösungen wurden wie in Sambrook *et al.* (1989) beschrieben angesetzt. Die Zellen aus dem Rest der Vorkultur wurden pelletiert (5 min 2500 g), nach Dekantieren des Überstandes im Restvolumen resuspendiert und auf einer zweiten LB-Selektionsplatte ausgestrichen.

### 2.8.4 Blau-Weiß-Selektion von transformierten Bakterien

Die nach Abschnitt 2.8.3 erzeugten Transformanten wurden nach der Methode des *blue-white screenings* selektiert (Sambrook *et al.* 1989). Nur Bakterien, die ein Plasmid ohne Insert aufgenommen hatten, konnten das synthetische Substrat X-Gal spalten (Mühlhardt 1999). Die hierdurch hervorgerufene Blaufärbung erlaubte die Unterscheidung von solchen Klonen, die ein Plasmid mit Insert aufgenommen hatten (farblos). Aus letzteren wurden die Plasmide isoliert (2.8.5) und nach Aufreinigung und Überprüfung (2.8.6) zur DNA-Sequenzierung (2.10) eingesetzt.

### 2.8.5 Plasmid-Minipräparation

Die Isolierung von Plasmiden aus transformierten Zellen erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly 1979). Von den Nährböden aus der Blau-Weiß-Selektion (2.8.4) wurden farblose Klone mittels einer Impfföse in Reagenzgläser mit 3 mL LB-Medium (2.1.2.2) überführt. Die Kulturen wurden über Nacht bei 37 °C auf einem Rundschüttler (300 rpm) inkubiert. Das Zellmaterial wurde durch Zentrifugieren von 1,8 mL dieser Kulturen in 2 mL-Reaktionsgefäßen (5 min 18.300 g, Sigma 2K15) gewonnen. Die Zellen wurden in 50 µL Lösung I (50 mM Glucose, 25 mM Tris·HCl pH 8,0, 10 mM EDTA) durch Reiben der Reaktionsgefäße über ein Metallgitter resuspendiert. Nach 2 min wurden zur Lyse der Zellen 150 µL Lösung II (0,2 M NaOH, 5 % SDS w/v) hinzugegeben; das Mischen erfolgte durch Invertieren der Reaktionsgefäße. Nach weiteren 2 min kamen 100 µL Lösung III (3 M Kaliumacetat pH 4,8) hinzu, um Proteine, genomische DNA und die Dodecylsulfationen auszufällen. Nach Zentrifugation (10 min 18.300 g, Sigma 2K15) wurde der Überstand in frische 1,5 mL-Reaktionsgefäße überführt, in die 350 µL Isopropanol vorgelegt waren. Die Plasmide wurden nach 0,5 h Inkubation bei RT durch Zentrifugation pelletiert (30 min 18.300 g, Sigma 2K15) und mit 70 %igem Rotisol (Roth, Karlsruhe) gewaschen. Die getrockneten Plasmide (Vakuumzentrifuge SC100, Savant) wurden in 30 µL einer RNase A-Lösung (10 µg/mL; Boehringer, Mannheim) aufgenommen. Diese RNase-Lösung wurde vor Gebrauch aus einer 100fach konzentrierten Stammlösung verdünnt und für 10 min in einem Thermocycler (PersonalCycler, Biometra, Göttingen) auf 100 °C erhitzt, um DNasen zu inaktivieren. Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C wurden 470 µL H<sub>2</sub>O (demin.) und anschließend 500 µL eines Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (25+24+1) zugegeben. Nach Ausschütteln der Proben wurden die Phasen durch Zentrifugieren (10 min 18.300 g, Sigma 2K15) wieder getrennt. Die wässrige Oberphase wurde in neue 1,5 mL-Reaktionsgefäße überführt und mit 50 µL Kaliumacetat (3 M, pH 4,8) versetzt. Nach Fällung, Waschen und Trocknen wie oben beschrieben wurden die Plasmide in 30 µL H<sub>2</sub>O (Millipore) gelöst.

### 2.8.6 Kontrolle der Insertgröße

Die Größe der in die Plasmide inserierten Fragmente wurde durch einen Restriktionsverdau, gefolgt von einer Gelelektrophorese, überprüft. Hierzu wurde das Insert mit der Restriktionsendonuklease *EcoRI* aus dem Plasmid ausgeschnitten; der Vektor pGEM<sup>T</sup>-Easy ist mit *EcoRI*-Schnittstellen beiderseits der Insertionsstelle ausgestattet. Der Restriktionsansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 15 µL neben 3,0 µL der Plasmidlösung 1,5 µL *EcoRI*-Puffer und 0,5 µL des Enzyms selbst (beide Fermentas). Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C wurde der gesamte Restriktionsansatz auf ein Agarosegel aufgetragen. Neben den Banden für die verschiedenen Konformationen des Plasmids, wurde in der Regel eine einzige Insertbande erhalten. Die längeren PCR-Produkte des 16S rRNA-Gens (27F/1495R und 63f/1387r) konnten jedoch auch intern eine *EcoRI*-Schnittstelle enthalten, so dass in diesen Fällen zwei Insertbanden auf dem Gel erschienen. Plasmide mit der erwarteten Insert-Größe wurden zur späteren DNA-Sequenzierung (2.10) bei -20 °C aufbewahrt.

## 2.9 Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP)

Der Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus diente als Kontrolle bei der tRFLP (2.14.6), wurde aber auch eingesetzt, um die Identität kultivierter Laborstämme (2.1.1) zu überprüfen.

Bei einem RFLP-Versuch wurden aufgereinigte PCR-Produkte (2.5, 2.7.2) in vier bis sechs parallelen Ansätzen durch Restriktionsendonukleasen fragmentiert. Pro Enzym wurden hierfür etwa 1 - 2 µg Probe-DNA eingesetzt. Die Restriktionsansätze hatten ein Gesamtvolumen von 15 µL und enthielten neben der DNA-Probe 0,5 µL Enzym (Fermentas, St. Leon-Roth) und 1,5 µL Puffer (Fermentas). Nach 2 h Inkubation bei 37 °C wurden die Ansätze auf 68 °C (10 min) erhitzt, um die Enzyme zu inaktivieren. Anschließend wurden die kompletten RFLP-Ansätze auf ein 3 %iges Agarosegel aufgetragen (2.6). Die Detektion und Dokumentation der Fragmente erfolgte nach 3 h Elektrophorese (3 V/cm) wie in Abschnitt 2.6 beschrieben. Zur exakten Größenbestimmung der Fragmente wurde die Laufstrecke der Banden auf einem Gelphoto ausgemessen; die Fragmente des Größenstandards (100bp DNA Ladder, Fermentas) dienten zur Eichung.

Für RFLPs wurden die folgenden Restriktionsenzyme verwendet (alle Fermentas): *AluI* (cg/at), *Bsh1236I* (cg/cg), *HaeIII* (gg/cc), *Hin6I* (c/gcg), *Hinfi* (g/aNtc), *MboI* (/gatc), *MspI* (c/cgg) oder *RsaI* (gt/ac). Es wurden nur Verdauungen mit je einem Enzym pro Ansatz durchgeführt.

## 2.10 DNA-Sequenzierung nach dem Kettenabbruchverfahren

### 2.10.1 Sequenzier-PCR

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach dem Kettenabbruchverfahren (Sanger *et al.* 1977). Hierzu wurde das Big Dye v1.1 Sequencing Kit (Applied Biosystems, Darmstadt) verwendet. Die Sequenzier-PCR wurde auf einem GeneAmp 5700 (Applied Biosystems) in Streifen von 0,2 mL-Mikroreaktionsgefäßen durchgeführt. Die PCR erfolgte in 35 Zyklen (15 s 96 °C, 15 s 50 °C, 4 min 60 °C). Pro Sequenzieransatz wurden 1,0 µL Plasmidlösung (2.8.5), 2,0 µL Big Dye v1.1, 1,0 µL Sequenzierpuffer (Applied Biosystems), 5,0 µL H<sub>2</sub>O (Millipore) sowie 1,0 µL eines Sequenzierprimers eingesetzt. Es wurden T7forw (gta ata cga ctc act ata ggg c) oder Sp6rev (ttt agg tga cac tat aga ata c) eingesetzt, die vor bzw. nach der Klonierungsstelle des pGEM<sup>T</sup>-Vektors (2.8.1) binden. Die mit den Primern 27F/1495R und 63f/1387 (Tabelle 3) amplifizierte 16S rDNA-Abschnitte wurden, falls es keine Überschneidung der T7- mit der Sp6-Sequenz gab, zusätzlich intern mit 685F und/oder 778R (Tabelle 3, S. 18) sequenziert. Die Fragmente aus der Sequenzier-PCR wurden über die automatischen Sequenziergeräte ABI 377 oder ABI 3100 (beide Applied Biosystems) detektiert (Sequenzierlabors Medizinische Fakultät oder Genetik, Universität Köln).

### 2.10.2 Manuelle Korrektur automatisch erstellter Sequenzen

Aus dem Elektropherogramm der automatischen Sequenzierung von klonierten PCR-Fragmenten wurde die Basenabfolge mit Hilfe des Programmes BioEdit 7.0 (Hall 1999) abgeleitet. Fehler wie

Basenverdopplungen oder übergangene Basen konnten meist durch manuelle Korrekturen beseitigt werden konnten. Durch ein mit ClustalX (Thompson *et al.* 1997) erstelltes *multiple sequence alignment* ließen sich auf Sequenzierfehler zurückgehende Insertionen bzw. Deletionen (Indels) bei den Genen *nifH* und *nosZ* feststellen, da sie Verschiebungen im Leseraster der DNA-Sequenzen zur Folge hatten. Im Falle des 16S rRNA-Gens waren solche Fehler weniger leicht auszumachen, da dieses Gen nicht translatiert wird. Bei allen Genen half darüber hinaus der Vergleich (ClustalX; Thompson *et al.* 1997) mit verwandten Sequenzen beim Auffinden von Fehlern.

### 2.10.3 Test auf chimäre Sequenzen

In einer PCR-Reaktion können chimäre Produkte entstehen, bei denen der 5'- und 3'-Teil von unterschiedlichen Template-Spezies stammen (von Wintzingerode *et al.* 1997). Dies ist besonders dann möglich, wenn das zu amplifizierende Genstück – wie das 16S rRNA-Gen – hoch konservierte Bereiche enthält.

Zum Aufspüren chimärer Sequenzen wurde zunächst ein *multiple sequence alignment* erstellt (ClustalX; Thompson *et al.* 1997). Hieraus wurden dann NJ-Phylogramme für die vordere und hintere Hälfte getrennt berechnet (ClustalX). Ließen sich diese beiden Phylogramme nicht in allen Großgruppen zur Deckung bringen, war dies ein Hinweis auf chimäre Sequenzen. Zusätzlich wurden die Alignments mit dem Programm Bellerophon (Huber *et al.* 2004) überprüft. Dieses basiert auf der Annahme, dass beim Auftreten von Chimären in einer Klonbibliothek auch die beiden „Elternsequenzen“ in der Bibliothek enthalten sind. Dieses Testverfahren war für *nosZ* und das 16S rRNA-Gen geeignet; die *nifH*-Sequenzen waren mit etwa 400 bp zu kurz für eine Überprüfung nach diesem Verfahren. Die 16S rDNA-Sequenzen wurden zusätzlich mit dem Programm ChimeraCheck (Larsen, o. A.) überprüft. Hierbei werden sämtliche in der GenBank (Benson *et al.* 2000) deponierten Sequenzen als potentielle Elternsequenzen von Chimären in Betracht gezogen. Aus dem Resultat, das in graphischer und in Tabellenform ausgegeben wird, ließ sich die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer chimären Sequenz abschätzen.

## 2.11 Zusammenfassung nahezu identischer Sequenzen zu Operational Taxonomic Units (OTUs)

Sequenzen, die in ihrer Basenabfolge sehr ähnlich waren, wurden zu *operational taxonomic units* (OTUs) zusammengefasst, um den Einfluß von PCR- und Sequenzierfehlern auf die Auswertungen von Klonbibliotheken zu minimieren. Hierzu wurde zunächst ein Alignment (ClustalX; Thompson *et al.* 1997) erstellt und für eine manuelle Korrektur in BioEdit 7.0 (Hall 1999) importiert. Zur Quantifizierung der Sequenzunterschiede diente eine Distanzmatrix (Boxshade; Hofmann und Baron o. A.). DNA-Sequenzen, die eine paarweise Homologie von mindestens 98 % aufwiesen, wurden manuell der gleichen OTU zugewiesen. Im Falle von *nifH* und *nosZ* wurden ca. 400 bzw. 700 bp lange Sequenzen, die den PCR-Produkten exklusive Primer entsprachen, für

die Definition der OTUs herangezogen. Bei der 16S rDNA hingegen wurden die OTUs nur über den 63/778-Bereich (etwa 700 bp) definiert, um direkte Vergleiche zwischen den Sequenzen der drei verwendeten Primerpaare (63f/778R, 63f/1387r, 27F/1495R) zu ermöglichen. Da die Unterschiede zwischen den Sequenzen der gleichen OTU gering waren ( $\leq 2\%$ ), wurde als Stellvertretersequenz einer OTU keine Consensus-Sequenz konstruiert, sondern anhand des Alignments (ClustalX) die Sequenz ausgewählt, die die geringsten Unterschieden zu den übrigen Sequenzen derselben OTU zeigte. Die jeweilige Sequenz, die die OTU in den folgenden Auswertungen vertrat, wurde als Prototyp bezeichnet. Die Klonbibliotheken (2.8) wurden auf der Basis von OTUs und nicht auf der einzelner Sequenzen ausgewertet.

## 2.12 Verwandtschaftsanalysen von Sequenz- oder tRFLP-Daten aus dem Dünnwaldboden

Verwandtschaftsanalysen wurden auf zwei Ebenen durchgeführt: erstens wurden aus dem Dünnwald erhaltene DNA-Sequenzen taxonomisch eingeordnet bzw. in Phylogrammen graphisch dargestellt (2.12.1 und 2.12.2). Zweitens wurde über eine Cluster-Analyse die Ähnlichkeit verschiedener Klonbibliotheken oder tRFLP-Profile zueinander untersucht (2.12.3).

### 2.12.1 Taxonomische Einordnung von Dünnwald-Sequenzen

Um einen ersten Überblick über die Taxonomie eines aus dem Dünnwaldboden erhaltenen OTUs zu erlangen, wurden mit dem BLAST-Suchalgorithmus (Altschul *et al.* 1990) die ähnlichsten Sequenzen innerhalb des Datenbestandes der GenBank (Benson *et al.* 2000) gesucht. Sequenzen des 16S rRNA-Gens konnten zudem mit dem RDP II Classifier (<http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>) taxonomisch eingeordnet werden. Auf dieser Methode beruht die in Tabelle 28 (Anhang) angegebene Klassifizierung, aber auch die taxonomische Auswertung der tRFLP-Ergebnisse mit der TREFID-Methode (2.15). Der Einordnung lag der *Naïve Bayesian rRNA Classifier Version 1.0* und die vom Bergey's Trust herausgegebene Systematik der Bakterien (Garrity *et al.* 2004) zugrunde. Der Algorithmus unterteilt 16S rDNA-Sequenzen 8 nt-Abschnitte und vergleicht deren Vorkommen in der Probe mit den erwarteten Häufigkeiten für bekannte Bakterien. Das Ergebnis ist eine hierarchische Einordnung, wobei für jede systematische Ebene die Zuverlässigkeit mit einem Prozentwert angegeben ist, z. B.:

Proteobacteria	[100%]
Alphaproteobacteria	[100%]
Rhodospirillales	[98%]
Rhodospirillaceae	[88%]
Skermanella	[51%]

Werte unter 70 - 80 % sind nicht signifikant. Im Beispiel wäre die Zuordnung daher nur bis zur Ebene der Familie (Rhodospirillaceae) sicher. Details zur Methode sind auf der angegebenen Internetseite zu finden (<http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>).

### 2.12.2 Phylogenetische Auswertung von DNA-Sequenzen

Die phylogenetische Auswertung diente dazu, die Diversität von OTUs aus dem Dünnwaldboden graphisch darzustellen und eine taxonomische Klassifizierung dieser OTUs vorzunehmen. Diese Klassifizierung wurde durch den Vergleich mit Referenzsequenzen aus der GenBank (Benson *et al.* 2000) ermöglicht, die über eine BLAST-Suche für die Prototypen der *nifH*- und 16S rDNA-OTUs aus dem Dünnwaldboden ausgewählt wurden (27/28. September 2004 bzw. 19/21. Oktober 2004). Für *nosZ* wurden am 5. Oktober 2004 alle Sequenzen ( $N = 399$ ) aus der GenBank geladen und für die phylogenetische Auswertung evaluiert.

Die BLAST-Ergebnisse für alle OTUs, die in einem gemeinsamen Stammbaum dargestellt werden sollten, wurden zusammengefasst und von Mehrfacheinträgen identischer Sequenzen bereinigt. Dann wurde mit den OTU-Prototypen ein gemeinsames Alignment erstellt (ClustalX 1.8.3; Thompson *et al.* 1997). Ohne Korrekturen wurde hieraus unter Ausschluß von Indel-Positionen und unter Berücksichtigung von Mehrfachsubstitutionen ein Neighbor-Joining-(NJ-)Phylogramm mit 100 *bootstraps*-Replikaten berechnet. Aus dem in TreeView 1.6.6 (Page 1996) dargestellten Phylogramm wurden die zu den Dünnwald-OTUs nächst-verwandten zwei bis fünf GenBank-Sequenzen ausgewählt. Mit dieser Auswahl wurde ein erneutes Alignment erstellt (ClustalX) und in BioEdit 7.0 (Hall 1999) manuell korrigiert. Aus dem korrigierten Alignment wurde die Phylogenie der Sequenzen nach dem Neighbor-Joining-(NJ-)Algorithmus (Saitou und Nei 1987) rekonstruiert (Phylo\_Win; Galtier *et al.* 1996). Für NJ-Phylogramme wurden 1000 *bootstrap*-Replikate unter Verwendung der Matrix von Tajima und Nei (1984) berechnet. Lücken im Alignment wurden sequenzpaarweise entfernt, so dass die Information charakteristischer Insertionen erhalten blieb. Die Phylogramme in TreeView (Page 1996) gewurzelten Phylogramme wurden in Powerpoint 2002 (Microsoft Corporation) graphisch aufbereitet.

### 2.12.3 Cluster-Analyse

Die Cluster-Analyse wurde durchgeführt, um verschiedene Klonbibliotheken und tRF-Profile auf ihre Ähnlichkeit hin zu untersuchen. Hierfür wurde das Computerprogramm Cluster 2.11 (Eisen 1999) verwendet, das zur Analyse von Expressionsdaten entwickelt wurde und das als Eingabe eine Tabelle mit Intensitätswerten für verschiedene Kategorien mehrerer unabhängiger Experimente benötigt. Bei der Analyse von Klonbibliotheken entsprachen die einzelnen OTUs den Kategorien und die verschiedenen Bibliotheken den Experimenten. Die Intensität war die Zahl der verschiedenen Klonbibliotheken, in denen das jeweilige OTU auftrat; ein bestimmtes OTU hatte in allen Bibliotheken, in denen es enthalten war die gleiche Intensität und in den Bibliotheken, in denen es fehlte eine Intensität von 0. Auf diese Weise wurde die Ähnlichkeit der verschiedenen Bibliotheken zueinander betont. Für den Vergleich von tRFLP-Profilen wurden die berechneten Fragmentgrößen der detektierten Peaks auf ganzzahlige Werte gerundet (54,89 nt  $\rightarrow$  55 nt). Um den Fehler der Größenbestimmung (2.14.5) zu berücksichtigen wurden anschließend die Fluoreszenzintensitäten (*rfu*) für überlappende 3 nt-Intervalle addiert:

experimentelle Rohdaten		gerundete Fragmentgrößen		Intensitäten über 3 nt-Intervalle	
54,89 nt	150 nt	54 nt	0 rfu	54 nt	150 rfu
		55 nt	150 rfu	55 nt	150 rfu
		56 nt	0 rfu	56 nt	8650 rfu
57,33 nt	8500 rfu	57 nt	8500 rfu	57 nt	8620 rfu
57,98 nt	120 rfu	58 nt	120 rfu	58 nt	9370 rfu
59,21 nt	750 rfu	59 nt	750 rfu	59 nt	870 rfu

In der Cluster-Analyse von tRFLP-Profilen wurden nur die tRFs ausgewertet, die nach den Modifikationen (s. o.) in mindestens zwei (16S rDNA) oder drei (*nifH*) tRFLP-Experimenten auftraten. Das Ergebnis von Cluster-Analysen wurden mit dem Programm TreeView 1.6 (Eisen 2002) visualisiert (nicht zu verwechseln mit TreeView 1.6.6 zur Darstellung von Phylogrammen; 2.12.2).

## 2.13 Methoden zur Beschreibung von Diversität

Die Diversität der Bakteriengemeinschaft im Dünnwaldboden wurde anhand von Klonbibliotheken auf molekularer Ebene beurteilt. Für eine quantitative Beschreibung von Diversität ist neben der bloßen Artenzahl (*species richness*) auch die Häufigkeitsverteilung der Arten in der Gemeinschaft, beschrieben durch die Ebenmäßigkeit (*species evenness*), von Bedeutung (Washington 1984; Begon *et al.* 1991; Hughes *et al.* 2001). Eine Gemeinschaft aus zehn Arten, von denen eine Art die Hälfte der Individuen stellt, ist unter Berücksichtigung der Ebenmäßigkeit weniger divers als eine Gemeinschaft, in der jede Art den gleichen Anteil an Individuen beisteuert. In dieser Arbeit entspricht eine Art einem OTU und ein Individuum einer DNA-Sequenz; die Gesamtindividuenzahl ist demnach der Zahl sequenzierter Klone gleichzusetzen.

### 2.13.1 Diversitätsindex nach SHANNON

Der gebräuchlichste Index für die Quantifizierung von Diversität ist der SHANNON-Index ( $H_S$ ), der nach folgender Formel berechnet wird:

$$H_S = -\sum_{i=1}^I p_i \ln p_i$$

Hierbei ist  $p_i$  die relative Häufigkeit mit der eine einzelne Art bezogen auf die Gesamtindividuenzahl einer Gemeinschaft mit  $I$  Arten vorkommt. Abweichend von Shannon (1948) wird hier – wie in der Ökologie gebräuchlich – der natürliche Logarithmus anstelle des zur Basis 2 benutzt. Die Ebenmäßigkeit in einer Gemeinschaft lässt sich als  $E_S = H_S / H_S^{\max} = H_S / \ln I$  angeben und kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen. Der SHANNON-Index wurde für Klonbibliotheken (3.2), aber auch für tRF-Daten berechnet. Letzteres diente der Evaluierung einzelner Restriktionsenzyme für die TReFID-Methode (2.15).

### 2.13.2 Rarefaction-Analyse von Klonbibliotheken

Die statistische Methode der Rarefaction-Analyse wird zur nachträglichen Korrektur von Daten angewandt, deren Erhebung unter nicht-standardisierten Bedingungen stattfand (Sanders 1968; Hurlbert 1971; Hughes *et al.* 2001). Mit dieser Analyse kann auf der Basis von Arten- und Individuenzahlen einer umfangreicheren Probe auf die Artenzahl für eine weniger umfangreiche Probe

geschlossen werden. Umgekehrt lässt sich beurteilen, wie gut die Gesamtprobe durch eine Teilprobe repräsentiert wird. Die Rarefaction-Analyse wurde mit dem Programm Analytic Rarefaction 1.3 (Holland 2003) durchgeführt. Als Eingabewerte dienten Anzahlen der Sequenzen pro OTU. Hieraus berechnete das Programm die Erwartungswerte für die Zahl an OTUs ( $E$ ) bis zur Individuenzahl der Probe (maximaler x-Wert) sowie die zugehörigen Varianzen ( $Var$ ). Das Konfidenzintervall wurde nach  $E \pm a\sqrt{Var}$  aus den Erwartungswerten und Varianzen berechnet; für das 95 %-Konfidenzintervall galt  $a = 1,96$ , für das 99 %-Interval  $a = 2,58$  (Schloss und Handelsman 2004). Die Rarefaction-Kurve, welche die erwartete Artenzahl ( $E$ ) in Abhängigkeit von der Individuenzahl in der Probe  $n$  graphisch darstellt, läßt eine Abschätzung der Gesamtdiversität zu, da sie einer Sättigungskurve ähnelt (Schloss und Handelsman 2004).

## 2.14 Terminaler Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus

Der terminale Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus, kurz tRFLP (Liu *et al.* 1997), diente der klonierungs-unabhängigen Charakterisierung von Bakteriengemeinschaften im Dünnwaldboden. Das Zielgen (*nifH*, *nosZ* oder 16S rDNA) wurde zunächst in einer PCR mit Fluorochrommarkierten Primern aus extrahierter Boden-DNA (2.4) partiell amplifiziert (2.14.1). Die PCR-Produkte wurden aufgereinigt (2.14.2) und mit bis zu 13 verschiedenen Restriktionsendonukleasen fragmentiert (2.14.4). Da bei der Detektion nur die Fragmente, die den Primer beinhalteten, Fluoreszenz zeigten, ließen sich so Peakmuster erstellen, die die Variabilität in der Lage der Schnittstellen bei den ursprünglichen PCR-Produkten widerspiegeln (2.14.5). Die fluoreszierenden Fragmente werden als terminale Restriktionsfragmente (tRFs) bezeichnet.

### 2.14.1 PCR mit Fluorochrom-markierten Primern

Die Markierungs-PCR diente dem Einbringen eines Fluoreszenzmarkers in das PCR-Produkt. Die Zusammensetzung der PCR-Ansätze war wie in Abschnitt 2.5 beschrieben. Die hier verwendeten Primer waren jedoch am 5'-Ende mit 6-Carboxyfluorescein (FAM), 6-Carboxy-1,4-dichloro-2',7'-dichlorofluorescein (TET), 6-Carboxy-4',5'-dichloro-2',7'-dimethoxyfluorescein (JOE) oder 6-Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA) markiert (MWG Biotech, Ebersberg). In jeder PCR wurde nur ein markierter Primer eingesetzt; bei *nifH* und der 16S rDNA waren dies *nifH*-F bzw. 63f und bei *nosZ* *nosZ*-R (vergleiche Tabelle 3, S. 18). Wegen der Lichtempfindlichkeit dieser Farbstoffe wurde vorwiegend abgedunkelt gearbeitet. Als Template diente aufgereinigtes PCR-Produkt aus einer ersten PCR mit unmarkierten Primern (2.5). Eine tRFLP mit 13 Enzymen benötigte etwa 1000  $\mu$ L PCR-Produkt, die in mehreren unabhängigen PCR-Reaktionen erzeugt wurden.

### 2.14.2 Aufreinigung Fluorochrom-markierter PCR-Produkte

Die markierten PCR-Produkte (2.14.1) wurden durch eine Ethanol-Fällung (2.7.1) konzentriert und dann auf einem Agarosegel aufgetrennt. Die Fragmente aus den ausgeschnittenen Produktbanden wurden über QiaQuick- oder Ultrafree-MC 0,65  $\mu$ m Filtersäulchen (2.7.2) eluiert.

### 2.14.3 Restriktionsendonukleasen für tRFLP-Experimente

Für tRFLP-Experimente wurden Restriktionsendonukleasen mit einer 4 bp-Erkennungssequenz eingesetzt:

/aatt	<i>TasI</i> ( <i>TspEI</i> )	cg/cg	<i>Bsh1236I</i> ( <i>FnuDII</i> )
acgt/	<i>TaiI</i> ( <i>MaeII</i> : a/cgt)	/gac	<i>MboI</i>
ag/ct	<i>AluI</i>	gg/cc	<i>HaeIII</i> ( <i>BsuRI</i> )
c/cgg	<i>MspI</i> ( <i>HpaII</i> )	gt/ac	<i>RsaI</i>
c/gcg	<i>Hin6I</i>	t/cga	<i>TaqI</i>

Zusätzlich wurden noch drei weitere Enzyme mit einer varianten Position in der Erkennungssequenz verwendet: *Bme1390I* (*ScrFI*) (cc/Ngg), *Hinfi* (g/aNtc) und *Cfr13I* (*AsuI*) (g/gNcc).

### 2.14.4 Restriktionsverdau der Fluorochrom-markierten Fragmente

Die aufgereinigten Produkte der Markierungs-PCR (2.14.1 und 2.14.2) wurden gleichmäßig auf dreizehn 1,5 mL-Reaktionsgefäße verteilt und mit H<sub>2</sub>O (Millipore) auf 90 µL aufgefüllt. Anschließend wurden 10 µL RE-Puffer und 1 µL Restriktionsenzym (beide Fermentas) hinzugegeben, so dass die markierten Produkte in jedem Aliquot mit einem anderen Enzym verdaut wurden. Die Ansätze wurden über Nacht in einem mit Alufolie abgedunkelten Heizblock bei 37 °C inkubiert, bzw. bei 65 °C für *TaiI*, *TaqI* und *TasI*. Der Verdau wurde durch Ethanolfällung (2.7.1) gestoppt. Die getrockneten Fragmentgemische wurden bis zur Analyse bei -20 °C gelagert.

### 2.14.5 Fragment-Analyse zur Erstellung von tRFLP-Profilen

Die getrockneten Fragmentgemische (2.14.4) wurden in 10 µL H<sub>2</sub>O (Millipore) gelöst. Hiervon wurden 2,5 µL in 0,5 mL-Reaktionsgefäßstreifen pipettiert und mit 1,0 µL Formamid (deionisiert, Roth), 1,0 µL Auftragspuffer (Applied Biosystems) und 0,5 µL GeneScan 500 ROX-Längenstandard (Applied Biosystems) vermischt. Von diesem Gemisch wurden 1,6 µL auf ein Polyacrylamidgel (36 cm, 4,5 %) aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung der Fragmente erfolgte in 3 h bei 2700 V auf einem Sequenzierautomaten (ABI 377, Applied Biosystems; Sequenzierlabor Medizinische Fakultät). Die Fluoreszenzsignale wurden vom Steuerungsprogramm zu einem künstlichen Gelbild zusammengesetzt, das mit GeneScan 3.1.2 (Applied Biosystems) ausgewertet und als tRFLP-Profil dargestellt werden konnte. Die Größe der Fragmente wurde mittels der *Local Southern*-Methode (implementiert in GeneScan 3.1.2.) als zweistelliger Dezimalbruch bestimmt, wobei die Fragmente aus dem Größenstandard der Kalibrierung dienten. Da der GeneScan 500-Standard nur Fragmente im Bereich zwischen 30 und 500 nt enthielt, konnte die Proben nur in diesem Bereich analysiert werden. Die minimale Fluoreszenzintensität für die Signalerkennung wurde für jedes Profil separat bestimmt. Die Daten der in einem Profil detektierten Peaks wurden als Textdatei exportiert und in TReFID (2.15) ausgewertet. Alternativ wurden Fragmentgemische im Institut für Genetik (Arbeitsgruppe Prof. D. Tautz) auf einem MegaBACE-Sequenzierautomaten (Amersham Biosciences) aufgetrennt und mit den Programmen Genetic Profiler 2.2 und Fragment Profiler 1.2 (beide Amersham) ausgewertet.

### 2.14.6 Kontrollversuche für die tRFLP

Um die Genauigkeit der Größenbestimmung von Fragmenten in der tRFLP zu kontrollieren, wurden Plasmide mit bekannten Insert-Sequenzen anstelle von Boden-DNA eingesetzt. So konnte exakt vorausgesagt werden, welche Fragmente zu erwarten waren. Außerdem wurde mit einer gewöhnlichen RFLP (2.9) überprüft, ob das Insert auch tatsächlich an allen Schnittstellen geschnitten wurde. Die Reproduzierbarkeit der tRFLP wurde auch in Versuchen mit Boden-DNA überprüft, indem ein Fragmentgemisch teilweise auf mehrere Spuren im gleichen Gel oder auf verschiedene Gele verteilt wurde – teils auch in verschiedenen Proben-Konzentrationen.

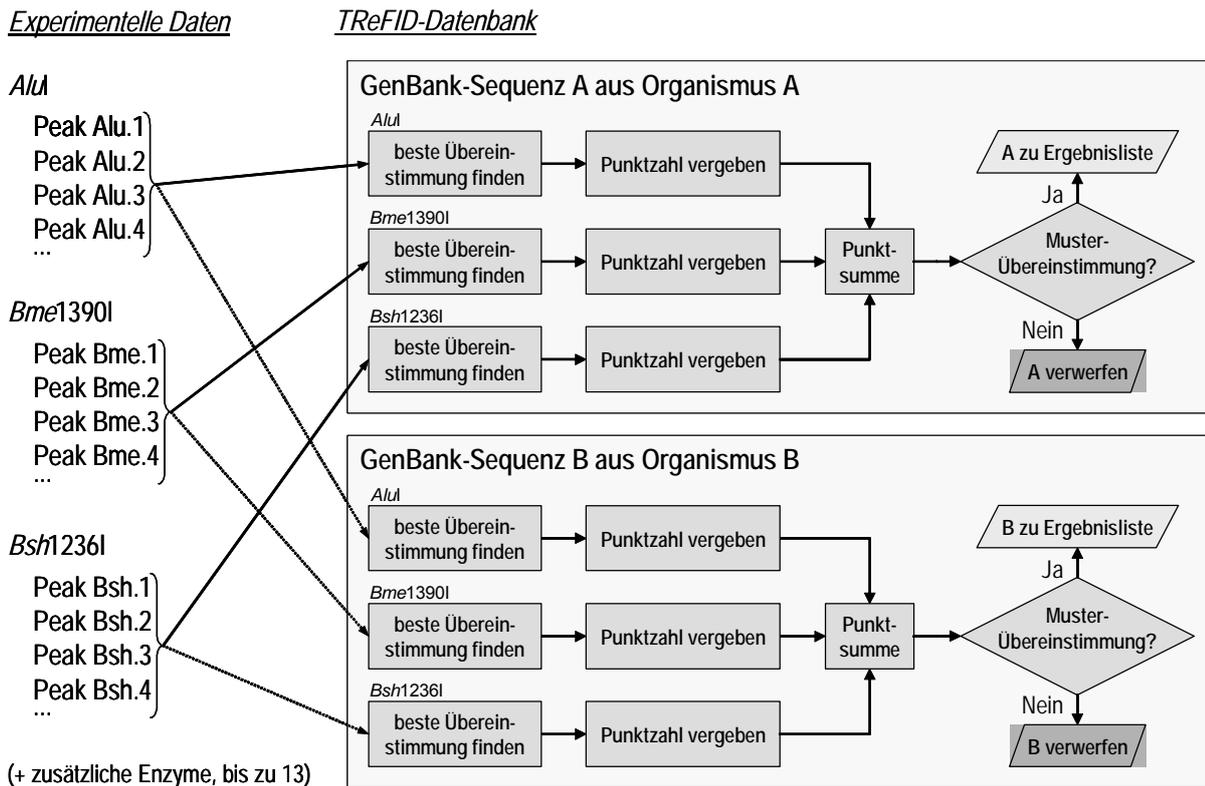
## 2.15 TReFID-Programm zur Auswertung von tRFLP-Daten

Das Computerprogramm TReFID (*terminal restriction fragment identifier*) (Rösch und Bothe 2005) diente zur Erstellung von „Artenlisten“ für Gemeinschaften von Bodenbakterien. Experimentelle Grundlage waren die tRF-Daten aus tRFLP-Experimenten (2.14), bei denen bis zu 13 Enzyme in unabhängigen Restriktionen eingesetzt wurden.

### 2.15.1 Prinzip der TReFID-Auswertung

Die TReFID-Auswertung von tRF-Daten beruht darauf, Sequenzen zu finden, die die experimentell gefundenen tRFs liefern können. Im Umkehrschluß wird davon ausgegangen, dass diese Sequenzen (bzw. die entsprechenden Organismen) in der untersuchten Probe vorhanden sind (Rösch und Bothe 2005). Je mehr Sequenzen hierbei analysiert werden, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass für alle detektierten tRFs passende Sequenzen gefunden werden. Es konnten nur 30 bis 500 nt lange tRFs ausgewertet werden (2.14.5), weshalb pro Restriktionsenzym maximal 470 unterscheidbare tRFs möglich sind. Viele Sequenzen haben aber für bestimmte Enzyme keine Schnittstellen in diesem Bereich. Außerdem ergeben Sequenzen unverwandter Bakterien häufig das gleiche tRF. Daher wurden für die vorliegende Arbeit bis zu 13 Enzyme verwendet, um über eine kombinierte Auswertung dieser Daten geeignete Sequenzen identifizieren zu können. Hierzu wurde ein Computerprogramm geschrieben, TReFID, das diese Auswertung automatisiert und als Ergebnis eine Liste mit Organismen ausgibt, die zu den tRFLP-Daten passen. Eine schematische Darstellung des Prinzips ist in Bild 5 gegeben. Neben dem eigentlichen TReFID-Programm sind die Datenbanken mit den Vergleichswerten von entscheidender Bedeutung. Informationen hierzu sind in den Abschnitten 2.15.3 und 3.3.1 zu finden.

Die Eingabe für eine TReFID-Auswertung sind Tabellen mit tRF-Daten. Da die experimentelle Größenbestimmung von Fragmenten aufgrund der Elektrophorese (2.14.5) mit einer Unsicherheit behaftet war und die Länge der tRFs als Dezimalbruch (2.14.5) vorlag, wurden die tRFs nicht als diskrete Werte, sondern als Intervalle behandelt. Die Intervallgrenzen können vom Benutzer des Programms im Bereich von  $\pm 0,33\%$  bis  $\pm 1,00\%$  festgelegt werden (Voreinstellung  $\pm 0,50\%$ ). Dieser Prozentwert wird im Folgenden als tRF-Längenabweichung (*tRF size deviation*) bezeichnet.

**Bild 5:** Schema des bei der TReFID-Auswertung angewandten Algorithmus

*Legende zu Bild 5:* Bei der TReFID-Auswertung wurde jeder Eintrag in der TReFID-Datenbank auf eine Übereinstimmung mit den experimentell bestimmten tRFs überprüft. Für jedes der bis zu 13 Restriktionsenzyme wurden dabei Punktzahlen (*score*) vergeben, die je nach Grad der Übereinstimmung zwischen 0 und 1 lagen. Wenn mindestens 2/3 aller tRF-liefernden Enzyme eine Übereinstimmung (*tRF match*) ergab, also eine Muster-Übereinstimmung (*pattern match*) vorlag, wurde der Eintrag in die Ergebnisliste übernommen. Die Datenbank-Einträge konnten umso sicherer identifiziert werden, je mehr Enzyme verwendet wurden. Für Details siehe Text.

net. Eine Übereinstimmung von gefundenem und erwartetem tRF (*tRF match*) innerhalb dieser Grenzen wird mit einer Punktzahl (*score*) von 1,00 gewertet; Übereinstimmungen innerhalb von zwei oder drei Intervallgrenzen ( $\pm 1,00\%$  bzw.  $\pm 1,50\%$  bei der Voreinstellung) werden mit 0,50 bzw. 0,25 gewertet. Die minimale Längenabweichung beträgt immer  $\pm 0,5$  nt, unabhängig vom eingestellten Prozentwert.

Für jedes Restriktionsenzym eines Datenbankeintrages wird die maximale Punktzahl gespeichert und zu einer Gesamtpunktzahl (*score sum*) addiert. Diese Summe, bezogen auf die Zahl der Enzyme, die beim entsprechenden Datenbankeintrag ein tRF ergeben, quantifiziert für jeden Eintrag der TReFID-Datenbank die Übereinstimmung zu den experimentellen Daten (ID-Sicherheit oder *similarity*). Unabhängig von der Punktsumme kommen aber nur solche Einträge in die TReFID-Ergebnisliste, bei denen mindestens ein bestimmter Anteil (Voreinstellung 2/3) von Restriktionsenzymen eine Übereinstimmung (*tRF match*) ergab. Diese Bedingung wird im folgenden als Muster-Übereinstimmung (*pattern match*) bezeichnet; hierbei findet keine Unterscheidung zwischen guten und schlechten Übereinstimmungen (hohe bzw. niedrige Punktsumme) statt. Beispielsweise

konnte ein Organismus, der nur für 9 von 13 Restriktionsenzymen ein tRF im Bereich von 30 - 500 nt lieferte, in die Ergebnisliste kommen, wenn es in einem Experiment mit 13 Enzymen in mindestens sechs Fällen (2/3 von 9) eine Übereinstimmung (*tRF match*) zu den Erwartungswerten gab.

Da jeder TReFID-Datensatz als ein Polygon dargestellt werden kann (Bild 6a) und die experimentellen Werte auf die gleiche Weise wie die Datenbankwerte in Bild 6b aufgetragen werden können, entspricht die TReFID-Auswertung der Suche nach Polygonen, deren Eckpunkte durch experimentell nachgewiesene tRFs abgedeckt werden können.

### **Definitionen von Begriffen zum TReFID-Verfahren**

tRF-Muster (*tRF pattern*): Jede Datenbank-Sequenz läßt sich durch einen Datensatz aus Restriktionsenzymen und zugehörigen tRFs beschreiben. In der graphischen Darstellung entspricht dies einem Polygon (vergleiche Bild 6a). Ähnliche Sequenzen können das gleiche tRF-Muster ergeben, besonders bei der Betrachtung von wenigen Enzymen. Die Auswertung von TReFID-Ergebnislisten erfolgte auf der Basis von tRF-Mustern und nicht Treffern (s. u.).

tRF-Längenabweichung (*tRF size deviation*): Die Unsicherheit der experimentellen Fragmentlängenbestimmung wird durch ein Intervall ausgedrückt und kann vom Benutzer festgelegt werden (Voreinstellung  $\pm 0,5\%$ ).

tRF-Übereinstimmung (*tRF match*): Wenn ein detektiertes tRF mit dem Erwartungswert für ein Enzym innerhalb der tRF-Längenabweichung übereinstimmt, wird eine Punktzahl vergeben.

Punktzahl (*score*): Wenn das gefundene mit dem erwarteten tRF optimal übereinstimmt, das heißt innerhalb des durch die tRF-Längenabweichung vorgegebenen Intervalls (Voreinstellung  $\pm 0,5\%$ ), wird eine Punktzahl von 1,00 vergeben. Bei Übereinstimmungen innerhalb von zwei oder drei Intervallgrenzen (Voreinstellung  $\pm 1,0$  bzw.  $\pm 1,5\%$ ), beträgt die Punktzahl nur 0,50 bzw. 0,25.

Punktsumme (*score sum*): Für jeden Datenbank-Eintrag wird die Summe der Punktzahlen für alle Enzyme gebildet, um die ID-Sicherheit zu bestimmen.

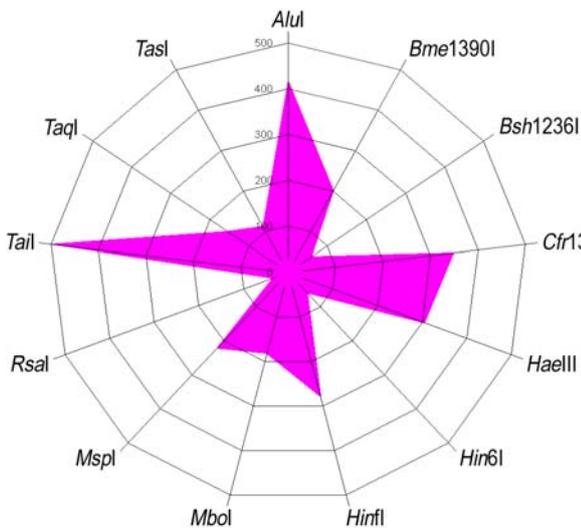
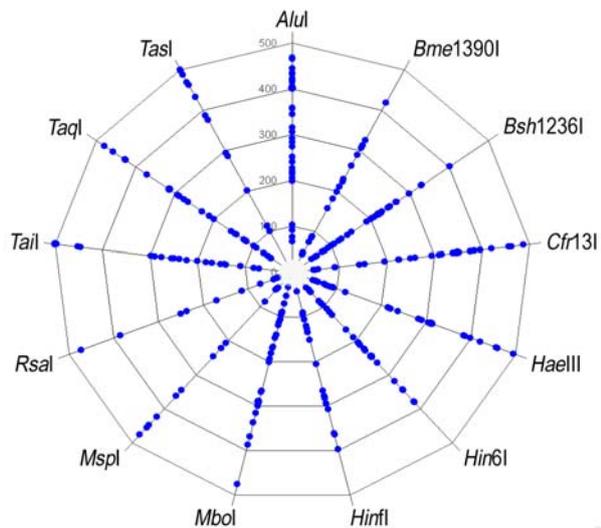
Maximale Punktsumme: Sie entspricht der Zahl der tRF-liefernden Enzyme (maximale Punktzahl in allen Fällen) und kann deshalb für verschiedene Organismen unterschiedlich hoch sein.

ID-Sicherheit (*similarity*): Dieser Prozentwert wird für jeden Datenbankeintrag separat berechnet, indem die Punktsumme (*score sum*) durch die Anzahl der Enzyme, die ein tRF ergeben, dividiert wird.

Muster-Übereinstimmung (*pattern match*): Nur Sequenzen, die in mindestens 2/3 (Voreinstellung) aller tRF-liefernden Enzyme Übereinstimmungen mit experimentellen tRFs ergaben (*tRF match*) kamen als potentielle Treffer in die TReFID-Ergebnisliste.

Treffer (*hit*): Eintrag in der TReFID-Ergebnisliste.

Ergebnisliste (*result list*): Sämtliche Datenbank-Einträge, die die Kriterien für eine Muster-Übereinstimmung erfüllen, werden als potentiell in der untersuchten Probe vorkommend in eine Ergebnisliste aufgenommen, die einer „Artenliste“ für die untersuchte Umweltprobe entspricht.

**Bild 6: Veranschaulichung von TReFID-Datensätzen in einem „Spinnennetz-Graphen“**(a) *Bradyrhizobium japonicum* (*nosZ*)(b) TReFID-Datenbank (*nosZ*)

Legende zu Bild 6: Die aus GenBank-Sequenzen berechneten tRFs ließen sich als Polygone in einem Spinnennetz-Graphen visualisieren (a). Hierfür wurde die tRF-Länge für jedes der 13 Restriktionsenzyme auf einer separaten Achse aufgetragen. Durch das Verbinden der Punkte aller 13 Achsen entstehen Polygone wie das für *Bradyrhizobium japonicum* (AJ002531) wiedergegebene. Das Auflösungsvermögen der TReFID-Methode ist auf die Zahl unterscheidbarer Polygone beschränkt. In (b) sind die Eckpunkte sämtlicher Polygone wiedergegeben, deren Daten in der TReFID-Datenbank für *nosZ* enthalten waren (vergleiche Tabelle 11, S. 70); die Kanten der 307 unterschiedlichen Polygone sind der Übersichtlichkeit wegen nicht gezeigt. Da die Fragmentgröße bei der tRFLP nur für den Bereich 30 - 500 nt bestimmt werden konnte (2.14.5), beginnt jede Achse im Bild erst bei 30 nt.

## 2.15.2 Programmierung des TReFID-Computerprogramms

Die Computerprogramme TReFID, GBSD (2.15.3) und CPC (2.15.4) wurden in Purebasic (Fantaisie Software, Fegersheim, Frankreich) geschrieben. Die ausführbaren Programmdateien wurden mit einem FASM-Compiler (Fantaisie Software) erzeugt. Der zentrale Algorithmus der TReFID-Auswertung ist unten als Pseudo-Code wiedergegeben (vergleiche auch Bild 5). In diesem Teil des Programms wird die Punktsumme (*score sum*) sukzessive für alle Datenbank-Einträge berechnet:

### TReFID-Algorithmus zur Berechnung der Punktsumme für Datenbank-Sequenzen

```

For i = 1 To {Anzahl Datenbank-Einträge}
  For j = 1 To {Anzahl verwendeter Enzyme}
    For k = 1 To {Anzahl tRFs für Enzym j}
      slice [nt] = {Erwartungswert (i, j) [nt]} - {Fragmentgröße (k) [nt]}
      dev [nt] = {tRF-Längenabweichung [%]} × {Fragmentgröße (k) [nt]}
      If dev < 0.5 [nt] Then dev = 0.5 [nt] EndIf
      Select slice
        Case1 slice ∈ [-3 × dev ; 3 × dev] Do score(i, j) = 0.25
        Case2 slice ∈ [-2 × dev ; 2 × dev] Do score(i, j) = 0.50
        Case3 slice ∈ [-1 × dev ; 1 × dev] Do score(i, j) = 1.00
      EndSelect
    Next k
  Next j
  score_sum (i) = ∑j score (i, j)
Next i

```

Bei einer Datenbank von 22.145 Einträgen (16S rDNA, siehe Abschnitt 3.3.1), 13 Restriktionsenzymen und durchschnittlich 35 tRFs pro Enzym sind nach dem angegebenen Algorithmus  $22.145 \times 13 \times 35 \approx 10^7$  Operationen nötig, um eine vollständige Auswertung durchzuführen. Um diese Zahl zu reduzieren, wurden verschiedene Abbruchbedingungen eingefügt. Zum Beispiel werden bei der Auswertung Enzyme, die kein tRF im Bereich von 30 - 500 nt liefern, übergangen. Auch wird die Analyse einzelner Datenbank-Einträge abgebrochen, wenn die Bedingungen zur Aufnahme in die Ergebnisliste nicht mehr erfüllt werden können (z. B. tRF-Übereinstimmungen in weniger als 2/3 der tRF-liefernden Enzyme). Die beste Übereinstimmung eines tRFs zu einem Erwartungswert aus der Datenbank wird mit einem binären Suchalgorithmus gefunden, der die Zahl maximal notwendiger Vergleiche von  $N$  auf  $\log_2 N$  reduziert, also z. B. von 35 auf 5 Schritte. Durch diese Optimierungen liegt die Zahl notwendiger Operationen in einer Auswertung zwischen 5 und 10 % des Maximalwertes (ca.  $10^6$  für die Beispielwerte oben). Die Details hierzu können dem Quellcode auf der beiliegenden CD-ROM entnommen werden.

### 2.15.3 Erstellung der Datenbanken für die TReFID-Auswertung

Die TReFID-Datenbanken basierten auf GenBank-Einträgen (Benson *et al.* 2000). Daher wurden zunächst alle Sequenzen für *nosZ*, *nifH* und die 16S rDNA heruntergeladen und als Datei im GenBank-Format gespeichert. Diese Dateien wurden mit dem Hilfsprogramm GBSD geöffnet, welches die Verwaltung von GenBank-Einträgen erleichtert, indem aus der Datei eine bearbeitbare Liste erstellt wird. GBSD ermöglichte das Sortieren nach Sequenzlänge, Organismusname oder anderen Feldern. Die in GBSD geladenen Daten können auf drei verschiedene Weisen exportiert werden: als Tabelle (Tabulator-Text), als FASTA- oder TReFID-Datei. Im Tabellenformat können beliebige Felder der GenBank-Einträge gespeichert werden, was für die Analyse der Sequenz-Annotationen (z. B. phylogenetische Information) nützlich ist. Das FASTA-Format ist ein Standardformat für Sequenzdaten und kann z. B. von ClustalX (Thompson *et al.* 1997) zur Erstellung von Alignments gelesen werden (2.12). Dateien im TReFID-Format können mit dem TReFID-Programm geöffnet werden, sofern sie tRF-Daten enthalten (s. u.).

Bei der tRFLP war ein Primer markiert (2.14), so dass die tRFs von der Seite dieses Primers aus berechnet werden mussten (5' für *nifH* und die 16S rDNA, 3' für *nosZ*). Zur Generierung der tRF-Daten, wurden zunächst Alignments für alle verfügbaren Sequenzen erstellt (ClustalX). Aus dem Vergleich mit den Dünnwald-Klonen wurden die Sequenzen ermittelt, die den gleichen Genbereich abdeckten. Dann wurde eine Tabelle angelegt, die für jede Sequenz – bezeichnet durch die Zugriffsnummer und den Organismusnamen – angab, wie diese zu modifizieren war, um beim markierten Primer (*nosZ*-R, *nifH*-F oder 63f; 2.14.1) zu beginnen. Diese Tabelle konnte dann in GBSD importiert werden und diente als Matrize zur Modifikation der Sequenzen, bei der überhängende Nukleotide abgeschnitten wurden und bis zu 30 fehlende Positionen in der Primerbindungsstelle mit „N“ aufgefüllt wurden. Sequenzen, die die Primerbindungsstelle nicht enthielten, wurden gelöscht (Tabellen-Eintrag „delete“). Nach der Modifikation begannen daher alle ver-

bliebenen Sequenzen an der gleichen Position, nämlich am Anfang der Primerbindungsstelle. Für diese Sequenzen wurden die Restriktionsschnittstellen aller 13 verwendeten Enzyme (2.14.3) bestimmt. Daraus ergab sich die Länge der tRFs sowie die Länge für fluoreszierende Fragmente aus unvollständigem Verdau. Die vollständige TReFID-Datenbank umfasste die Annotationen der ursprünglichen GenBank-Sequenzen, die modifizierte Sequenz und die entsprechenden tRF-Daten. Die TReFID-Datenbanken wurden unter verschiedenen Aspekten analysiert (siehe Ergebnisteil, 3.3.1). Um die Verteilung und Häufigkeit einzelner tRFs quantifizieren zu können, wurde für jedes Enzym der SHANNON-Index und die Ebenmäßigkeit berechnet (vergleiche Abschnitt 2.13.1). Auf der Basis dieser Diversitätsindices, der Anzahl unterschiedlicher tRFs und des Anteils der Sequenzen, die kein tRF ergaben, wurde die Eignung der verwendeten Restriktionsenzyme für eine TReFID-Auswertung bestimmt. Um Verfälschungen zu vermeiden, wurden die Dünnwald-Sequenzen, die bei *nosZ* knapp 60 % der TReFID-Datenbank ausmachten (38 % bei *nifH* und 2,8 % beim 16S rRNA-Gen), in diese Analysen nicht eingeschlossen.

#### **2.15.4 Eingabedaten für die TReFID-Analyse und Erstellung der Projektdateien**

Die auszuwertenden tRF-Daten müssen für die TReFID-Analyse in einer Textdatei mit vorgegebenem Format und Dateiendung \*.project vorliegen (siehe Beispieldateien im TReFID-Unterverzeichnis \Projects auf beiliegender CD-ROM). Diese Projektdateien können in TReFID automatisch aus den exportierten GeneScan-Tabellen erstellt werden.

Die tRF-Listen von mehrfach durchgeführten tRFLP-Experimenten mit DNA der gleichen Probe und von den Dreifachproben A, B und C einer Fläche wurden vor der TReFID-Auswertung mit dem Hilfsprogramm CPC zusammengefasst (enthalten im Ordner \TReFID auf der CD-ROM). Dabei wurde für jedes Restriktionsenzym zunächst eine nach der Fragmentgröße sortierte Liste aller Fragmente der zusammenfassenden Experimente erstellt. Alle Fragmente mit einem Abstand von weniger als 0,4 nt zum folgenden Fragment wurden dabei als gleiches tRF behandelt und bekamen als tRF-Länge, Peakhöhe und -fläche die Mittelwerte der ursprünglichen Fragmente zugewiesen. Der maximale Abstand vom ersten bis zum letzten Fragment, die zum selben tRF kombiniert werden konnten betrug 0,8 nt.

#### **2.15.5 TReFID-Homepage**

Das TReFID-Programm sowie Datenbanken für *nifH*, *nosZ* und das 16S rRNA-Gen können von folgender Internetseite heruntergeladen werden:

[www.trefid.net](http://www.trefid.net)

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Ergebnisse der Bodenanalysen von Dünnwaldproben

Über die Bestimmung einiger physikochemischer Bodenparameter wurde der Zustand des Bodens zu jedem Zeitpunkt der Probenentnahme dokumentiert. Neben der Bestimmung von pH-Wert, Wassergehalt und Kornfraktionen wurden Elementaranalysen für den Gesamtboden und die lösliche Fraktion einer Bodensuspension durchgeführt.

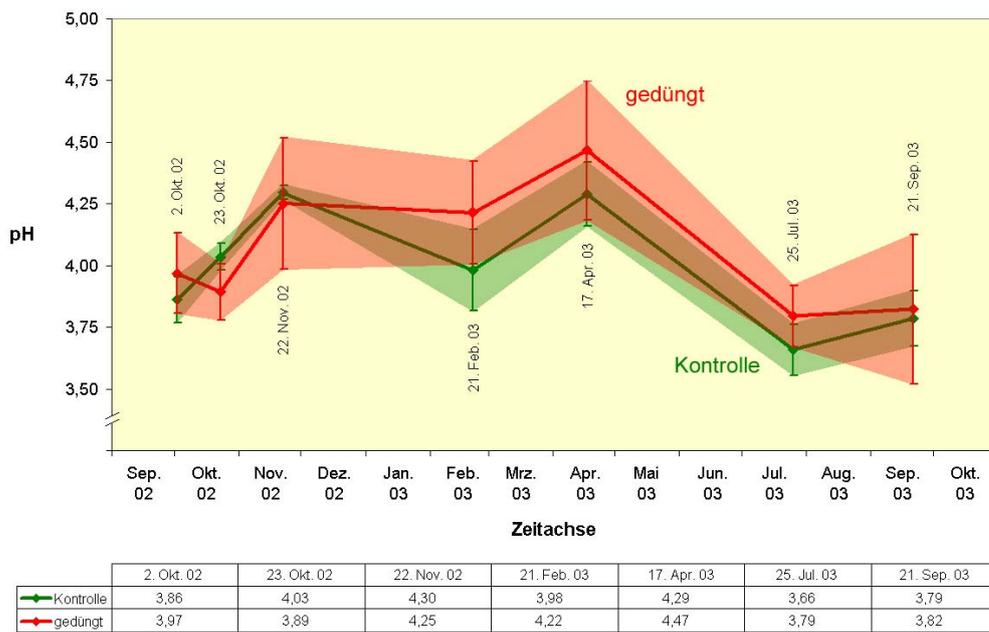
#### 3.1.1 Azidität des Dünnwaldbodens

Der pH-Wert der einzelnen Bodenproben wurde nach der Vorschrift in Abschnitt 2.3.1 bestimmt. In Bild 7 ist das Ergebnis für die gedüngte und die Kontrollfläche auf einer Zeitachse graphisch dargestellt. Auffallend sind die großen Fehlerbereiche, die in der Graphik transparent wiedergegeben sind, aber auch eine deutliche Veränderung des pH-Wertes im Jahresverlauf.

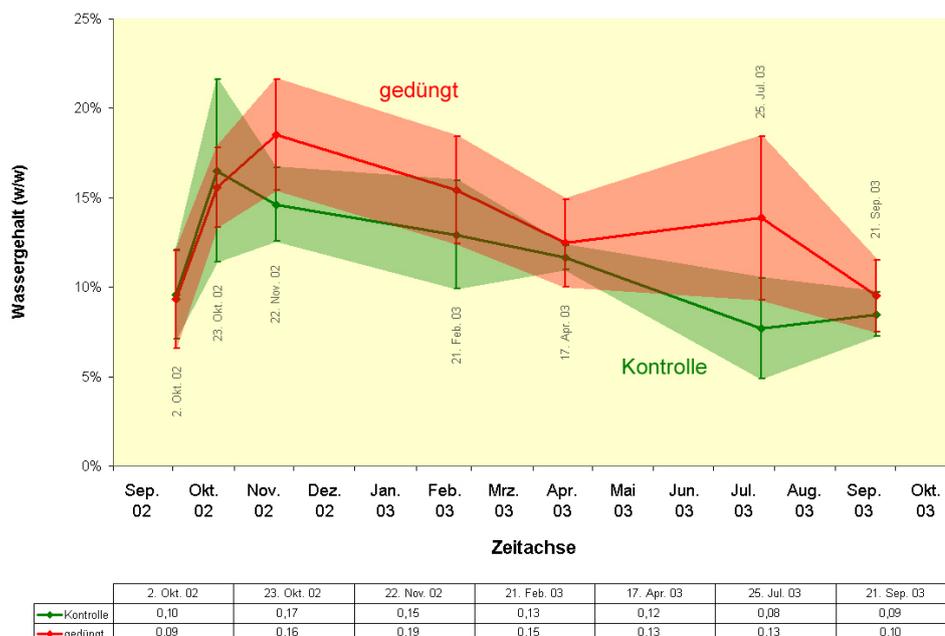
Die Schwankung des pH-Wertes im Jahresverlauf war – bezogen auf die Mittelwerte – dreimal größer als der maximale Unterschied zwischen beiden Flächen zu einem Zeitpunkt. Denn im Boden der gedüngten Fläche betrug das jahreszeitliche pH-Minimum 3,79 und das Maximum 4,47, was einer Differenz von 0,67 pH-Einheiten entspricht (Bild 7). Für die Kontrollfläche war die Differenz zwischen jahreszeitlichem Minimum (3,66) und Maximum (4,30) mit 0,64 genauso groß. Hingegen betrug die maximale Differenz zwischen den pH-Werten zum gleichen Zeitpunkt nur 0,23 (21. Feb. 2003), also etwa ein Drittel der Jahresschwankung. Vor Beginn der Düngung lag der Unterschied zwischen beiden Flächen bereits bei 0,11 pH-Einheiten und damit im Rahmen des Unterschiedes zu den anderen Zeitpunkten (Durchschnitt  $0,13 \pm 0,07$  Einheiten). Wegen der starken Überlappung der Fehlerbereiche ließen sich die beiden Flächen hinsichtlich des pH-Wertes nicht unterscheiden.

#### 3.1.2 Wassergehalt der Bodenproben aus dem Dünnwald

Die Bestimmung der Bodenfeuchte (2.3.2) ermöglichte es zu beurteilen, ob eine der beiden Flächen mehr Niederschlag speicherte als die andere, oder schneller austrocknete. Bild 8 zeigt, dass die Bodenfeuchte während des Zeitraumes der Probennahme über einen Bereich von etwa 8 % bis 18 % (w/w) schwankte. Der Jahresverlauf war im Vergleich zum pH-Wert (3.1.1) weniger deutlich ausgeprägt (Bild 8). Anhand der Mittelwerte der Bodenfeuchte unterschieden sich die beiden Flächen weder vor Beginn der Düngung noch ein Jahr später (Differenz von 0,3 % bzw. 1,0 %). In der Zwischenzeit lagen die Werte für die gedüngte Fläche zwar höher, doch die Stichproben-Standardabweichungen (Fehlerbalken in Bild 8) waren für beinahe jede Messung mit einem relativen Fehler von durchschnittlich über  $\pm 20$  % so groß, dass die Fehlerbereiche beider Flächen sich in großen Teilen überlappten. Bezüglich ihres Wassergehaltes waren die beiden Flächen daher gleich.

**Bild 7: pH-Wert der Bodenproben aus dem Dünnwald**

*Legende zu Bild 7:* Der pH-Wert der Bodenproben ist für jeden Zeitpunkt der Probennahme als Mittelwert dargestellt, jeweils für die gedüngte (grün) und die ungedüngte Kontrollfläche (rot). Da die Mittelwerte jeweils auf fünf Messungen jeder einzelnen der Dreifachproben (A, B und C) beruhen, geht ein Wert im Bild auf 15 Einzelmessungen zurück (vergleiche Abschnitt 2.3.1); die Mittelwerte sind in der Tabelle unter dem Graphen angegeben. Zur Veranschaulichung ist der Fehlerbereich transparent in der jeweiligen Farbe hervorgehoben.

**Bild 8: Wassergehalt der Bodenproben aus dem Dünnwald**

*Legende zu Bild 8:* Der Wassergehalt wurde als g H<sub>2</sub>O pro g Boden (frisch) bestimmt (vergleiche Abschnitt 2.3.2). Im Diagramm sind die Mittelwerte aus den Dreifachproben (A, B und C) für jeden Zeitpunkt dargestellt; die Werte für die ungedüngte Kontrollfläche sind grün, die der gedüngten Fläche rot. Die jeweiligen Fehlerbereiche sind transparent wiedergegeben.

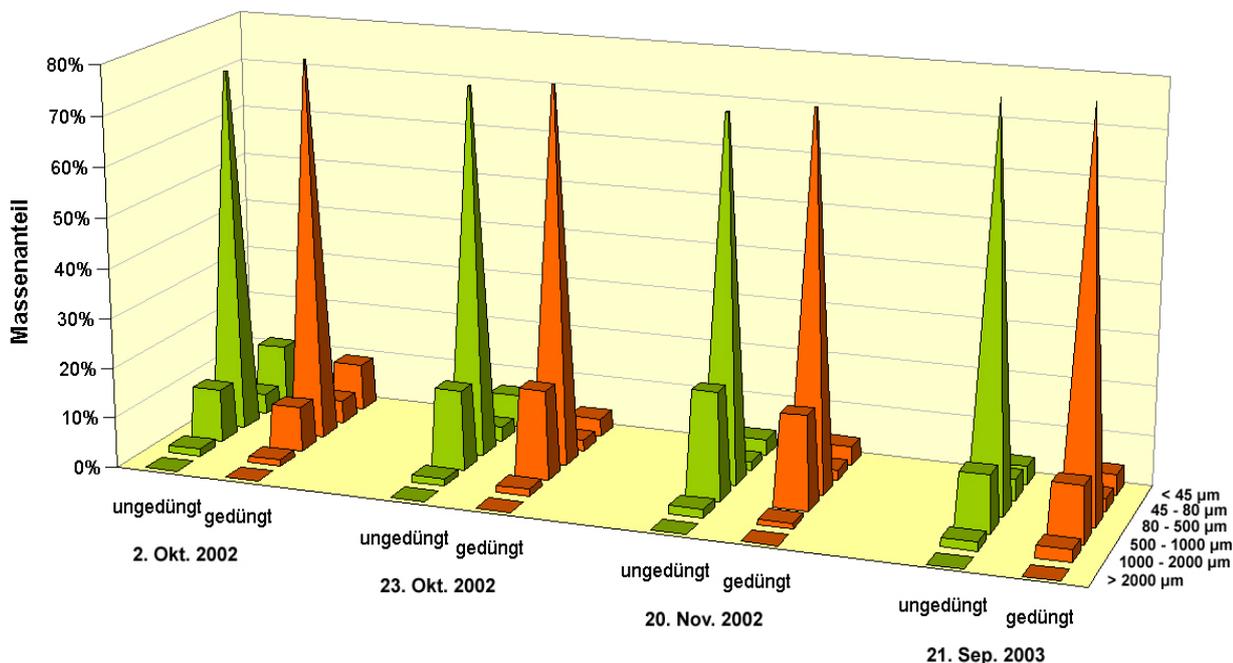
### 3.1.3 Kornfraktionen des Dünnwaldbodens

Die Bestimmung der Korngrößenfraktionen für die Dünnwaldbodenproben (2.3.3) ergab keine Hinweise auf mögliche Veränderungen in der Bodenstruktur infolge der Düngung (Bild 9). Jede Säule in Bild 9 stellt den Mittelwert aus den einzeln untersuchten Dreifachproben dar (vergleiche Bild 4, S. 15). Die Unterschiede zwischen den beiden Flächen waren marginal, besonders im Vergleich zu den größeren Unterschieden zwischen den vier Zeitpunkten. Für die drei nicht gezeigten Zeitpunkte (5, 6, und 7) wurde keine entsprechende Bestimmung vorgenommen.

Den Hauptteil in allen Bodenproben stellte die Fraktion der Partikel zwischen 80 µm und 500 µm; über alle Proben gemittelt lag der Anteil dieser Fraktion bei  $75,5 \pm 2,7 \%$ . Die Körnung betreffend war der Dünnwaldboden sehr homogen. Mineralische Partikel mit einem Durchmesser von 1 - 2 mm traten durchgängig in einer Häufigkeit von etwa 1 Korn pro g Boden auf, größere Partikel nur sehr sporadisch. Daher betrug der Skelettanteil des Bodens, d. h. der Anteil mineralischer Partikel über 2 mm im Durchmesser, in allen Proben weit unter 1 % (w/w).

Die Unterschiede zwischen den Dreifachproben waren mit absoluten Abweichungen von kleiner 0,1 % bis 5,2 % generell eher gering. Die relativen Fehler der Mittelwerte waren aber gerade für die Fraktionen mit geringen Anteilen ( $< 10 \%$ ) am Boden groß und erreichten bis zu 80 % (Durchschnitt  $21 \pm 20 \%$ ). Der Übersichtlichkeit wegen sind diese Fehler in Bild 9 aber nicht dargestellt.

**Bild 9: Korngrößenverteilung in den Dünnwaldbodenproben**



*Legende zu Bild 9:* Das Säulendiagramm zeigt die relativen Anteile von sechs Kornfraktionen (rechte Achse) in Abhängigkeit von der untersuchten Bodenprobe aus dem Dünnwald. Die dargestellten Werte sind die Mittelwerte der Dreifachproben (A, B und C); Fehlerbalken wurden der Übersichtlichkeit wegen nicht dargestellt (vergleiche Text). Die Unterschiede zwischen der ungedüngten (grün) und der gedüngten Fläche (rot) waren in jedem der vier Fälle geringer als die Unterschiede zwischen den Zeitpunkten.

### 3.1.4 Elementaranalysen: CNSH-Analyse

Die Gesamtgehalte des Dünnwaldbodens an Kohlenstoff, Stickstoff, Wasserstoff und Schwefel sind in Bild 10 gezeigt. Die Dreifachproben wurden nicht einzeln analysiert, sondern als homogenisiertes Gemisch (2.3.4). Daher stellen die in Bild 10 angegebenen Fehlergrenzen auch nicht die Standardabweichungen aus einer Mittelwertbildung, sondern vielmehr die bei der Analyse aufgetretenen Meßfehler dar. Der S-Gehalt lag in allen Proben nur knapp über der Nachweisgrenze, so dass hier keine Auswertung möglich war (Bild 10d). Wegen der engen Fehlerbereiche ließen die Meßwerte zu den übrigen Elementen aber eine klare Unterscheidung beider Flächen zu..

Anfang Oktober 2002, also vor Beginn des Düngungsexperiments, waren die C-, N- und H-Gehalte beider Flächen vergleichbar (Bild 10abc), obwohl sie auf der Kontrollfläche um 7 % bis 12 % (relativ) über den Werten der anderen Fläche lagen. Infolge der Düngung wies die gedüngte Fläche zu den nächsten drei Zeitpunkten (bis März 2003) sowohl beim C- als auch beim N-Gehalt um 32 % bis 52 % (rel.) höhere Werte auf, als die Kontrollfläche (Bild 10ab). Beim Wasserstoff ergäbe sich ein ähnliches Bild, wenn die Kurven für die beiden Flächen nicht im November 2002 zusammenfallen würden (Bild 10c). Bis Juli 2003 nivellierten sich die Unterschiede zwischen beiden Flächen wieder, bis ein Zustand erreicht war, wie er vor Beginn der Düngung vorlag. Zum letzten Zeitpunkt stiegen die Gehalte an C, N und H in der gedüngten Fläche wieder an, allerdings mit einer großen Meßunsicherheit.

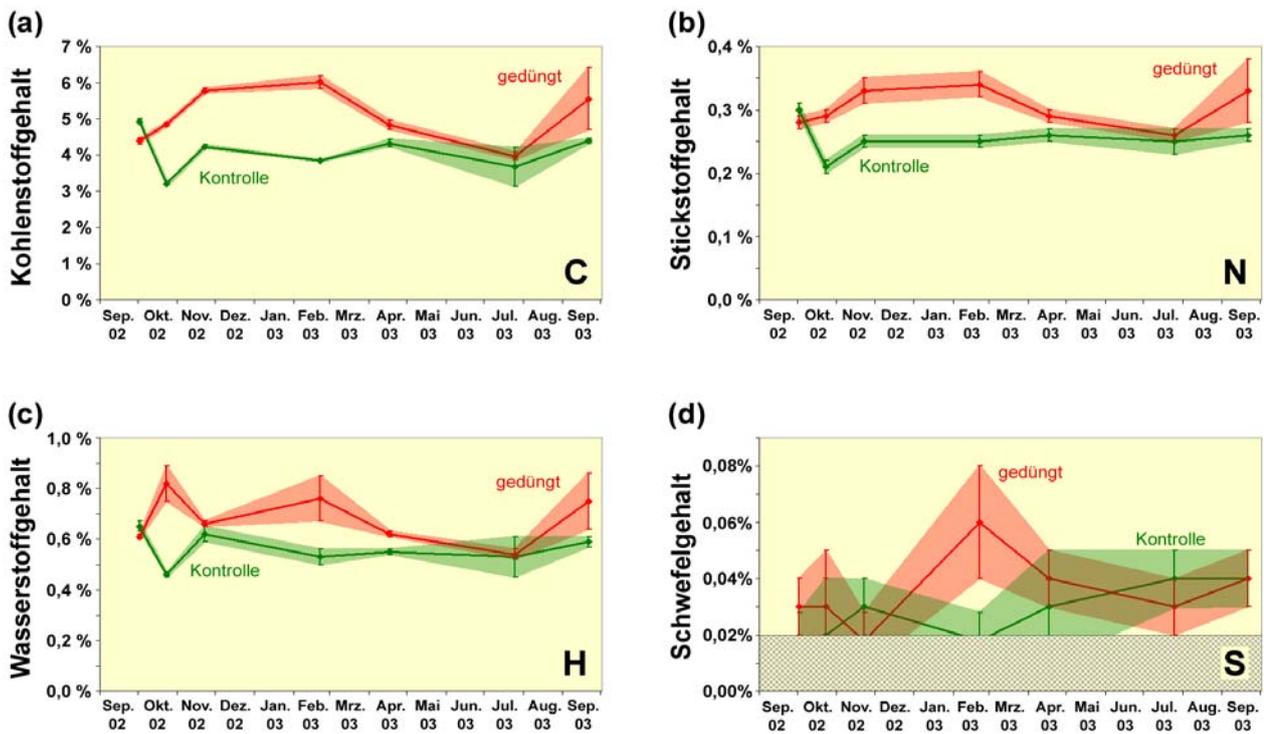
Aus den Gesamtgehalten für C und N wurde das C/N-Verhältnis als Maß der Verfügbarkeit von Stickstoff im Boden berechnet (2.3.4) und graphisch dargestellt (Bild 11). Im Laufe des Jahres schwankte das Verhältnis zwischen 17,1 und 20,6, wobei die Maximalwerte auf der gedüngten Fläche im November 2002 und Februar 2003 erreicht wurden. Ab April 2003 war zwischen beiden Flächen kein Unterschied mehr festzustellen, insbesondere unter Berücksichtigung der Fehlergrenzen ( $\pm$  Stichproben-Standardabweichung).

### 3.1.5 Ergebnisse der Elementaranalysen für die lösliche Fraktion

Neben den Gesamtgehalten von vier Elementen (3.1.4) wurden für die Dünnwaldbodenproben der ersten vier Zeitpunkte auch die Konzentrationen von  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  und  $\text{NO}_2^-$ , sowie von S, P und sieben Metallen bestimmt (Bild 12). Hierfür konnten nicht die festen Bodenproben verwendet werden, sondern es wurden Bodensuspensionen bereitet (2.3.4).

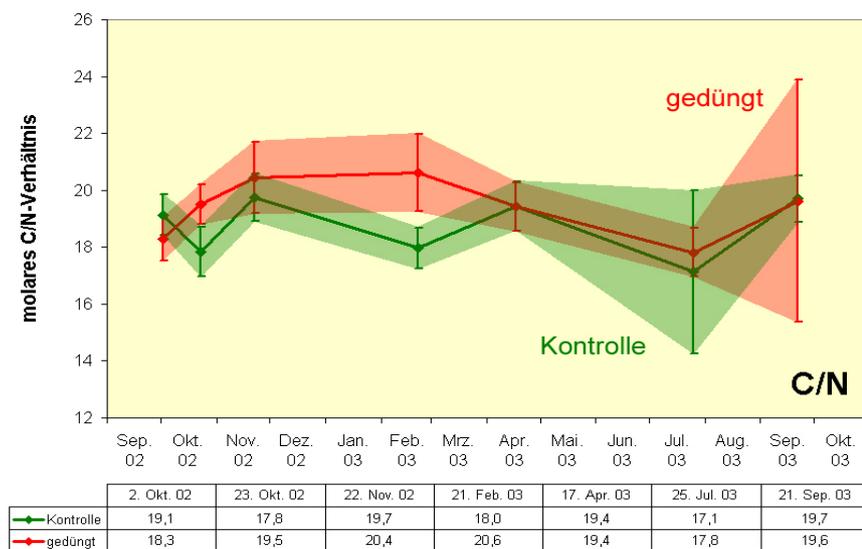
Die Düngung mit  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  resultierte erwartungsgemäß in einem starken Anstieg der Konzentrationen von  $\text{NH}_4^+$  und  $\text{NO}_3^-$  (Bild 12ab): am 23. Oktober 2002, also zwei Wochen nach der ersten Düngung, waren die Konzentrationen in der gedüngten Fläche im Vergleich zur Kontrollfläche 5fach ( $\text{NH}_4^+$ ) bzw. 40fach ( $\text{NO}_3^-$ ) erhöht. Nach den weiteren Düngungen blieb der  $\text{NH}_4^+$ -Gehalt auf etwa gleichbleibend hohem Niveau, während der  $\text{NO}_3^-$ -Gehalt schon zum dritten Zeitpunkt auf weniger als die Hälfte des anfänglichen Spitzenwertes abgesunken war. Im Februar 2003 war der  $\text{NO}_3^-$ -Gehalt im gedüngten Boden nur noch unwesentlich erhöht, nämlich um einen Faktor 2,4 im Vergleich zur Kontrollfläche. Die  $\text{NO}_2^-$ -Konzentration lag für beide Flächen unter der Nach-

**Bild 10: Ergebnisse der Elementaranalysen (CNSH) von Dünnwaldbodenproben**

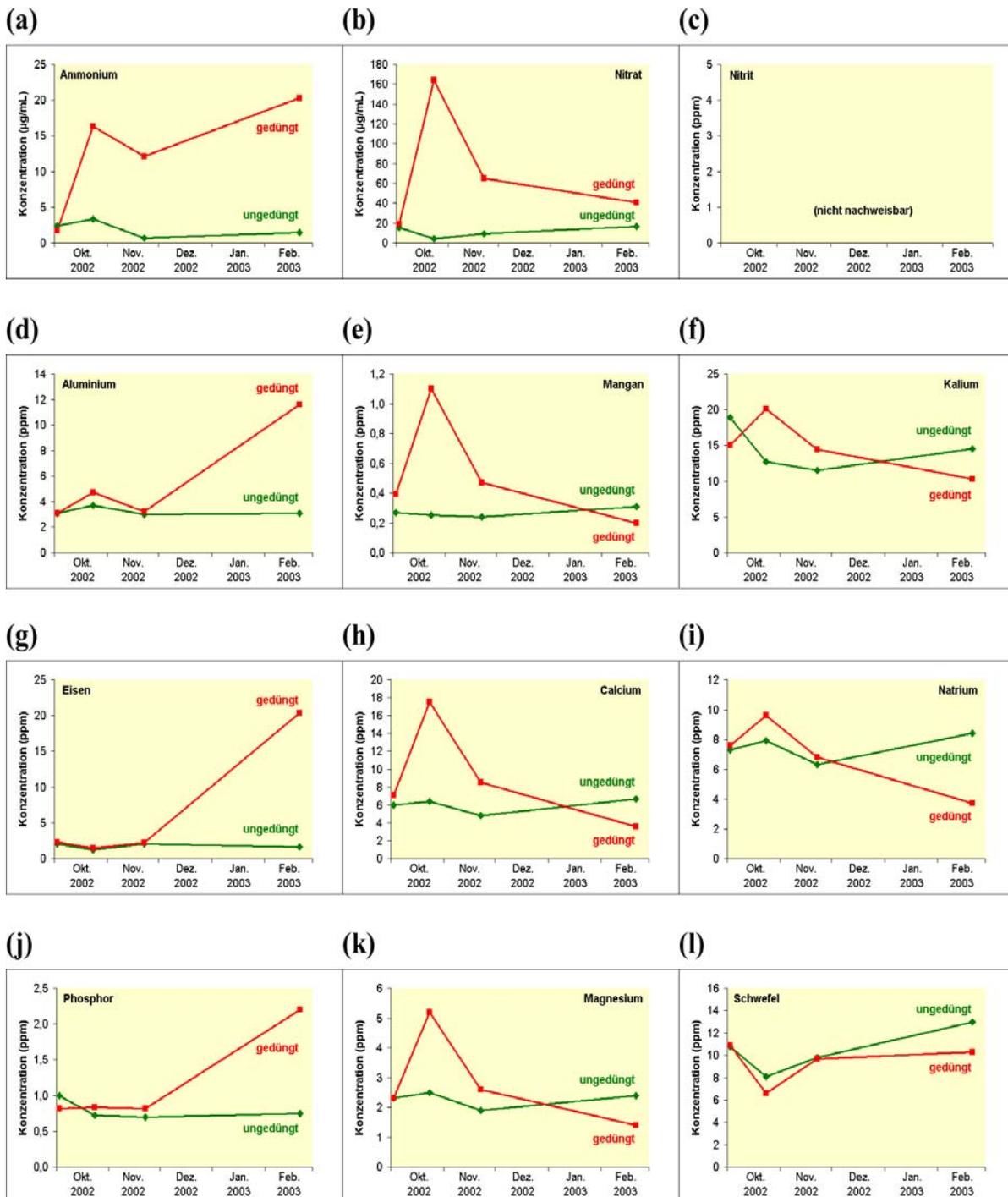


Legende zu Bild 10: Die vier Diagramme zeigen den Anteil (w/w) an Kohlenstoff (a), Stickstoff (b), Wasserstoff (c) und Schwefel (d) im Boden der gedüngten Fläche und der ungedüngten Kontrollfläche zu den sieben Zeitpunkten der Probenahme. Die Werte wurden für die vereinigten Dreifachproben (A, B und C) bestimmt, so dass pro Fläche und Zeitpunkt nur je ein Wert vorlag (die Fehlerbalken geben den Meßfehler dieser einen Messung an). Die Werte für Schwefel (d) liegen alle nahe der Nachweisgrenze von 0,02 %, so dass hier keine Auswertung möglich ist.

**Bild 11: C/N-Verhältnis im Dünnwaldboden**



Legende zu Bild 11: Die molaren Kohlenstoff- zu Stickstoff-Verhältnisse (C/N) wurden auf der Basis der in Bild 10 dargestellten Werte für den C- bzw. N-Gehalt berechnet. Unterschiede zwischen beiden Flächen gab es nur im Winter 2002/2003. Die Fehlerbereiche geben die Stichproben-Standardabweichungen wieder.

**Bild 12: Elementaranalysen der löslichen Fraktion aus den Dünnwaldbodenproben**

*Legende zu Bild 12:* Neben der CNSH-Analyse (Bild 10) wurden Elementaranalysen der löslichen Fraktionen von den Dünnwald-Bodenproben der ersten vier Zeitpunkte durchgeführt. Die Ammonium- und Nitratwerte (a, b) stiegen nach der Düngung – im Vergleich zur Kontrollfläche – um ein Vielfaches an. Nitrit (c) war in keiner der Proben nachweisbar ( $< 0,05 \mu\text{g/mL}$ ). Bei Aluminium, Eisen und Phosphor (d, g, j) stieg der Gehalt erst einige Zeit nach Beginn der Düngung ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) an. Hingegen wurden bei Mangan, Calcium und Magnesium (e, h, k) – ähnlich wie beim Nitrat (b) – unmittelbar nach der Düngung Spitzenwerte erreicht, woraufhin der Gehalt aber unter den der Kontrollfläche abfiel. Ähnlich, wenn auch weniger deutlich, verhalten sich der Kalium- und der Natriumgehalt (f, i). Auf den Schwefelgehalt (l) scheint die Düngung nur geringen Einfluß zu haben. Der relative Fehler beträgt  $\pm 3 \%$  für  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$  und  $\text{NO}_2^-$ ,  $\pm 10 \%$  für P und  $\pm 5 \%$  für S und alle Metalle.

weisgrenze. Die übrigen neun, aus der löslichen Fraktion quantifizierten Elemente ließen sich grob in drei Gruppen einteilen. Die erste Gruppe umfaßte solche Elemente, die über die Zeit einen mit  $\text{NH}_4^+$  vergleichbaren Konzentrationsverlauf zeigten: Al, Fe und P. Die Elemente der zweiten Gruppe (Mn, Ca und Mg) verhielten sich ähnlich wie  $\text{NO}_3^-$ . In der dritten Gruppe (K, Na und S) gab es keinen wesentlichen Düngungseffekt, allenfalls einen schwachen Anstieg (K und Na) oder Abfall (S) in den Konzentrationen nach Beginn der Düngung.

Was die Kontrollfläche betrifft, waren die Konzentrationen sämtlicher zwölf untersuchter Ionen bzw. Elemente zeitlich relativ konstant. Die maximal gemessene Konzentration der neun Elemente im Boden war, unabhängig vom zeitlichen Verlauf, nur um durchschnittlich  $44 \pm 18 \%$  höher als die minimal gemessene – im Gegensatz zu  $350 \pm 360 \%$  für die gedüngte Fläche.

### 3.2 Ergebnisse der Auswertung von Klonbibliotheken für *nosZ*, *nifH* und die 16S rDNA aus dem Dünnwaldboden

Es wurden Klonbibliotheken für drei verschiedene Gene erstellt, mit denen die Gesamtdiversität der Bodenbakterien (16S rDNA), die Diversität von stickstofffixierenden (*nifH*) und von denitrifizierenden Mikroorganismen (*nosZ*) erfasst wurde. Insgesamt wurden – für alle Bodenproben und Zeitpunkte zusammengenommen – 1453 klonierte PCR-Produkte sequenziert: 363 für *nosZ*, 500 für *nifH* und 590 für die 16S rDNA (Tabelle 4). Nach der Zusammenfassung von Sequenzen mit wenigstens 98 % Homologie (siehe Abschnitt 2.11) ergaben sich 211 OTUs für die 16S rDNA, aber nur 47 für *nifH* und 49 für *nosZ*. Es kamen also im Falle der 16S rDNA etwa 2,8 Sequenzen auf eine OTU ( $590/211$ ). Für *nosZ* lag dieser Wert bei 7,4, für *nifH* bei 10,6 Sequenzen pro OTU. Tabelle 4 enthält die SHANNON-Diversitätsindices (2.13), die für jedes Gen aus der kombinierten Klonbibliothek (beide Flächen und alle Zeitpunkte zusammen) berechnet wurden. Die nach Flächen und Zeitpunkten separat berechneten Indices sind in den folgenden Abschnitten mit den detaillierten Auswertungen der drei Klonbibliotheken zu finden (3.2.1 bis 3.2.3). Die mittlere paarweise Sequenzhomologie der Stellvertretersequenzen (Prototypen) betrug für die 211 OTUs des

**Tabelle 4: Übersicht zu Umfang und Diversität der Dünnwald-Klonbibliotheken**

	<i>nosZ</i>	<i>nifH</i>	16S rDNA
Ausgewertete Klone insgesamt	363	500	590
Operational Taxonomic Units (OTUs)	49	47	211
SHANNON-Index $H_s$ (Ebenmäßigkeit $E_s$ )	2,57 (0,66)	2,78 (0,72)	6,58 (0,85)
GenBank-Zugriffsnummern	AY724208-AY724250, AY912909-AY913228	AY724096-AY724207, AY912515-AY912908	AY723961-AY724095, AY913229-AY913753

*Legende zu Tabelle 4:* Die in Form des SHANNON-Index (2.13.1) angegebenen Diversitäten entsprechen der Übersichtlichkeit wegen der Gesamtdiversität für das entsprechende Gen; die nach Zeitpunkten und Flächen separat berechneten Werte sind in Tabelle 5 (*nosZ*), Tabelle 6 (*nifH*) und Tabelle 7 (16S rDNA) aufgeführt. Neben den 590 16S rDNA-Sequenzen für den vollständigen 63/778-Genbereich lagen 20 kürzere Sequenzen vor, die zusammen 16 weitere OTUs darstellten und nicht phylogenetisch ausgewertet wurden, aber in die TReFID-Datenbank Eingang fanden (3.3.3.3).

16S rRNA-Gens  $73,3 \pm 7,5$  %. Der entsprechende Wert lag für die 49 *nosZ*-OTUs im gleichen Bereich ( $72,6 \pm 9,5$  %), lag für die 47 *nifH*-OTUs mit  $69,2 \pm 9,4$  % aber etwas niedriger. Die *nifH*-Sequenzen waren also im Mittel untereinander verschiedener, als die *nosZ* und 16S rDNA-Sequenzen, obwohl die *nifH*-Klonbibliothek wenig divers war.

Im Folgenden werden für jedes der drei Gene die Ergebnisse der Rarefaction-, der Cluster- und der phylogenetischen Analysen dargestellt. Die Rarefaction-Analyse (2.13.2) der Gesamt-Klonbibliothek erlaubte eine Abschätzung der Repräsentativität einzelner Bibliotheken (pro Fläche und Zeitpunkt). Mit der Cluster-Analyse (2.12.3) wurden die Klonbibliotheken daraufhin untersucht, wie sehr sich die einzelnen Zeitpunkte ähnelten und wie groß die Unterschiede zwischen gedüngter und ungedüngter Fläche waren. Die Phylogramme (2.12.2) dienen vor allem der taxonomischen Einordnung der Dünnwald-OTUs. Die in den Phylogrammen enthaltenen Referenzsequenzen stammten aus der GenBank (die Zugriffsnummern sind in Klammern angegeben). Details zu den Dünnwald-OTUs sind im Anhang zusammengefasst (Tabelle 26 bis Tabelle 28).

### 3.2.1 Ergebnisse zur Diversität von Denitrifikanten im Dünnwaldboden

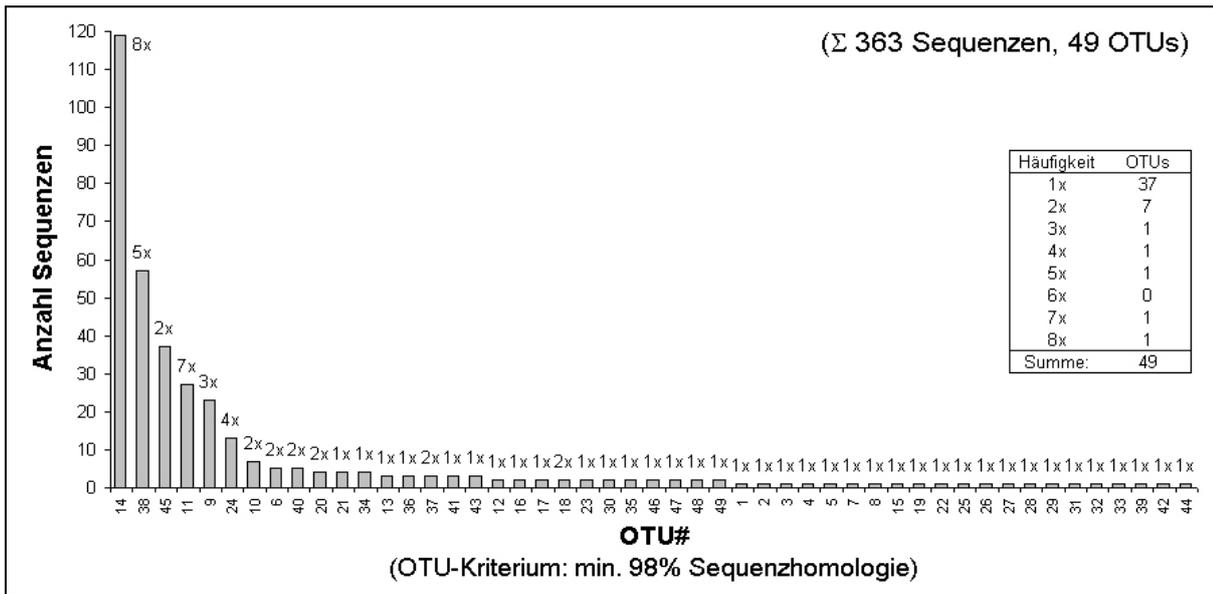
Die Diversität denitrifizierenden Bakterien im Dünnwaldboden wurde mittels des Markergens *nosZ* untersucht, das die  $N_2O$ -Reduktase codiert. Zu diesem Zweck wurden insgesamt 363 partielle *nosZ*-Sequenzen ausgewertet, von denen stammten 209 (58 %) von der gedüngten Fläche und 154 (42 %) von der Kontrollfläche stammten (Tabelle 5). Die 363 Sequenzen ließen sich in insgesamt 49 OTUs einteilen (2.11). Von diesen traten 29 OTUs (59 %) auf der gedüngten Fläche und 33 OTUs (67 %) auf der Kontrollfläche auf; beiden Flächen gemeinsam waren 11 dieser OTUs (Tabelle 5). Die Verteilung der 363 Sequenzen auf die 49 OTUs ist in Bild 13 dargestellt. Aus der Verteilung wird deutlich, dass es nur sehr wenige OTUs gab, die durch viele Sequenzen definiert waren: allein OTU#14 umfasste bereits ein Drittel aller *nosZ*-Sequenzen aus dem Dünnwald. In der Regel kamen die OTUs, die viele Sequenzen beinhalteten, auch in der größten Zahl an separaten Klonbibliotheken vor (Bild 13).

**Tabelle 5: Übersicht der *nosZ*-Klonbibliotheken aus dem Dünnwaldboden**

Zeitpunkt:	02. Okt. 2002	20. Nov. 2002	21. Feb. 2003	17. Apr. 2003	25. Jul. 2003	21. Sep. 2003	alle zusammen
<i>(a) gedüngte Fläche:</i>	DUN+1	DUN+3	DUN+4	DUN+5	DUN+6	DUN+7	DUN+
Sequenzen	39	44	20	0	39	67	209
OTUs, gesamt (exklusiv)	9 (4)	11 (8)	2 (0)	---	7 (3)	8 (1)	29 (16)
SHANNON $H_s$ ( $E_s$ )	1,59 (0,72)	1,27 (0,53)	0,50 (0,72)	---	1,54 (0,79)	0,89 (0,43)	2,01 (0,60)
<i>(b) ungedüngte Fläche:</i>	DUN-1	DUN-3	DUN-4	DUN-5	DUN-6	DUN-7	DUN-
Sequenzen	16	47	0	31	28	32	154
OTUs, gesamt (exklusiv)	1 (0)	15 (10)	---	4 (1)	11 (6)	10 (4)	33 (22)
SHANNON-Index $H_s$ ( $E_s$ )	0 (N/A)	2,17 (0,80)	---	0,76 (0,55)	2,22 (0,92)	2,06 (0,89)	2,68 (0,77)
<i>beiden Flächen gemeinsame OTUs:</i>	1	2	---	---	4	3	11

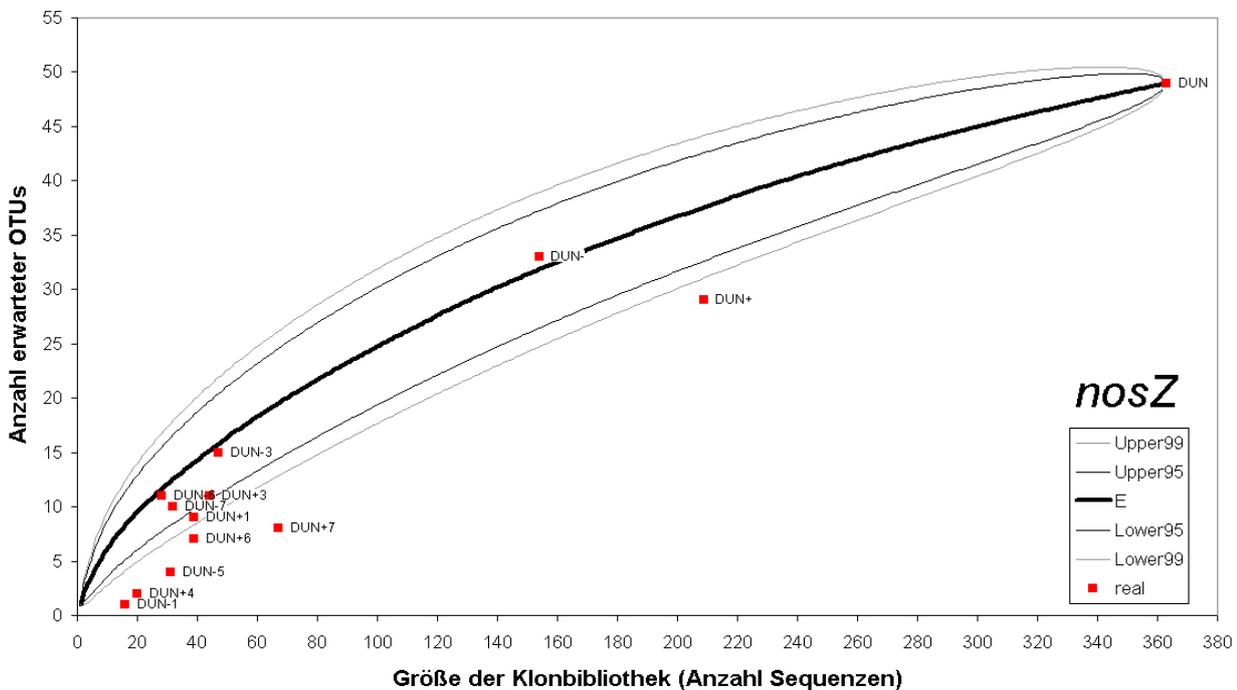
*Legende zu Tabelle 5:* Die insgesamt 363 *nosZ*-Sequenzen aus dem Dünnwaldboden verteilten sich auf zehn Bodenproben. Hinter der Zahl der OTUs ist in die Klammern die Anzahl der OTUs angegeben, die einzig in der jeweiligen Probe gefunden wurden (exklusiv).

**Bild 13: Verteilung der 363 *nosZ*-Sequenzen aus dem Dünnwaldboden auf die 49 OTUs**



Legende zu Bild 13: Die insgesamt 363 aus dem Dünnwaldboden erhaltenen *nosZ*-Sequenzen verteilen sich sehr ungleichmäßig auf die einzelnen OTUs. Ein Drittel aller Sequenzen gehörte zu OTU#14, während 21 der 49 OTUs (entspricht 43 %) nur durch eine Sequenz definiert waren. Die Zahlen über den Balken geben an, in wievielen Klonbibliotheken (von maximal 10) die betreffende OTU vertreten war. Die Tabelle rechts im Bild fasst diese Daten zusammen (vergleiche Text).

**Bild 14: Rarefaction-Analyse von *nosZ*-Klonbibliotheken für den Dünnwaldboden**



Legende zu Bild 14: Aus den Daten der kombinierten *nosZ*-Klonbibliotheken wurde eine Rarefaction-Kurve erstellt (E), die die Anzahl erwarteter OTUs in Abhängigkeit von der Größe der Klonbibliothek zeigt. Die Grenzen der 95 %- und 99 %-Konfidenzintervalle sind als graue Kurven ober- bzw. unterhalb der Rarefaction-Kurve eingetragen. Die Daten für die realen Klonbibliotheken (und für die zusammengefassten Bibliotheken DUN- und DUN+) sind zum Vergleich als rote Quadrate gezeigt.

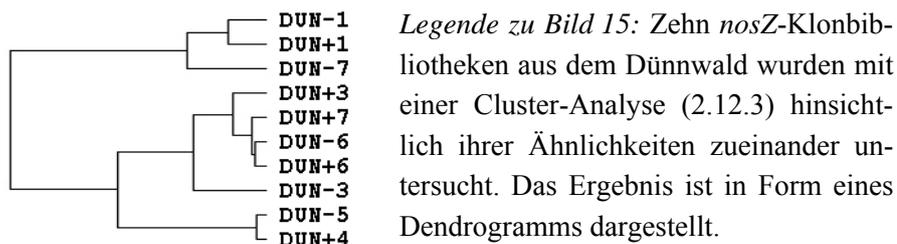
### 3.2.1.1 Rarefaction-Analyse der *nosZ*-Klonbibliotheken für den Dünnwaldboden

Die Daten zur Verteilung der 363 *nosZ*-Sequenzen auf die 49 OTUs der kombinierten Klonbibliothek (vergleiche Bild 13) wurden für eine Rarefaction-Analyse eingesetzt (2.13.2). Die resultierende Kurve ist zusammen mit den realen Werten für die einzelnen *nosZ*-Bibliotheken in Bild 14 dargestellt. Aus der geringen Steigung im Endbereich der Kurve (Bild 14) ist zu schließen, dass die Sequenzierung von mehr Klonen relativ wenige neue OTUs erbracht hätte. Die zehn Dünnwald-Klonbibliotheken zu den einzelnen Bodenproben hatten einen durchschnittlichen Umfang von 25,9 Sequenzen, die zu 5,6 OTUs gehörten. Nach der Rarefaction-Kurve wären 11 OTUs mit einer Amplitude von 6 bis 16 (99 % Konfidenz) zu erwarten gewesen (Bild 14). Tatsächlich lagen nur fünf der zehn Bibliotheken im erwarteten Bereich. Die Ursachen dieser mangelhaften Übereinstimmung sind in Abschnitt 4.2.7 diskutiert.

### 3.2.1.2 Cluster-Analyse der *nosZ*-Klonbibliotheken für den Dünnwaldboden

Für zehn *nosZ*-Klonbibliotheken (vergleiche Tabelle 5), die auf klonierte PCR-Produkte aus dem Dünnwaldboden zurückgingen, wurde die Ähnlichkeit zueinander über eine Cluster-Analyse (2.12.3) ermittelt und in Bild 15 graphisch dargestellt. Wie im Dendrogramm für die Klonbibliotheken (Bild 15) zu erkennen ist, waren nach der Cluster-Analyse die Unterschiede zwischen den Flächen zum sechsten (DUN+/-6) und ersten (DUN+/-1) Zeitpunkt, aber auch zwischen DUN+4 und DUN-5 am geringsten. Zum dritten (DUN+/-3) und insbesondere zum siebten Zeitpunkt (DUN+/-7) waren die Unterschiede zwischen den Flächen dagegen groß. Eine Gruppierung der zehn Klonbibliotheken nach den Flächen („gedüngt vs. ungedüngt“) war nicht festzustellen.

**Bild 15: Cluster-Analyse von zehn *nosZ*-Klonbibliotheken aus dem Dünnwaldboden**



### 3.2.1.3 Phylogenetische Auswertung partieller *nosZ*-Sequenzen aus dem Dünnwaldboden

Die phylogenetische Analyse der 49 *nosZ*-OTUs (vergleiche Tabelle 4) ist ergab das Bild 16 dargestellt NJ-Phylogramm (2.12.2). Das zugrundeliegende *multiple sequence alignment* umfasste im ersten Schritt 255 Sequenzen – darunter die 49 Prototypen der Dünnwald-OTUs – und damit auch alle GenBank-Sequenzen, die den *nosZ*-F/*nosZ*-R-Genbereich einschlossen (Stand 5. Oktober 2004). Um das Phylogramm lesbar darstellen zu können, wurden aus dem ersten NJ-Phylogramm 140 Sequenzen wieder entfernt. Hierbei handelte es sich um Sequenzen unkultivierter Bakterien, die im Phylogramm weit von den Dünnwald-OTUs entfernt standen, oder um GenBank-Sequenzen aus Gruppen einander sehr ähnlicher Sequenzen („GenBank-OTUs“). Im end-

gültigen Phylogramm (Bild 16) sind daher nur 115 der ursprünglich 255 Sequenzen enthalten. Dreißig dieser Sequenzen stammen aus identifizierten Bakterien und 37 aus unkultivierten Bakterien von anderen Standorten als dem Dünnwald. Als *outgroup* diente die Sequenz von *Wolinella succinogenes* (AJ640086), die im Phylogramm isoliert stand und eine maximale paarweise Homologie von 49,1 % zu den übrigen Sequenzen aufwies.

Die OTUs aus dem Dünnwaldboden streuten über die ganze Breite der bekannten *nosZ*-Sequenzen, doch bildeten 22 der insgesamt 49 OTUs gleichzeitig auch ein distinktes Cluster (Bild 16, Mitte). Die Diversität in diesem Cluster war aber hoch, da die durchschnittliche paarweise Sequenzhomologie für die 22 OTUs in dieser Gruppe  $81,6 \pm 5,9$  % betrug. Die zu dieser Gruppe mit  $81,0 \pm 1,6$  % Homologie nächst-verwandte GenBank-Sequenz wurde in Mais-Rhizosphärenboden gefunden (Mounier *et al.* 2004).

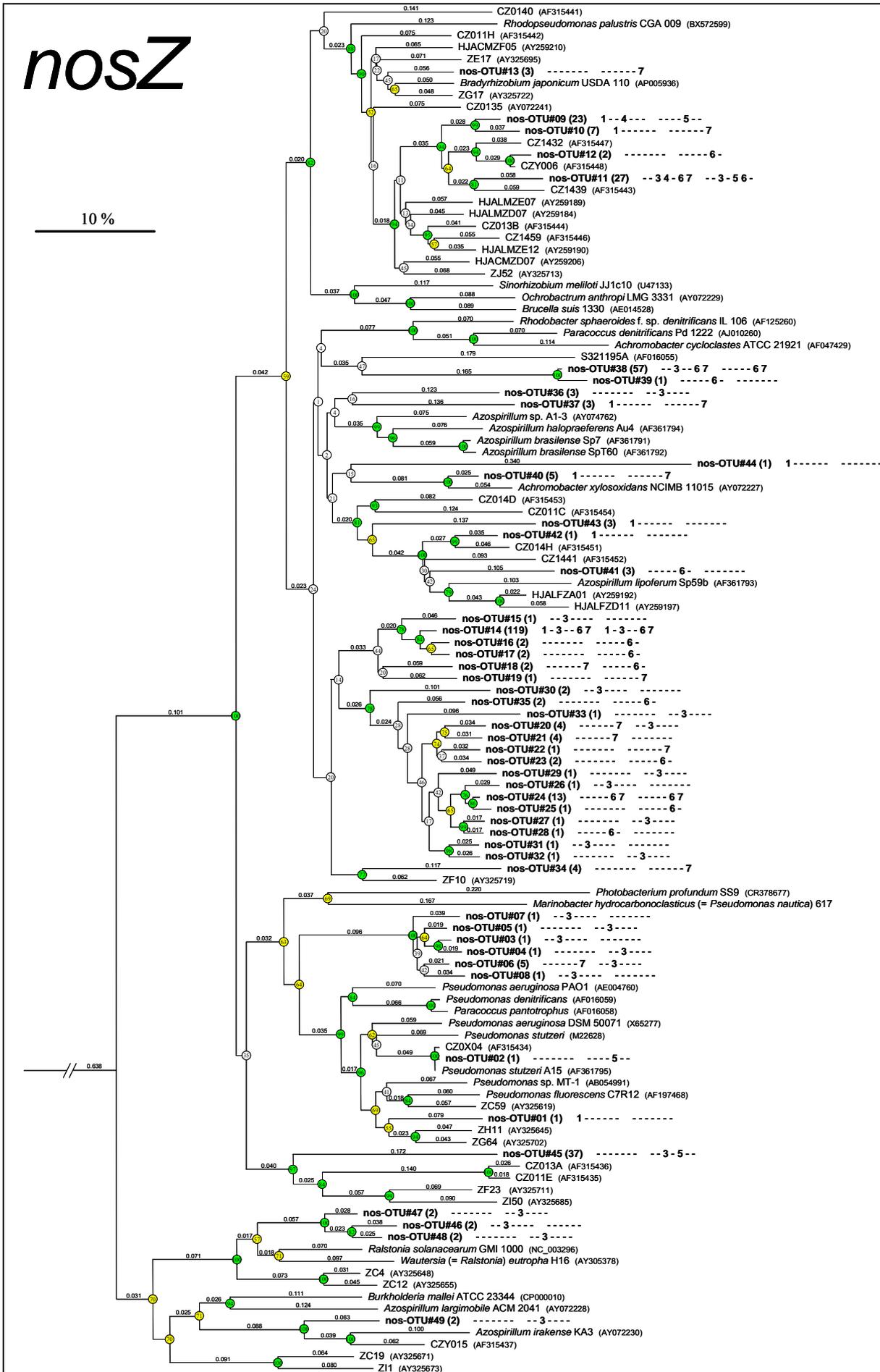
Hervorzuheben ist, dass die OTU#02 praktisch identisch zu den *nosZ*-Sequenzen von *Pseudomonas stutzeri* A15 und dem unkultivierten Bakterium CZ0X04 war. Letzteres ist eine Sequenz aus dem Chorbuschboden (Köln), der in einem früheren Projekt untersucht worden war (Rösch *et al.* 2002). Neben dieser OTU konnte auch die mit der Nummer #01 eindeutig den Pseudomonaden zugerechnet werden, doch stammten die nächst-verwandten Sequenzen hier aus *Pseudomonas fluorescens* (AF197468) und aus dem unkultivierten Bakterium ZG64 (Mounier *et al.* 2004); die paarweisen Sequenzhomologien betrugen 87,1 % bzw. 86,5 %. Die kleine, OTUs #03 bis #08 umfassende Gruppe repräsentiert Gammaproteobakterien, möglicherweise ebenfalls Pseudomonaden. Sämtliche übrigen Dünnwald-OTUs (41 von 49, entspricht einem Anteil von 84 %) konnten keiner taxonomischen Gruppe zugeordnet werden (siehe auch Tabelle 26, Anhang).

---

*Legende zu Bild 16:* Das NJ-Phylogramm zeigt die Verwandtschaft der 49 Dünnwald-OTUs (vergleiche Tabelle 26, Anhang) zu 67 GenBank-Sequenzen, darunter 37 von unidentifizierten Bakterien aus Umweltproben. Bei den Dünnwald-OTUs ist vermerkt, in welchen der Bodenproben diese nachgewiesen wurden. Die Symbolkette -- 3 ---- ---- 5 -- steht für eine OTU, das durch Sequenzen in den Proben DUN+3 und DUN-5 vertreten ist. Die Zahlen über den Ästen des Phylogramms geben die genetische Distanz an (in Nukleotidaustauschen pro Position im zugrundeliegenden Alignment mit 687 Positionen). Äste mit *bootstrap*-Werten über 75 % (bezogen auf 1000 Resamplings) sind mit einem grünen Kreis markiert, solche mit *bootstrap*-Werten von 50 - 75 % mit einem gelben Kreis. Zur Wurzelung wurde die Sequenz von *Wolinella succinogenes* (AJ640086) gewählt.

Sequenzen aus Umweltproben: Mais-Rhizosphäre (Mounier *et al.* 2004): ZC59, ZH11, ZC4, ZC12, ZC19, ZI1, ZI50, ZE17, ZG64, ZF23, ZJ52, ZF10 und ZG17 – Waldboden, Cascade Mountains, Oregon (Rich *et al.* 2003): HJALMZD07, HJALMZE07, HJALMZE12, HJALFZA01, HJALFZD11, HJACMZD07, HJACMZD05 – Laubwald Köln-Chorbusch (Rösch *et al.* 2002): CZ0X04, CZ011E, CZ013A, CZY015, CZ0140, CZ011H, CZ1439, CZ013B, CZ1459, CZ1432, CZY006, CZ014H, CZ1441, CZ014D, CZ011C, CZ0135.

Bild 16: Phylogramm zur Einordnung der 49 nosZ-OTUs aus dem Dünnwaldboden



### 3.2.2 Ergebnisse zur Diversität von stickstofffixierenden Mikroorganismen im Dünnwaldboden

Zur Untersuchung der Diversität von diazotrophen Mikroorganismen im Dünnwaldboden wurden insgesamt 500 partielle Sequenzen von *nifH* ausgewertet. Von diesen Sequenzen stammten 294 (59 %) von der gedüngten Fläche und 206 (41 %) von der Kontrollfläche (Tabelle 6). Die 500 Sequenzen wurden zu 47 OTUs zusammengefasst (2.11), von denen 40 (85 %) auf der gedüngten, aber nur 26 (55 %) auf der ungedüngten Fläche vertreten waren. Der Anteil der OTUs, die auf beiden Flächen vertreten waren, lag bei 40 % (19 von 47 OTUs). In Bild 17 ist die Verteilung der 500 *nifH*-Sequenzen auf die insgesamt 47 OTUs dargestellt. Gewöhnlich waren die OTUs mit den meisten Sequenzen auch in den meisten Bibliotheken zu finden. Eine Ausnahme stellte OTU#04 mit 115 Sequenzen dar, die sich etwa gleichmäßig auf die Bibliotheken DUN+3 und -3 aufteilten.

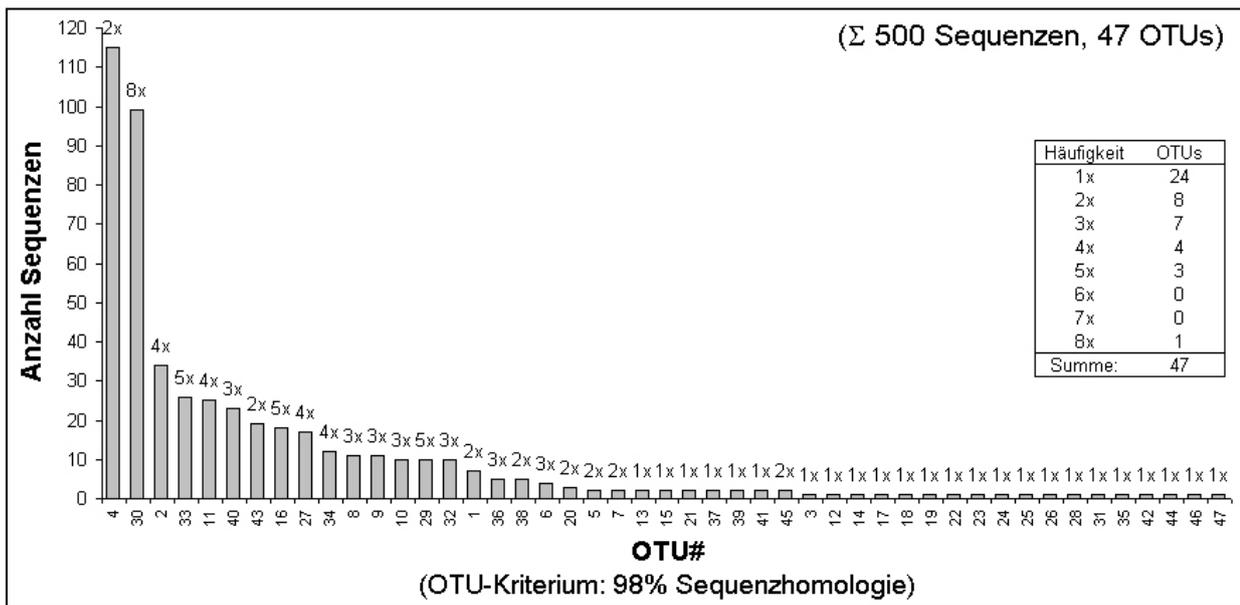
**Tabelle 6: Übersicht der *nifH*-Klonbibliotheken aus dem Dünnwaldboden**

Zeitpunkt:	02. Okt. 2002	23. Okt. 2002	20. Nov. 2002	21. Feb. 2003	25. Jul. 2003	21. Sep. 2003	alle zusammen
<i>(a) gedüngte Fläche:</i>	DUN+1	DUN+2	DUN+3	DUN+4	DUN+6	DUN+7	DUN+
Sequenzen	100	30	101	0	18	45	294
OTUs, gesamt (exklusiv)	17 (5)	15 (2)	17 (6)	---	7 (2)	9 (2)	40 (21)
SHANNON $H_s$ ( $E_s$ )	2,40 (0,85)	2,38 (0,88)	1,59 (0,56)	---	1,61 (0,83)	1,54 (0,70)	2,81 (0,76)
<i>(b) ungedüngte Fläche:</i>	DUN-1	DUN-2	DUN-3	DUN-4	DUN-6	DUN-7	DUN-
Sequenzen	43	33	77	4	12	37	206
OTUs, gesamt (exklusiv)	7 (1)	6 (1)	8 (1)	2 (1)	4 (1)	8 (2)	26 (7)
SHANNON-Index $H_s$ ( $E_s$ )	1,54 (0,79)	1,21 (0,68)	1,10 (0,53)	0,69 (1,00)	1,13 (0,81)	1,72 (0,83)	2,47 (0,76)
<i>beiden Flächen gemeinsame OTUs:</i>	5	5	5	---	3	3	19

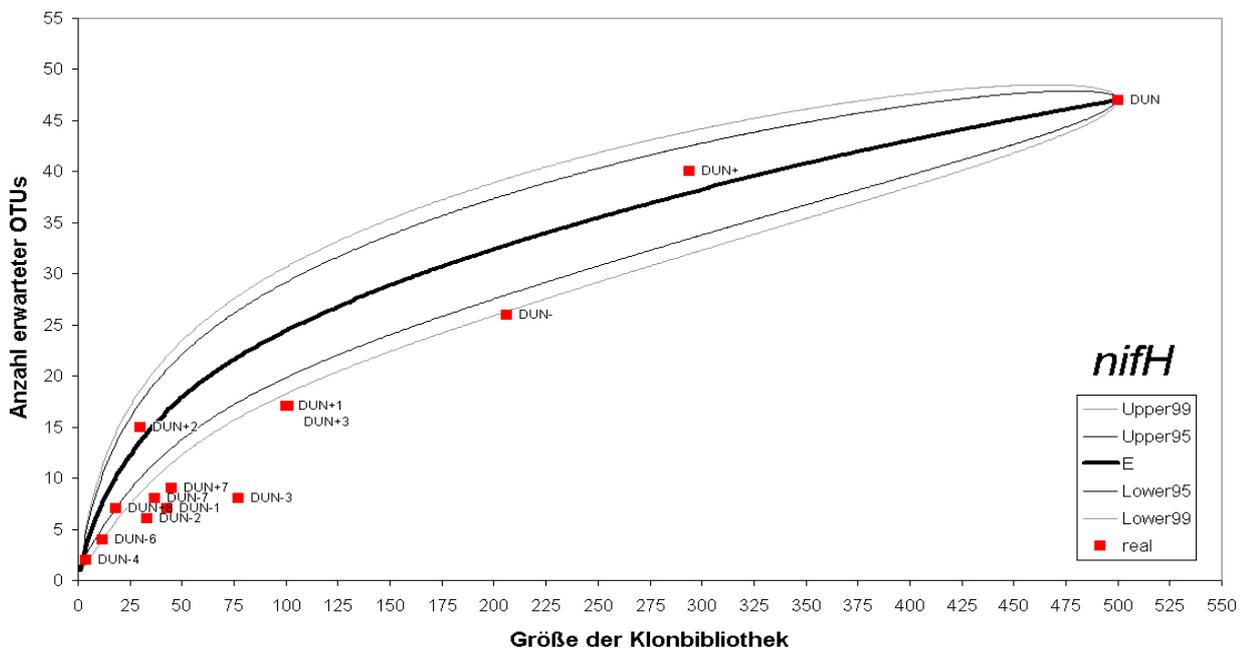
*Legende zu Tabelle 6:* Die insgesamt 500 *nifH*-Sequenzen aus dem Dünnwaldboden verteilten sich auf elf Bodenproben; für DUN+4, +5 und -5 lagen keine Sequenzen vor. Hinter der Zahl der OTUs ist in Klammern die Anzahl der OTUs angegeben, die einzig (exklusiv) in dieser Probe gefunden wurde.

#### 3.2.2.1 Rarefaction-Analyse der *nifH*-Klonbibliotheken für den Dünnwaldboden

Zur Beurteilung der verschiedenen *nifH*-Klonbibliotheken (vergleiche Tabelle 6) wurde eine Rarefaction-Analyse durchgeführt (2.13.2). Die Rarefaction-Kurve (Bild 18) zeigt einen steilen Anfangsbereich und flacht dann schnell ab. Das optimale Verhältnis von OTUs zur Anzahl sequenzierter Klone liegt bei Klonbibliotheken von bis zu 50 Sequenzen vor. Außer der Rarefaction-Kurve sind in Bild 18 die Daten für die elf realen Dünnwald-Klonbibliotheken und zusätzlich für die zusammengefassten Bibliotheken DUN- (206 Sequenzen, 26 OTUs) und DUN+ (294 Sequenzen, 40 OTUs) als rote Punkte eingetragen. Die Punkte für DUN+1 und DUN+3 sind im Bild nicht unterscheidbar, da beide Bibliotheken je 17 OTUs enthielten, bei Sequenzzahlen von 100 bzw. 101 (vergleiche Tabelle 6). Die durchschnittliche Größe der *nifH*-Bibliotheken lag bei 45,5 Sequenzen und 9,1 OTUs. Der Erwartungswert für eine Klonbibliothek dieser Größe lag nach der Rarefaction-Analyse (mit 99 %iger Sicherheit) allerdings bei  $17 \pm 4$  OTUs. Im erwarteten Bereich lagen neben den für die beiden Flächen zusammengefassten Bibliotheken nur vier der zehn einzelnen Klonbibliotheken (siehe Diskussion in Abschnitt 4.2.8).

**Bild 17: Verteilung der 500 *nifH*-Sequenzen aus dem Dünnwaldboden auf die 47 OTUs**

**Legende zu Bild 17:** Die insgesamt 500 aus dem Dünnwaldboden erhaltenen *nifH*-Sequenzen verteilen sich ungleichmäßig auf die einzelnen OTUs. Die beiden häufigsten OTUs (#04 und #30) stellten zusammen 43 % aller Sequenzen. Gleichzeitig waren mehr als die Hälfte aller OTUs nur mit ein oder zwei Sequenzen vertreten (57 %). Die Zahlen über den Balken geben an, in wievielen Klonbibliotheken (von maximal 11) das betreffende OTU vertreten war. Die Tabelle rechts im Bild fasst diese Daten zusammen (vergleiche Text).

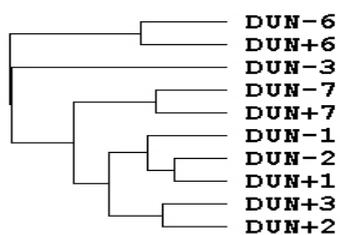
**Bild 18: Rarefaction-Analyse von *nifH*-Klonbibliotheken für den Dünnwaldboden**

**Legende zu Bild 18:** Aus den Daten der kombinierten *nifH*-Klonbibliotheken wurde eine Rarefaction-Kurve erstellt (E), die die Anzahl erwarteter OTUs in Abhängigkeit von der Größe der Klonbibliothek zeigt. Die Grenzen der 95 %- und 99 %-Konfidenzintervalle sind als graue Kurven ober- bzw. unterhalb der Rarefaction-Kurve eingetragen. Die Daten für die realen Klonbibliotheken (und für die zusammengefassten Bibliotheken DUN- und DUN+) sind zum Vergleich als rote Quadrate gezeigt.

### 3.2.2.2 Cluster-Analyse der *nifH*-Klonbibliotheken für den Dünnwaldboden

Um die Ähnlichkeit von zehn *nifH*-Klonbibliotheken untereinander darzustellen, wurde eine Cluster-Analyse durchgeführt (2.12.3). Das Resultat ist in Bild 19 graphisch dargestellt. Dem Dendrogramm (Bild 19) zufolge waren die Klonbibliotheken von DUN+/-6 und DUN+/-7 einander recht ähnlich. Die Bibliotheken von DUN+/-1, DUN+/-2 und DUN+3 gruppierten im gleichen Cluster (DUN-3 stand als einzige Bibliothek isoliert). Die Unterschiede zwischen den Zeitpunkten waren demnach größer als zwischen den Versuchsflächen (gedüngt und ungedüngt).

**Bild 19: Cluster-Analyse von zehn *nifH*-Klonbibliotheken aus dem Dünnwaldboden**



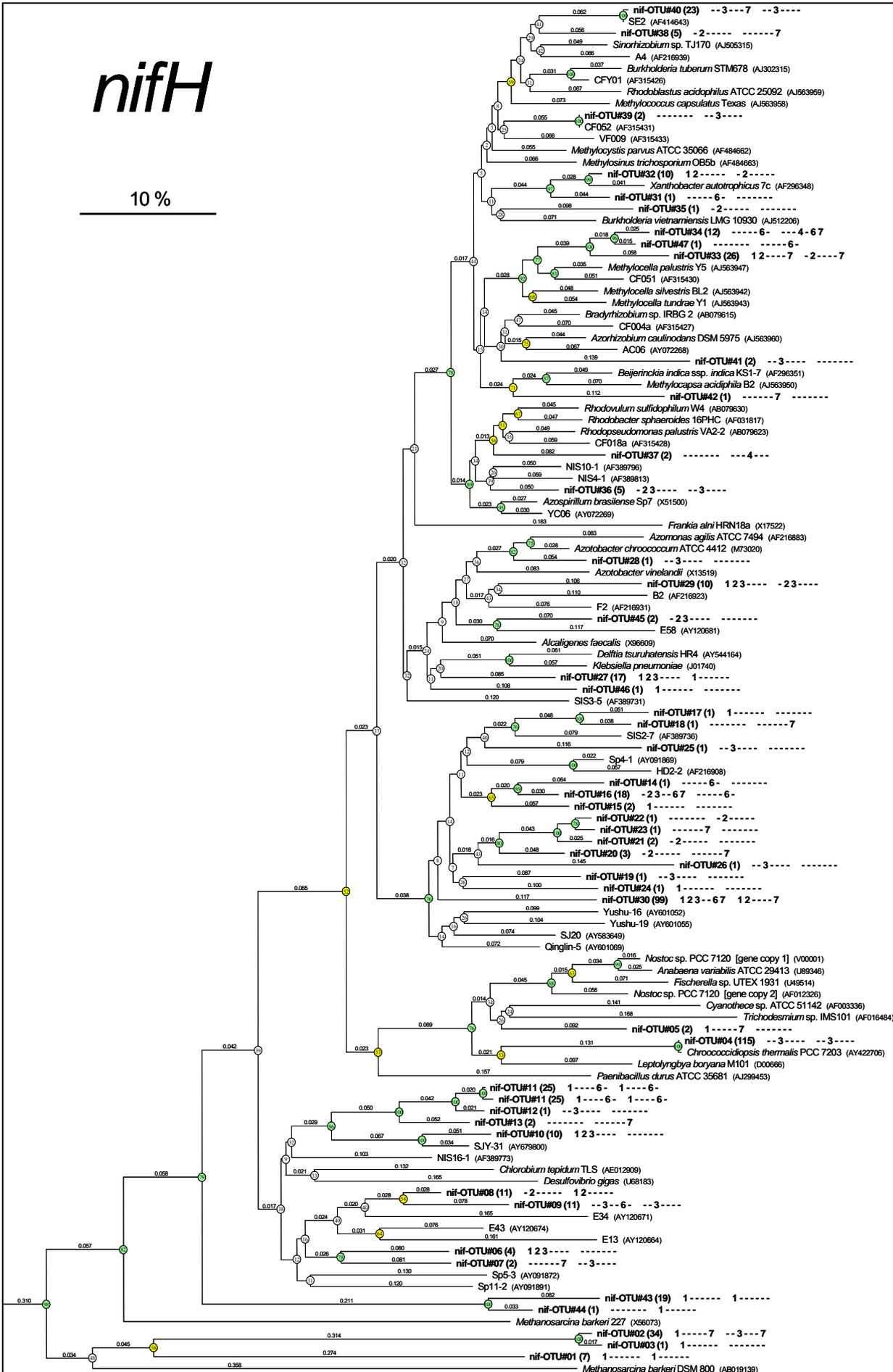
Legende zu Bild 19: Das Dendrogramm, Ergebnis einer Cluster-Analyse von zehn Dünnwald-Klonbibliotheken, zeigt die Ähnlichkeit von zehn verschiedenen *nifH*-Klonbibliotheken untereinander. Für Details zur Konstruktion siehe Abschnitt 2.12.3.

### 3.2.2.3 Phylogenetische Auswertung partieller *nifH*-Sequenzen aus dem Dünnwaldboden

Die 47 *nifH*-OTUs aus den Dünnwald-Klonbibliotheken wurden über eine phylogenetische Analyse (2.12.2) mit GenBank-Sequenzen verglichen. Die erste Auswahl von GenBank-Sequenzen enthielt die jeweils 50 besten BLAST-Treffer für jede der 47 OTUs. Unter diesen  $47 \times 50$  Sequenzen waren nur 411 verschiedene, die den vollständigen *nifH*-F/R-Bereich umspannten. Die 71 im endgültigen Phylogramm (Bild 20) enthaltenen GenBank-Sequenzen wurden anhand eines Phylogramms jener 411 Sequenzen ausgewählt und beinhalteten alle Sequenzen identifizierter Mikroorganismen ( $N = 40$ ) in diesem Alignment und 31 Sequenzen aus Umweltproben, die im Phylogramm in unmittelbarer Nähe zu Dünnwald-OTUs standen. Das Phylogramm wurde mit der Sequenz des Spirochäten *Treponema azotonutricium* (AF325804) gewurzelt.

Eine Zuordnung von Dünnwald-OTUs zu bekannten Gruppen von Mikroorganismen war nur für OTU#05 und #04 möglich, die cyanobakteriellen Ursprungs waren (Bild 20). Dabei war OTU#04 mit einer Homologie von 99,7 % identisch zur Sequenz aus *Chroococcidiopsis thermalis* (AY422706); OTU#05 stand dagegen isoliert innerhalb der Cyanobacteria. Die anderen OTUs ließen sich noch nicht einmal bis zur Klasse einordnen, obwohl die meisten Sequenzen aus Proteobakterien zu stammen schienen (Bild 20, obere Hälfte). Ein großes Cluster – im Phylogramm zwischen den Ästen der Cyanobakterien und der Proteobakterien stehend – umfasst neben den Dünnwald-OTUs #14 bis #26 und #30 auch mehrere Sequenzen aus anderen Umweltproben. Die GenBank enthielt aber keine Sequenz eines bekannten Prokaryoten, die in diese Gruppe passen würde. Fünf der 47 OTUs (#01 bis #03, #43 und #44) waren mit einer maximalen paarweisen Homologie von weniger als 60 % so entfernt zu allen GenBank-Sequenzen verwandt, dass unklar blieb, ob es sich um Sequenzen aus Bakterien oder Archaeen handelte. Weitere acht OTUs (#06 bis #13) repräsentierten wahrscheinlich Bakterien, konnten aber keinem Phylum zugeordnet werden.

Bild 20: Phylogramm zur Einordnung der 47 *nifH*-OTUs aus dem Dünnwaldboden



*Legende zu Bild 20:* Das Phylogramm zeigt die Verwandtschaft der 47 *nifH*-OTUs (vergleiche Tabelle 27, Anhang) aus dem Dünnwaldboden zu 71 GenBank-Sequenzen, darunter 40 von identifizierten Bakterien. Die Zahl über den Ästen steht für die genetische Distanz (in Nukleotidaustauschen pro Position im zugrundeliegenden Alignment mit 349 Positionen). Äste mit *bootstrap*-Werten über 75 % (bezogen auf 1000 Berechnungen) sind mit einem grünen Kreis markiert, solche mit Werten von 50 - 75 % mit einem gelben Kreis. Zur Wurzelung wurde die Sequenz von *Treponema azotonutricium* (AF325804) gewählt. Sequenzen aus Umweltproben: „Seegraswiese“ (Bagwell *et al.* 2002): SE2 – unbekannte Umweltprobe (Decker *et al.* 2002): Sp4-1 – Rhizosphäre von *Spartina alterniflora* (Lovell *et al.* 2000): HD2-2, B2, F2, A4 – tote Biomasse von *S. alterniflora* (Lovell *et al.* 2001): SIS3-5, SIS2-7, NIS16-1, NIS10-1, NIS4-1 – Tiefsee (Mehta *et al.* 2003): E13, E34, E43, E58 – Waldboden, Köln-Chorbusch (Rösch *et al.* 2002): CFY01, CF004a, CF018a, CF051, CF052, VF009, AC06, YC06 – Boden, Qing-Zang Plateau, China (Zhang *et al.* 2004): Yushu-16, Yushu-19, SJY-31, SJ20, Qinglin-5.

Zwei Dünnwald-OTUs waren beinahe identisch zu Sequenzen aus unkultivierten Umweltbakterien waren: OTU#40 zu Klon SE2, einer Sequenz aus einer tropischen Seegraswiese (Bagwell *et al.* 2002) und OTU#39 zu CF052, einem Klon aus einem Waldboden bei Köln-Chorbusch (Rösch *et al.* 2002). OTU#32 wies mit 94 % Homologie zu *Xanthobacter autotrophicus* die größte Verwandtschaft zu einem identifizierten Bakterium auf (die Identität von *C. thermalis* und OTU#04 ist in 4.2.8 diskutiert). Bedeutende Gruppen N<sub>2</sub>-fixierender Bakterien wie Rhizobien, Pseudomonaden oder Azospirillen konnten für den Dünnwald über *nifH* nicht nachgewiesen werden.

### 3.2.3 Ergebnisse zur bakteriellen Gesamtdiversität im Dünnwaldboden

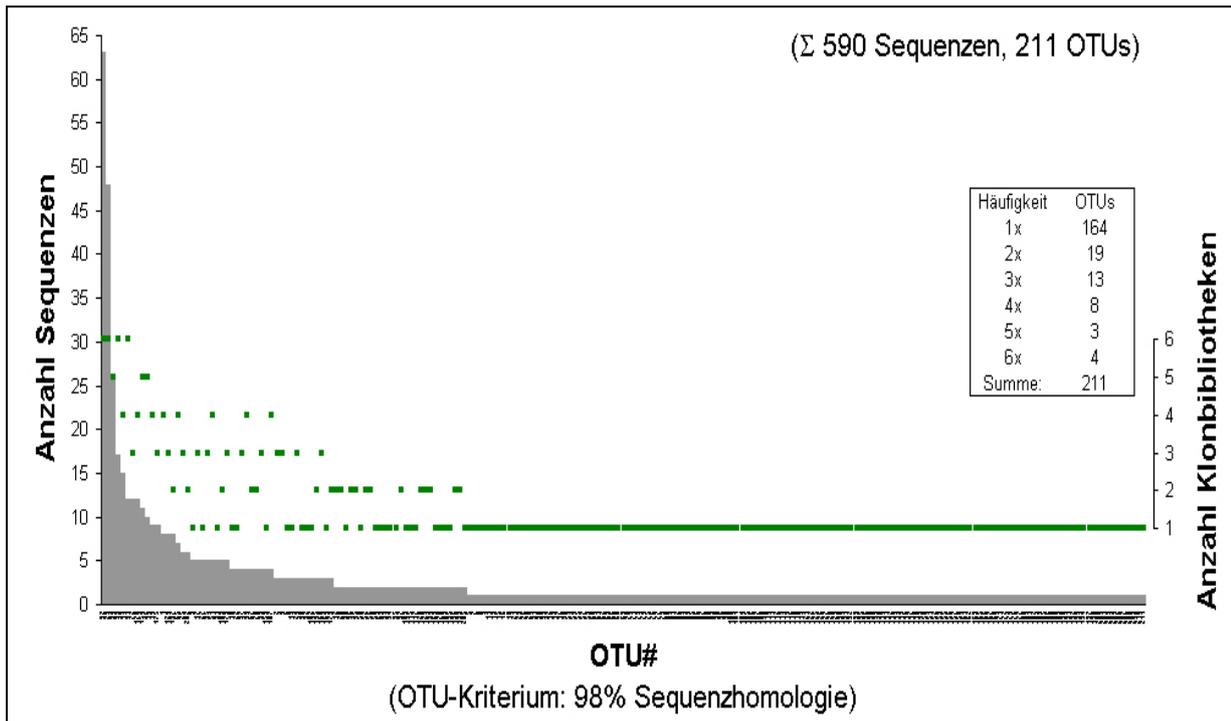
Die bakterielle Gesamtdiversität im Dünnwaldboden wurde anhand des 16S rRNA-Gens untersucht. Insgesamt wurden 590 Klone sequenziert und nach dem 98 %-Kriterium in 211 OTUs eingeteilt (2.11). Wie in Tabelle 7 zusammengefasst ist, stammten die Sequenzen zu etwa gleichen Teilen aus dem Boden der gedüngten (*N* = 299; 51 %) und ungedüngten Fläche (*N* = 291; 49 %). Bei den OTUs war die Kontrollfläche mit 130 OTUs gegenüber 119 OTUs für die gedüngte Fläche etwas stärker repräsentiert. Die Verteilung der insgesamt 590 Sequenzen auf die 211 OTUs ist in Bild 21 dargestellt. Wie auch bei *nosZ* und *nifH* waren die OTUs mit den meisten Sequenzen auch die, die in der größten Zahl von Klonbibliotheken vertreten waren (Bild 21, Skala rechts).

**Tabelle 7: Übersicht der 16S rDNA-Klonbibliotheken aus dem Dünnwaldboden**

Zeitpunkt:	02. Okt. 2002	23. Okt. 2002	20. Nov. 2003	25. Jul. 2003	21. Sep. 2003	alle zusammen
<i>(a) gedüngte Fläche:</i>	DUN+1	DUN+2	DUN+3	DUN+6	DUN+7	DUN+
Sequenzen	92	14	73	0	120	299
OTUs, gesamt (exklusiv)	45 (21)	8 (4)	35 (19)	---	58 (34)	119
exklusiv / gesamt	47 %	50 %	54 %	---	59 %	---
SHANNON <i>H</i> <sub>s</sub> ( <i>E</i> <sub>s</sub> )	3,38 (0,89)	1,67 (0,80)	3,27 (0,92)	---	3,57 (0,88)	4,08 (0,85)
<i>(b) ungedüngte Fläche:</i>	DUN-1	DUN-2	DUN-3	DUN-6	DUN-7	DUN-
Sequenzen	58	27	75	9	122	291
OTUs, gesamt (exklusiv)	33 (10)	20 (15)	37 (19)	7 (5)	67 (37)	130
exklusiv / gesamt	30 %	75 %	51 %	71 %	55 %	---
SHANNON <i>H</i> <sub>s</sub> ( <i>E</i> <sub>s</sub> )	3,19 (0,91)	3,02 (0,98)	3,37 (0,93)	1,83 (0,94)	3,86 (0,92)	4,37 (0,90)
<i>beiden Flächen gemeinsame OTUs (Anteil):</i>	10 (15 %)	1 (3 %)	11 (18 %)	---	15 (14 %)	38 (18 %)

*Legende zu Tabelle 7:* Die 590 16S rDNA-Sequenzen aus dem Dünnwaldboden stammten zu beinahe gleichen Teilen von der gedüngten (299) und der ungedüngten (291) Fläche. Für die fehlenden Zeitpunkte (21. Februar 2003 und 17. April 2003) lagen keine 16S rDNA-Sequenzen vor. Die OTUs einer bestimmten Probe kamen zu 30 - 75 % exklusiv in dieser und keiner anderen Probe vor. Der Anteil der beiden Flächen gemeinsamen OTUs bezieht sich auf die Zahl der insgesamt zu einem Zeitpunkt vorkommenden OTUs, z. B. für DUN1 10 von  $(45 + 33 - 10) = 68$  OTUs. Erläuterungen zu den Diversitätsindices  $H_S$  und  $E_S$  sind in Abschnitt 2.13.1 gegeben.

**Bild 21:** Verteilung der 16S rDNA-Sequenzen aus dem Dünnwaldboden auf die OTUs



*Legende zu Bild 21:* Die insgesamt 590 16S rDNA-Sequenzen aus dem Dünnwaldboden verteilten sich ungleichmäßig auf die 211 OTUs. Nur zehn OTUs umfassten zehn oder mehr Sequenzen und OTU#037 war mit 63 Sequenzen das dominanteste in der kombinierten Klonbibliothek. Die grünen Punkte symbolisieren für jedes OTU, in wievielen Klonbibliotheken es vertreten war (Skala rechts). Die eingesetzte Tabelle rechts im Bild fasst die Daten zusammen.

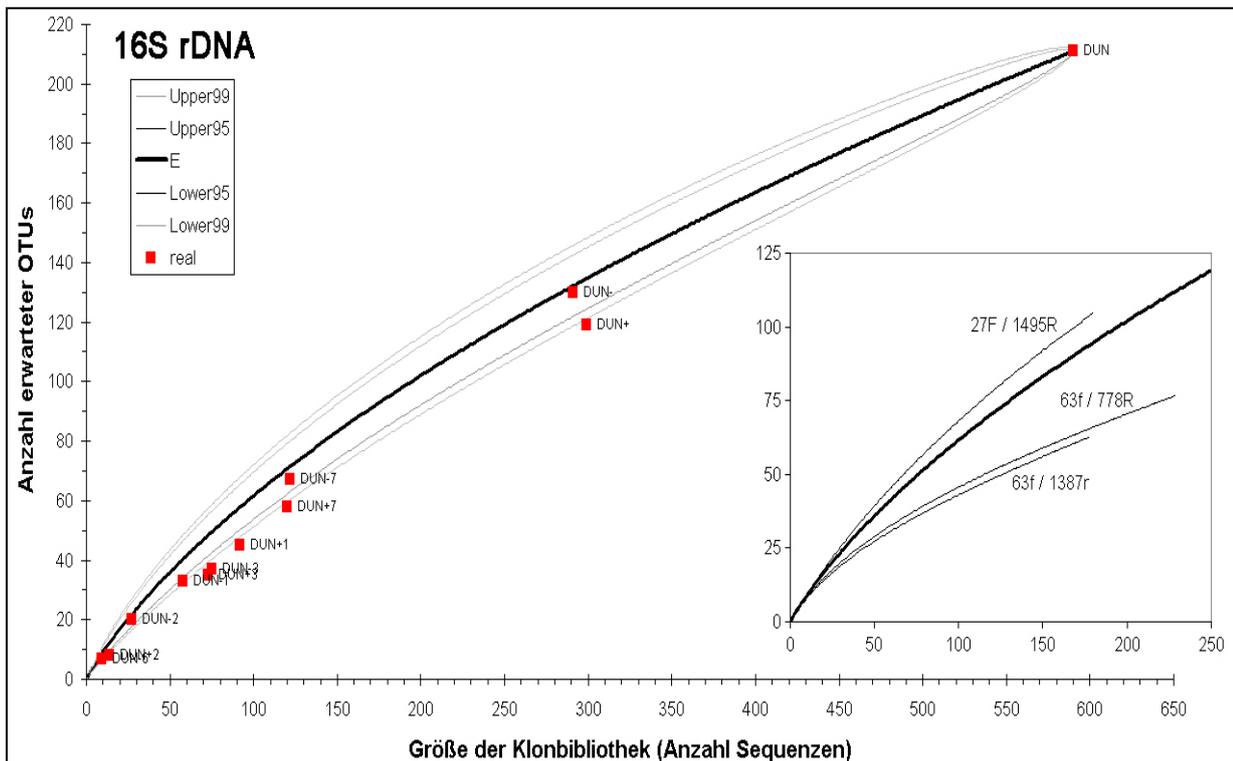
### 3.2.3.1 Rarefaction-Analyse der 16S rDNA-Klonbibliotheken

Das Ergebnis einer Rarefaction-Analyse (2.13.2) der kombinierten 16S rDNA-Klonbibliothek mit insgesamt 590 Sequenzen aus 211 OTUs ist in Bild 22 wiedergegeben. Die Rarefaction-Kurve ( $E$ ) war auch beim Endpunkt noch weit vom Sättigungsbereich entfernt, was bedeutet, dass die Diversität der bakteriellen Gemeinschaft (genauer: PCR-Produkte) nur stichprobenhaft erfasst wurde. Die Werte der separaten Bibliotheken – in Bild 22 als rote Quadrate gezeigt – lagen zumeist innerhalb des 99 %-Konfidenzintervalls. Daher waren die Klonbibliotheken der einzelnen Zeitpunkte, auch wenn sie weniger als 50 Sequenzen enthielten, vermutlich repräsentativ für die Gesamtdiversität.

Bei der Erstellung der 16S rDNA-Klonbibliotheken wurden drei verschiedene PCR-Primerpaare eingesetzt: 27F/1495R, 63f/778R und 63f/1387r (Tabelle 3, S. 18). Daher wurden zusätzlich Rare-

faction-Analysen durchgeführt, für die die 590 Sequenzen je nach Primerpaar in drei Gruppen eingeteilt wurden (vergleiche Abschnitt 3.2.3.3). Die zugehörigen Rarefaction-Kurven sind im eingesetzten Diagramm in Bild 22 dargestellt. Für einen Vergleich enthält das Teilbild den Anfangsbereich der Kurve für die kombinierte Klonbibliothek. Bei gleicher Größe einer Klonbibliothek sind bei Verwendung von 27F/1495R die meisten OTUs zu erwarten. Zwischen 63f/778R und 63f/1387r besteht in dieser Hinsicht nur ein marginaler Unterschied (vergleiche Abschnitt 3.2.3.3).

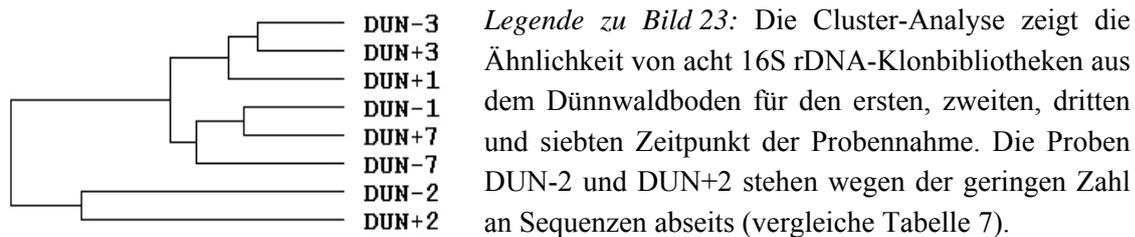
**Bild 22: Rarefaction-Analyse der 16S rDNA-Klonbibliothek aus dem Dünnwaldboden**



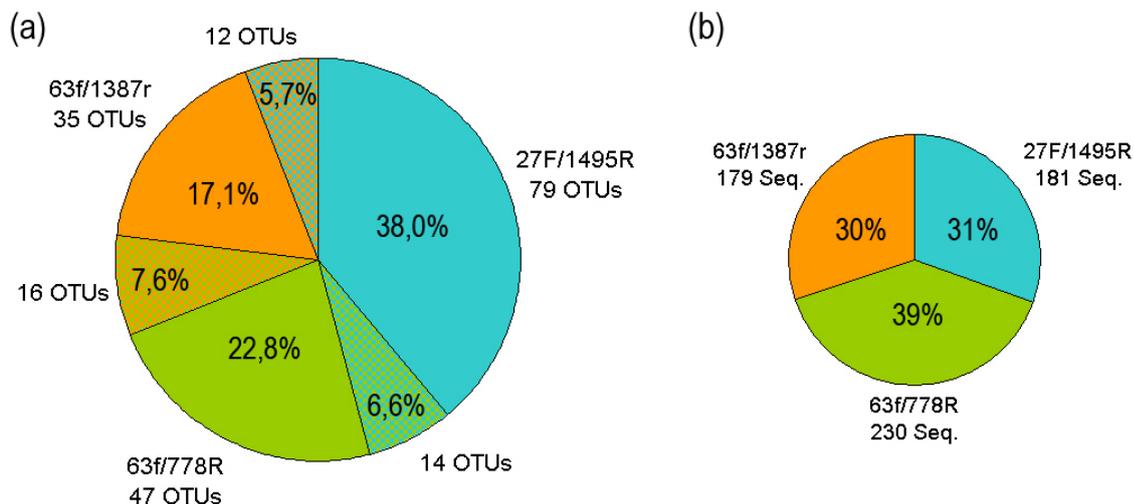
*Legende zu Bild 22:* Grundlage der Rarefaction-Analyse (2.13.2) waren 590 Dünnwald-Sequenzen aus insgesamt 211 OTUs der kombinierten 16S rDNA-Klonbibliothek. Die grauen Kurven beiderseits der zentralen Rarefaction-Kurve (E) geben die Konfidenzgrenzen mit 95 % bzw. 99 % Sicherheit wieder (innere beide bzw. äußere beide Kurven). Die Daten für die realen Klonbibliotheken sind zum Vergleich als rote Quadrate gezeigt. Das rechts unten eingesetzte Teilbild zeigt neben der Rarefaction-Kurve für die gesamte Klonbibliothek (fett) die nach verwendetem Primerpaar separat berechneten Rarefaction-Kurven (alle ohne Konfidenzintervalle). Bei einer gegebenen Probengröße liegt die Zahl der zu erwartenden OTUs für 27F/1495R höher, als für die beiden anderen Primerpaare.

### 3.2.3.2 Cluster-Analyse der 16S rDNA-Klonbibliotheken für den Dünnwaldboden

Die Cluster-Analyse (2.12.3) wurde durchgeführt, um die Ähnlichkeit von 16S rDNA-Klonbibliotheken aus dem Dünnwald untereinander darzustellen. Hierfür wurden die Bibliotheken DUN+/-1, DUN+/-2, DUN+/-3 und DUN+/-7 untersucht (vergleiche Tabelle 7). Nach dem in Form eines Dendrogramms dargestellten Ergebnis (Bild 23) gab es keine Gruppierung der Klonbibliotheken nach gedüngter und ungedüngter Fläche. Statt dessen ähnelten sich die beiden Bibliotheken desselben Zeitpunkts stärker.

**Bild 23: Cluster-Analyse von acht 16S rDNA-Klonbibliotheken aus dem Dünnwaldboden****3.2.3.3 Vergleich der mit den drei 16S rDNA-Primerpaaren erzielten Ergebnisse**

Von den insgesamt 590 16S rDNA-Sequenzen aus dem Dünnwaldboden gingen die meisten (230; 39 %) auf die Primerkombination 63f/778R zurück. Zusätzlich wurden 179 63f/1387r-Klone und 181 27F/1495R-Klone sequenziert, was Anteilen von 30 % bzw. 31 % entsprach (Bild 24b). Bezüglich der OTUs stellten aber die 27F/1495R-Klone mit 105 von insgesamt 211 OTUs (50 %) den größten Anteil. Allerdings gab es bei den OTUs Überschneidungen, da die Sequenzen, die die entsprechende OTU bildeten, teilweise auf verschiedene Primerpaare zurückgingen. So gab es in 14 Fällen OTUs, die sowohl 27F/1495R- als auch 63f/778R-Sequenzen enthielten (Bild 24a). Mit lediglich 8 Fällen (3,8 % von 211) waren OTUs, die Sequenzen aller drei Primerpaare enthielten, aber sehr selten. Zu diesen 8 OTUs gehörten auch die drei häufigsten OTUs (#032, #029 und #034), die zusammen 137 Sequenzen beinhalteten. Die Ergebnisse der Rarefaction-Analyse für die nach den Primerpaaren aufgeteilte Klonbibliothek sind in Abschnitt 3.2.3.1 enthalten.

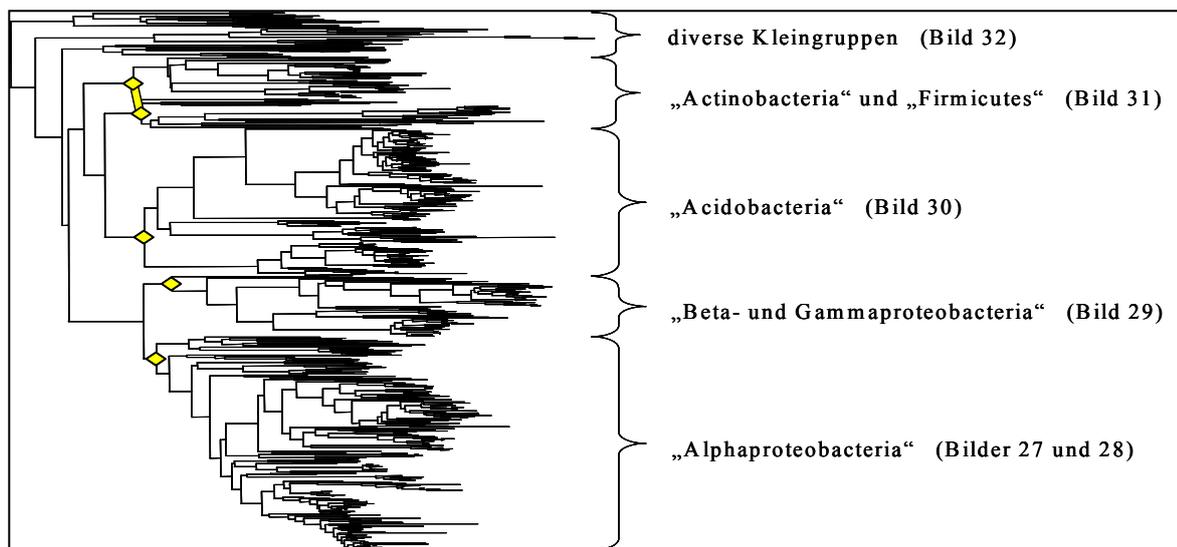
**Bild 24: Verteilung der 16S rDNA-OTUs auf die verwendeten PCR-Primer**

**Legende zu Bild 24:** Die insgesamt 211 16S rDNA-OTUs aus dem Dünnwaldboden wurden aus 590 partiellen Gensequenzen gebildet. Die meisten dieser Sequenzen gingen auf das Primerpaar 63f/778R zurück (b), doch die meisten OTUs konnten aus den 27F/1495R-Sequenzen konstruiert werden (a). Die Anzahl der OTUs, die bei zwei verschiedenen Primerpaaren auftraten, war in jedem Fall gering: 12, 14 und 16 OTUs (a). Zusätzlich gab es 8 OTUs, die mit allen drei Primerpaaren gefunden wurden.

### 3.2.3.4 Phylogenetische Auswertung partieller 16S rDNA-Sequenzen aus dem Dünwaldboden

Aufgrund der hohen Zahl von 211 Dünwald-OTUs, aber auch wegen der großen Diversität dieser OTUs, wurde die phylogenetische Analyse (2.12.2) der partiellen 16S rDNA-Sequenzen in mehreren Gruppen unabhängig ausgeführt. Zur Definition dieser Gruppen wurde ein Phylogramm mit den 211 OTUs und jeweils 50 BLAST-Ergebnissen jeder OTU erstellt. Dieses umfasste nur den Bereich zwischen den Primerbindungsstellen von 63f und 778R (Tabelle 3, S. 18), um die mit drei Primerpaaren erhaltenen Sequenzen vergleichen zu können (3.2.3.3). Das Phylogramm ermöglichte die Definition von fünf Gruppen: „Alphaproteobacteria“, „Beta- und Gammaproteobacteria“, „Acidobacteria“, „Actinobacteria/Firmicutes“ und eine Gruppe, die überwiegend basal stehende Sequenzen umfasste („diverse Kleingruppen“) (Bild 25). Für jede dieser fünf Gruppen wurde ein separates Phylogramm mit den jeweiligen OTUs und den ein bis fünf nächst-verwandten GenBank-Sequenzen jeder OTU berechnet (Bild 37 bis Bild 42; Legende auf S. 9, Anhang).

**Bild 25: Phylogramm zur Einordnung der 16S rDNA-OTUs aus dem Dünwald**



*Legende zu Bild 25:* Das NJ-Phylogramm zeigt eine Übersicht der Großgruppen, die über partielle 16S rDNA-Sequenzen (63/778-Bereich) im Dünwaldboden nachgewiesen wurden. Die Zuordnung wurde durch eine Auswahl von GenBank-Sequenzen ermöglicht. Anhand dieses Phylogramms – dargestellt ist nur das Skelett ohne Beschriftungen der Taxa – wurden die fünf Gruppen definiert, wie sie rechts im Bild bezeichnet sind. Drei dieser Gruppen waren monophyletisch, während die Actinobacteria und Firmicutes auf zwei paraphyletische Äste verteilt waren (gelbe Rauten). Dargestellt ist hier nur das Skelett des Stammbaumes ohne Beschriftungen der Taxa oder Knoten. Für jede einzelne dieser Gruppen wurde ein separates Phylogramm berechnet (Bild 37 bis Bild 42, Anhang).

#### **Gruppe I: „Alphaproteobacteria“ (Bild 37 und Bild 38)**

Insgesamt 79 Dünwald-OTUs waren in der „Alphaproteobacteria“-Gruppe (Bild 25) enthalten, die zusammen mit 32 Sequenzen bekannter Bakterien sowie 56 Sequenzen aus Umweltproben die Datenbasis zur Erstellung des auf Bild 37 und Bild 38 (Anhang) aufgeteilten Phylogramms waren. Es gab jedoch innerhalb dieses Phylogramms keine klaren Unterteilungen; die *bootstrap*-Werte der meisten basalen Knoten lagen bei unter 20 % (von 1000 Replikaten). Doch trotz der fehlenden

Absicherung durch die Phylogenie ließen sich die Sequenzen grob in „Rhizobiales“ (Part a, Bild 37) und „Rhodospirillales“ (Part b, Bild 38) einteilen. Wenige Rhodospirillaceae (z. B. *Phaeospirillum* und *Dechlorospirillum*) waren allerdings im „Rhizobiales“-Teil enthalten und umgekehrt. Grundsätzlich ließen sich die zu den „Rhizobiales“ zählenden OTUs anhand des Phylogramms besser taxonomisch einordnen, als das bei den „Rhodospirillales“-ähnlichen OTUs der Fall war, denn hier gab es mehr verwandte GenBank-Sequenzen zum Vergleich.

Etwa ein Drittel der 37 in der „Rhizobiales“-Gruppe enthaltenen OTUs repräsentierten zur Gattung *Rhodoplanes* (Hyphomicrobiales) verwandte Bakterien (OTU#029, #032, #033, #038, #154 bis #158 und #161, #162 und #167). Diese bildeten zwar kein über die *bootstrap*-Werte abgesichertes Cluster innerhalb des Phylogramms, doch gehörten dem RDP II Classifier (2.12.1) zufolge 7 der 12 OTUs mit großer Sicherheit (> 90 %) in die Gattung *Rhodoplanes* (siehe Tabelle 28, Anhang). Die zu den OTUs nächst-verwandte *Rhodoplanes*-Sequenz, sie stammte aus *R. elegans*, war zu jenen durchschnittlich  $93,7 \pm 2,8$  % homolog. OTU#163 war nach der phylogenetischen Analyse (Bild 37) verwandt zu Sequenzen aus *Methylocapsa*, *Methylocella* und *Beijerinckia* (alle Beijerinckiaceae) und wurde mit dem RDP II Classifier als *Beijerinckia* sp. identifiziert (99 % Sicherheit). Die Sequenzhomologie zu *B. indica* ATCC 9039 und *B. mobilis* DSM 2326 betrug 96,7 % und 97,0 %, aber die Homologie zu *Methylocella palustris* Ch3 war mit 98,4 % noch höher. OTU#039 war eine Sequenz aus *Caulobacter* (Caulobacteraceae), wie aus dem Phylogramm (Bild 37) und dem Ergebnis der taxonomischen Klassifizierung (Tabelle 28) ersichtlich ist. Die Homologie zu den drei im Phylogramm enthaltenen *Caulobacter*-Arten betrug 96,7 - 97,5 %, die zu einem in Mineralwasser gefundenen Klon<sup>1</sup> 98,4 %. Die OTUs #035, #165 und #170 bildeten zusammen mit mehreren Klonen aus Umweltproben eine scharf abgegrenzte Gruppe, deren Familienzugehörigkeit nicht zu bestimmen war. OTU#165 war mit 98,7 % Homologie nächst-verwandt zu einer Sequenz<sup>2</sup> aus vulkanischen Ablagerungen auf Hawaii. OTU#035 hatte mit 99 % bzw. 98,3 % Homologie größte Ähnlichkeit zu zwei Sequenzen<sup>3</sup> aus Schwermetallkontaminiertem Boden (USA) bzw. aus Graslandboden (Niederlande). Eine noch schärfer abgegrenzte Gruppe bildeten die sechs OTUs #172 bis #177, die nur bis zur Ordnung Rhizobiales sicher klassifiziert werden konnten. Zwar gab es in deren Nachbarschaft keine GenBank-Sequenzen, doch die höchste Ähnlichkeit dieser OTUs bestand zu den Sequenzen aus *Filomicrobium* ( $90,6 \pm 0,7$  %), *Rhodomicrobium* ( $88,7 \pm 0,7$  %) und *Hyphomicrobium* ( $89,6 \pm 0,9$  %). Da diese drei Gattungen zu den Hyphomicrobiaceae gehören, könnte es sich bei den OTUs um Vertreter dieser Familie handeln. Unter den übrigen OTUs, die den „Rhizobiales“ angehörten, sind drei hervorzuheben, die große Ähnlichkeit zu GenBank-Sequenzen hatten: OTU#168 war mit 99,5 % Homologie nahezu identisch zu einem Klon aus Weidelandboden<sup>4</sup> (Victoria, Australien).

<sup>1</sup> **D-1** (AF523036), Loy *et al.* (2002)

<sup>2</sup> **1700-6** (AY425766), Gomez-Alvarez *et al.* (2003)

<sup>3</sup> **K20-34** (AF145832), Marsh *et al.* (1999) — **DA067** (Y07582), Felske *et al.* (1998)

<sup>4</sup> **Ellin329** (AF498711), Sait *et al.* (2002)

OTU#169 war 98,3 % homolog zu einem aus renaturiertem Feuchtland<sup>1</sup> (South Carolina, USA) und OTU#153 95,9 % zu einem Klon<sup>2</sup> aus der Baltischen See.

Der die „Rhodospirillales“ umfassende Teil des Alphaproteobacteria-Phylogramms (Bild 38) enthielt 42 Dünnwald-OTUs neben den Sequenzen von lediglich neun bekannten Bakterien. Hier ließ sich im Gegensatz zu den „Rhizobiales“ keine OTU bis auf die Gattungsebene klassifizieren. Auffällig war aber eine große, allerdings nicht monophyletische Gruppe von 22 OTUs (#014 bis #024, #127 bis #136 und #146), zu denen es kaum verwandte GenBank-Sequenzen gab (Bild 38, untere Hälfte). Das einzige bekannte Bakterium dieser Verwandtschaft war *Stella humosa* DSM 5900 (Acetobacteraceae). Die durchschnittliche Homologie der OTUs zu diesem Bakterium betrug jedoch nur  $88,8 \pm 1,0$  %. Die in dieser „*Stella*-Gruppe“ enthaltenen sechs Sequenzen unkultivierter Bakterien<sup>3</sup> stammten aus Regenwurm Kot (*Lumbricus rubellus*) oder aus verschiedenen Böden (Bulgarien, Australien oder Wyoming). Die OTUs #149 und #150 repräsentierten unbekannte Gattungen innerhalb der Acetobacteraceae. Die nächst-verwandten bekannten Bakterien waren *Acidisphaera rubrifaciens* HS-AP3 (91,2 bzw. 93,4 % Homologie) und *Rhodopila globiformis* DSM 164 (91,9 bzw. 93,0 %). Geringfügig ähnlicher zu den OTUs war ein Klon aus PCB-kontaminiertem Boden<sup>4</sup> (93,2 % Homologie, OTU#149) und einer aus Boden des Amazonasbeckens<sup>5</sup> (93,4 %, OTU#150).

Des Weiteren gab es eine OTU (#028), die entfernt zu *Azospirillum* verwandt war (vergleiche Abschnitt 3.2.3.5). Allerdings betrug die Homologie zu *A. amazonense* lediglich 87,1 %, die zu *A. halopraeferens* 89,2 %; die Werte für *A. brasilense*, *A. irakense* und *A. doebereineriae* lagen dazwischen (nicht dokumentiert). Wesentlich ähnlicher zu OTU#028 waren dagegen zwei Sequenzen<sup>6</sup> aus PCB-kontaminiertem Boden mit 97,8 bzw. 97,9 % Homologie.

#### **Gruppe II: „Beta- und Gammaproteobacteria“ (Bild 39)**

Nach der phylogenetischen Analyse (Bild 39, Anhang) stammten 14 der 211 Dünnwald-OTUs aus Gammaproteobacteria und nur zwei aus Betaproteobacteria. Eine Einteilung in niedrigere taxonomische Ebenen war allerdings nur bei den OTUs #010 bis #012 möglich. Diese gehörten sowohl dem Phylogramm als auch nach den Ergebnissen des RDP II Classifiers zufolge zur Familie der Xanthomonadaceae (Xanthomonadales). Die OTUs #010 und #012 konnten als *Frateuria* spp. identifiziert werden: die Sequenzhomologie von OTU#010 zu *Frateuria* sp. WJ64 betrug 98,7 %,

---

<sup>1</sup> **FW96** (AF523945), Brofft *et al.* (2002)

<sup>2</sup> **OS-206** (AJ311962), Brettar *et al.* (2003)

<sup>3</sup> **c277** (AY154627), Singleton *et al.* (2003) — **EB1033** (AY395352), Schoenborn *et al.* (2003) — **Ellin5299** (AY234650), Joseph *et al.* (2003) — **TM12** (X97078), Rheims *et al.* (1996a) — **KCM-B-24** (AJ581583), Sacanska (2003) — **YNPFFP50** (AF391977), Botero *et al.* (2001)

<sup>4</sup> **WD248** (AJ292598), Nogales *et al.* (2001)

<sup>5</sup> **337-2** (AY326615), Kim und Crowley (2003)

<sup>6</sup> **WD231** (AJ292594) und **WD2103** (AJ292608), Nogales *et al.* (2001)

die von OTU#012 zu *Frateuria aurantia* 96,7 %. Außerdem war OTU#012 beinahe identisch mit einem Klon<sup>1</sup> aus einem Torfmoor (99,6 % Homologie). OTU#011 war ebenfalls sehr nahe mit *Frateuria* verwandt (max. 97,3 % Homologie), doch nach dem RDP II Classifier stammte diese Sequenz eher aus einer *Rhodanobacter*-Art (88 % Sicherheit), wie auch der im Phylogramm benachbart stehende Klon<sup>2</sup>, der an einer Uranerzmühle in Gittersee (Sachsen) gefunden wurde.

OTU#126 stand im Phylogramm (Bild 39) ziemlich isoliert. Die nächst-verwandte Sequenz<sup>3</sup> (90,8 % Homologie) stammte aus einer Abraumhalde des Uranbergbaus (Johanngeorgenstadt, Sachsen). Dem RDP II Classifier zufolge gehörte diese OTU eher zu den Alpha- als zu den Gammaproteobakterien (87 % Sicherheit), doch gruppierte es bei der phylogenetischen Analyse mit letzteren. Die übrigen zehn OTUs – #001 bis #009 und #182 – bildeten im Phylogramm (Bild 39) ein gemeinsames Cluster mit GenBank-Sequenzen unkultivierter Bakterien. Sie ließen sich aber keiner bekannten Ordnung zuteilen, da identifizierte Bakterien in diesem Cluster fehlten. Dem RDP II Classifier zufolge war selbst die Zugehörigkeit zu den Gammaproteobacteria nicht in allen Fällen sicher (74 - 100 % Wahrscheinlichkeit), was aber dem Ergebnis der phylogenetischen Analyse (Bild 39) entsprach. Bemerkenswert war die hohe Ähnlichkeit einzelner OTUs zu GenBank-Sequenzen aus Umweltproben. So waren OTU#007 und WD260<sup>4</sup> aus PCB-kontaminiertem Boden nahezu identisch (99,4 % Homologie). Für OTU#001 und Ellin5264<sup>5</sup> lag die Homologie bei 98,1 %, für OTU#002 und YNPRH65B<sup>6</sup> bei 97,5 %. Die letzten beiden GenBank-Sequenzen entstammen Böden.

Die beiden OTUs #013 und #183 gehörten zu den Betaproteobacteria und wahrscheinlich in die Ordnung der Burkholderiales (68 % Sicherheit; RDP II Classifier). Für eine genauere Klassifizierung fehlten zu den OTUs verwandte bekannte Bakterien. Beide OTUs befanden sich im gleichen Cluster des Phylogramms (Bild 39); die nächst-verwandte Sequenz mit Homologien von 96,1 % bzw. 90,3 % war ein Klon<sup>7</sup> aus der Kartoffel-Rhizosphäre (Deutschland).

### **Gruppe III: „Acidobacteria“ (Bild 40)**

Im Übersichts-Phylogramm (Bild 25) gab es eine klar abgegrenzte Gruppe, die neben 74 Dünnwald-OTUs auch die Sequenz aus *Acidobacterium capsulatum* enthielt. Alle anderen GenBank-Sequenzen dieser Gruppe stammten aus Umweltproben und waren zum überwiegenden Teil als Acidobacteria-Sequenzen annotiert. Die im folgenden „Acidobacteria“ genannte Gruppe wurde wiederum in sechs Untergruppen aufgeteilt (A bis F), von denen die größte (A) als Acidobacteria

<sup>1</sup> **WIT-Mc-77** (AY309108), Schultz *et al.* (2003)

<sup>2</sup> **Gitt-KF-177** (AJ532696), Selenska-Pobell *et al.* (2002)

<sup>3</sup> **KF-JG30-C25** (AJ295652), Selenska-Pobell (2002)

<sup>4</sup> **WD260** (AJ292673), Nogales *et al.* (2001)

<sup>5</sup> **Ellin5264** (AY234615), Joseph *et al.* (2003)

<sup>6</sup> **YNPRH65B** (AF465652), Norris *et al.* (2002)

<sup>7</sup> **SC-I-84** (AJ252660), Lukow (1999)

*sensu strictu* bezeichnet wurde (obere Hälfte in Bild 40). Diese Untergruppe enthielt die *A. capsulatum*-Sequenz und setzte sich deutlich von den übrigen Untergruppen ab. Außerdem war die innere Diversität relativ gering: die 47 in dieser Untergruppe stehenden OTUs (#041 bis #069, #092 bis #107, #210 und #211) hatten eine mittlere paarweise Sequenzhomologie von  $91,7 \pm 3,4$  % zueinander. Die Homologie zur Sequenz aus *A. capsulatum* war mit durchschnittlich  $91,9 \pm 2,9$  % ähnlich hoch; die größte Verwandtschaft zu *A. capsulatum* hatte OTU#045 (95,7 %). Einzelne OTUs waren aber zu unkultivierten Bakterien noch näher verwandt. Zum Beispiel betrug die Homologie von OTU#053 zu einem Klon<sup>1</sup> aus deutschem Ackerboden 98,3 % und die von OTU#093 zu einem anderen Klon<sup>2</sup> aus Waldboden (Gisburn Forest, Yorkshire) 98,4 %. Genauso hohe Verwandtschaft gab es aber auch zu Sequenzen geographisch oder ökologisch andersartiger Standorte. OTU#095 war 98,1 % homolog zu einem in australischem Weideland (Ellinbank, Victoria) gefundenen Klon<sup>3</sup> und zwei weitere Klone waren über 98 % homolog zu OTU#059. Einer davon stammte aus einer Mine in Kalifornien (Iron Mountain)<sup>4</sup> und der andere aus dem Darm einer japanischen Termitenart (*Reticulitermes speratus*)<sup>5</sup>.

Die übrigen 27 Dünnwald-OTUs repräsentierten Acidobacteria im weiteren Sinne (*sensu lato*). Die Untergruppe B beinhaltete eine einzige Sequenz, nämlich die der isoliert stehenden OTU#108, zu der es keine verwandte Sequenz in der GenBank gab. Das Phylogramm (Bild 40) und der RDP II Classifier (Tabelle 28, Anhang) bestätigten aber, dass es sich um eine Sequenz aus der Verwandtschaft von *A. capsulatum* handelte. In der Untergruppe C war ebenfalls nur eine Dünnwald-OTU (#109) enthalten, doch gab es hier mehrere verwandte Sequenzen, von denen zwei aus Virginia bzw. Delaware (USA)<sup>6</sup> im Phylogramm (Bild 40) gezeigt sind. In der Untergruppe D waren 16 OTUs (#110 bis #125) mit einer durchschnittlichen paarweisen Sequenzhomologie von  $90,0 \pm 3,9$  % zusammengefasst. Mit 99,5 % Homologie war OTU#117 nahezu identisch zu einem Klon<sup>7</sup> aus dem Yellowstone Park (Wyoming); keine andere Dünnwald-OTU innerhalb der „Acidobacteria“-Gruppe hatte größere Ähnlichkeit zu einer GenBank-Sequenz. OTU#115 war 98,8 % homolog zu einem Klon<sup>8</sup> aus Ackerboden und OTU#111 zeigte 98,2 % Homologie zu einer Sequenz<sup>9</sup> aus einer Abraumhalde im Uranbergbau (Sachsen).

In den Untergruppen E und F, die zusammen 9 OTUs beinhalten, gab es mit einer Ausnahme keine den OTUs sehr nahestehenden GenBank-Sequenzen – die Homologiewerte lagen alle unter

---

<sup>1</sup> **MCS2/16** (AJ830724), Ulrich und Becker (2004)

<sup>2</sup> **UA1** (AF200696), Radajewski *et al.* (2000)

<sup>3</sup> **Ellin5017** (AY234434), Joseph *et al.* (2003)

<sup>4</sup> **TRB82** (AF047646), Edwards *et al.* (1998)

<sup>5</sup> **Rs-M39** (AB089126), Hongoh *et al.* (2003)

<sup>6</sup> **ABS-165** (AY289387) und **DS-38** (AY289400), Zhou *et al.* (2003)

<sup>7</sup> **YNPRH2B** (AF465650), Norris *et al.* (2002)

<sup>8</sup> **MCS2/4** (AJ830729), Ulrich und Becker (2004)

<sup>9</sup> **JG30-KF-C37** (AJ536864), Satchanska *et al.* (2003)

95 %. Diese Ausnahme war OTU#070 mit einer Homologie von 98,8 % zu einem Klon<sup>1</sup> aus einer Abraumhalde bei Johanngeorgenstadt (Sachsen). Die Ähnlichkeit der OTUs zur Sequenz von *A. capsulatum* betrug in diesen beiden Untergruppen nur noch durchschnittlich  $79,0 \pm 1,1$  %.

**Gruppe IV: „Actinobacteria und Firmicutes“ (Bild 41)**

Insgesamt konnten 24 Dünnwald-OTUs den grampositiven Bakterien zugerechnet werden. Auf die Klasse der Actinobacteria entfielen dabei 13 OTUs, die aber in keinem Fall eng zu kultivierten Bakterien verwandt waren. Die sieben OTUs #75, #185 bis 189 und #191 gehörten alle zur selben Gruppe im Phylogramm (Bild 41, Anhang) und waren – mit Ausnahme von #075, und trotz der hohen Diversität innerhalb dieser Gruppe (mittlere paarweise Sequenzhomologie  $90,3 \pm 5,3$  %) – als Sequenzen aus *Acidimicrobium* spp. (Acidimicrobiales) klassifiziert worden (Tabelle 28, Anhang). In diesem Cluster befanden sich zehn Sequenzen<sup>2</sup> der GenBank-Auswahl, die zum überwiegenden Teil aus nassen Böden stammten. Drei weitere OTUs – #193, #076 und #194 – gehörten zu den Actinomycetales, einer anderen Ordnung innerhalb der Actinobacteria. Die beiden letzteren, die die größte Verwandtschaft zu drei Sequenzen<sup>3</sup> aus verschiedenen Böden zeigten, waren wahrscheinlich Vertreter der Thermomonosporaceae. OTU#193 ließ sich nicht näher einordnen, da auch die nächst-verwandten Sequenzen<sup>4</sup> nur bis zur Ordnung Actinomycetales klassifizierbar waren. Wahrscheinlich gehörten auch die OTUs #190 und #192 zu den Actinomycetales, obwohl sie im Phylogramm (Bild 41) fernab von identifizierten Bakterien standen und mit dem RDP II Classifier nicht über die Klasse hinaus eingeordnet werden konnten. Die diesen OTUs nächst-verwandten Sequenzen<sup>5</sup> stammten aus verschiedenen Umweltproben. OTU#171 war nach dem RDP II Classifier eine Sequenz aus *Conexibacter* sp. (Rubrobacterales) und hatte eine Sequenzhomologie von 93,2 % zu *C. woesei* und 95,0 % zu einem Klon<sup>6</sup> aus vulkanischem Sediment (Hawaii).

Die acht OTUs #077 bis #084 bildeten – zusammen mit drei GenBank-Sequenzen<sup>7</sup> aus Umweltproben – ein eigenes Cluster, das zwischen den Actinobacteria und Firmicutes angesiedelt war.

<sup>1</sup> **KF-JG30-18** (AJ295656), Selenska-Pobell *et al.* (2001)

<sup>2</sup> **TM56** (X92695), **TM62** (X92696), **TM81** (X92697), **TM208** (X92703), **TM210** (X92704) und **TM213** (X92705), Rheims *et al.* (1996b) — **FW103** (AF524000), Brofft *et al.* (2002) — **DA079** (Y11555), Felske *et al.* (1998) — **LWSR-4** (AY345538), Donachie *et al.* (2003) — **BA84** (AF225451), Bond *et al.* 2000

<sup>3</sup> **1532-2** (AY326626), Kim und Crowley (2003) — **DA016** (Y07606), Felske *et al.* (1998) — **RCP2-68** (AF523918), Brofft *et al.* (2002)

<sup>4</sup> **Chibacore\_1500** (AB038407), Kaneko und Sakihama (2000) — **ML615J-23** (AF448193), Humayoun *et al.* (2001)

<sup>5</sup> **SIMO-2123** (AY711489), Moran *et al.* (2004) — **1013-28-CG55** (AY532590), Gihring *et al.* (2004) — **JH12\_C55** (AY568894), Cho *et al.* (2004)

<sup>6</sup> **1959-7** (AY425791), Gomez-Alvarez *et al.* (2003)

<sup>7</sup> **271-2** (AY326529), Kim und Crowley (2003) — **WD272** (AJ292684), Nogales *et al.* (2001) — **1790-7** (AY425775), Gomez-Alvarez *et al.* (2003)

Dies wurde auch durch den RDP II Classifier bestätigt, nach dem diese OTUs mit Wahrscheinlichkeiten von 48 - 52 % als Firmicutes klassifiziert worden waren (Tabelle 28, Anhang). Zu diesem Cluster gehörte im weiteren Sinne auch OTU #085, die eine einzigartige Sequenz vertrat, zu der es in der GenBank keine Sequenz mit mehr als ca. 80 % Homologie gab. Die OTUs #086 und #087 repräsentierten möglicherweise Bacteria aus tiefwurzelnden Phyla (Thermomicrobia mit 79 % Sicherheit für OTU#087; RDP II Classifier), doch passten sie bei der phylogenetischen Auswertung besser zu den grampositiven Bakterien als zu den in Bild 42 gezeigten OTUs (nicht dokumentiert). Es gab zwar nur sehr wenige GenBank-Sequenzen, die diesen beiden OTUs ähnlich waren, doch die im Phylogramm enthaltenen Klone<sup>1</sup> aus einer Uranbergbau-Abraumhalde (Sachsen) waren den Dünnwald-OTUs sehr ähnlich (97,5 % bzw. 97,4 % Homologie).

#### **Gruppe V: diverse Kleingruppen (Bild 42)**

Zu dieser Gruppe wurden Dünnwald-OTUs mit ihren GenBank-Referenzsequenzen zusammengefasst, die sich entweder nicht eindeutig einer der anderen Gruppen zuordnen ließen oder aber im Übersichts-Phylogramm (Bild 25) eine basale Stellung einnahmen. Die sechs OTUs #195, #196, #199, #200, #207 und #290 konnten weder über die phylogenetische Analyse (Bild 42, Anhang) noch über den in Abschnitt 2.12.1 beschriebenen RDP II Classifier (Tabelle 28, Anhang) einem bekannten Bakterienstamm zugeordnet werden. Im Falle der OTUs #195 und #196 war zwar keine taxonomische Einordnung möglich, doch gab es einen Klon<sup>2</sup> aus chinesischem Tiefsee-Sediment, der ca. 94,4 - 94,6 % homolog zu diesen beiden OTUs war.

Die übrigen 11 der insgesamt 17 OTUs, die in dieser Gruppe enthalten waren, ließen sich teilweise bis auf die Gattungsebene identifizieren. So repräsentierte OTU#201 mit großer Sicherheit (100 %; RDP II Classifier) eine *Gemmatimonas*-Art (Phylum Gemmatimonadetes), auch wenn die Sequenzhomologie zu *G. aurantiaca* nur bei 88,2 % lag. Zur gleichen Klasse könnte auch OTU#198 gehören (71 % Sicherheit), deren mit 85,6 % Sequenzhomologie nächst-verwandter GenBank-Klon<sup>3</sup> aus Methanhydrat im Golf von Mexiko<sup>3</sup> stammt. OTU#209 war eine Planctomyceten-Sequenz, möglicherweise aus *Pirellula* (89 % Sicherheit; RDP II Classifier). Die nächst-verwandten Sequenzen stammten von unkultivierten Planctomyceten<sup>4</sup> aus Klärschlamm (A25; 91,3 % Homologie) oder Waldboden (clone23; 92,7 % Homologie).

Die OTUs #202 bis #206 konnten als Vertreter der Bacteroidetes identifiziert werden, wobei OTU#203 zur Familie der Flexibacteraceae und OTU#204 zu den Flavobacteriaceae gehörte. Letztere Sequenz gruppierte im Phylogramm zusammen mit zwei *Gillisia* spp. (Bild 42) obwohl sie nach dem RDP II Classifier aus der Gattung *Salegentibacter* stammte (88 %; Tabelle 28, Anhang). Beide Gattungen sind allerdings nahe verwandt: die Sequenz von *Gillisia limnaea* wird

---

<sup>1</sup> **JG36-GS-122** (AJ582049), Sacanska (2003) — **JG30-KF-A11** (AJ536865), Sacanska *et al.* (2003)

<sup>2</sup> **MBMPE41** (AJ567555), Xu *et al.* (2003)

<sup>3</sup> **AT425\_EubC11** (AY053483), Lanoil *et al.* (2001)

<sup>4</sup> **clone23** (AF271319), Chatzinotas *et al.* (2000) — **A25** (AF234700), Juretschko *et al.* (2002)

vom RDP II Classifier mit einer Sicherheit von 50 - 60 % *Salegentibacter* zugewiesen (nicht dokumentiert). Die OTUs #205 und #206 bildeten mit einigen Sequenzen aus Umweltproben<sup>1</sup> ein distinktes Cluster ohne nähere Verwandtschaft zu anderen Vertretern der Bacteroidetes.

Die OTUs #040, #184 und #197 stammten wahrscheinlich von Proteobakterien, fügten sich aber nicht in die Phylogramme für die Alpha- (Bild 37 und Bild 38) bzw. Beta- und Gammaproteobakterien (Bild 39). OTU#184 repräsentierte nach dem RDP II Classifier mit einer Wahrscheinlichkeit von 63 % ein Deltaproteobakterium (Tabelle 28, Anhang) und das nächst-verwandte identifizierte Bakterium stammte nach den BlastN-Ergebnissen tatsächlich aus dieser Klasse (*Geobacter grbicum*, 402 bits,  $E = 10^{-109}$ ) (vergleiche Bild 42). Doch gab es 15 erheblich bessere Treffer von Sequenzen unkultivierter Proteobakterien, die aus den Beta-, Delta- und Epsilon-Klassen stammten. Das mit lediglich 82 % Sicherheit als Proteobakterium klassifizierte OTU#040 zeigte keine Verwandtschaft zu bekannten Bakterien, war aber verwandt zu GenBank-Sequenzen aus Boden (293-1; Amazonasgebiet) und Sedimentgestein (MIZ46; ohne geographische Angabe)<sup>2</sup>.

#### **Verteilung der Dünnwald-OTUs auf die bakteriellen Klassen (Bild 26)**

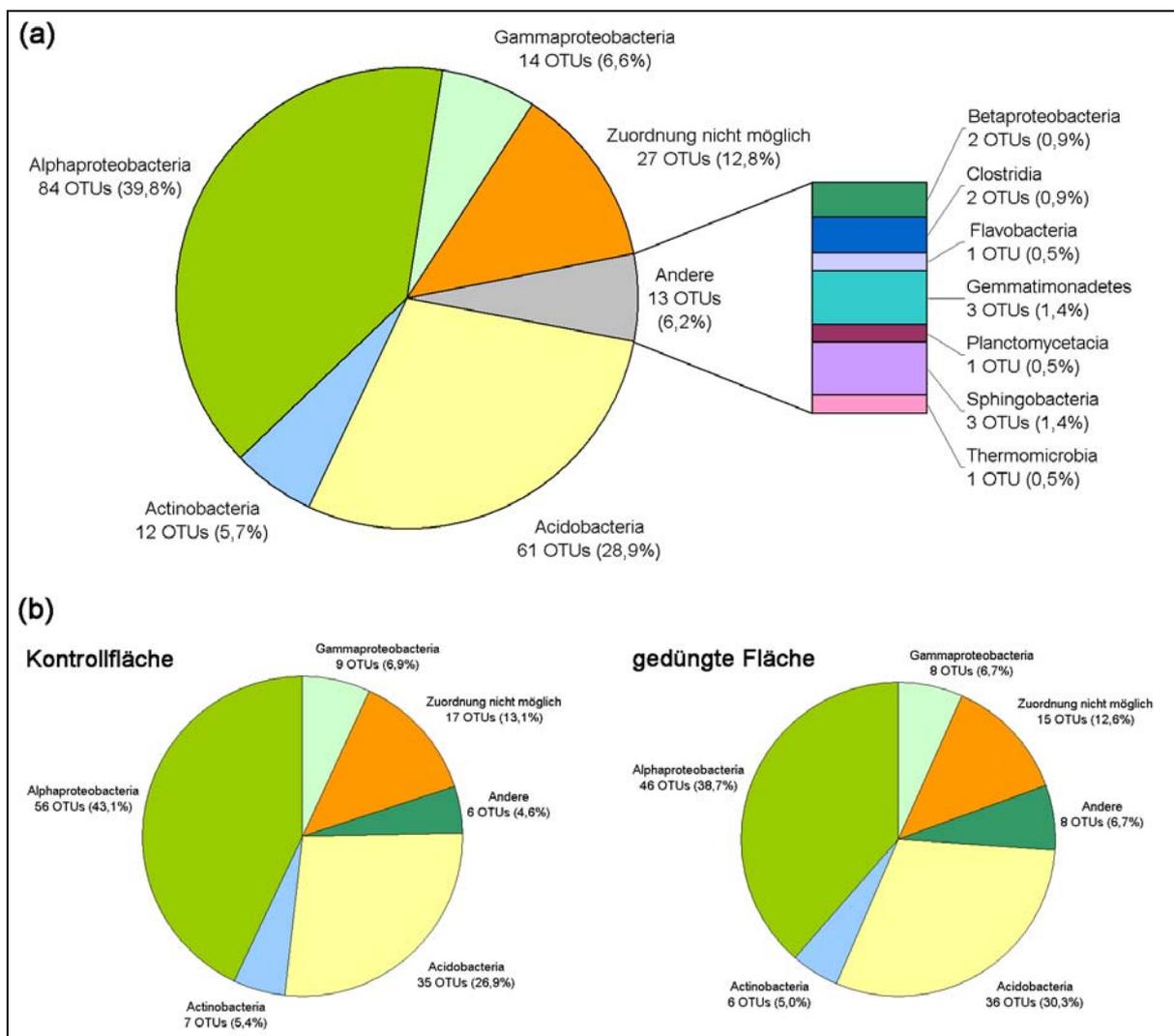
Die 16S rDNA-OTUs aus dem Dünnwaldboden wurden mittels des RDP II Classifiers taxonomisch eingeordnet (2.12.1). Die Ergebnisse für die insgesamt 211 OTUs sind in Tabelle 28 (Anhang) zusammengestellt. Für die Darstellung in Bild 26 wurden die OTUs auf die bakteriellen Klassen aufgeteilt, wobei für eine Zuordnung eine Sicherheit von mindestens 70 % erforderlich war. Insgesamt konnten so Bakterien aus 11 Klassen im Dünnwaldboden nachgewiesen werden. Knapp 70 % der erfassten Biodiversität verteilte sich auf die Alphaproteo- (40 %) und Acidobacteria (29 %). Sieben Klassen waren dagegen mit höchstens drei OTUs vertreten: Gemmatimonadetes, Sphingobacteria, Betaproteobacteria, Clostridien, Flavobacteria, Planctomyceten und Thermomicrobia. Bei einem Achtel der OTUs ( $N = 27$ ) war keine Klassifizierung möglich.

#### **3.2.3.5 Selektive Erfassung von „Azospirillen“ und „Rhizobien“**

Die Diversität von „Azospirillen“ und „Rhizobien“ wurde für den Dünnwaldboden mithilfe selektiver PCR-Primer (Tabelle 3, S. 18) untersucht. Das Phylogramm in Bild 43 gibt die verwandtschaftlichen Stellung von 8 Dünnwald-OTUs dieser Gruppen wieder. Fünf der OTUs (12 Sequenzen) wurden mit dem Azospirillen-selektiven Primer AZOSP-R erhalten (A02, A07, A09, A11 und A12), während die übrigen 3 OTUs (12 Sequenzen) auf den Rhizobien-selektiven Primer RHIZO-R zurückgehen (R06, R09 und R12); Forwardprimer war in beiden Fällen GENER-F. Für einen Vergleich wurden über eine BLAST-Suche die zu den Dünnwald-Sequenzen ähnlichsten GenBank-Einträge ausgewählt und in das Alignment integriert, auf dem das Phylogramm beruht. Für die Darstellung (Bild 43) wurden sämtliche Sequenzen unkultivierter Bakterien, aber auch die einiger

<sup>1</sup> **LA7-B21N** (AF513957), Donachie *et al.* (2002) — **ML602M-3** (AF449782), Humayoun *et al.* (2001) — **PI\_RT107** (AY580838), Acinas *et al.* (2004a)

<sup>2</sup> **293-1** (AY326617), Kim und Crowley (2003) — **MIZ46** (AB179537), Yoshida *et al.* (2004)

**Bild 26: Verteilung der 211 16S rDNA-OTUs aus dem Dünnwald auf bakterielle Klassen**

**Legende zu Bild 26:** (a) Die 211 OTUs der kombinierten 16S rDNA-Klonbibliothek (590 Sequenzen) wurden mit dem RDP II Classifier taxonomisch eingeordnet und auf der Ebene von Klassen zusammengefasst (mindestens 70 % Sicherheit, vergleiche Abschnitt 2.12.1). An den Kreissegmenten ist die absolute Zahl an OTUs angegeben, die der jeweiligen Klasse angehörten. Die relative Häufigkeit (in Klammern) bezieht sich auf die Gesamtheit von 211 OTUs. Grundlage des Diagramms sind die Daten in Tabelle 28 (Anhang). In (b) sind die Verteilungen nach Versuchsflächen getrennt, aber für alle Zeitpunkte zusammen, dargestellt.

identifizierter Bakterien, die nicht in unmittelbarer Nachbarschaft zu den Dünnwald-Sequenzen standen, wieder entfernt. Zur Wurzelung des Phylogramms diente eine 16S rDNA-Sequenz des Gammaproteobakteriums *Escherichia coli* K12 (NC\_000913).

Der „Azospirillenast“ (Bild 43, obere Hälfte) enthielt neben den Sequenzen von sieben *Azospirillum* spp. auch die von nahe verwandten Arten der gleichen Familie (Rhodospirillaceae). Einzig *Stella humosa* gehörte innerhalb der „Azospirillengruppe“ zu einer anderen Rhodospirillales-Familie (Acetobacteraceae), war aber nach Bild 43 zu den Dünnwald-Sequenzen etwas näher verwandt als diese zu *Azospirillum* spp. selbst. Eine zu den Dünnwald-Klonen größere Verwandtschaft als jedes identifizierte Bakterium zeigten jedoch GenBank-Sequenzen aus Umweltproben.

So bildeten A02, A11 und A12 ein Cluster mit den Klonen FW93 (Brofft *et al.* 2002), KCM-B-24 und JG30-KF-C3 (Satchanska *et al.* 2003), die aus verschiedenen Bodenproben stammen. Die zu A07 und A09 nächst-verwandten Sequenzen stammten ebenfalls aus Böden (Bild 43).

Im „Rhizobienast“ des Phylogramms (Bild 43, untere Hälfte) standen die Dünnwald-Sequenzen ebenfalls Sequenzen unkultivierter Bakterien näher, als solchen identifizierter Bakterien. Die Homologie zwischen R06 und MNF4 (Stein *et al.* 2001) betrug 96,0 %, die zwischen R09 und DA122 (Felske 1997) 97,6 % und R12 war 98,5 % homolog zu Klon 52-2 (Kim und Crowley 2003). Die Klone 52-2 und DA122 stammten aus Boden, MNF4 aus Süßwasser. Ähnlich wie bei den „Azospirillen“ gab es keine bekannten Bakterien, die den Dünnwald-Klonen näher verwandt waren. Das zu R12 nächst-verwandte Bakterium war *Bradyrhizobium* sp. Shinshu-th2 (94,4 % Homologie). Im Falle von R06 und R09 war *Rhodoplanes elegans* (95,1 % bzw. 92,7 %) das Bakterium mit der höchsten Verwandtschaft.

### 3.3 Ergebnisse zum TReFID-Verfahren

#### 3.3.1 TReFID-Datenbanken zur Auswertung von tRF-Daten aus dem Dünnwaldboden mit dem TReFID-Computerprogramm

Die Erstellung der TReFID-Datenbanken erfolgte auf der Grundlage der in der GenBank publizierten Sequenzen (2.15.3). Für *nifH* und *nosZ*, die der Untersuchung der Gemeinschaften N<sub>2</sub>-fixierender bzw. denitrifizierender Mikroorganismen dienen, wurden alle verfügbaren Sequenzen auf ihre Eignung für TReFID überprüft (Tabelle 8). Geeignet waren solche, die eine Bindungsstelle für den Fluorochrom-markierten Primer (*nifH*-F oder *nosZ*-R, 2.14.1) enthielten. Die Sequenzen konnten aber kürzer sein als die erwarteten PCR-Produkte, da die Bindungsstelle des zweiten Primers nicht überprüft wurde (vergleiche Bild 27, S. 68). Im Falle der 16S rDNA als Marker für die bakterielle Gesamtgemeinschaft wurden aufgrund der großen Datenmenge nur 26 % der verfügbaren Sequenzen überprüft. Bei allen drei Genen war etwa die Hälfte der überprüften Sequenzen ungeeignet. Zusammen mit den Dünnwald-Sequenzen enthielten die TReFID-Datenbanken 607 (*nosZ*), 1.318 (*nifH*) und 22.145 (16S rDNA) Einträge.

**Tabelle 8: Einträge in den TReFID-Datenbanken für *nosZ*, *nifH* und die 16S rDNA**

	<i>nosZ</i>	<i>nifH</i>	16S rDNA
Anzahl publizierter Sequenzen (GenBank) <sup>1</sup>	428	1.873	150.706
Anzahl überprüfter Sequenzen (Abschnitt 2.15.3)	428 (100 %)	1.873 (100 %)	39.069 (26 %)
GenBank-Sequenzen in der TReFID-Datenbank	244 (57 %)	812 (43 %)	21.529 (14 %) <sup>2</sup>
Dünnwald-Sequenzen in der TReFID-Datenbank	363	506	611
Gesamtzahl Sequenzen in der TReFID-DB.	607	1.318	22.145

<sup>1</sup> Stand: Januar 2004 für *nifH*, 21. Februar 2005 für *nosZ* und 25. Februar für 16S rDNA. Die Anzahl der Sequenzen bei der 16S rDNA beinhaltet nur Bacteria und Archaea, nicht Eukarya (Plastiden und Mitochondrien). Für Details zu den GenBank-Sequenzen siehe Tabelle 12.

<sup>2</sup> Hinzu kommen 5 Eukarya-Sequenzen (Plastiden-16S rDNA).

**Tabelle 9: Übersicht der Gesamtanzahl von tRFs für die TReFID-Auswertung**

Anzahl von Restriktionsenzymen, die ein tRF ergaben	<i>nosZ</i>		<i>nifH</i>		16S rDNA	
	Anzahl Sequenzen	Gesamtzahl an tRFs	Anzahl Sequenzen	Gesamtzahl an tRFs	Anzahl Sequenzen	Gesamtzahl an tRFs
13	70	910	37	481	1.323	17.199
12	101	1.212	206	2.472	4.634	55.608
11	361	3.971	502	5.522	5.866	64.526
10	68	680	332	3.320	4.762	47.620
9	7	63	109	981	3.500	31.500
8	0	0	95	760	1.306	10.448
7	0	0	33	231	484	3.388
6	0	0	3	18	174	1.044
5	0	0	1	5	49	245
4	0	0	0	0	39	156
3	0	0	0	0	5	15
2	0	0	0	0	3	6
1	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0
<i>Summe:</i>	<i>607</i>	<i>6.836</i>	<i>1.318</i>	<i>13.790</i>	<i>22.145</i>	<i>231.755</i>

*Legende zu Tabelle 9:* Diese Übersicht zeigt, dass den meisten Sequenzen in den TReFID-Datenbanken (GenBank- plus Dünnwald-Sequenzen) Schnittstellen für einige der insgesamt 13 Restriktionsenzymen fehlten. Bei *nosZ* lieferten beispielsweise nur 70 Sequenzen tRFs für alle 13 Enzyme, zusammen also  $70 \times 13 = 910$  tRFs. Die Gesamtzahl von 6.836 *nosZ*-tRFs verteilte sich auf 341 einzigartige tRFs (829 bei *nifH* und 5.082 bei 16S rDNA). Im Durchschnitt lieferten also  $6.826/341 = 20$  *nosZ*-Sequenzen das gleiche tRF (für alle Enzyme und Datenbank-Einträge zusammen genommen). Doch bei Verwendung von 13 Restriktionsenzymen ließen sich 307 *nosZ*-tRF-Muster („Polygone“) unterscheiden (nicht dokumentiert).

### 3.3.1.1 TReFID-Datenbank zur Untersuchung von Gemeinschaften diazotropher Mikroorganismen

In die TReFID-Datenbank für *nifH* wurden 812 der insgesamt 1.873 im Januar 2004 verfügbaren GenBank-Sequenzen aufgenommen (Tabelle 8). Die übrigen 1.061 Sequenzen (57 %) waren ungeeignet, da sie den hinteren Genbereich abdeckten, der mit *nifH*-F/*nifH*-Rbc nicht erfasst wurde. Der größte Teil (93 %) der 812 *nifH*-Sequenzen in der TReFID-Datenbank war kürzer als 500 nt; bei der tRFLP konnten Fragmente bis zu dieser Länge ausgewertet werden (2.14.5). Eine Übersicht der berechneten tRF-Daten für 13 Restriktionsenzyme ist in Tabelle 10 gegeben. Der Anteil von Sequenzen, die kein tRF im auswertbaren Bereich von 30 bis 500 nt ergaben, lag im Mittel bei  $19,3 \pm 20,4$  %. Der Maximalwert von 61,6 % bei *TasI* bedeutet, dass bei diesem Enzym effektiv nur 312 der 812 GenBank-Sequenzen zur TReFID-Auswertung beitragen konnten. Den niedrigsten SHANNON-Index ( $H_S$ ) wie auch die ungleichmäßigste Verteilung ( $E_S$ ) hatten die tRFs für *HinfI*. Im Gegensatz zu *TasI* lieferten bei *HinfI* zwar fast alle GenBank-Sequenzen ein tRF im Bereich von 30 - 500 nt (Tabelle 10), doch gab es unter den insgesamt 799 tRFs nur 24 verschiedene. Nach den Eignungsgraden war *Bme1390I* für eine *nifH*-tRFLP mit *nifH*-F am besten geeignet (Tabelle 10); als ungeeignet wurden *AluI*, *RsaI* und *TasI* eingestuft. Bild 27 zeigt eine graphische Gegenüberstellung der tRF-Daten für *Bme1390I* und *AluI*. Von den 812 GenBank-Sequenzen in der TReFID-Datenbank stammten nur 140 (17,6 %) von identifizierten Bakterien und unter diesen waren vor allem Proteobacteria (95 Sequenzen), aber auch einige Archaea (10 Sequenzen). Die übrigen 672 Sequenzen stammten aus verschiedenen Umweltproben (Bild 27). Hinzu kamen 506

in der vorliegenden Arbeit sequenzierte Dünnwald-Klone, von denen 500 den kompletten *nifH*-F/R-Bereich abdeckten, so dass die Gesamtgröße der Datenbank bei 1318 Sequenzen lag.

### 3.3.1.2 TReFID-Datenbank zur Untersuchung von Gemeinschaften denitrifizierender Mikroorganismen

Die TReFID-Datenbank für *nosZ* enthielt 244 der 428 in der GenBank publizierten *nosZ*-Sequenzen (Tabelle 8). Da in der vorliegenden Arbeit ein markierter *nosZ*-R-Primer für die tRFLP Verwendung fand, konnten in die Datenbank nur die Sequenzen integriert werden, die bis nahe an den 3'-Terminus des Gens reichten. Die übrigen 184 Sequenzen deckten nur den vorderen Genbereich ab und überschritten sich mit dem PCR-Produkt von *nosZ*-F/*nosZ*-R um höchstens 230 nt am 5'-Ende. Die durchschnittliche Länge der 812 Sequenzen lag bei  $819 \pm 430$  bp (Median 681 bp); der Anteil von Sequenzen über 500 bp, der Maximallänge auswertbarer tRFs, lag bei 88 %.

In Tabelle 10 ist eine Übersicht der TReFID-Datenbank für *nosZ* gegeben. Der mit Abstand niedrigste SHANNON-Index wurde für *RsaI* berechnet ( $E_S = 0,683$ ), was aus der geringen Anzahl unterschiedlicher tRFs (10), aber auch aus einer sehr ungleichmäßigen Verteilung ( $E_S = 0,129$ ) resultierte; 86 % aller *nosZ*-Sequenzen mit *RsaI*-Schnittstelle ergaben das gleiche tRF (171 nt). Aus diesem Grund gehörte *RsaI* zu den ungeeignetsten Enzymen für eine *nosZ*-tRFLP mit *nosZ*-R als Primer. Gut geeignet waren hingegen *Bsh1236I*, *Cfr131I* und *MboI* (Tabelle 11).

Identifizierte Prokaryoten stellten 72 der 244 GenBank-Sequenzen in der TReFID-Datenbank. Es waren 31 verschiedene Arten aus 17 Gattungen vertreten. Eine der 72 Sequenzen stammte aus dem Euryarchaeoten *Haloarcula marismortui*, der Rest aus Proteobacteria: 24 aus Alpha-, 9 aus Beta- und 38 aus Gammaproteobacteria. Unter letzteren waren 26 partielle Sequenzen verschiede-

---

*Legende zu Bild 27:* In den radialen Diagrammen ist die Länge aller GenBank-Sequenzen in der TReFID-Datenbank (*nifH*) zusammen mit den aus diesen Sequenzen berechneten tRFs graphisch dargestellt ( $N = 812$ ). Die Länge der Sequenzen kann an der Skala abgelesen werden, die von 0 nt (Mittelpunkt) bis 500 nt (äußerster Kreis) reicht. Einzelne Sequenzen sind durch Punkte der schwarzen (gezackten) Begrenzungslinie symbolisiert. Bei den identifizierten Bakterien ist die Linie offen, weil deren Sequenzen teilweise länger als 500 nt waren. Die grünen Strahlen symbolisieren die berechneten tRFs der GenBank-Sequenzen, in (a) für *Bme1390I* und in (b) für *AluI*. Die Länge eines Strahls entspricht der Fragmentgröße in nt. Die gelben Strahlen in (b) repräsentieren GenBank-Sequenzen, die keine *AluI*-Schnittstelle aufwiesen und damit kein tRF zur TReFID-Datenbank beisteuerten (vergleiche Tabelle 10). Die Säulendiagramme rechts geben die absoluten Häufigkeit der tRFs wieder und damit die Anzahl von GenBank Sequenzen, die ein tRF einer bestimmten Länge ergaben: bei *Bme1390I* gab es 144 Sequenzen, die ein tRF der Länge 251 nt ergaben. Am äußeren Rand der Kreisdiagramme ist angegeben, woher die entsprechenden Sequenzen stammten: *Identifizierte Bakterien:* 1 Euryarchaeota, 2 Actinobacteria, 3 Cyanobacteria, 4 Firmicutes und Nitrospirae, 5 - 7 Proteobacteria (5 Alphap., 6 Beta- und Deltap., 7 Gammap.), 8 Spirochaeta. *Sequenzen aus Umweltproben:* a anaerober Bioreaktor (von Wintzingerode *et al.* 1998), b Bad Sachsa (Boison *et al.* 2004), c Laubwald (Rösch *et al.* 2002), d Tiefsee (Mehta *et al.* 2003), e Reiswurzeln (Ueda *et al.* 1995b), f in Verbindung mit *S. alterniflora* (Lovell *et al.* 2000; Lovell *et al.* 2001; Brown *et al.* 2003), g Termitendarm (Ohkuma *et al.* 1996; Noda *et al.* 1999; Ohkuma *et al.* 1999; Noda *et al.* 2002), h Seegraswiese (Bagwell *et al.* 2002) und i (Decker *et al.* 2002) Umweltproben ohne Angabe der Herkunft.

---

**Bild 27:** Graphische Repräsentation der *nifH*-TReFID-Datenbank für zwei Enzyme

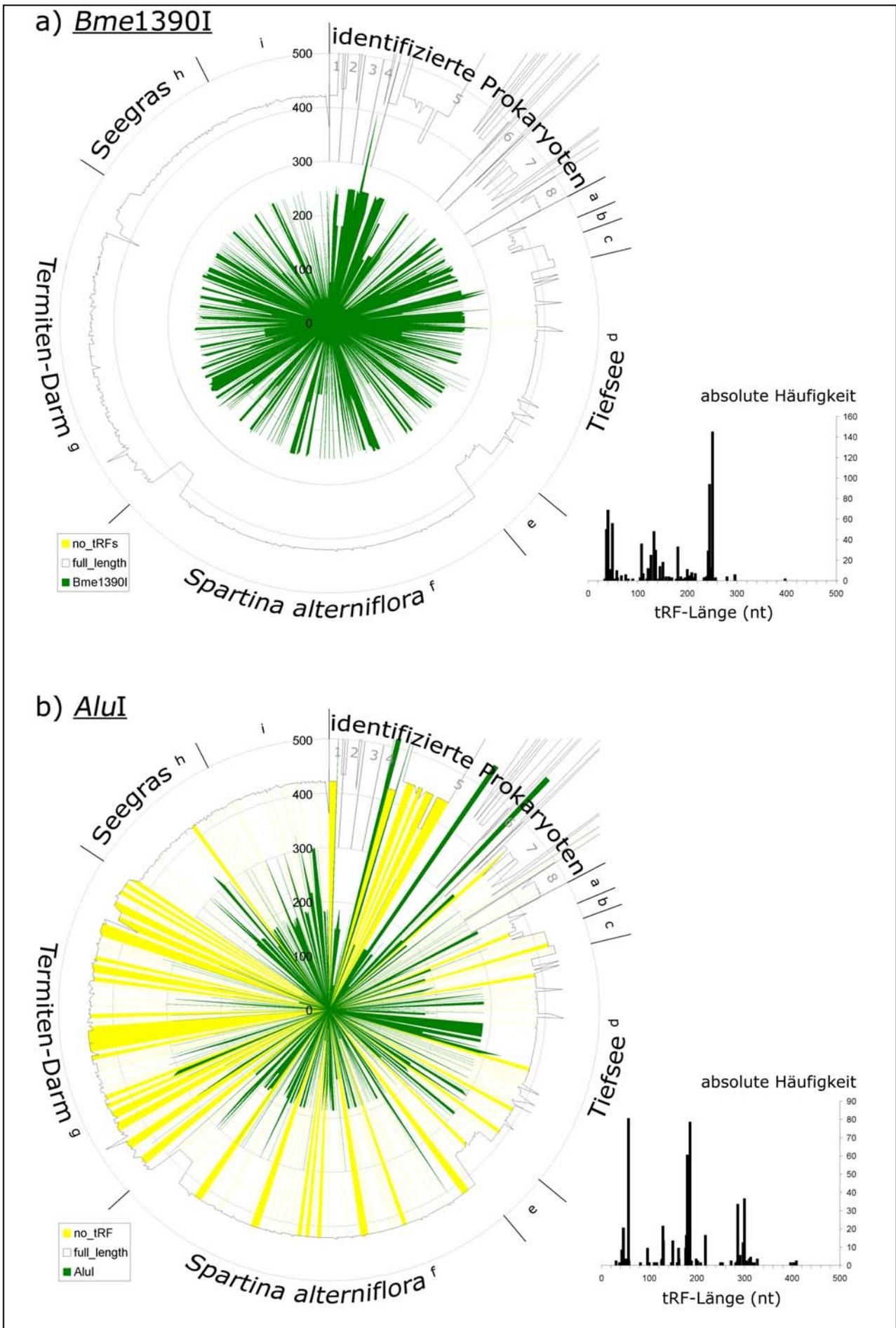


Tabelle 10: Übersicht der TReFID-Datenbank für *nifH* (GenBank-Sequenzen)

Restriktionsenzym	durchschnittliche tRF-Länge	Anzahl unterschiedlicher tRFs	$H_s$	$E_s$	Sequenzen ohne tRF im Bereich von 30 bis 500 nt Länge		Eignung zur tRFLP
					Anzahl	Anteil	
AluI	182 ± 106	59	3,052	0,490	303	37,3 %	--
Bme1390I	161 ± 84	65	3,138	0,469	1	0,1 %	+++
Bsh1236I	169 ± 141	72	3,180	0,487	127	15,6 %	0
Cfr13I	184 ± 74	47	2,424	0,362	2	0,2 %	++
HaeIII	115 ± 114	53	3,018	0,463	131	16,1 %	0
Hin6I	175 ± 123	66	2,930	0,449	127	15,6 %	0
Hinfi	99 ± 40	24	1,331	0,199	13	1,6 %	-
MboI	112 ± 86	52	2,734	0,419	129	15,9 %	-
MspI	181 ± 71	72	3,203	0,483	54	6,7 %	+
RsaI	263 ± 152	66	3,464	0,593	467	57,5 %	--
TaqI	226 ± 93	62	2,951	0,446	65	8,0 %	0
TaqI	165 ± 107	54	2,804	0,428	116	14,3 %	0
TasI	261 ± 271	68	3,546	0,617	500	61,6 %	--

Legende zu Tabelle 10: Für diese Übersicht wurden alle GenBank-Sequenzen von *nifH* analysiert, die im Bereich der Primer nifHF/nifHRbc lagen ( $N = 812$ ). Von jeder Sequenz wurde die Länge der erwarteten tRFs für 13 Restriktionsenzyme berechnet (in der Tabelle sind die Durchschnittswerte mit Standardabweichung angegeben). Die Zahl unterschiedlicher tRFs lag pro Enzym zwischen 24 und 72. Die SHANNON-Indices  $H_s$  und  $E_s$  (2.13.1) beziehen sich nur auf den Anteil der 812 Sequenzen, die ein tRF im Bereich von 30 - 500 nt ergaben. Teilweise hatten GenBank-Sequenzen keine Schnittstelle für ein bestimmtes Enzym (gelb in Bild 27), oder diese lag so weit von der nifHF-Primerbindungsstelle entfernt, dass das berechnete tRF länger als 500 nt war. Zum Beispiel lieferten 37,3 % der Sequenzen Sequenzen kein auswertbares AluI-tRF, aber nur bei 1,6 % lag dies an zu langen Fragmenten – die übrigen 35,7 % der Sequenzen besaßen keine AluI-Schnittstelle. Anhand der tabellierten Werte wurde für jedes Enzym seine Eignung für eine nifH-tRFLP mit dem Primer nifH-F berechnet (nicht dokumentiert) und qualitativ angegeben.

**Tabelle 11: Übersicht der TReFID-Datenbanken für *nosZ* und die 16S rDNA (GenBank-Seq.)**

Gen	Restr.-Enzym	durchschnittliche tRF-Länge	Anzahl unterschiedlicher tRFs	H <sub>s</sub>	E <sub>s</sub>	Sequenzen ohne tRF im Bereich von 30 bis 500 nt		Eignung zur tRFLP
						Anzahl	Anteil	
								tRF > 500 nt
<b>nosZ</b>	AluI	337 ± 136	29	2,496	0,459	15	6,1 %	4,9 %
	BmeI390I	127 ± 149	18	1,348	0,248	17	7,0 %	7,0 %
	Bsh1236I	183 ± 101	33	2,836	0,516	1	0,4 %	0,4 %
	Cfr13I	231 ± 137	29	2,579	0,469	0	0	0
	HaeIII	128 ± 128	28	2,720	0,497	5	2,0 %	2,0 %
	Hin6I	207 ± 135	27	2,205	0,406	16	6,6 %	4,9 %
	Hinfi	332 ± 301	19	1,834	0,373	108	44,3 %	7,4 %
	MboI	141 ± 83	28	2,429	0,442	0	0	0
	MspI	96 ± 139	14	1,356	0,247	2	0,8 %	0,8 %
	RsaI	100 ± 207	10	0,683	0,129	44	18,0 %	6,1 %
	TaiI	212 ± 184	20	2,333	0,435	30	12,3 %	8,2 %
	TaqI	161 ± 72	25	1,952	0,355	0	0	0
	TasI	420 ± 412	13	1,783	0,403	161	66,0 %	15,6 %
<b>16S rDNA</b>	AluI	148 ± 130	355	4,537	0,457	880	4,1 %	3,0 %
	BmeI390I	339 ± 249	396	4,944	0,524	8922	41,4 %	28,3 %
	Bsh1236I	191 ± 121	393	4,698	0,472	268	1,2 %	0,2 %
	Cfr13I	207 ± 80	330	4,847	0,487	340	1,6 %	0,5 %
	HaeIII	214 ± 134	378	4,918	0,496	1176	5,5 %	3,3 %
	Hin6I	308 ± 255	420	4,897	0,507	5954	27,6 %	18,2 %
	Hinfi	261 ± 190	384	4,607	0,466	1864	8,7 %	4,4 %
	MboI	268 ± 257	412	4,942	0,503	3102	14,4 %	8,3 %
	MspI	237 ± 165	412	5,078	0,514	1843	8,6 %	2,8 %
	RsaI	372 ± 238	397	4,947	0,512	5715	26,5 %	13,8 %
	TaiI	261 ± 190	361	4,485	0,458	1864	8,7 %	9,8 %
	TaqI	464 ± 334	428	4,951	0,545	12610	58,6 %	8,3 %
	TasI	373 ± 196	411	5,083	0,537	8687	40,3 %	25,0 %

Legende zu Tabelle 11: Diese Analyse der TReFID-Datenbanken bezieht sich auf 244 *nosZ*- und 21.534 16S rDNA-Sequenzen aus der GenBank (vergleiche Tabelle 8, S. 65). Für weitere Erläuterungen siehe Legende zu Tabelle 10, S. 69.

ner *Pseudomonas stutzeri*-Isolate (Cladera *et al.* 2004). Die beiden *nosZ*-Sequenzen des Epsilon-proteobakteriums *Wolinella succinogenes* (AJ640086 und NC\_005090) wurden nicht in die Datenbank aufgenommen, da sie sich stark von den übrigen *nosZ*-Sequenzen unterschieden. Die 162 GenBank-Sequenzen unidentifizierter Organismen stammten aus vier Umweltproben (Scala und Kerkhof 1998; Rösch *et al.* 2002; Rich *et al.* 2003; Mounier *et al.* 2004). Durch die *nosZ*-Sequenzen aus dem Dünnwaldboden stieg die Datenbankgröße auf das annähernd 2,5fache (Tabelle 8).

### 3.3.1.3 TReFID-Datenbank zur Untersuchung der bakteriellen Gesamtgemeinschaft

Für die TReFID-Datenbank des 16S rRNA-Gens wurde ein gutes Viertel der in der GenBank publizierten Sequenzen überprüft (39.069 von 150.706; Tabelle 8). Bei 934 der überprüften Sequenzen konnte kein zuverlässiges Alignment im Bereich der 63f-Bindungsstelle erstellt werden und weitere 16.601 Sequenzen deckten einen anderen Genbereich ab. Daher erwiesen sich nur 21.534 aller überprüften Sequenzen als geeignet für TReFID (Tabelle 8). Eine Übersicht der aus den GenBank-Sequenzen abgeleiteten tRFs gibt Tabelle 11. Je nach Restriktionsenzym wurden beim virtuellen Verdau bis zu 428 (*TaqI*) unterschiedliche Fragmentlängen erhalten, was dem theoretischen Maximum von 470 nahe kam. Bei allen Enzymen gab es aber Sequenzen, die kein tRF im Bereich von 30 - 500 nt ergaben, doch bei *TaqI* war dieser Anteil mit knapp 60 % aller Sequenzen in der TReFID-Datenbank außergewöhnlich hoch. Einige Enzyme waren im Vergleich zu den übrigen weniger gut für eine 16S rDNA-tRFLP geeignet, etwa *Bme1390I* (Tabelle 11).

Von den 21.534 GenBank-Sequenzen in der TReFID-Datenbank waren 21.290 (98,9 %) bakteriellen Ursprungs, 243 (1,1 %) kamen aus Archaea und 5 aus Plastiden. Die bakteriellen Sequenzen waren zu 77,3 % mit Angaben zur Taxonomie versehen, so dass sie einem der Phyla (Garrity *et al.* 2004) zugeordnet werden konnten (Tabelle 12). Allerdings beschränkten sich diese Annotationen gerade bei Sequenzen aus Umweltproben auch oft auf das Phylum (Stamm), Angaben zur Gattung waren nur bei 49 % der 21.534 Sequenzen vorhanden. Neben den GenBank-Sequenzen enthielt die 16S rDNA-Datenbank 611 Dünnwald-Sequenzen. Dies waren die 590 Sequenzen, die den vollständigen 63/778-Genbereich abdeckten (vergleiche Tabelle 4, S. 42), sowie 21 weitere, kürzere Sequenzen. Bei diesem Gen lag der Anteil der Dünnwald-Sequenzen an der Gesamtdatenbank nur bei 2,8 %.

---

*Legende zu Tabelle 12:* In dieser Übersicht ist die Verteilung der Sequenzen in der TReFID-Datenbank und der GenBank<sup>1</sup> auf verschiedene bakterielle Phyla nebeneinander gestellt (Nummerierung und Bezeichnung der Phyla nach Garrity *et al.* (2004), aber taxonomische Einordnung nach den GenBank-Annotationen). Sequenzen gehörten zu „unklassifizierten Bakterien“, wenn unter „Lineage“ kein Phylum eingetragen war. Ein großer (nicht quantifizierter) Teil der Sequenzen klassifizierter Bakterien stammte aus unkultivierten oder nicht bis auf die Artebene identifizierten Bakterien. Die beiden in der Übersicht fehlenden Phyla (Chrysiogenetes und Dictyoglomi) waren nicht in der TReFID-Datenbank enthalten, in der GenBank aber auch nur mit zusammen 11 Sequenzen vertreten. Die Thermomicrobia werden in der GenBank als Klasse innerhalb der Chloroflexi geführt; die exakte Zahl der Thermo- (Fortsetzung nächste Seite)

**Tabelle 12: Taxomische Gruppen in der TReFID-Datenbank für das 16S rRNA-Gen**

Phylum	TReFID-Datenbank		GenBank (26. 02. 2005)		Anteil in der TReFID-DB. enthaltener GenBank-Sequenzen
	Anzahl Sequenzen	rel. Anteil [%]	Anzahl Sequenzen	rel. Anteil [%]	
BI. Aquificae	116	0,5 %	412	0,3 %	28,2 %
BII. Thermotogae	60	0,3 %	98	< 0,1 %	61,2 %
BIII. Thermodesulfobacteria	5	< 0,1 %	52	< 0,1 %	9,6 %
BIV. Deinococcus-Thermus	182	0,9 %	311	0,2 %	58,5 %
BV. Thermomicrobia	?		17	< 0,1 %	?
BVI. "Chloroflexi"	71	0,3 %	782	0,5 %	9,1 %
BVIII. "Nitrospira"	87	0,4 %	252	0,2 %	34,5 %
BIX. Deferribacteres	7	< 0,1 %	48	< 0,1 %	14,6 %
BX. Cyanobacteria	1.059	5,0 %	4.332	2,9 %	24,4 %
BXI. Chlorobi	54	0,3 %	278	0,2 %	19,4 %
BXII. Proteobacteria	6.903	32,4 %	49.401	32,8 %	14,0 %
I. Alphaproteobacteria	2.019	9,5 %	13.236	8,8 %	15,3 %
II. Betaproteobacteria	1.770	8,3 %	8.876	5,9 %	19,9 %
III. Gammaproteobacteria	2.489	11,7 %	20.630	13,7 %	12,1 %
IV. Deltaproteobacteria	220	1,0 %	3.544	2,4 %	6,2 %
V. Epsilonproteobacteria	314	1,5 %	1.790	1,2 %	17,5 %
BXIII. "Firmicutes"	1.918	9,0 %	15.105	10,0 %	12,7 %
I. "Clostridia"	352	1,7 %	2.720	1,8 %	12,9 %
II. Mollicutes	173	0,8 %	1.509	1,0 %	11,5 %
III. "Bacilli"	1.333	6,3 %	10.311	6,8 %	12,9 %
BXIV. Actinobacteria	1.686	7,9 %	15.238	10,1 %	11,1 %
V. Actinobacteridae	1.492	7,0 %	13.291	8,8 %	11,2 %
BXV. "Planctomycetes"	361	1,7 %	1.107	0,7 %	32,6 %
BXVI. Chlamydiae	78	0,4 %	367	0,2 %	21,3 %
BXVII. Spirochaetes	1.157	5,4 %	1.824	1,2 %	63,4 %
BXVIII. "Fibrobacteres"	31	0,1 %	43	< 0,1 %	72,1 %
BXIX. "Acidobacteria"	509	2,4 %	1.000	0,7 %	50,9 %
BXX. "Bacteroidetes"	1.978	9,3 %	5.936	3,9 %	33,3 %
I. "Bacteroidetes" (Klasse)	482	2,3 %	940	0,6 %	51,3 %
II. Flavobacteria	614	2,9 %	1.362	0,9 %	45,1 %
III. "Sphingobacteria"	455	2,1 %	1.134	0,8 %	40,1 %
BXXI. "Fusobacteria"	28	0,1 %	240	0,2 %	11,7 %
BXXII. "Verrucomicrobia"	118	0,6 %	549	0,4 %	21,5 %
BXXIV. Gemmatimonadetes	3	< 0,1 %	68	< 0,1 %	4,4 %
"Candidate Divisions" (OP11, TM6 etc.)	56	0,3 %	?		?
<i>Summe (klassifizierte Bakterien):</i>	<i>16.467</i>	<i>77,3 %</i>	<i>97.471</i>	<i>64,7 %</i>	<i>16,9 %</i>
unklassifizierte Bakterien	4.823	22,7 %	53.235	35,3 %	9,1 %
<b>Gesamtsumme:</b>	<b>21.290</b>	<b>100,0 %</b>	<b>150.706</b>	<b>100,0 %</b>	<b>14,1 %</b>
+ Archaea	239		10.647		2,2 %
+ Eukarya (Plastiden & Mitochondrien)	5		37.796		< 0,1 %

microbia-Sequenzen in der TReFID-Datenbank ist unbekannt, aber niedriger als 17. Bei einigen Phyla sind zusätzlich die Werte für ausgewählte Klassen angegeben. Die TReFID-Datenbank enthielt insgesamt nur etwa 14 % aller GenBank-Sequenzen, aber bei den meisten Gruppen waren die relativen Anteile in beiden Datenbanken ähnlich.

<sup>1</sup> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=nucleotide>. Abfrage der NCBI Nucleotide Datenbank (26. Februar 2005) nach folgendem Schema für jedes Taxon, das in Tabelle 12 enthalten ist: "Bacteroidetes"[Organism] AND 16S[All Fields] AND (ribosomal[All Fields] OR rRNA[All Fields]).

### 3.3.2 Kontrollversuche zur TReFID-Analyse von tRF-Daten

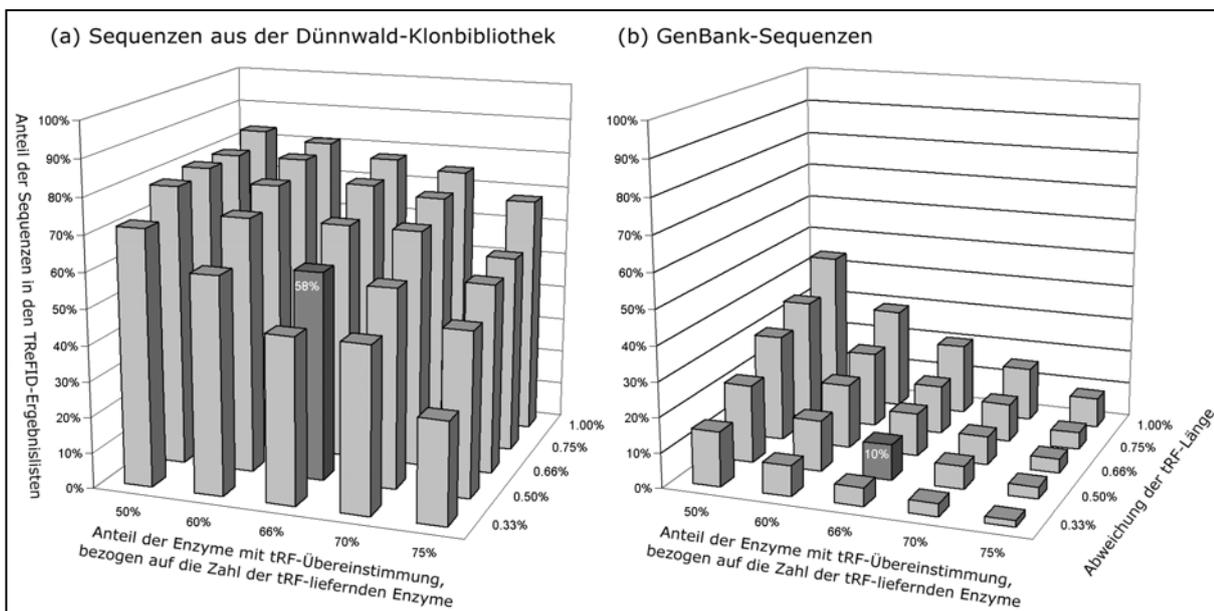
Zur Beurteilung der TReFID-Ergebnisse wurden vier unabhängige Kontrollen durchgeführt, die im folgenden detailliert beschrieben sind. Die Grundlage für die Kontrollen A und C war eine ältere 16S rDNA-Datenbank mit 17.462 Einträgen, darunter nur 84 Dünnwald-Sequenzen (Rösch und Bothe 2005). Für die Kontrollen B und D wurde die aktuellste Datenbank mit 22.145 Einträge (inklusive aller Dünnwald-Klone) zugrunde gelegt.

#### 3.3.2.1 TReFID-Kontrolle A (Ergebnisanteile von GenBank- und Dünnwald-Sequenzen)

In einer ersten Kontrolle wurden die Anteile von GenBank- bzw. Dünnwald-Sequenzen in TReFID-Ergebnislisten bestimmt (Bild 28). Hierzu wurde eine 16S rDNA-tRFLP, die mit 63f-FAM und DNA aus der Bodenprobe DUN+1 (02. Oktober 2002) durchgeführt wurde, unter verschiedenen Bedingungen ausgewertet. Dabei wurden die tRF-Längenabweichung (*deviation*) und das Kriterium zur Muster-Übereinstimmung (*pattern match*) (Definitionen in Abschnitt 2.15.1) variiert, um die optimale Kombination herauszufinden. Von den Dünnwald-Sequenzen in der TReFID-Datenbank war bekannt, dass sie in der untersuchten Probe vorhanden waren. Jedoch waren in den Ergebnislisten maximal 70 von 84 (83 %) dieser Sequenzen enthalten. Bei den restriktivsten Bedingungen (0,33 % Längenabweichung und  $\frac{3}{4}$  der Enzyme müssen eine Übereinstimmung geben) lag der Anteil nur bei 29 % (Bild 28a). Im Vergleich dazu waren in den Ergebnislisten zwischen 2 % und 44 % der GenBank-Sequenzen aus der TReFID-Datenbank enthalten (Bild 28b). Der Anteil war für die Dünnwald-Sequenzen im Durchschnitt um 51 % höher als für die GenBank-Sequenzen (Bild 28). Auf der Grundlage der in Bild 28 gezeigten Daten wurden die Standardparameter für TReFID-Auswertungen festgelegt: 0,50 % tRF-Längenabweichung und tRF-Übereinstimmungen in  $\frac{2}{3}$  der tRF-liefernden Enzyme sind für eine Muster-Übereinstimmung erforderlich (2.15.1). Bei dieser Kombination wurden 58 % der Dünnwald-Sequenzen wiedergefunden, während die Ergebnisliste nur 10 % der Datenbank-Sequenzen enthielt (dunkle Säulen in Bild 28).

#### 3.3.2.2 TReFID-Kontrolle B (synthetische tRFLP-Profile)

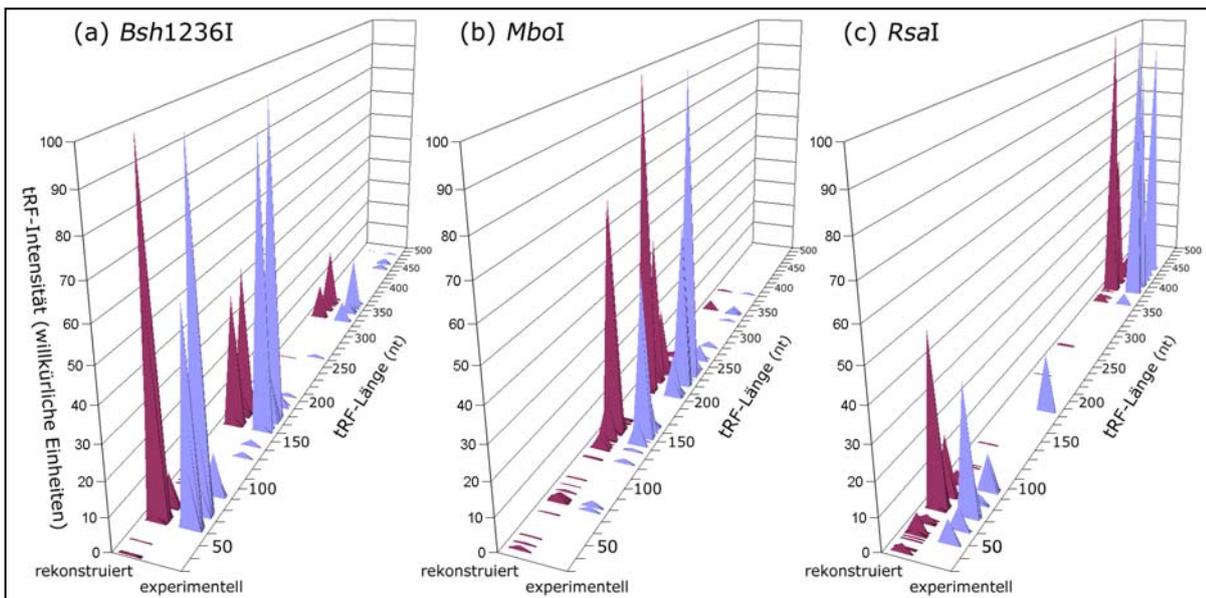
Die TReFID-Ergebnislisten erlaubten die Rekonstruktion von synthetischen tRFLP-Profilen und damit einen direkten Vergleich zu den experimentellen Daten (Bild 29). Die Originaldaten stammten aus der gleichen tRFLP wie bei Kontrolle A (16S rDNA mit Dünnwald-DNA vom 02. Oktober 2002) und wurden mit folgenden Parametern ausgewertet: 0,5 % tRF-Längenabweichung und 75 % als Kriterium für eine Muster-Übereinstimmung (für Definitionen siehe 2.15.1). Als Datenbank wurde die 16S rDNA-Datenbank mit 22.145 Einträgen verwendet (3.3.1). Der Rekonstruktion lag die Annahme zugrunde, dass sämtliche in der Ergebnisliste aufgeführten Organismen tatsächlich in der untersuchten Bodenprobe vorhanden waren. Die für diese Organismen berechneten tRFs wurden daher wie experimentelle tRFs behandelt, wobei als „Intensität“ anstelle der Fluoreszenz die absolute Häufigkeit des entsprechenden tRFs in der Ergebnisliste betrachtet wurde. Die Bearbeitung dieser Daten erfolgte halb-automatisch in einer Microsoft Excel-Arbeitsmappe. In Bild 29 sind drei solchermaßen rekonstruierte Profile den entsprechenden tRFLP-Profilen

**Bild 28: TReFID-Kontrolle A (Ergebnisanteile von GenBank- und Dünwaldsequenzen)**

*Legende zu Bild 28:* Das Bild zeigt die Abhängigkeit der TReFID-Analyse von zwei Parametern. Die Auswertungen basieren auf Werten einer einzigen 16S rDNA-tRFLP mit DNA aus dem Dünwaldboden (Probe vom 02. Oktober 2002). Die TReFID-Ergebnislisten wurden für jede Auswertung in Dünwald- und GenBank-Sequenzen aufgeteilt. Für beide Gruppen wurde berechnet, wie hoch der Anteil bezogen auf die Gesamtzahl von Sequenzen in der TReFID-Datenbank war. Über einen der beiden Parameter wurde festgelegt, welcher Anteil der bei der tRFLP verwendeten Restriktionsenzyme (13) eine tRF-Übereinstimmung geben musste. Der angenommene Fehler bei der Fragmentgrößenbestimmung (Abweichung der tRF-Länge) konnte ebenso bei der TReFID-Analyse variiert werden, wie der erforderliche Enzymanteil. Als Standardkombination wurde eine Abweichung von 0,5 % und ein Enzymanteil von 66 % gewählt (dunkle Säulen). In diesem Fall enthielt die TReFID-Ergebnisliste 58 % der 84 Dünwald-Sequenzen und 10 % der GenBank-Sequenzen.

gegenübergestellt. In den meisten Fällen gab es eine gute Deckung zwischen beiden Profilen. Hervorzuheben ist, dass diese Übereinstimmung nicht nur die Fragmentlänge, sondern in vielen Fällen auch die „Intensität“ betraf, obwohl die Peakhöhe (oder -fläche) bei der TReFID-Auswertung unberücksichtigt blieb.

In jedem rekonstruierten Profil gab es tRFs, die experimentell nicht nachgewiesen wurden (z. B. 33 nt bei *RsaI*, Bild 29c). Der umgekehrte Fall trat dagegen seltener auf (z. B. 183 nt bei *RsaI*). Die Auswertung der Über- bzw. Nichtübereinstimmungen aller Profile aus diesem Kontrollversuch, inklusive der in Bild 29 nicht gezeigten, sind in Tabelle 13 zusammengefasst. Abweichungen zwischen realem und rekonstruiertem tRFLP-Profil fanden sich vor allem bei schwachen Peaks bzw. bei in der Ergebnisliste selten auftretenden tRFs (Tabelle 13). Denn der Anteil an der Peakflächensumme bzw. an der Gesamtheit der virtuellen tRFs war immer deutlich niedriger als der Anteil an der Gesamtzahl von tRFs: bei *RsaI* gab es für 6 % der tRFs, die zusammen 4 % der Gesamtintensität aller detektierten *RsaI*-tRFs ausmachten, keine Entsprechung in der Ergebnisliste. Im Gegensatz dazu gab es bei den virtuellen tRFs für 42 % keinen experimentellen Nachweis, doch stellten diese zusammen nur 7 % aller virtuellen tRFs für *RsaI* (Tabelle 13).

**Bild 29: TReFID-Kontrolle B (synthetische tRFLP-Profile)**

**Legende zu Bild 29:** Das Bild zeigt für drei Enzyme die Gegenüberstellung des experimentell erhaltenen (blau) und des auf der Basis einer TReFID-Ergebnisliste rekonstruierten (rot) tRFLP-Profiles (vergleiche Tabelle 13). Die experimentellen Daten stammten aus einer 16S rDNA-tRFLP mit DNA vom 02. Oktober 2002. Die Rekonstruktion erfolgte unter der Annahme, dass alle Organismen in der Ergebnisliste in der untersuchten Bodenprobe vorhanden waren. Die Intensität bei den rekonstruierten Profilen entspricht der absoluten Häufigkeit des entsprechenden tRFs in der Ergebnisliste. Die höchsten Peaks beider Datensätze wurden auf 100 skaliert.

**Tabelle 13: Vergleich von rekonstruierten und realen tRFLP-Profilen**

	AluI	Bme1390I	Bsh1236I	Cfr13I	HaeIII	Hin6I	HinI	MboI	MspI	RsaI	TaiI	TasI
experimentelle tRFs	47	51	48	29	36	54	37	45	63	31	31	18
virtuelle tRFs	104	96	65	76	89	92	65	77	113	88	75	93
exakte Übereinstimmungen	37	41	32	25	28	36	24	34	40	21	20	16
Übereinstimmungen $\pm 1$ nt	43	46	36	28	33	45	30	42	54	29	25	18
experimentelle tRFs ohne Übereinstimmung mit virtuellen tRFs	4	5	12	1	3	9	7	3	9	2	6	0
Anteil bezogen auf experimentelle tRFs	9%	10%	25%	3%	8%	17%	19%	7%	14%	6%	19%	0%
Anteil an der Peakflächensumme aller experimentellen tRFs	5%	7%	5%	1%	3%	4%	3%	1%	4%	4%	5%	0%
virtuelle tRFs ohne Übereinstimmung mit experimentellen tRFs	35	25	11	29	32	24	19	17	31	37	30	60
Anteil bezogen auf virtuelle tRFs	34%	26%	17%	38%	36%	26%	29%	22%	27%	42%	40%	65%
Anteil an der Gesamtheit virtueller tRFs	7%	9%	1%	6%	11%	4%	4%	2%	10%	7%	6%	16%

**Legende zu Tabelle 13:** In der ersten Zeile ist die Anzahl der tRFs für zwölf Enzyme einer 16S rDNA-tRFLP mit DNA des Dünnwaldbodens (02. Oktober 2002) angegeben – *TaqI* wurde nicht mit aufgeführt, da dessen tRFLP-Profil nur drei sehr schwache Peaks enthielt. Die virtuellen tRFs stammen aus der Rekonstruktion von tRFLP-Profilen (vergleiche Bild 28). Als exakte Übereinstimmung wurde gezählt, wenn detektierte und virtuelle tRFs gleicher Länge auftraten; für fast-exakte Übereinstimmungen war eine Toleranz von  $\pm 1$  nt erlaubt (experimentelle Unsicherheit der Bestimmung). Mit Ausnahme von *TasI* traten bei jedem Enzym wenige experimentelle tRFs auf, die nicht durch die Organismen der Ergebnisliste abgedeckt waren. Umgekehrt gab es für 17 % bis 42 % der tRFs, die aus der Ergebnisliste abgeleitet werden konnten, keine entsprechenden experimentellen tRFs.

### 3.3.2.3 TReFID-Kontrolle C (TReFID-Auswertung einer artifiziellen tRFLP)

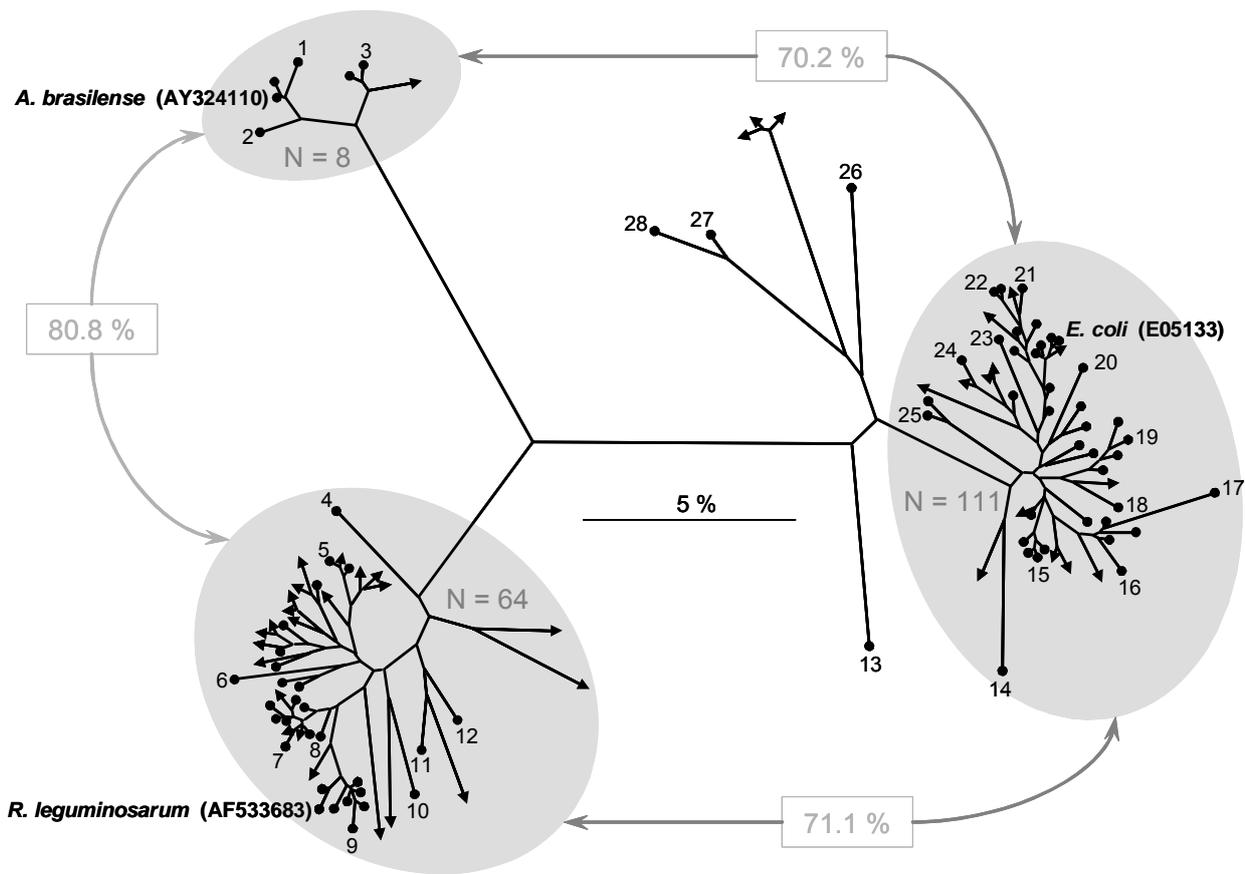
Es wurden drei Bakterienstämme aus der TReFID-Datenbank (16S rDNA) ausgewählt, deren berechnete tRFs als Eingabewerte für eine TReFID-Analyse mit den voreingestellten Standardparametern (2.15.1) dienen. Durch eine phylogenetische Auswertung der Sequenzen in der Ergebnisliste konnte gezeigt werden, in welcher verwandtschaftlichen Beziehung die Organismen dieser Liste zu den drei ausgewählten Stämmen standen. Die Wahl der Organismen fiel dabei auf *Azospirillum brasilense* (*Abr*; Alphaproteobacteria, Rhodospirillales, Rhodospirillaceae), *Escherichia coli* (*Eco*, Gammaproteobacteria, Enterobacteriales, Enterobacteriaceae) und *Rhizobium leguminosarum* (*Rle*, Alphaproteobacteria, Rhizobiales, Rhizobiaceae), da diese mit zu den häufigsten Klassen in der TReFID-Datenbank gehörten (Tabelle 13).

Insgesamt enthielt die TReFID-Ergebnisliste 537 Sequenzen, von denen 280 kürzer als 500 nt und damit für die phylogenetische Analyse unbrauchbar waren. Diese 280 Sequenzen, unter denen 209 identische Sequenzen aus *Salmonella enterica* (Enterobacteriaceae), aber auch solche aus *Escherichia* sp., *Rhizobium* sp. und unkultivierten Bakterien waren, wurden aus der Liste gelöscht. Von den übrigen 257 Sequenzen wurde ein Alignment erstellt, aus dem anschließend 65 redundante Sequenzen, die identisch zu anderen Sequenzen des Alignments waren, wieder entfernt wurden. Das in Bild 30 gezeigte NJ-Phylogramm wurde mit den verbliebenen 192 Sequenzen berechnet.

Im Phylogramm (Bild 30) ist eine klare Aufteilung der Sequenzen auf drei Cluster erkennbar, die je einen der Kontrollstämme enthalten. Die mittlere paarweise Sequenzhomologie von *Abr* zu den übrigen sieben Sequenzen in diesem Cluster betrug 97,4 %. Für das *Rle*-Cluster (64 Sequenzen) lag dieser Wert bei 96,0 % und für das *Eco*-Cluster (111 Sequenzen) bei 95,2 %. Die durchschnittliche Homologie des *Abr*- zum *Rle*-Cluster betrug 80,8 %. Zum *Eco*-Cluster waren die beiden genannten nur 70,2 % bzw. 71,1 % homolog, was die Zugehörigkeit zu verschiedenen Klassen der Proteobacteria widerspiegelt. Die fehlenden neun Sequenzen (4,7 % von 192) standen außerhalb der *Abr*-, *Rle*- und *Eco*-Cluster (Bild 30). Vier der neun Sequenzen stammten aus unkultivierten Bakterien mit gleichen tRF-Mustern, die Rest verteilte sich auf Gammaproteobacteria aus der Ordnung Alteromonadales; in Tabelle 14 sind die tRF-Daten dieser Artefakte denen der Kontrollstämme gegenübergestellt.

### 3.3.2.4 TReFID-Kontrolle D (verschiedene Kombinationen von tRF-Daten und Datenbanken)

Die Genspezifität der TReFID-Methode wurde getestet, indem die experimentellen Daten mit den TReFID-Datenbanken aller drei Gene ausgewertet wurden. Als Eingabewerte für eine Analyse mit der 16S rDNA-Datenbank wurden daher auch die mit DNA des Dünnwaldbodens erhaltenen tRF-Daten für *nifH* oder *nosZ* eingesetzt (Tabelle 15). Die tRF-Daten zur 16S rDNA lieferten bei der Analyse mit der *nosZ*-Datenbank in einem Fall zwei Treffer, aber sonst nur in Verbindung mit der 16S rDNA-Datenbank. Falsch-Positive traten auch bei der Kombination von 16S rDNA-Datenbank mit *nifH*- und *nosZ*-tRF-Daten auf, aber nur in geringer Zahl: während die 16S rDNA-Daten 1601 bis 3102 Treffer ergaben, lag die Zahl der Falsch-Positiven bei den anderen beiden Genen bei maximal 26 (Tabelle 15).

**Bild 30: TReFID-Kontrolle C (TReFID-Auswertung einer artifziellen tRFLP)**

*Legende zu Bild 30:* Dieses ungewurzelte NJ-Phylogramm wurde mit 192 Sequenzen aus der TReFID-Ergebnisliste zu Kontrolle C errechnet (siehe Text). Die drei Kontrollstämme, deren tRF-Daten als Eingabewerte für die TReFID-Auswertung dienten, sind namentlich gekennzeichnet. Die grau hervorgehobene Sequenzgruppe um *A. brasilense* enthielt insgesamt 8 Sequenzen, die im Mittel 97,4 % zueinander homolog waren; die *R. leguminosarum*-Gruppe umfasste 64, die *E. coli*-Gruppe 111 Sequenzen mit mittleren Homologien von 96,0 % bzw. 95,2 %. Viele dieser Sequenzen sind im Bild graphisch nicht aufgelöst, da sie zu Untergruppen nahezu identischer Sequenzen gehörten. Die Prozentzahlen geben die mittlere paarweise Sequenzhomologie zwischen den in den Gruppen zusammengefassten Sequenzen an.

Die Zahlen an den Ästen stehen für die folgenden Organismen: 1 *Roseomonas fauriae* (AF533354), 2 *Roseomonas* Genomospezies (AY150050), 3 *Azospirillum* sp. (AB049110), 4 *Devosia riboflavina* (AF501346), 5 *Agrobacterium tumefaciens* (AF508094), 6 *Agrobacterium tumefaciens* (AF406666), 7 *Sinorhizobium kummerowiae* (AF364067), 8 *Sinorhizobium meliloti* (AF533685), 9 *Rhizobium tropici* (U89832), 10 *Mesorhizobium plurifarium* (AF516882), 11 *Ochrobactrum* sp. (AF452128), 12 *Ochrobactrum anthropi* (AF501340), 13 *Idiomarina baltica* (AJ440214), 14 *Xenorhabdus nematophila* (AF522294), 15 *Pectobacterium carotovorum* (AF373189), 16 *Serratia quinovorans* (AJ279050), 17 *Serratia* sp. (AF511524), 18 *Serratia odorifera* (AF286870), 19 *Pectobacterium carotovorum* (AF373184), 20 *Erwinia amylovora* (AF141892), 21 *Escherichia albertii* (AJ508775), 22 *Escherichia coli* (AY319394), 23 *Obesumbacterium proteus* (AY077753), 24 *Escherichia senegalensis* (AY217654), 25 *Dickeya dadantii* (AF520707), 26 *Shewanella gelidimarina* (AF530149), 27 *Pseudoalteromonas* sp. (AB055788), 28 *Pseudoalteromonas prydzensis* (U85855).

Schwarze Kreise stehen für Sequenzen identifizierter Organismen, Dreiecke für solche unidentifizierter.

**Tabelle 14: Übersicht der tRFs der drei Kontrollstämme und der Artefakte (Kontrolle C)**

Organismus	tRF-Länge [nt]												
	AluI	BmeI390I	Bsh1236I	Cfr13I	HaeIII	Hin6I	HinFI	MboI	MspI	RsaI	TalI	TaqI	TasI
<i>Azospirillum brasilense</i>	226	415	173	167	36	45	274	217	115	>500	65	>500	470
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	171	402	60	255	190	302	66	204	366	>500	481	489	457
<i>Escherichia coli</i>	40	>500	360	161	171	336	295	238	461	392	143	>500	>500
<i>Idiomarina</i> sp. und <i>I. baltica</i>	<b>40</b>	>500	<b>360</b>	148	<b>171</b>	<b>336</b>	<b>295</b>	<b>238</b>	<b>461</b>	>500	443	>500	434
<i>Shewanella gelidimarina</i>	<b>40</b>	>500	<b>360</b>	161	<b>171</b>	427	<b>295</b>	<b>238</b>	<b>461</b>	<b>392</b>	443	98	>500
<i>Pseudoalteromonas prydzensis</i>	<b>40</b>	>500	<b>360</b>	148	<b>171</b>	<b>336</b>	<b>295</b>	<b>238</b>	<b>461</b>	>500	443	>500	>500
<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	<b>40</b>	>500	<b>360</b>	148	<b>171</b>	<b>336</b>	<b>295</b>	<b>238</b>	<b>462</b>	>500	443	56	>500
vier unkultivierte Proteobakterien	<b>40</b>	>500	<b>360</b>	<b>161</b>	<b>171</b>	176	<b>295</b>	<b>238</b>	<b>461</b>	<b>392</b>	443	>500	433

Legende zu Tabelle 14: Diese Zusammenstellung der tRF-Daten zeigt, dass die Artefakte in der TReFID-Ergebnisliste für Kontrolle C (siehe Text) bei vielen Enzymen die für *E. coli* erwarteten tRFs ergaben (fett und unterstrichen gedruckte Werte). Bei *Idiomarina* lieferten 10 der 13 Enzyme tRFs, aber nur in drei Fällen gab es Abweichungen zu den für *E. coli* erwarteten tRFs. Übereinstimmungen zu den tRFs der beiden anderen Kontrollstämme *A. brasilense* und *R. leguminosarum* traten in keinem Fall auf. tRFs > 500 nt konnten mit TReFID nicht ausgewertet werden.

GenBank-Zugriffsnummern: AY324110 (*A. brasilense*), AF533683 (*R. leguminosarum*), E05133 (*E. coli*), AF513450 (*Idiomarina* sp.), AJ440214 (*I. baltica*), AF530149 (*S. gelidimarina*), AB055788 (*Pseudoalteromonas* sp.), U85855 (*P. prydzensis*); für die unkultivierten Proteobakterien: AJ310686, AJ310687, AJ310689 und AJ310690.

**Tabelle 15: TReFID-Ergebnisse für alle Kombinationen von tRF-Daten und Datenbanken**

tRFLP-Projekt	Gesamtzahl tRFs, Restriktionsenzyme	TReFID-Datenbank			
		16S rDNA 22.145 Einträge	<i>nifH</i> 1318 Einträge	<i>nosZ</i> (invertierte Seq.) 607 Einträge	<i>nosZ</i> (nicht-invertierte Seq.) 607 Einträge
<b>16S rDNA</b> (DUN-1)	294 tRFs, 9 RE	<b>1601 Treffer</b>	keine Treffer	keine Treffer	keine Treffer
<b>16S rDNA</b> (DUN+1)	407 tRFs, 9 RE	<b>3102 Treffer</b>	keine Treffer	keine Treffer	keine Treffer
<b>16S rDNA</b> (DUN-7)	787 tRFs, 13 RE	<b>1676 Treffer</b>	keine Treffer	<b>2 Treffer</b>	keine Treffer
<b>16S rDNA</b> (DUN+7)	581 tRFs, 13 RE	<b>1725 Treffer</b>	keine Treffer	keine Treffer	keine Treffer
<i>nifH</i> (DUN-1)	346 tRFs, 13 RE	keine Treffer	<b>466 Treffer</b>	keine Treffer	keine Treffer
<i>nifH</i> (DUN+1)	449 tRFs, 13 RE	<b>26 Treffer</b>	<b>480 Treffer</b>	keine Treffer	keine Treffer
<i>nifH</i> (DUN-2)	278 tRFs, 11 RE	keine Treffer	<b>240 Treffer</b>	keine Treffer	keine Treffer
<i>nifH</i> (DUN+2)	419 tRFs, 11 RE	<b>13 Treffer</b>	<b>356 Treffer</b>	keine Treffer	keine Treffer
<i>nifH</i> (DUN-7)	287 tRFs, 13 RE	keine Treffer	<b>208 Treffer</b>	keine Treffer	keine Treffer
<i>nifH</i> (DUN+7)	315 tRFs, 13 RE	keine Treffer	<b>376 Treffer</b>	keine Treffer	keine Treffer
<i>nosZ</i> (DUN+1)	99 tRFs, 10 RE	keine Treffer	keine Treffer	<b>98 Treffer</b>	keine Treffer
<i>nosZ</i> (DUN+7)	114 tRFs, 8 RE	<b>2 Treffer</b>	keine Treffer	<b>53 Treffer</b>	keine Treffer

Legende zu Tabelle 15: Allen Analysen wurden mit den voreingestellten Standardparametern (2.15.1) durchgeführt. Bei *nosZ* war der Reverseprimer markiert, weshalb zur TReFID-Auswertung eine *nosZ*-Datenbank mit invertierten Sequenzen verwendet wurde. Die *nifH*-Daten ergaben mit den beiden *nosZ*-Datenbanken keine Treffer, mit der 16S rDNA-Datenbank aber in zwei Fällen 13 bzw. 26 Treffer. Die Anzahl der Treffer bezieht sich auf die Zahl der Datenbankeinträge, nicht auf die Zahl unterscheidbarer tRF-Muster, die deutlich niedriger läge (vergleiche Abschnitt 3.3.3).

### 3.3.3 Ergebnisse der tRFLP-Experimente für den Dünnwaldboden

Für tRFLP-Experimente wurden meist 13 Restriktionsenzyme eingesetzt. Einzelne tRFLP-Proben konnten aber leer sein, z. B. weil die Fragmente bei der Aufreinigung verloren gingen oder weil Enzyme nicht geschnitten hatten. Teilweise fielen aus technischen Gründen auch einzelne Proben oder ganze Farbkanäle aus, so dass in wiederholten Fällen 96 Proben nicht auszuwerten waren. Die TReFID-Auswertung erfolgte immer nur für die Enzyme, die tRF-Daten für beide Flächen eines Zeitpunktes, also z. B. DUN+1 und DUN-1, lieferten. Zwischen den Zeitpunkten konnte die Zahl der Enzyme dagegen variieren (z. B. 10 bei DUN1 und 13 bei DUN7).

#### 3.3.3.1 Auswertung der tRFLP-Experimente zu *nifH* im Dünnwaldboden

Insgesamt wurden 25 tRFLP-Experimente zu *nifH* im Dünnwaldboden ausgewertet (Tabelle 16), wobei nur bei vier Experimenten Daten für alle 13 Enzyme vorlagen; im Durchschnitt konnten Daten zu 11 Enzymen pro Experiment gewonnen werden. Die aus den tRFLP-Profilen abgeleiteten Peaklisten (2.14.5) wurden manuell überprüft und in TReFID-Projektdateien zusammengefasst (2.15.4). Fragmente  $\geq 397$  nt wurden gelöscht, da die ungeschnittenen *nifH*-PCR-Produkte um 400 bp lang waren. Entsprechende Peaks um 400 nt traten in den meisten tRFLP-Profilen auf, hatten in der Regel aber nur eine geringe Intensität. Eine Übersicht der tRF-Zahlen pro Enzym ist in Tabelle 17 gegeben. Die Ähnlichkeit der Ergebnisse aus den verschiedenen tRFLP-Experimenten wurde anhand einer Cluster-Analyse veranschaulicht (Bild 31). Hierbei wurden nur die tRFs berücksichtigt, die in mindestens drei der insgesamt 25 Experimente nachgewiesen wurden, um mögliche Artefakte der Peakdetektion auszuschließen. Das Dendrogramm (Bild 31) zeigt, dass sich die Experimente weder nach gedüngter (+) und ungedüngter Fläche (-) noch nach Zeitpunkt (DUN1, DUN2 und DUN7) gruppieren ließen. Für die TReFID-Auswertung wurden daher alle tRFLP-Experimente einer Fläche zusammengefasst (2.15.4), also alle sechs Experimente für DUN+7 oder die drei Experimente für DUN-1 (vergleiche Tabelle 16).

Die TReFID-Auswertung der kombinierten tRF-Daten mit der *nifH*-Datenbank (1318 Einträge) resultierte je nach Probe in 205 (DUN-7) bis 466 Treffern (DUN-1) (Tabelle 18). Trotz der stark schwankenden Trefferzahlen enthielten die Ergebnislisten zu den Proben DUN-1, DUN+1 und DUN+7 etwa gleich viele tRF-Muster (ca. 180; Tabelle 18). Für den letzten Zeitpunkt war die Zahl der tRF-Muster in der Kontrollfläche (DUN-7) deutlich herabgesetzt, während es für die gedüngte Fläche (DUN+7) keine Änderung zum Ausgangszustand (DUN-1 und DUN+1) gab.

Die GenBank-Annotationen der Sequenzen, die den tRF-Mustern zugrunde lagen, ermöglichten eine Auswertung der tRF-Muster nach Taxonomie bzw. Herkunft (Bild 32). Zwar umfassten die meisten tRF-Muster mehr als eine Sequenz (z. B. durchschnittlich 2,6 bei DUN-1; Tabelle 18), doch stammten diese immer entweder aus der gleichen Prokaryotenart oder aber aus der gleichen Umweltprobe. Bei den unkultivierten Organismen stellten die Sequenzen aus dem Dünnwaldboden mit 30 - 41 % der totalen tRF-Musterzahl den größten Anteil (Bild 32). Die Ergebnislisten der beiden Proben DUN-1 und DUN+1 enthielten zusammen 90 tRF-Muster, die 32 von insgesamt 49

**Tabelle 16: Anzahl von *nifH* tRFLP-Experimenten mit DNA aus dem Dünnwaldboden**

Bodenprobe	gedüngte Fläche (+)				ungedüngte Fläche (-)			
	A, B & C	A	B	C	A, B & C	A	B	C
DUN1 (02. Oktober 2002)	8	2 + 3	1 + 2	0	3	1	1	1
DUN2 (23. Oktober 2002)	2	1	1	0	1	0	0	1
DUN7 (21. September 2003)	6	4	1	1	5	3	1	1

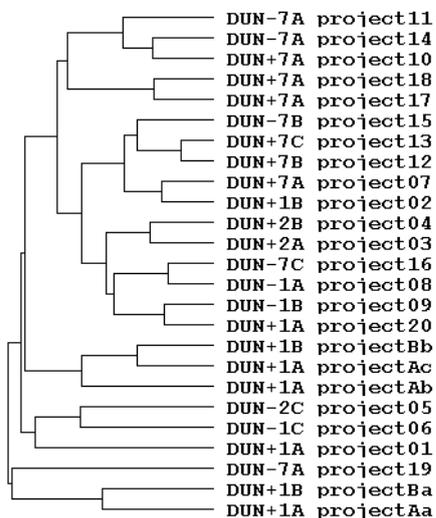
*Legende zu Tabelle 16:* Insgesamt wurden 25 tRFLP-Experimente zu *nifH* ausgewertet. Die tRF-Daten für die Dreifachproben (A, B und C; vergleiche Bild 4) einer Fläche und eines Zeitpunktes wurden vor der TReFID-Auswertung kombiniert (siehe Text). Fünf der acht Experimente bei DUN+1 wurden auf dem ABI 377-Sequenziergerät (Applied Biosystems) durchgeführt, sämtliche anderen Experimente auf dem MegaBACE-Gerät (Amersham).

**Tabelle 17: Anzahl der *nifH*-tRFs pro Restriktionsenzym für die TReFID-Auswertung**

Restriktionsenzym	02. Oktober 2002		23. Oktober 2002		21. September 2003	
	ungedüngt DUN-1	gedüngt DUN+1	ungedüngt DUN-2	gedüngt DUN+2	ungedüngt DUN-7	gedüngt DUN+7
<i>AluI</i>	21	35	22	49	11	16
<i>BmeI390I</i>	35	35	33	27	25	25
<i>Bsh1236I</i>	43	38	28	37	20	28
<i>Cfr13I</i>	29	46	30	50	20	21
<i>HaeIII</i>	22	57	0	0	10	18
<i>Hin6I</i>	33	54	40	48	40	31
<i>HinfI</i>	35	19	0	0	9	19
<i>MboI</i>	35	31	24	40	24	21
<i>MspI</i>	23	23	20	28	39	28
<i>RsaI</i>	14	30	10	44	13	23
<i>TaI</i>	19	45	23	42	36	27
<i>TaqI</i>	23	17	30	46	20	35
<i>TasI</i>	14	19	18	8	20	23
Summe der tRFs:	346	449	278	419	287	315
Anzahl Experimente:	3	3	1	2	5	6
Anzahl Enzyme:	13	13	11	11	13	13

*Legende zu Tabelle 17:* Die tRF-Zahlen beziehen sich auf die für die einzelnen Flächen zusammengefassten Experimente (vergleiche Tabelle 16). Beispielsweise wurden bei den fünf Experimenten zu DUN-7 insgesamt 40 verschiedene *Hin6I*-tRFs nachgewiesen. Im Falle von DUN+1 wurden nur die drei auf dem MegaBACE-Gerät durchgeführten Experimente ausgewertet (vergleiche Tabelle 16).

**Bild 31: Cluster-Analyse von *nifH*-tRF-Daten aus 25 tRFLP-Experimenten**



*Legende zu Bild 31:* Die Ähnlichkeit der tRFLP-Profile von 25 verschiedenen Experimenten zu *nifH* im Dünnwaldboden wurde über eine Cluster-Analyse (2.12.3) untersucht. Hierfür wurden die Profile für 13 (DUN1 und DUN7) bzw. 11 (DUN2) Restriktionsenzyme zusammen ausgewertet. Das Ergebnis ist im Bild als Dendrogramm dargestellt. Es gab keine eindeutige Gruppierung der tRFLP-Experimente nach Zeitpunkt oder nach gedüngter (+) und ungedüngter Fläche (-). Die fünf Experimente mit den Kürzeln Aa, Ab, Ac, Ba und Bb wurden auf dem ABI 377-Gerät durchgeführt, die übrigen 20 auf dem MegaBACE-Gerät.

*nifH*-OTUs (65 %) und 355 der 504 partiellen *nifH*-Sequenzen (70 %) aus dem Dünnwaldboden repräsentierten (vergleiche Abschnitt 3.2.2). Die 63 Dünnwald-tRF-Muster bei DUN2 umfassten 18 von 49 OTUs (37 %) und 288 von 504 Sequenzen (57 %). Im Falle von DUN7 deckten die 60 tRF-Muster ähnlich viele OTUs ab (17 von 49 OTUs; 35 %), aber nur 192 der 504 Sequenzen (38 %). Die TReFID-Ergebnisliste für DUN1 enthielt aber ebensowenig bevorzugt tRF-Muster von DUN1-Sequenzen wie die TReFID-Liste für DUN7 solche von DUN7-Sequenzen. Beispielsweise vertraten die tRF-Muster zu den Dünnwald-Sequenzen in der DUN1-Ergebnisliste 11 OTUs aus den DUN1-Proben und 10 OTUs aus den DUN7-Proben. Unter den DUN7-Treffern waren ebenfalls 11 OTUs von DUN1, aber nur 7 OTUs von DUN7.

Bei jeder mit TReFID untersuchten Probe stammte etwa die Hälfte der tRF-Muster in der Ergebnisliste von Sequenzen aus anderen Umweltproben als dem Dünnwald (Bild 32). Hierunter waren tRF-Muster von Sequenzen aus der Rhizosphäre des Schlickgrases *Spartina alterniflora* (Lovell *et al.* 2000; Lovell *et al.* 2001) am prominentesten vertreten (Bild 32). Weitere tRF-Muster stammten von Sequenzen aus Reiswurzeln (Ueda *et al.* 1995b), aus einer tropische Seegraswiese (Bagwell *et al.* 2002), aus Tiefseeproben (Mehta *et al.* 2003) und aus dem Darm verschiedener Termitenarten (Ohkuma *et al.* 1996; Noda *et al.* 1999; Noda *et al.* 2002). Außerdem waren in den Ergebnislisten tRF-Muster für den Chorbusch-Wald (Rösch *et al.* 2002) enthalten. Einzelne tRF-Muster gingen auf andere, unbestimmte Umweltproben zurück.

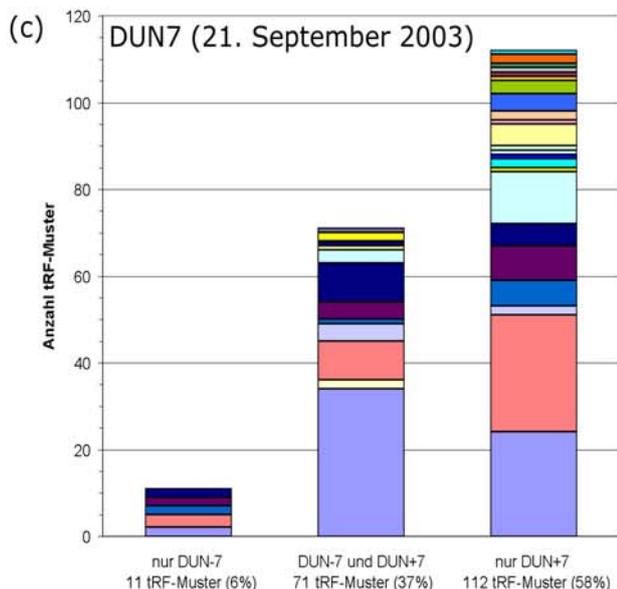
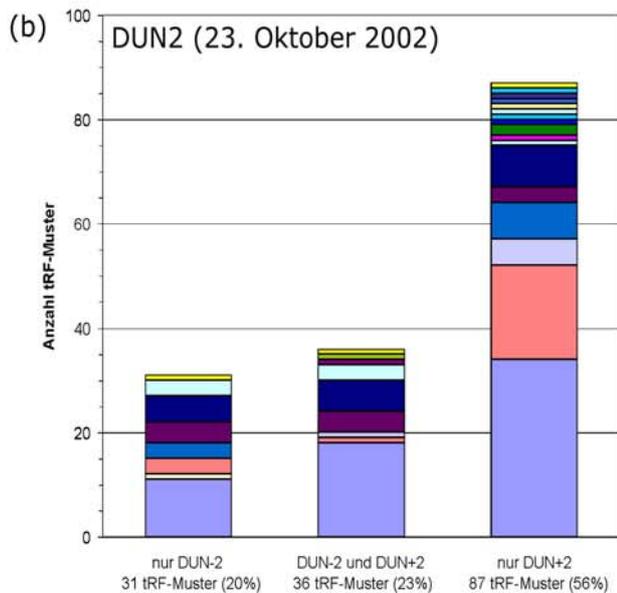
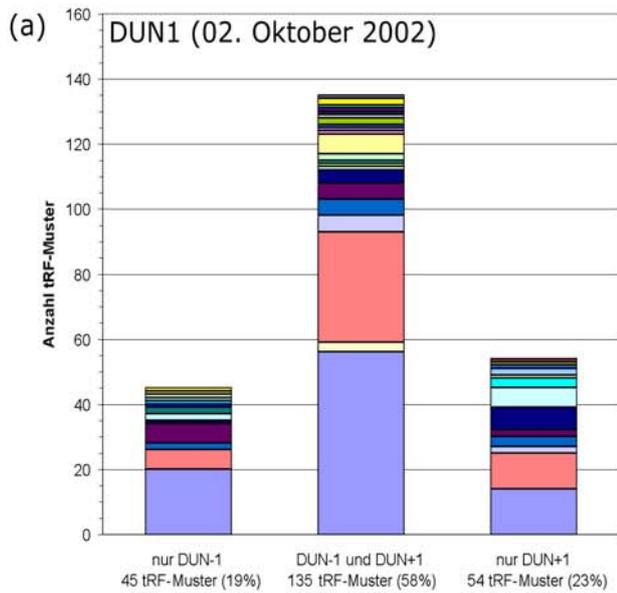
**Tabelle 18: Kennzahlen der TReFID-Ergebnisse zu den Dünnwaldproben (*nifH*)**

Kennzahl	TReFID-Projekt					
	DUN-1	DUN+1	DUN-2	DUN+2	DUN-7	DUN+7
Gesamtzahl Treffer in der Ergebnisliste	466	396	240	356	205	369
- davon Dünnwald-Sequenzen (Anteil an der Gesamt-Trefferzahl)	312 (67%)	219 (55%)	186 (78%)	258 (72%)	147 (72%)	187 (51%)
durchschnittliche Punktsomme	7,9	8,1	5,8	7,2	7,4	7,9
durchschnittliche ID-Sicherheit	75%	74%	70%	80%	68%	73%
unterscheidbare tRF-Muster	180	189	67	123	82	183
- davon tRF-Muster zu Dünnwald-Sequenzen (Anteil an der Gesamt-Musterzahl)	75 (42%)	69 (37%)	29 (43%)	52 (42%)	36 (44%)	56 (31%)
Treffer pro tRF-Muster	2,6	2,1	3,6	2,9	2,5	2,0

*Legende zu Tabelle 18:* Die in der Tabelle zusammengefassten Werte beziehen sich auf die TReFID-Auswertungen der kombinierten tRF-Daten für *nifH* (siehe Text). Das Kriterium zur Muster-Übereinstimmung lag für DUN1 und DUN7 bei 0,62 (8 von 13 RE) und für DUN2 bei 0,64 (7 von 11 RE). Zur Definition der Begriffe siehe 2.15.1.

*Legende zu Bild 32:* Es wurden separate *nifH*-TReFID-Analysen mit den tRF-Daten der Proben DUN+1/-1, DUN+2/-2 und DUN+7/-7 durchgeführt (siehe Text). Für die Balkendiagramme wurden die tRF-Muster unidentifizierter Mikroorganismen, die 80 - 90 % aller tRF-Muster jeder Ergebnisliste ausmachten, den Umweltproben entsprechend gruppiert. Etwa die Hälfte der tRF-Muster unidentifizierter Organismen gehörte zu Dünnwald-Sequenzen. Die identifizierten Organismen, die der TReFID-Analyse zufolge in den Dünnwaldproben vorkommen könnten, sind namentlich aufgeführt. Für DUN1 und DUN7 wurden die tRFLP-Profile von jeweils 13 Restriktionsenzymen ausgewertet, für DUN2 von 11 Enzymen. In der Wertetabelle (rechts) sind die tRF-Musterzahlen für die drei Zeitpunkte zusammengefasst; deren Verteilung auf die Flächen ist den Balkendiagrammen zu entnehmen.

**Bild 32: Ergebnisse der TReFID-Auswertung von *nifH*-tRFLPs mit DNA des Dünnwaldbodens von drei verschiedenen Zeitpunkten**



Legende und Wertetabelle zu (a), (b) und (c)

	DUN1	DUN2	DUN7
<i>Xanthobacter autotrophicus</i>	1	0	1
<i>Vibrio</i> spp.	3	3	2
<i>Pseudomonas</i> spp.	1	1	1
<i>Methylococcus capsulatus</i>	1	0	0
<i>Methylobacter</i> spp.	2	0	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	0	1
<i>Azomonas agilis</i>	1	1	1
<i>Burkholderia tuberum</i>	1	0	1
<i>Alcaligenes faecalis</i>	1	0	1
<i>Sinorhizobium</i> sp.	0	0	1
<i>Rhodovulum</i> spp.	3	1	3
<i>Rhodopseudomonas</i> spp.	2	1	4
<i>Rhodobacter</i> sp. AP-10	1	0	2
<i>Methylosinus trichosporium</i>	1	0	0
<i>Methylocystis</i> sp.	1	0	1
<i>Bradyrhizobium</i> spp.	6	1	6
<i>Beijerinckia indica</i>	4	0	1
<i>Plectonema boryanum</i>	1	1	1
<i>Nostoc</i> spp.	2	1	0
<i>Cyanothece</i> ATCC 51142	1	1	1
<i>Anabaena variabilis</i> oder <i>A. azollae</i>	2	2	0
<i>Clostridium beijerinckii</i>	0	1	0
<i>Frankia</i> spp.	3	0	2
<i>Leptospirillum ferrooxidans</i>	1	0	1
<i>Methanobacterium ivanovii</i>	0	1	0
verschiedene Umweltproben	9	7	15
Termitendarm	12	19	16
Tiefsee (Juan de Furca-Graben)	13	11	14
tropische Seegrasswiese	10	10	9
Reiswurzeln (Japan)	7	6	6
Rhizosphäre v. <i>S. alterniflora</i> (CA, USA)	51	22	39
Chorbusch (Köln)	3	1	2
Dünnwald (Köln; diese Arbeit)	90	63	60

	DUN1	DUN2	DUN7
Gesamtzahl verschiedener tRF-Muster	234	154	194
Anteil identifizierter Mikroorganismen	17%	10%	17%
Anteil der tRF-Muster aus dem Dünnwald	39%	41%	30%
Anteil sonstiger unidentifizierter Mikroorg.	45%	49%	52%

Der Anteil identifizierter Organismen in den TReFID-Ergebnislisten war gering: 17 % bei DUN1 und DUN7 und nur 10 % bei DUN2 (Bild 32). Für alle Proben zusammen wurden tRF-Muster von Organismen aus 26 verschiedenen Gattungen erhalten. Mehr als zwei Drittel davon – 18 von 26 – gehörten zu den Alpha- (9), Beta- (2) oder Gammaproteobacteria (7). Vier tRF-Muster stammten von Cyanobakterien: *Anabaena*, *Nostoc*, *Plectonema* und *Cyanothece*. Jeweils ein tRF-Muster gehörte zu *Clostridium beijerinckii* (Firmicutes), *Frankia* (Actinobacteria), *Leptospirillum ferrooxidans* (Nitrospirae) und dem methanogenen Archaeon *Methanobacterium ivanovii*.

### 3.3.3.2 TReFID-Auswertung der tRFLP-Experimente zu *nosZ* im Dünnwaldboden

Mit der TReFID-Methode wurden zwei tRFLP-Experimente zu *nosZ* im Dünnwaldboden (DUN+1B und DUN+7B) ausgewertet. Für eine Muster-Übereinstimmung waren tRF-Übereinstimmungen (2.15.1) bei der Hälfte der tRF-liefernden Restriktionsenzyme erforderlich. Die statistischen Kenngrößen der Ergebnisse aus diesen Auswertungen sind in Tabelle 19 zusammengefasst. Zum Vergleich enthält Tabelle 19 die entsprechenden Werte für Auswertungen mit dem sonst angewandten Kriterium von 2/3 für eine Muster-Übereinstimmung. Die Unterschiede zwischen den beiden Auswertungen zu DUN+1 waren gering (Tabelle 19), aber bei dem stringenteren Kriterium enthielt die Ergebnisliste bei DUN+7 nur 11 verschiedenen tRF-Muster, die ausschließlich Sequenzen aus dem Dünnwaldboden und solche aus der Mais-Rhizosphäre repräsentierten (Mounier *et al.* 2004) (nicht dokumentiert). Aus diesem Grund sind im folgenden nur die Ergebnisse der Auswertungen mit dem weniger stringenten Kriterium von 1/2 beschrieben.

Mit 18 von 61 unterscheidbaren tRF-Mustern stammte etwa ein Drittel der Muster in der Ergebnisliste zu DUN+1 von Sequenzen identifizierter Bakterien, die aber nur drei Gattungen repräsentierten: *Azospirillum*, *Paracoccus* und *Pseudomonas*. Allein von *Pseudomonas stutzeri* waren 9 verschiedene tRF-Muster in der Liste enthalten. Hinzu kamen zwei Muster von *P. aeruginosa* und je eines von *P. balearica* und *P. fluorescens*. Aus der Gattung *Paracoccus* waren *P. denitrificans* und *P. pantotrophus* vertreten (je 1 Muster). Die übrigen drei tRF-Muster gingen auf Sequenzen aus *Azospirillum* sp. A1-3, *A. lipoferum* und *A. halopraeferens* zurück.

Unter den unkultivierten Bakterien waren die Dünnwald-Klone und Sequenzen aus der Rhizosphäre von Mais (Mounier *et al.* 2004) mit je 15 tRF-Mustern, also einem Viertel aller tRF-Muster, gleich stark vertreten. Die Dünnwald-Muster repräsentierten 35 Sequenzen aus 16 OTUs und deckten damit zwar nur 9 % der insgesamt 363 partiellen *nosZ*-Sequenzen, aber 34 % der 47 *nosZ*-OTUs ab (vergleiche Abschnitt 3.2.1). Die 15 Dünnwald-Muster beinhalteten drei OTUs mit *nosZ*-Sequenzen aus der Klonbibliothek DUN+1. Zusätzlich waren in der Ergebnisliste aber auch Dünnwald-Sequenzen der Bibliotheken DUN-3, +3, -6, +6, -7 und +7 vertreten. Von den übrigen tRF-Mustern der TReFID-Auswertung zu DUN+1 gingen je sechs auf Sequenzen aus zwei anderen Waldböden (Rösch *et al.* 2002; Rich *et al.* 2003) zurück. Somit stammte beinahe die Hälfte (44 %) der tRF-Muster aus Waldböden. Das letzte tRF-Muster beinhaltete zwei Sequenzen aus marinem Sediment (Scala und Kerkhof 1998).

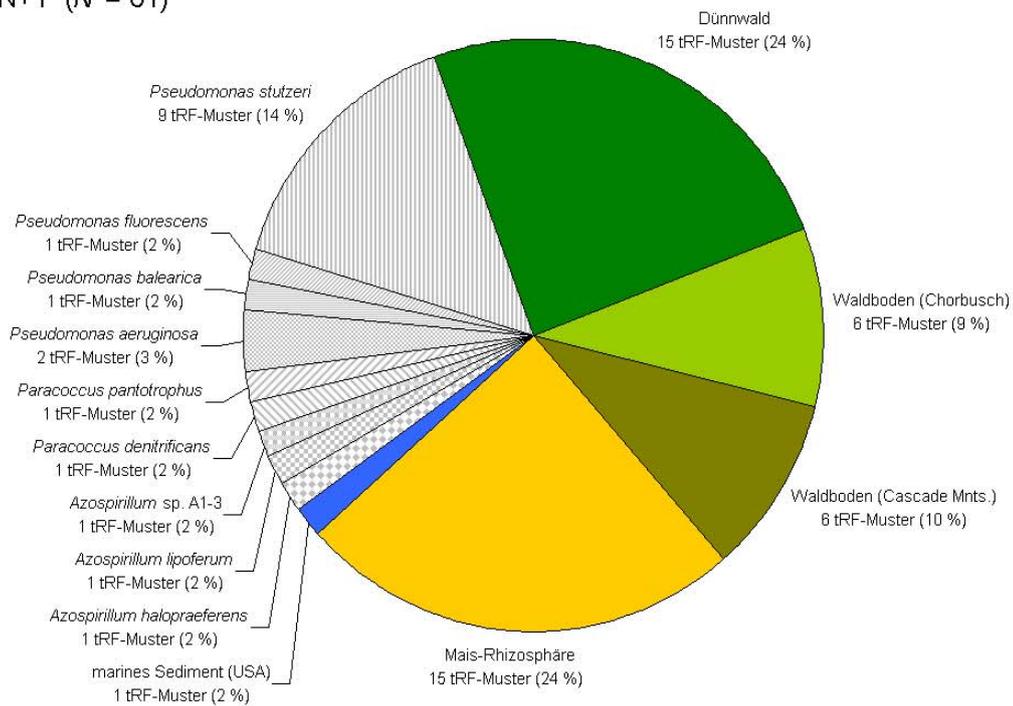
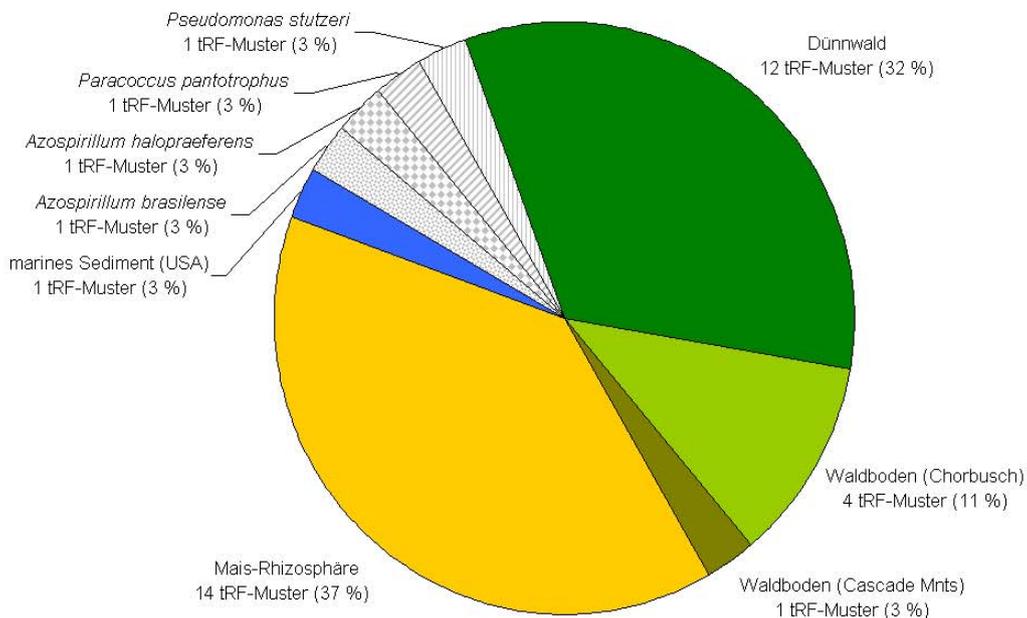
Die TReFID-Ergebnisliste für DUN+7 enthielt 86 Treffer aus 36 tRF-Mustern. Nur 4 dieser Muster (11 %) stammten von Sequenzen kultivierter Bakterien, darunter die auch bei DUN+1 auftretenden *A. halopraeferens*, *P. pantotrophus* und *P. stutzeri*. Zusätzlich war bei DUN+7 *Azospirillum brasilense* vertreten. Den größten Anteil an der DUN+7-Ergebnisliste hatten mit 39 % tRF-Muster, die auf *nosZ*-Sequenzen aus der Mais-Rhizosphäre zurückgehen (Mounier *et al.* 2004). Die 12 Dünnwald-Muster stellten einen Anteil von 33 %. Diese umfassten 11 OTUs und 86 Sequenzen und damit 23 % der insgesamt 47 *nosZ*-OTUs und 15 % aller Dünnwald-Sequenzen. Drei der 12 Dünnwald-Muster repräsentierten Sequenzen aus DUN+7. Außerdem befanden sich unter den Dünnwald-Treffern Sequenzen aus DUN+1, -3, +3, -5 und -7. Der Standort Chorbusch (Rösch *et al.* 2002) war mit 4 Mustern und ein Wald bei Oregon (Rich *et al.* 2003) mit einem weiteren vertreten. Zusammen stammten 47 % der 36 unterscheidbaren Muster aus Waldböden. Wie bei DUN+1 stammte eines der tRF-Muster aus marinem Sediment (Scala und Kerkhof 1998).

Den Ergebnislisten zu DUN+1 und DUN+7 waren 12 tRF-Muster gemeinsam. Dies entspricht einem Fünftel der 63 tRF-Muster bei DUN+1 und einem Drittel der 36 Muster bei DUN+7. Neben den drei oben erwähnten identifizierten Bakterien waren darunter 3 Muster von Dünnwald-Sequenzen vertreten, die zu den *nosZ*-OTUs #37, #42 und #43 gehörten (vergleiche Tabelle 26), aber auch 3 Muster von Chorbusch-Sequenzen (Rösch *et al.* 2002). Die drei übrigen tRF-Muster stammten von Sequenzen aus Oregon (Rich *et al.* 2003), der Mais-Rhizosphäre (Mounier *et al.* 2004) und marinem Sediment (Scala und Kerkhof 1998).

**Tabelle 19: Statistische Kennzahlen der TReFID-Ergebnisse zu den Dünnwaldproben (*nosZ*)**

Kennzahl	TReFID-Projekt			
	DUN+1 (5 von 10 RE)	DUN+1 (6 von 10 RE)	DUN+7 (4 von 8 RE)	DUN+7 (5 von 8 RE)
Gesamtzahl Treffer in der Ergebnisliste	103	98	86	53
- davon Dünnwald-Sequenzen (Anteil)	35 (34%)	34 (35%)	55 (64%)	48 (91%)
durchschnittliche Punktsumme	5,8	5,8	4,5	5,0
durchschnittliche ID-Sicherheit	72 %	73 %	68%	76 %
unterscheidbare tRF-Muster	61	57	36	11
- davon tRF-Muster zu DUN-Seq. (Anteil)	15 (25%)	14 (25%)	12 (33%)	7 (64%)
Treffer pro tRF-Muster	1,7	1,7	2,4	4,8

*Legende zu Tabelle 19:* Die Tabelle fasst die Kenngrößen von je zwei TReFID-Auswertungen der beiden *nosZ*-tRFLPs mit DNA aus dem Dünnwaldboden zusammen. Die im Text beschriebenen Ergebnisse beziehen sich auf die TReFID-Auswertungen mit erforderlicher tRF-Übereinstimmung bei 5 von 10 (DUN+1) bzw. 4 von 8 (DUN+7) Restriktionsenzymen für eine Muster-Übereinstimmung. Zur Definition der Begriffe siehe Abschnitt 2.15.1.

**Bild 33: Graphische Auswertung der TReFID-Ergebnisse zu *nosZ* im Dünnwaldboden**(a) DUN+1 ( $N = 61$ )(b) DUN+7 ( $N = 36$ )

**Legende zu Bild 33:** Die beiden Diagramme geben die TReFID-Ergebnisse der in Tabelle 19 umrissenen Analysen zu DUN+1 (5 von 10 RE) (a) und DUN+7 (4 von 8 RE) (b) wieder. Die Kreissegmente für tRF-Muster von Sequenzen aus Waldböden sind grün eingefärbt; sie machten bei beiden Proben knapp die Hälfte aller tRF-Muster aus. Der Anteil identifizierter Bakterien betrug 30 % bei DUN+1 und 11 % bei DUN+7. Zwölf tRF-Muster waren in DUN+1 und DUN+7 vertreten, darunter 3 Muster von drei verschiedenen Dünnwald-OTUs (siehe Text)

#### 3.3.3.3 Auswertung der tRFLP-Experimente zum 16S rRNA-Gen im Dünnwaldboden

Es wurden insgesamt 14 tRFLP-Experimente zum 16S rRNA-Gen im Dünnwaldboden ausgewertet (Tabelle 20), 5 mit DNA vom ersten Zeitpunkt der Probennahme (DUN1) und 9 mit DNA vom letzten Zeitpunkt (DUN7). Die Experimente zu DUN1 wurden auf dem ABI377-Sequenzierer, die zu DUN7 auf dem MegaBACE-Gerät ausgeführt. Bei DUN1 wurden die tRF-Daten von *Cfr13I*, *Bme1390I*, *TaqI* und *TasI* nicht ausgewertet, da sie nicht für alle Experimente vorlagen. Die folgenden Ergebnisse basieren daher für DUN1 auf 9 Restriktionsenzymen, für DUN7 aber auf 13 Restriktionsenzymen. Die Peaklisten aus den einzelnen Experimenten wurden manuell überprüft und wie in Abschnitt 2.15.4 beschrieben für die einzelnen Flächen zusammengefasst (z. B. die sechs Experimente zu DUN+7). Die Zahlen der tRFs pro Enzym, die in die TReFID-Auswertung eingingen, sind in Tabelle 21 zusammengefasst. Die Ähnlichkeit der Ergebnisse aus den 14 verschiedenen tRFLP-Versuchen zueinander wurde mittels einer Cluster-Analyse (2.12.3) der tRFs untersucht, die in tRFLP-Profilen von mindestens 2 der 14 Experimente auftraten. Die 5 Experimente zu DUN1 setzten sich im Dendrogramm (Bild 34) von denen zu DUN7 ab, doch auch innerhalb der 9 DUN7-Experimente gab es eine Aufteilung in DUN+7 und DUN-7. Diese Aufteilung nach gedüngter und ungedüngter Fläche war aber nicht absolut (Bild 34).

Die kombinierten tRF-Daten für DUN-1, DUN+1, DUN-7 und DUN+7 wurden mit der TReFID-Datenbank für das 16S rRNA-Gen (22.145 Einträge) ausgewertet. Die Ergebnislisten dieser Analysen enthielten 1600 bis 3100 Treffer (Tabelle 22). Im Vergleich zu DUN-1 war die tRF-Musterzahl bei DUN+1 beinahe doppelt so hoch, doch zwischen den beiden DUN7-Proben gab es nur einen geringen Unterschied. Die TReFID-Ergebnisse zu DUN-1 und DUN+1 enthielten 594 gemeinsame tRF-Muster. Dieses entsprach 73 % der insgesamt 814 tRF-Muster bei DUN-1, aber nur 38 % der 1549 tRF-Muster bei DUN+1. Zusammen genommen enthielten die Ergebnislisten von DUN-1 und DUN+1 1769 verschiedene tRF-Muster. Bei den beiden DUN7-Proben war die Verteilung gleichmäßiger: die 395 gemeinsamen tRF-Muster stellten 38 % der 1039 Muster bei DUN-7 und 37 % der 1074 Muster bei DUN+7. Die Ergebnislisten zu den beiden Proben der Kontrollfläche, DUN-1 und DUN-7, enthielten zusammen 1362 verschiedene tRF-Muster, von denen 369 Muster (27 %) bei beiden Proben vorkamen. Die 433 tRF-Muster, die den beiden Proben der gedüngten Fläche (DUN+1 und DUN+7) gemeinsam waren, stellten einen Anteil von 21 % an den insgesamt 2056 unterscheidbaren Mustern für DUN+.

Da die TReFID-Ergebnisse neben der Artenliste mit den Treffern auch die DNA-Sequenzen der Treffer beinhalteten, konnten die tRF-Muster der einzelnen Proben mit dem RDP II Classifier (2.12.1) taxonomisch ausgewertet werden. Eine Überprüfung der einzelnen tRF-Muster ergab, dass nur solche Treffer im gleichen tRF-Muster zusammengefasst waren, deren Sequenzen – bei identifizierten Organismen – zur gleichen Gattung gehörten oder aber aus der gleichen Umweltprobe stammten. Die GenBank-Einträge zur Taxonomie wurden ignoriert, da bei 63 - 73 % der Sequenzen in den TReFID-Ergebnislisten jegliche Angaben fehlten. Demgegenüber lag der Anteil

**Tabelle 20: Anzahl von tRFLP-Experimenten zum 16S rRNA-Gen im Dünnwaldboden**

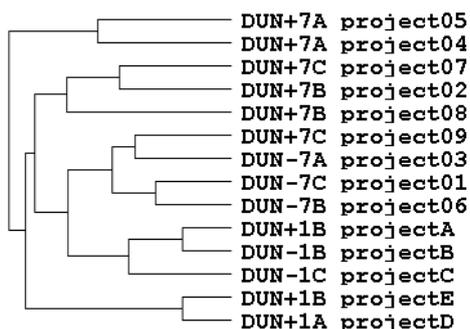
Bodenprobe	gedüngte Fläche (+)				ungedüngte Fläche (-)			
	A, B & C	A	B	C	A, B & C	A	B	C
DUN1 (02. Oktober 2002)	3	1	2	0	2	0	1	1
DUN7 (21. September 2003)	6	2	2	2	3	1	1	1

*Legende zu Tabelle 20:* Insgesamt wurden 14 tRFLP-Experimente zum 16S rRNA-Gen mit der TReFID-Methode ausgewertet. Die tRF-Daten für die Dreifachproben (A, B und C; vergleiche Bild 4) einer Fläche und eines Zeitpunktes wurden vor der Auswertung kombiniert (siehe Text).

**Tabelle 21: Anzahl der 16S rDNA-tRFs pro Restriktionsenzym für die TReFID-Auswertung**

	02. Oktober 2002		21. September 2003	
	ungedüngt DUN-1	gedüngt DUN+1	ungedüngt DUN-7	gedüngt DUN+7
<i>AluI</i>	35	32	75	50
<i>BmeI390I</i>	---	---	45	52
<i>Bsh1236I</i>	28	31	66	51
<i>Cfr13I</i>	---	---	77	41
<i>HaeIII</i>	27	21	54	37
<i>Hin6I</i>	29	34	50	48
<i>HinfI</i>	22	26	64	38
<i>MboI</i>	23	36	61	60
<i>MspI</i>	32	50	61	55
<i>RsaI</i>	11	24	48	51
<i>TaI</i>	18	24	63	46
<i>TaqI</i>	---	---	56	28
<i>TasI</i>	---	---	67	24
Summe der tRFs:	225	278	787	581
Anzahl Experimente	2	3	3	6
Anzahl Enzyme	9	9	13	13

*Legende zu Tabelle 21:* Die tRF-Zahlen beziehen sich auf die für die einzelnen Flächen zusammengefassten Experimente (Tabelle 20). Beispielsweise wurden bei den sechs Experimenten zu DUN+7 insgesamt 50 verschiedene *AluI*-tRFs nachgewiesen.

**Bild 34: Cluster-Analyse von 16S rDNA-tRF-Daten aus 14 tRFLP-Experimenten**

*Legende zu Bild 34:* Das Dendrogramm zeigt das Ergebnis der Cluster-Analyse von 14 tRFLP-Versuchen zum 16S rRNA-Gen im Dünnwaldboden und stellt damit die Ähnlichkeit der tRFLP-Ergebnisse zueinander dar. Grundlage der Cluster-Analyse waren die in Tabelle 21 zusammengefassten tRF-Werte.

**Tabelle 22: Kenngrößen für die TReFID-Ergebnisse zu den Dünnwaldproben (16S rDNA)**

Kennzahl	TReFID-Auswertung			
	DUN-1	DUN+1	DUN-7	DUN+7
Gesamtzahl Treffer in der Ergebnisliste	1601	3102	1676	1725
- davon Dünnwald-Sequenzen (Anteil an Gesamttrefferzahl)	420 (25%)	396 (14%)	285 (17%)	233 (14%)
durchschnittliche Punktsomme	6,5	6,2	7,9	8,0
durchschnittliche ID-Sicherheit	79%	77%	77%	76%
unterscheidbare tRF-Muster	814	1549	1039	1074
- davon tRF-Muster zu Dünnwald-Sequenzen (Anteil)	123 (15%)	132 (8%)	121 (12%)	103 (10%)
Treffer pro tRF-Muster	2,0	2,0	1,6	1,6

*Legende zu Tabelle 22:* Die in der Tabelle zusammengefassten Werte beziehen sich auf die TReFID-Auswertungen der kombinierten tRF-Daten aus tRFLP-Experimenten zur 16S rDNA im Dünnwaldboden (siehe Text). Die zulässige tRF-Längenabweichung betrug bei allen Auswertungen  $\pm 0,5\%$ . Das Kriterium zur Muster-Übereinstimmung lag für DUN1 bei 0,67 (6 von 9 RE) und für DUN7 bei 0,69 (9 von 13 RE). Zur Definition der Begriffe siehe 2.15.1.

---

der Treffer, die mit dem RDP II Classifier keinem bekannten Phylum zugeordnet werden konnten, nur bei 6,3 - 6,9 % und damit um einen Faktor 10 niedriger.

Über die TReFID-Methode wurden im Dünnwaldboden insgesamt Vertreter aus 18 der 24 anerkannten bakteriellen Phyla (Garrity *et al.* 2004) detektiert. Für die einzelnen Proben umfassten die TReFID-Ergebnislisten allerdings nur Treffer aus zwölf (DUN-1) oder 15 (DUN+1, -7, +7) unterschiedliche Phyla. In Tabelle 23 ist eine nach Taxon und Probe aufgeschlüsselte Übersicht der Häufigkeit von tRF-Mustern in den TReFID-Ergebnislisten gegeben. Nur zehn dieser Phyla waren in allen vier Proben vertreten: Nitrospira, Cyanobacteria, Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Planctomycetes, Spirochaetes, Acidobacteria, Bacteroidetes und Gemmatimonadetes (Tabelle 23). Den weitaus größten Teil der tRF-Muster einzelner Proben, 58 - 72 %, stellten die Proteobacteria. Mit je 2 - 12 % Anteil gehörten aber auch die Acidobacteria, Cyanobacteria und Bacteroidetes zu den umfangreicher vertretenen Phyla. In den Ergebnislisten von ein bis drei Proben waren außerdem Vertreter Aquificae, Deinococcus-Thermus, Thermomicrobia, Chlorobi, Chlamydiae, Fibrobacteres, Fusobacteria und Verrucomicrobia enthalten. Jedes dieser Phyla umfasste höchstens 18 tRF-Muster (Chlorobi bei DUN+1; vergleiche Tabelle 23), im Durchschnitt aber nur 2,1 Muster. Im Vergleich hierzu lag die durchschnittliche Musterzahl bei den 10 Phyla, die in allen vier Proben vertreten waren, bei 103. Vertreter der Thermotogae, Thermodesulfobacteria, Chrysiogenetes, Chloroflexi, Deferribacteres oder Dictyoglomi wurden für keine Probe detektiert.

Neben den tRF-Zahlen für die vier Dünnwald-Proben ist in Tabelle 23 für jedes Taxon auch angegeben, wieviele tRFs der gedüngten und der ungedüngten Fläche eines Zeitpunktes gemeinsam waren (DUN-1 und DUN+1 bzw. DUN-7 und DUN+7). Beispielsweise resultierte die TReFID-Auswertung von DUN-1 und DUN+7 in jeweils etwa 600 proteobakteriellen tRF-Mustern (Tabelle 23). Beiden Flächen gemeinsam waren davon aber nur 210 Muster. Dies entsprach einem Anteil von 20 % der zusammen für DUN7 detektierten tRF-Muster:  $210 / (602 + 637 - 210)$ . Bei den Taxa mit mehr als 10 tRF-Mustern in DUN1 und DUN7 lag der beiden Flächen gemeinsame Anteil an Mustern bei nicht mehr als 80 % (Tabelle 23). Daneben wurde die Zahl der tRF-Muster ermittelt, die für beide Proben der ungedüngten (DUN-1 und DUN-7) bzw. gedüngten Fläche (DUN+1 und DUN+7) detektiert worden waren (Tabelle 23).

Eine graphische Darstellung der in Tabelle 23 zusammengefassten Werte ist in Bild 35 auf Ebene der Klasse gegeben. Bild 35a zeigt die Verteilung der tRF-Muster zum ersten Zeitpunkt der Probennahme (02. Oktober 2002), also die Ausgangslage vor Beginn der Düngung. Von den insgesamt 1769 verschiedenen tRF-Mustern, die für die gedüngte und ungedüngte Fläche zusammen detektiert wurden, kamen 34 % in beiden Flächen vor. Der Anteil der einzig in der Kontroll-

**Tabelle 23: Taxonomische Einordnung der tRF-Muster aus den TReFID-Auswertungen (16S rDNA) und deren Verteilung auf die verschiedenen Flächen**

Taxon	02. Oktober 2002			21. September 2003			DUN-1 und DUN-7	DUN+1 und DUN+7
	DUN -1	DUN +1	DUN-1 und DUN+1	DUN -7	DUN +7	DUN-1 und DUN+1		
Aquificae	0	4	0 / 4	3	1	0 / 4	0 / 3	0 / 5
Deinococcus-Thermus	0	5	0 / 5	6	3	3 / 6	0 / 6	1 / 7
Thermomicrobia	0	1	0 / 1	0	0	---	---	0 / 1
Nitrospira (Phylum)	1	1	1 / 1	1	4	1 / 4	1 / 1	1 / 4
Cyanobacteria	50	125	22 / 153	125	48	39 / 134	14 / 161	10 / 163
Familie 1.1 (Subsektion 1)	16	83	10 / 89	16	4	3 / 17	0 / 32	0 / 87
Familie 3.1 (Subsektion 3)	7	9	6 / 10	25	7	6 / 26	7 / 25	3 / 13
Familie 4.1 (Subsektion 4)	2	11	1 / 12	37	13	11 / 39	1 / 38	3 / 21
Chlorobi	0	18	0 / 18	8	11	1 / 18	0 / 8	9 / 20
Proteobacteria	585	1028	420 / 1193	602	637	210 / 1029	274 / 913	286 / 1379
Alphaproteobacteria	506	616	361 / 761	443	257	181 / 519	260 / 689	155 / 718
Rhodospirillales	74	64	37 / 101	41	27	15 / 53	30 / 85	15 / 76
Rhodospirillaceae	53	40	25 / 68	36	24	15 / 45	28 / 61	15 / 49
Acetobacteraceae	10	7	2 / 15	2	3	0 / 5	0 / 12	0 / 10
Rhodobacterales	131	153	111 / 173	106	94	68 / 132	69 / 168	59 / 188
Sphingomonadales	54	41	23 / 72	34	11	10 / 35	23 / 65	4 / 48
Caulobacterales	17	18	13 / 22	11	17	8 / 20	6 / 22	11 / 24
Rhizobiales	176	232	139 / 269	192	76	61 / 207	101 / 267	46 / 262
Rhizobiaceae	8	31	7 / 32	18	1	0 / 19	3 / 23	1 / 31
Methylocystaceae	13	17	10 / 20	18	11	11 / 18	13 / 18	5 / 23
Beijerinckiaceae	13	8	7 / 14	6	2	2 / 6	5 / 14	2 / 8
Bradyrhizobiaceae	14	16	8 / 22	16	5	0 / 21	9 / 21	3 / 18
Hyphomicrobiaceae	55	64	52 / 67	75	27	23 / 79	34 / 96	14 / 77
Methylobacteriaceae	11	13	8 / 16	13	7	7 / 13	10 / 14	5 / 15
Betaproteobacteria	4	136	3 / 137	14	185	7 / 192	3 / 15	51 / 270
Burkholderiales	2	82	2 / 82	9	117	4 / 122	2 / 9	25 / 174
Burkholderiaceae	0	39	0 / 39	2	26	1 / 27	1 / 1	13 / 52
Oxalobacteraceae	0	0	---	0	7	0 / 7	---	0 / 7
Alcaligenaceae	0	4	0 / 4	2	21	1 / 22	0 / 2	2 / 23
Comamonadaceae	1	11	1 / 11	3	38	1 / 40	1 / 3	4 / 45
Nitrosomonadales	1	7	1 / 7	0	13	0 / 13	0 / 1	6 / 14
Rhodocyclales	0	18	0 / 18	1	39	0 / 40	0 / 1	13 / 44
Gammaproteobacteria	58	220	41 / 237	72	158	14 / 216	3 / 127	67 / 311
Chromatiales	0	8	0 / 8	2	1	1 / 2	0 / 2	0 / 9
Acidithiobacillales	0	8	0 / 8	0	2	0 / 2	---	2 / 8
Xanthomonadales	0	21	0 / 21	24	30	9 / 45	0 / 24	11 / 40
Thiotrichales	4	10	3 / 11	1	5	0 / 6	0 / 5	3 / 12
Thiotrichaceae	3	9	2 / 10	0	5	0 / 5	0 / 3	3 / 11
Methylococcales	0	4	0 / 4	0	0	---	---	0 / 4
Oceanospirillales	7	8	1 / 14	1	18	0 / 19	0 / 8	3 / 23
Pseudomonadales	6	86	5 / 87	3	36	0 / 39	0 / 9	20 / 102
Pseudomonadaceae	1	57	1 / 57	3	25	0 / 28	0 / 4	14 / 68
Moraxellaceae	5	29	4 / 30	0	11	0 / 11	0 / 5	6 / 34
Alteromonadales	3	12	2 / 13	20	8	3 / 25	1 / 22	2 / 18
Vibrionales	2	3	2 / 3	4	0	0 / 4	1 / 5	0 / 3
Enterobacteriales	7	4	2 / 9	7	2	1 / 8	0 / 14	1 / 5
Pasteurellales	0	0	---	2	0	0 / 2	0 / 2	---
Deltaproteobacteria	0	5	0 / 5	7	3	2 / 8	0 / 7	0 / 8
Myxococcales	0	0	---	2	1	1 / 2	0 / 2	0 / 1
Polyangiaceae	0	0	---	1	0	0 / 1	0 / 1	---
Nannocystaceae	0	0	---	1	1	1 / 1	0 / 1	0 / 1
Epsilonproteobacteria	9	25	9 / 25	56	11	3 / 64	7 / 58	5 / 31
Campylobacteriales	9	25	9 / 25	56	11	3 / 64	7 / 58	5 / 31
Campylobacteraceae	0	8	0 / 8	16	7	2 / 21	0 / 16	2 / 13
Helicobacteraceae	9	12	9 / 12	32	2	0 / 34	7 / 34	2 / 12
Firmicutes	2	17	0 / 19	21	50	5 / 66	1 / 22	8 / 59
Clostridia	2	11	0 / 13	8	26	3 / 31	0 / 10	4 / 33
Clostridiales	2	11	0 / 13	8	25	3 / 30	0 / 10	4 / 32
Clostridiaceae	0	4	0 / 4	1	18	0 / 19	0 / 1	2 / 20
Lanchnospiraceae	0	3	0 / 3	1	1	0 / 2	0 / 1	1 / 3

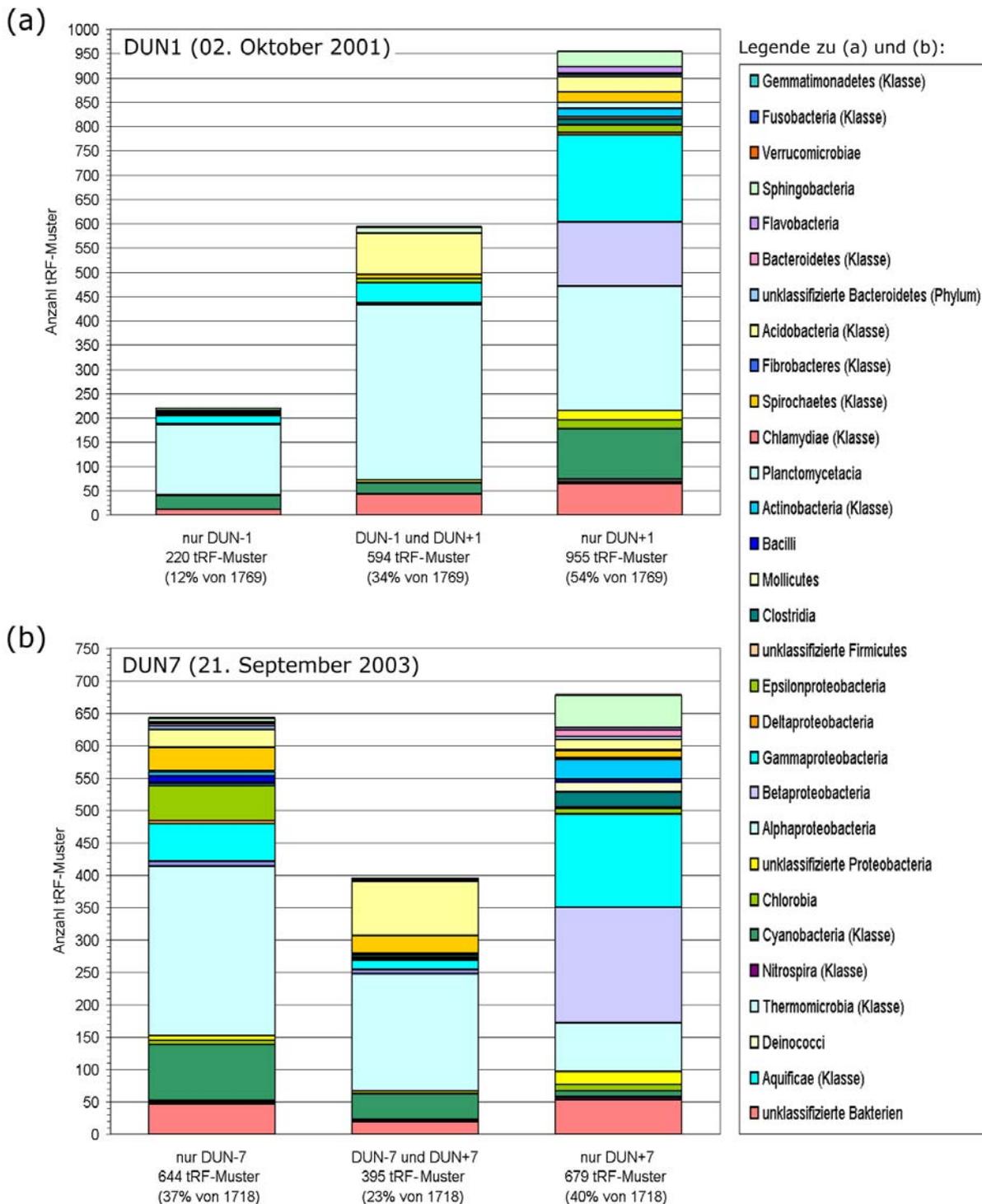
## Ergebnisse, Abschnitt 3.3.3

(Fortsetzung von Tabelle 23)

Taxon	02. Oktober 2002			21. September 2003			DUN-1 und DUN-7	DUN+1 und DUN+7
	DUN -1	DUN +1	DUN-1 und DUN+1	DUN -7	DUN +7	DUN-1 und DUN+1		
Mollicutes	0	5	0 / 5	1	16	0 / 17	0 / 1	4 / 17
Mycoplasmatales	0	0	---	0	4	0 / 4	---	0 / 4
Entomoplasmatales	0	5	0 / 5	0	4	0 / 4	---	4 / 5
Acholeplasmatales	0	0	---	0	3	0 / 3	---	0 / 3
Bacilli	0	0	---	12	6	2 / 16	0 / 12	0 / 6
Bacillales	0	0	---	3	6	2 / 7	0 / 3	0 / 6
Bacillaceae	0	0	---	1	1	1 / 1	0 / 1	0 / 1
Paenibacillaceae	0	0	---	0	4	0 / 4	---	0 / 4
Lactobacillales	0	0	---	9	0	0 / 9	0 / 9	---
Actinobacteria (Phylum)	2	16	0 / 18	6	30	0 / 36	0 / 8	2 / 44
Actinobacteria (Klasse)	2	16	0 / 18	6	30	0 / 36	0 / 8	2 / 44
Acidimicrobiales	0	2	0 / 2	0	1	0 / 1	---	1 / 2
Coriobacteriales	1	1	0 / 2	0	1	0 / 1	0 / 1	0 / 2
Actinomycetales	1	8	0 / 9	5	28	0 / 33	0 / 6	1 / 35
Actinomycetaceae	1	0	0 / 1	1	0	0 / 1	0 / 2	---
Micrococcaceae	0	0	---	0	7	0 / 7	---	0 / 7
Nocardioidaceae	0	4	0 / 4	1	0	0 / 1	0 / 1	0 / 4
Streptomycetaceae	0	0	---	0	9	0 / 9	---	0 / 9
Planctomycetes	2	13	0 / 15	2	4	1 / 5	0 / 4	4 / 13
Chlamydiae (Phylum)	0	0	---	1	0	0 / 1	0 / 1	---
Spirochaetes (Phylum)	11	29	8 / 32	63	38	27 / 74	4 / 70	11 / 56
Spirochaetes (Klasse)	11	29	8 / 32	63	38	27 / 74	4 / 70	11 / 56
Spirochaetales	11	29	8 / 32	63	38	27 / 74	4 / 70	11 / 56
Spirochaetaceae	3	15	3 / 15	36	12	3 / 45	0 / 39	1 / 26
Leptospiraceae	7	13	5 / 15	27	26	24 / 29	4 / 30	10 / 29
Fibrobacteres	0	0	---	0	2	0 / 2	---	0 / 2
Acidobacteria	87	118	86 / 119	112	99	84 / 127	67 / 132	81 / 136
Bacteroidetes (Phylum)	17	64	12 / 69	21	72	4 / 89	1 / 37	19 / 117
Bacteroidetes (Klasse)	1	3	1 / 3	7	13	3 / 17	0 / 8	2 / 14
Bacteroidales	1	3	1 / 3	7	13	3 / 17	0 / 8	2 / 14
Flavobacteria	1	14	0 / 15	2	3	0 / 5	0 / 3	0 / 17
Flavobacteriales	1	14	0 / 15	2	3	0 / 5	0 / 3	0 / 17
Sphingobacteria	15	42	11 / 46	7	51	1 / 57	1 / 21	15 / 78
Sphingobacteriales	15	42	11 / 46	7	51	1 / 57	1 / 21	15 / 78
Sphingobacteriaceae	5	5	3 / 7	0	5	0 / 5	0 / 5	2 / 8
Flexibacteraceae	8	24	7 / 25	4	30	0 / 34	1 / 11	9 / 45
Fusobacteria	2	1	1 / 2	0	0	---	0 / 2	0 / 1
Verrucomicrobia	0	0	---	1	1	0 / 2	0 / 1	0 / 1
Gemmatimonadetes	1	2	1 / 2	2	2	1 / 3	1 / 2	0 / 4
unklassifizierte Bakterien	54	107	43 / 118	65	72	19 / 118	17 / 102	26 / 153

*Legende zu Tabelle 23:* Die Ergebnislisten für die TReFID-Auswertungen zur 16S rDNA im Dünnwaldboden enthielten insgesamt 814 (DUN-1), 1549 (DUN+1), 1039 (DUN-7) bzw. 1074 (DUN+7) unterscheidbare tRF-Muster. Die Sequenzen für diese tRF-Muster wurden mit dem RDP II Classifier (2.12.1) taxonomisch eingeordnet. In der Tabelle sind alle Phyla und Klassen aufgelistet, für die ein tRF-Muster in mindestens einer der vier Proben auftrat. Die in der Liste enthaltenen Ordnungen und Familien stellen eine Auswahl dar (z. B. 5 von 7 Ordnungen der Alphaproteobacteria). Nach der aktuellen Taxonomie (Garrity *et al.* 2004) werden Cyanobacteria unterhalb der Klasse in nummerierte Subsektionen und Familien eingeteilt. Neben den tRF-Musterzahlen für die vier einzelnen Proben sind die Zahlen der je zwei Proben gemeinsamen tRF-Muster gegeben: DUN-1 & DUN+1, DUN-7 & DUN+7 sowie DUN-1 & DUN-7 und DUN+1 & DUN+7. Die Zahlen vor dem Schrägstrich geben dabei die Zahl gemeinsamer tRF-Muster an, die hinter dem Schrägstrich die Zahl unterscheidbarer Muster in den beiden verglichenen Proben zusammen. In Bild 35 ist die Muster-Verteilung auf der Ebene der Klasse graphisch dargestellt.

**Bild 35: Taxonomische Gruppen aus der TReFID-Auswertung von 16S rDNA-tRFLPs mit DNA des Dünnwaldbodens – Vergleich der Zeitpunkte DUN1 und DUN7**



*Legende zu Bild 35:* Die Balkendiagramme geben die jeweiligen Anteile der nachgewiesenen bakteriellen Klassen im Dünnwaldboden wieder. In (a) ist die Verteilung für die insgesamt 1769 unterschiedlichen tRF-Muster für den ersten Zeitpunkt dargestellt, in (b) die entsprechende Verteilung für 1718 tRF-Muster für den letzten Zeitpunkt. Trotz der ähnlichen Musterzahl beider Zeitpunkte ist die Verteilung bei DUN7 gleichmäßiger als bei DUN1. Im Vergleich zur Kontrollfläche (DUN-1/DUN-7) ist der Anteil von Beta- und Gammaproteobacteria in der gedüngten Fläche (DUN+1/DUN+7) deutlich erhöht. Die Zuordnung erfolgte mit dem RDP II Classifier (2.12.1) und basiert nicht auf der GenBank-Taxonomie; der Anteil unklassifizierter Bakterien liegt daher nur zwischen 6,3 und 6,9 %.

fläche vertretenen Muster lag bei 12 % und damit bei weniger als einem Viertel der Muster für die gedüngte Fläche. Insbesondere unterschieden sich die Anteile der proteobakteriellen Klassen zwischen beiden Flächen: nach den tRF-Mustern waren die Beta- und Gammaproteobakterien zusammen in der gedüngten Fläche (DUN+1) dreimal stärker vertreten als in der Kontrollfläche (DUN-1) (Tabelle 23 und Bild 35a). Ähnliches galt auch für den letzten Zeitpunkt (DUN7). Dort stieg der Anteil der Beta- und Gammaproteobacteria in DUN+7 auf 32 % und lag damit viermal höher als in DUN-7 (Tabelle 23 und Bild 35b). Allerdings stellten die Alphaproteobacteria in DUN+1 mit 40 % noch beinahe doppelt so viele tRF-Muster wie die beiden anderen Klassen zusammen. In DUN+7 waren die Alphaproteobacteria mit 24 % der tRF-Muster gegenüber den Beta- und Gammaproteobacteria mit 32 % in der Minderheit. Insgesamt war die Verteilung bei DUN7 aber gleichmäßiger als bei DUN1 (Bild 35b). Die Anteile der tRF-Muster, die nur in den Ergebnislisten zu DUN-7 oder nur in DUN+7 auftraten lag bei 37 % bzw. 40 %. Gleichzeitig waren im Vergleich zu DUN1 aber weniger tRF-Muster in beiden DUN7-Proben vertreten (23 % gegenüber 34 %).

#### ***Dünnwald-OTUs und -Sequenzen in den TReFID-Ergebnislisten***

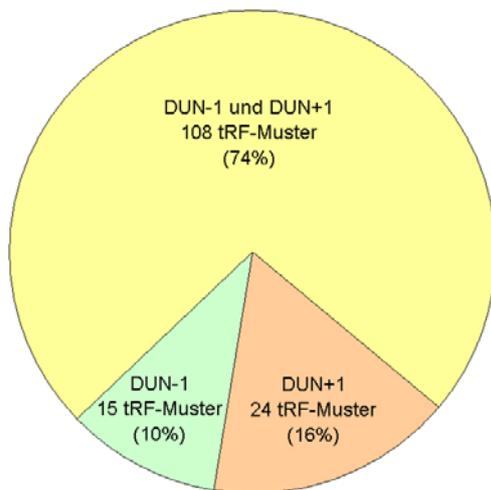
Die Einträge in den TReFID-Datenbanken waren einzelne Sequenzen mit ihren Annotationen. Die Klonbibliotheken wurden jedoch auf der Ebene von OTUs ausgewertet (2.11). Daher konnten in der TReFID-Ergebnisliste viele Dünnwald-Sequenzen aus wenigen OTUs vertreten sein, oder umgekehrt nur wenige Sequenzen, die dafür den Großteil der OTUs repräsentieren.

Die TReFID-Ergebnislisten für die Proben DUN-1 und DUN+1 enthielten 123 bzw. 132 tRF-Muster, die Dünnwald-Sequenzen repräsentierten (Tabelle 22). Die 123 tRF-Muster für DUN-1 umfassten 396 Sequenzen und damit 65 % der 611 Dünnwald-Sequenzen. Gleichzeitig repräsentierten diese Muster 45 % aller Dünnwald-OTUs (101 von 227). Bei DUN+1 waren 69 % aller Dünnwald-Sequenzen und 48 % aller OTUs in der TReFID-Ergebnisliste vertreten. Den beiden DUN1-Proben gemeinsam waren 377 Dünnwald-Sequenzen aus 91 OTUs und damit 86 % der Sequenzen und 77 % der OTUs, die in den Ergebnislisten der einzelnen DUN1-Proben vertreten waren. Die 377 gemeinsamen Sequenzen verteilten sich auf 108 verschiedene tRF-Muster.

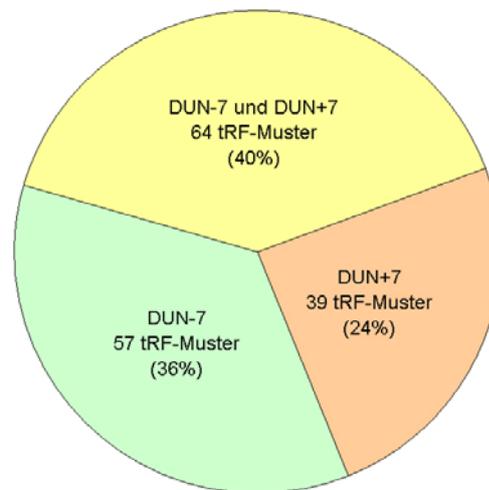
Im Falle von DUN-7 enthielt die Ergebnisliste 285 Dünnwald-Sequenzen aus 70 OTUs, die 121 verschiedene tRF-Muster bildeten (Tabelle 22). Die 103 tRF-Muster bei DUN+7 umfassten 233 Sequenzen aus ebenso vielen OTUs (69). Der Anteil an der Gesamtzahl von Dünnwald-Sequenzen lag für DUN-7 bei 47 % und für DUN+7 bei 38 %. In beiden Ergebnislisten war je knapp ein Drittel aller Dünnwald-OTUs vertreten: 31 % bei DUN-7 und 30 % bei DUN+7. Beiden Flächen gemeinsam waren 64 tRF-Muster, die 171 Dünnwald-Sequenzen aus 48 OTUs repräsentierten und damit die Hälfte der in den Ergebnislisten für DUN-7 und DUN+7 zusammen enthaltenen Sequenzen. Im Vergleich zu DUN1 war der Anteil der beiden Flächen gemeinsamen tRF-Muster deutlich geringer (Bild 36).

**Bild 36: Verteilung der tRF-Muster von Dünnwald-Sequenzen auf die Proben zu DUN1 und DUN7 im Vergleich zur Verteilung der tRF-Muster anderer Sequenzen**

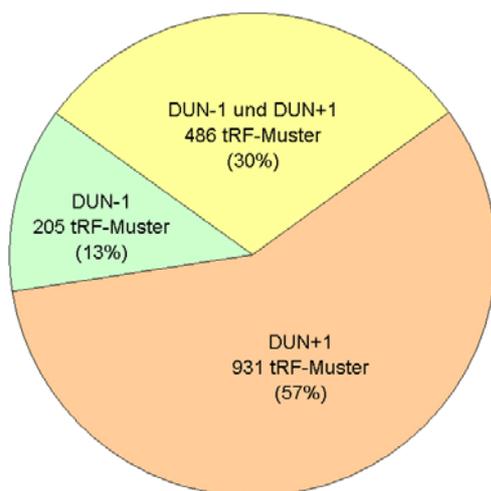
(a) DUN1 - tRF-Muster von Dünnwald-Sequenzen



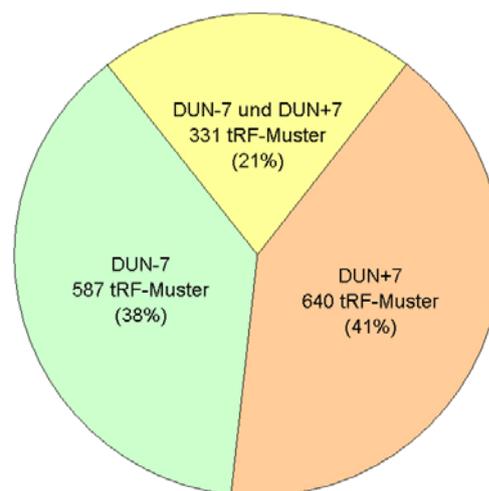
(b) DUN7: tRF-Muster von Dünnwald-Sequenzen



(c) DUN1: tRF-Muster anderer Sequenzen



(d) DUN7: tRF-Muster anderer Sequenzen



*Legende zu Bild 36:* Die Ergebnislisten der 16S rDNA TReFID-Auswertungen zu DUN-1, DUN+1, DUN-7 und DUN+7 wurden daraufhin untersucht, wie sich die tRF-Muster von Dünnwald-Sequenzen im Vergleich zu den Mustern der übrigen Sequenzen auf die Proben zur gedüngten und zur ungedüngten Fläche verteilten. Von den insgesamt 147 tRF-Mustern für den ersten Zeitpunkt (DUN1) waren 74 % in den Ergebnislisten von sowohl DUN-1 als auch DUN+1 vertreten. Für den letzten Zeitpunkt (DUN7) liegt dieser Anteil nur noch bei 40 %.

## 4 Diskussion

### 4.1 Bodenanalysen und Effekt der Stickstoffdüngung

Ein grundsätzliches Problem bei der Untersuchung des Einflusses von Düngung auf die mikrobielle Gemeinschaft im Boden bestand darin, dass die gleiche Bodenprobe nur ein einziges Mal untersucht werden konnte: nach der Entnahme von der Fläche. Alle Ergebnisse der Bodenanalysen wurden als Zeitverlauf dargestellt (Bild 7, S. 37 bis Bild 12, S. 41), was eine Kontinuität impliziert. Tatsächlich gingen die Werte für die einzelnen Zeitpunkte auf unabhängig entnommene Bodenproben zurück, die zumindest aus der jeweils gleichen, 4 m<sup>2</sup> großen Fläche stammten. Um die natürliche Variabilität im Boden auszugleichen, wurden zu jedem Zeitpunkt Dreifachproben entnommen und – sofern technisch möglich und finanziell vertretbar – getrennt analysiert. Gerade beim pH-Wert (Bild 7, S. 37) und dem Wassergehalt (Bild 8, S. 37) zeigten sich große Abweichungen zwischen den Dreifachproben. Da die Elementaranalysen mit den vereinigten Dreifachproben durchgeführt wurden, war der Fehler hier deutlich geringer; es wurde gewissermaßen nur der „Mittelwert“ für die Einzelproben bestimmt. Auch wurde die Versuchsfläche durch die Probenentnahme selbst gestört. Der Einfluß dieser Störung wurde jedoch dadurch minimiert, dass die einzelnen Dreifachproben „punktgenau“ entnommen (Bild 4, S. 15).

Ungeachtet der aufgeführten Schwierigkeiten waren die zu düngende und die Kontrollfläche zu Beginn in ihren pH-Werten (3.1.1), dem Wassergehalt und der spezifischen Dichte (3.1.2), der Korngrößenverteilung (3.1.3), sowie den Elementgehalten und dem C/N-Verhältnis (3.1.4 und 3.1.5) vergleichbar und damit für einen Düngungsversuch geeignet.

#### 4.1.1 Azidität des Dünnwaldbodens (pH-Wert)

Der pH-Wert des Dünnwaldbodens wurde durch die Jahreszeit mindestens dreifach stärker beeinflusst als durch die Düngung (3.1.1). Aufgrund der großen Fehlergrenzen gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen der gedüngten und der ungedüngten Fläche. Der deutlich erkennbare Jahresverlauf im pH-Wert (Bild 7, S. 37) ist für die vorliegende Arbeit ohne Bedeutung, da der Boden-pH von der Düngung unbeeinflusst blieb. Deswegen kann ein Selektionsdruck auf die Bodenbakterien aufgrund von pH-Änderungen ausgeschlossen werden.

#### 4.1.2 Wassergehalt der Bodenproben aus dem Dünnwald

Die Bodenproben aus dem Dünnwald enthielten je nach Zeitpunkt und Fläche zwischen 8 % und 18 % (w/w) Wasser (Bild 8, S. 37). Allerdings waren die Abweichungen zwischen den einzelnen Dreifachproben als Folge der Heterogenität von Boden sehr groß. Eine Korrelation zwischen Niederschlagsmenge und Bodenfeuchte ließ sich nicht herstellen (Klimadaten von der Wetterstation Köln-Wahn; nicht dokumentiert), weil in Wäldern ein Großteil des Regenwassers über den Stammablauf der Bäume in den Boden gelangt. Ein signifikanter Einfluß der Düngung auf die Bodenfeuchte konnte nicht festgestellt werden und war auch nicht zu erwarten.

### 4.1.3 Korngrößenfraktionen für den Dünnwaldboden

Es konnte gezeigt werden, dass sich die Bodenproben von vier untersuchten Zeitpunkten hinsichtlich ihrer Korngrößenverteilung kaum unterschieden (Bild 9, S. 38). Entscheidend war aber, dass es zu keinem Zeitpunkt Unterschiede zwischen gedüngter und ungedüngter Fläche gab, so dass – der Erwartung entsprechend – gefolgert werden kann, dass sich die Bodenstruktur infolge der Düngung nicht verändert hat.

### 4.1.4 Elementaranalysen: CNHS-Analyse und C/N-Verhältnis im Dünnwaldboden

Die Gesamtgehalte von C, N, H und S wurden für je sieben Bodenproben der beiden Dünnwaldversuchsflächen bestimmt (Bild 10, S. 40). Da diese Art der Analyse kostspielig ist, wurde pro Zeitpunkt und Fläche nur eine einzige Probe (homogenisiertes Gemisch aus den Dreifachproben) gemessen. Ein kontinuierliches Monitoring der Elementgehalte war aus technischen Gründen unmöglich, hätte aber besser den Effekt der Stickstoffdüngung zeigen können.

Vor Beginn des Düngungsversuches war der N-Gehalt beider Versuchsflächen gleich (Bild 10b, S. 40). Der Unterschied zwischen beiden Flächen zu den folgenden Zeitpunkten ging allerdings weniger auf einen Anstieg des N-Gehalts in der gedüngten Fläche, als vielmehr auf ein Absinken in der Kontrollfläche zurück: innerhalb der kurzen Zeitspanne von zwei Wochen (02. bis 23. Oktober 2002) verlor die Kontrollfläche nämlich ein Drittel ihres anfänglichen N-Gehaltes (0,30 % zu 0,21 %, w/w). Es erscheint unwahrscheinlich, dass solche extremen Schwankungen im Boden natürliche Ursachen haben. Meßfehler sollten aber nicht vorliegen, da der Kurvenverlauf der drei Elemente C, N und H gleich war. Abgesehen von den problematischen Werten zu Anfang blieb der N-Gehalt auf der Kontrollfläche im weiteren Verlauf aber erwartungsgemäß konstant. Entscheidend für die vorliegende Arbeit war, dass der N-Gehalt der gedüngten Fläche erhöht war. Allerdings stieg mit dem N-Gehalt in gleichem Maße auch der C-Gehalt an, was gleichbedeutend mit einem Zuwachs an Biomasse ist und eindeutig zeigt, dass der Dünnwaldboden N-limitiert war. Dies war eine Prämisse für die der Arbeit zugrundeliegenden Hypothese, nach der N-Düngung die Struktur der Bakteriengemeinschaft, insbesondere bei stickstofffixierenden und denitrifizierenden Bakterien, verändern sollte.

Ein besseres Maß als der N-Gehalt zur Beurteilung der tatsächlichen N-Verfügbarkeit im Boden ist das C/N-Verhältnis (Begon *et al.* 1991; Scheffer und Schachtschnabel 2002). Mikroorganismen können Stickstoff am besten aus organischer Substanz aufnehmen, die ungefähr einen C/N-Wert von 10 hat (Scheffer und Schachtschnabel 2002). In vielen Böden liegt das C/N-Verhältnis relativ konstant bei diesem Wert, was vor allem auf den Humusanteil ( $C/N \approx 10$ ) zurückzuführen ist. In sauren Böden können aber auch C/N-Werte bis 17 erreicht werden (Begon *et al.* 1991), was einen N-Mangel anzeigt. Der Dünnwaldboden konnte daher mit einem C/N-Verhältnis zwischen 18 und 20 für die Kontrollfläche (Bild 11, S. 40) als stark N-limitiert bezeichnet werden. Bild 11 zeigt aber, dass sich das C/N-Verhältnis durch den Biomassezuwachs infolge der Düngung kaum änderte – zumindest wurde kein der Erwartung entsprechendes Absinken des C/N-Wertes beob-

achtet. Die N-Verfügbarkeit konnte daher trotz Düngung nicht verbessert werden. Der verzeichnete Biomassenzuwachs könnte auf Pflanzen, Pilze und/oder andere Mikroorganismen (inkl. Protozoen) zurückzuführen sein. Der Anteil des Wurzelwachstums dürfte vernachlässigbar sein, da mit der Düngung erst gegen Ende der Vegetationsperiode (Oktober) begonnen worden war. Zum Pilzwachstum können keine Aussagen gemacht werden, doch ist bekannt, dass Pilze in Böden mit Abstand die größte Biomasse stellen und gerade in sauren Böden dominieren (Maier *et al.* 2000). Es ist fraglich, ob größere Mengen an  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ -Dünger dieses Ergebnis verändert hätten – wahrscheinlich wäre der zusätzliche Stickstoff unmittelbar ausgewaschen worden.

Die Unterschiede im C- und N-Gehalt beider Flächen nivellierten sich nach der letzten Düngung im Februar 2003 schnell wieder: in der Probe vom April lag der N-Gehalt der gedüngten Fläche noch um 12 % über dem der Kontrollfläche, im Juli waren beide Flächen aber bereits nicht mehr unterscheidbar. Der Anstieg im C- und N- sowie im H-Gehalt in der gedüngten Fläche zum letzten Zeitpunkt (September 2003) dürfte auf Meßfehlern beruhen, vor allem da die Fehler mit je  $\pm 15\%$  verglichen mit denen anderer Proben mehr als doppelt so groß waren.

Die Kurve des H-Gehaltes verläuft im Prinzip so wie die von C- und N-Gehalt. Die Messung für November ist aber fragwürdig, da die Kurven beider Flächen hier zusammenfallen, während sie für C- und N-Gehalt weit auseinander liegen. Daher geben die Meßwerte zu diesem Zeitpunkt wahrscheinlich nicht den realen Zustand wieder. Zu möglichen Änderungen im S-Gehalt ließen sich keine Aussagen treffen, da die Ergebnisse in allen Proben zu nahe der Nachweisgrenze von 0,02 % lagen (Bild 10c). Dies war jedoch ein methodisches Problem, da die erhaltenen Werte gut mit den üblichen Schwefelgehalten in Böden von 0,01 - 0,05 % korrespondierten (Schroeder 1992; Scheffer und Schachtschnabel 2002).

### **4.1.5 Elementaranalysen: lösliche Fraktion in den Dünwald-Bodensuspensionen**

Die Elementaranalysen für die lösliche Fraktion wurden aus finanziellen Gründen nur für die ersten vier Zeitpunkte durchgeführt. Außerdem war der Unterschied zwischen beiden Probenflächen nach den CNHS-Analysen ab dem fünften Zeitpunkt nur noch minimal (Bild 10, S. 40). Die in Bild 12 (S. 41) erkennbaren Unterschiede in den Elementgehalten zwischen gedüngter und ungedüngter Fläche waren in allen Fällen signifikant. Die Methode der ICP-AES (2.3.4) ist sehr empfindlich und liefert Werte, die ungefähr die Elementkonzentrationen widerspiegeln, die auch im Bodenwasser auftreten können. Gewöhnlich entspricht dies gleichzeitig den Konzentrationen, in denen Mikroorganismen (aber auch Pflanzen) diese Elemente leicht aufnehmen können.

Den deutlichsten Effekt zeigte die Düngung beim  $\text{NH}_4^+$ -Gehalt (Bild 12a). Allerdings sank der  $\text{NH}_4^+$ -Gehalt zwischen 23. Oktober und 22. November 2002 im Boden sowohl der gedüngten als auch der ungedüngten Fläche und stieg erst danach wieder leicht an. Dieser Kurvenverlauf liegt wahrscheinlich in der Aktivität nitrifizierender Mikroorganismen begründet; denn zum beobachteten Kurvenverlauf der  $\text{NH}_4^+$ -Konzentration passt, dass die Nitrifikationsraten in sauren Waldböden im Herbst maximal sind. Ohne Nitrifikation würde eine fortschreitende Akkumulation von

$\text{NH}_4^+$  erwartet werden, da insgesamt viermal gedüngt wurde. Für chemolithoautotrophe Nitrifikanten, die  $\text{NH}_4^+$  über  $\text{NO}_2^-$  zu  $\text{NO}_3^-$  oxidieren, ist der Dünnwaldboden mit einem pH zwischen 3,5 und 4,5 (Bild 7, S. 37) eigentlich zu sauer. In der Literatur wird für autotrophe Nitrifikanten ein pH-Minimum von 4,5 angegeben (Maier *et al.* 2000), doch auch in Waldböden mit pH 4 konnte Nitrifikation nachgewiesen werden (Paul und Clark 1989). Nach Myrold (1998) soll in sauren Waldböden allerdings die heterotrophe Nitrifikation von größerer Bedeutung sein, als die autotrophe.

Der Nitratgehalt stieg nach der ersten Düngung zunächst sehr stark an (23. Oktober 2002), fiel dann aber wieder drastisch ab – trotz dreier nachfolgender Düngungen. Offensichtlich gab es Prozesse im Boden, die den Nitratgehalt im Gegensatz zum Ammoniumgehalt kurzfristig wieder normalisieren konnten. Zwar kann durch Denitrifikation  $\text{NO}_3^-$  aus Böden eliminiert werden, jedoch nicht in diesem Ausmaß. Denitrifizierende Bakterien sind fakultativ anaerob und nutzen unter anoxischen Bedingungen  $\text{NO}_3^-$  als terminalen Elektronenakzeptor der Atmungskette. In der Regel wird die  $\text{O}_2$ -Atmung aber vorgezogen, da die ATP-Ausbeute höher ist (Bothe *et al.* 2000). Die Denitrifikation erfolgt daher vor allem in anoxischen Mikrohabitaten, die jedoch in einem gut durchlüfteten Sandboden wie dem Dünnwald keinen großen Anteil am für Bakterien verfügbaren Porenvolumen haben. Auch eine im Vergleich zu  $\text{NH}_4^+$  bevorzugte Aufnahme von  $\text{NO}_3^-$  durch Bodenorganismen kann ausgeschlossen werden. Da  $\text{NO}_3^-$  unter Energieaufwand erst auf die Stufe  $\text{N}^{\text{III}}$  reduziert werden müsste, um über das GS/GOGAT-System assimiliert werden zu können, nehmen Pflanzen und Mikroorganismen immer bevorzugt  $\text{NH}_4^+$  auf. Ungleich bedeutender dürfte dagegen die Auswaschung von  $\text{NO}_3^-$  gewesen sein, denn wegen der gleichnamigen Ladung kann  $\text{NO}_3^-$  nicht an Bodenpartikel binden und damit nur schlecht im Boden gespeichert werden.

Nitrit konnte in keiner der Proben nachgewiesen werden, weshalb die  $\text{NO}_2^-$ -Konzentration in der Bodenlösung aller Proben unter der Nachweisgrenze von  $0,05 \mu\text{g/mL}$  gelegen haben muß. Dies entspricht der Erwartung, nach der das toxische  $\text{NO}_2^-$  in Böden normalerweise nicht nachzuweisen ist. Zwar wird  $\text{NO}_2^-$  von Ammonium-oxidierenden Bakterien in erheblichen Mengen freigesetzt, doch von Nitrit-oxidierenden Bakterien wie *Nitrobacter* schnell zu  $\text{NO}_3^-$  oxidiert (Dunger und Fiedler 1997).

Die Konzentrationsverläufe für die sieben Metalle Al, Mn, K, Fe, Ca, Na und Mg (Bild 12, S. 41), lassen sich am besten mit der Ionenaustauschkapazität des Bodens erklären; denn die Böden humider Klimata wirken als Kationenaustauscher (Scheffer und Schachtschnabel 2002) und die genannten Metalle werden von Mikroorganismen und Pflanzen allenfalls in Spuren aufgenommen. Die Konzentration von Metallionen in der Bodenlösung hängt daher vor allem von abiotischen Faktoren ab. Die relativen Änderungen in den Konzentrationen waren für die genannten Ionen zwar teilweise erheblich (Bild 12), doch blieben die Absolut-Konzentrationen im unteren ppm-Bereich. Daher wurde davon ausgegangen, dass die Konzentrationsänderungen bei diesen Elementen, sowie bei S und P – zumindest im Vergleich zu den N-Spezies – keinen Einfluß auf die Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaften hatten.

## 4.2 Diskussion der Ergebnisse zu den Klonbibliotheken

Klonbibliotheken dienen zum einen dazu, die Zusammensetzung der Mikroorganismen-Gemeinschaften im Dünnwaldboden über Markergene – *nifH*, *nosZ* und das 16S rRNA-Gen – zu beschreiben. Außerdem waren Klonbibliotheken notwendig, um die TReFID-Ergebnisse zu den drei Genen im Boden unabhängig bewerten zu können (4.2.6 und folgende Abschnitte).

Die Untersuchung der Bodenbakterien im Dünnwald beruhte ausschließlich auf molekularen Methoden. Auf die Isolierung von Reinkulturen wurde verzichtet, da zum einen nur ein Bruchteil der Bodenbakterien mit herkömmlichen Methoden zu kultivieren ist (1.1.3) und zum anderen die kultivierten Bakterien nicht die natürliche Zusammensetzung der Gemeinschaft widerspiegeln (Dunbar *et al.* 1999; Felske *et al.* 1999; McCaig *et al.* 2001; Rösch *et al.* 2002; Joseph *et al.* 2003) (vergleiche auch Tabelle 25, unten). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit basieren auf DNA-Daten und müssen nicht für die tatsächlich aktive Gemeinschaft gelten; denn als ein Grund der geringen Kultivierbarkeit wird angesehen, dass ein Teil der Bodenbakterien in physiologisch wenig bis gar nicht aktiven Ruhestadien vorliegt (*viable but nonculturable*) (Colwell und Grimes 2000). Da die äußeren Bedingungen in Böden ständigem Wechsel unterliegen, könnte so immer nur der Teil der Bakterien aktiv sein, der an die gerade herrschenden Bedingungen angepasst ist. Um nur diese aktive Teilgemeinschaft zu erfassen, hätte rRNA bzw. mRNA aus dem Boden extrahiert werden müssen. Um eine Verzerrung der Ergebnisse durch kurzfristige Effekte auszuschließen, wären zudem häufigere Probenentnahmen erforderlich gewesen. In der vorliegenden Arbeit ging es aber um die Gesamtdiversität und um eher mittelfristige Veränderungen in der Gemeinschaft.

### 4.2.1 Erstellung von Klonbibliotheken zur Untersuchung der Diversität von Mikroorganismen im Dünnwaldboden

Die Grundlage zur Erstellung von Klonbibliotheken zu *nosZ*, *nifH* und dem 16S rDNA-Gen im Dünnwaldboden war die Möglichkeit zur Extraktion von Boden-DNA. Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch einen Rhizosphäreneffekt auszuschließen, wurde für die vorliegende Arbeit „wurzel-freier“ Boden entnommen (2.2.2); denn bereits mehrfach wurde gezeigt, dass die Zusammensetzung der Bodenbakteriengemeinschaft durch Pflanzenwurzeln beeinflusst wird (Rhizosphäreneffekt) (Curl und Truelove 1986; Liljeroth *et al.* 1991; Linne von Berg und Bothe 1992; Duineveld *et al.* 1998; Grayston *et al.* 1998), wobei der genaue Effekt aber höchst variabel ist und neben der Pflanzenart von vielen anderen Faktoren abhängt (Griffiths *et al.* 1999).

Bis vor wenigen Jahren war die Extraktion von Boden-DNA ein langwieriger Prozess (z. B. Mergel *et al.* 2001b). Mit den nun kommerziell erhältlichen Kits (2.4) kann Boden-DNA schnell und vor allem reproduzierbar aufgereinigt werden (C. Rösch, Diplomarbeit, 2001; Rösch *et al.* 2002). Dennoch sind aufgrund von Inhibitoren (Watson und Blackwell 2000) nicht alle DNA-Präparationen gleichermaßen für eine PCR-Amplifizierung einsetzbar: bei vielen Versuchen wurde kein PCR-Produkt erhalten. Dieses Problem bestand vor allem bei der Amplifizierung von *nosZ*, etwas weniger ausgeprägt auch bei der von *nifH*. PCR-Produkte des 16S rRNA-Gens wurden bei den

meisten Experimenten erhalten (nicht dokumentiert). Unter anderem deswegen sind die einzelnen Klonbibliotheken zu den drei Genen von so unterschiedlicher Größe (vergleiche Tabelle 5, S. 43, Tabelle 6, S. 48 und Tabelle 7, S. 52).

Bei der DNA-Extraktion wurden nur 50 mg Bodenprobe eingesetzt (2.4). Obwohl der Hersteller Mengen bis zu 500 mg empfiehlt, konnte bei solchen Mengen keine PCR-amplifizierbare DNA aus dem Dünnwaldboden gewonnen werden. Da der Boden aber ein heterogenes Substrat ist und kleinräumig die verschiedensten Milieus bietet (vergleiche Einleitung), wäre es wünschenswert, möglichst große Bodenmengen zur DNA-Extraktionen einzusetzen (vergleiche von Wintzingerode *et al.* 1997). Um Verfälschungen aufgrund zu geringer Bodenmengen zu minimieren, wurden die Klonbibliotheken in der Regel mit PCR-Produkten aller drei Dreifachproben erstellt; in der Bezeichnung jeder Sequenz ist durch einen Großbuchstaben (A, B oder C) angegeben, von welcher Probe sie stammt. Eine nach Proben A, B und C getrennte Auswertung erfolgte jedoch nicht, da dies den Aufwand verdreifacht hätte und pro Einzelprobe zu wenig Sequenzen vorlagen.

Den größten Einfluß auf die Qualität der Klonbibliotheken hatten wahrscheinlich die PCR-Reaktionen und hier vor allem die Selektivität der verwendeten Primer (Suzuki und Giovannoni 1996; von Wintzingerode *et al.* 1997; Polz *et al.* 1999). Bei der Entwicklung von Primern zur partiellen PCR-Amplifizierung eines Zielgens aus Umweltproben dienen zwangsläufig die in der GenBank publizierten Sequenzen als Grundlage. Da aber in jeder Umweltprobe beinahe ausschließlich zuvor unbekannte Sequenzen gefunden werden (Buckley und Schmidt 2002; Schloss und Handelsman 2004), ist die Annahme naheliegend, dass die in der GenBank repräsentierten Bakterien entweder untypisch für Umweltproben sind oder aber repräsentativ nur einen Bruchteil der tatsächlichen Diversität widerspiegeln. In beiden Fällen wäre die Entwicklung „universeller“ Primer, die ein bestimmtes Gen in all seinen Ausprägungen amplifizieren könnten, *a priori* unmöglich. Die PCR ist damit zwangsläufig immer selektiv, selbst wenn diese Selektivität mangels der Kenntnis nicht amplifizierter Sequenzen nicht erkannt werden kann. Hinzu kommen Unterschiede in der Amplifizierungsrate einzelner Sequenzen, so dass das Produkt im Extremfall von Sequenzen dominiert sein kann, die in der *template*-DNA sehr selten sind – und umgekehrt (Reysenbach *et al.* 1992; von Wintzingerode *et al.* 1997; Polz und Cavanaugh 1998). Auf die Eignung der in dieser Arbeit verwendeten PCR-Primer wird unten eingegangen (4.2.8, 4.2.9 und 4.2.9). Hinzu kommt aber auch, dass aufgrund der extrem hohen Diversität von Bodenbakterien zwangsläufig nur eine Stichprobe über die Sequenzierung klonierter PCR-Produkte untersucht werden kann. Selbst wenn die PCR-Primer für das Zielgen „universell“ wären, müssten zehntausende von 16S rDNA-Klone sequenziert werden, um an die geschätzte Diversität mit  $10^4$  Ribotypen heranzukommen. Die Ergebnisse zur Diversität im Dünnwaldboden (3.2 und 3.3) beziehen sich aus den genannten Gründen nur auf Stichproben der PCR-amplifizierbaren Genausprägungen. Diese Stichprobe kann im Idealfall der Gesamtdiversität nahe kommen oder zumindest einen repräsentativen Ausschnitt liefern, wie möglicherweise bei der TReFID-Auswertung von 16S rDNA-tRFs (3.3.3). Doch ist ebenso möglich, dass nur ein kleiner Ausschnitt erfasst wurde, der die reale Gemeinschaft im Boden nur eingeschränkt wiedergibt, wie dies bei *nosZ* und *nifH* der Fall gewesen sein könnte.

#### 4.2.2 Allgemeine Diskussion der Auswertung von partiellen Gensequenzen aus dem Dünwaldboden

Alle in dieser Arbeit gewonnenen DNA-Sequenzen stammen aus Umweltproben und nicht aus kultivierten Bakterien. Da unabhängige Wiederholungen der Sequenzierung nicht möglich waren, mussten die Fehler bei der Korrektur der einzelnen DNA-Sequenzen minimiert werden. Die kritischen Schritte, durch die solche Fehler in ein Sequenz eingeführt werden konnte, waren die Vorgänge in der PCR (2.5) und die Auswertung des Elektropherogramms (2.10.2). Während der PCR-Amplifikation konnte es zu Basenaustauschen, Insertionen bzw. Deletionen (Indels), oder aber zur Bildung chimärer Sequenzen (2.10.3) kommen (von Wintzingerode *et al.* 1997).

Basenaustausche lassen sich bei Sequenzen unkultivierter Bakterien auf experimentellem Wege nicht verifizieren. Aber die Häufigkeit von Basenaustauschen kann über die Fehlerrate der *Taq* DNA-Polymerase abgeschätzt werden. Diese wird mit  $(8,0 \pm 3,9) \cdot 10^{-6}$  angegeben (Cline *et al.* 1996), weshalb ein PCR-Produkt der Länge 700 nach 40 Zyklen ein bis drei fehlerhaft eingebaute Nukleotide<sup>1</sup> enthält. Das bedeutet, dass zwei Sequenzen im Extremfall um 0,9 % ( $2 \times 3$  nt bei 700 nt Produktlänge) abweichen können, obgleich sie auf dasselbe *template* zurückgehen (vergleiche hierzu Speksnijder *et al.* 2001). Basenaustausche sind aber in der Regel an der Sequenz nicht als Fehler erkennbar. Bei der 16S rDNA konnten die konservierten Bereiche dahingehend überprüft werden, ob die Sekundärstrukturbildung beeinträchtigt wurde. Im Falle von *nifH* und *nosZ* lieferten interne STOP-Codons oder – bei *nosZ* – der Austausch einer für die Ligandenbindung essentiellen Aminosäure Hinweise auf Punktmutationen dieser Art. Indel-Artefakte konnten zwar auch die Folge fehlerhafter Amplifizierung sein, gingen aber meist auf eine falsche Interpretation der Sequenz-Rohdaten zurück. Solche Fehler ließen sich über Alignments – und bei *nifH* oder *nosZ* auch Leserasterverschiebungen – leicht detektieren und zum überwiegenden Teil durch Vergleich mit den Elektropherogrammen beheben (vergleiche 2.10.2).

Die Bildung chimärer Produkte bei der PCR ist grundsätzlich nicht zu verhindern (2.10.3), da die *Taq* DNA-Polymerase bei jeder Bindung eines *template*-Strangs nur kurze Abschnitte synthetisiert (Mühlhardt 1999). Im Falle der 16S rDNA wurden 40 putative Chimären identifiziert und infolge dessen nicht ausgewertet. Dies entsprach immerhin einem Anteil von 6 % aller 670 Sequenzen. Unter den insgesamt 251 sequenzierten 63f/778R-Klonen (von denen 21 nicht in voller Länge sequenziert wurden) befanden sich 11 Chimären, was einem Anteil von 4,4 % entspricht. Bei 63f/1387r-Klonen lag dieser Anteil bei 5,7 % (12 von 211) und bei 27F/1495R-Klonen bei 8,2 %

---

<sup>1</sup> Die Zahl fehlerhafter Nukleotide wurde aus dem Informationsverlust pro Zeichen und Zyklus berechnet:

$$l \cdot z \cdot H^{-1} (f \log_2 f + (1-f) \log_2(1-f))$$

Dabei galt die Voraussetzung, dass keine der vier Basen einen Anteil von unter 10 % oder über 50 % im PCR-Produkt hat. Die Länge des PCR-Produkts ist durch  $l$  gegeben;  $z$  ist die Zahl der PCR-Zyklen und  $f$  die Fehler-rate, hier  $(8,0 \pm 3,9) \cdot 10^{-6}$ .  $H$  ist der SHANNON-Index (2.13.1) für die „Diversität“ der Basen im PCR-Produkt (modifiziert nach Shannon 1948).

(17 von 208). Dies zeigt, dass die Chimärenbildung bei langen PCR-Produkten begünstigt wird (von Wintzingerode *et al.* 1997). Einige weitere 16S rDNA-Sequenzen, die der Bellerophon-Analyse (2.10.3) zufolge chimär sein könnten, wurden ausgewertet, da die Entscheidung hier weniger eindeutig war (vergleiche Abschnitt 4.2.9).

Bei *nosZ* könnten 6 OTUs chimär sein (#19, #31, #32, #35, #38 und #39). Da die Entscheidung hier aber wesentlich unsicherer war als bei den 16S rDNA-Klonen, wurden alle *nosZ*-Sequenzen ausgewertet. Bei *nifH* gab es keine Hinweise auf chimäre Sequenzen – eine Folge der geringen Länge der Sequenzen (350 - 360 bp ohne Primer). Die Chimärenbildung ist zumindest bei der Auswertung von 16S rDNA-Klonbibliotheken ein nicht zu vernachlässigendes Problem. Allerdings gab es keine Möglichkeit, die putativen Chimären experimentell zu verifizieren.

### 4.2.3 Zusammenfassung von Sequenzen zu OTUs

Zur Untersuchung der Diversität in den Klonbibliotheken aus dem Dünnwaldboden wurden einander sehr ähnliche Sequenzen zu *operational taxonomic units* (OTUs) zusammengefasst (2.11). Dabei fungierte der Begriff OTU als „Platzhalter“ für eine Gruppe eng verwandter Sequenzen bzw. implizit Bakterien (Bohannon und Hughes 2003). Dieses Vorgehen war erforderlich, da eine biologisch sinnvolle Definition einer „Bakterienart“ fehlt (Staley 1997; Guest 1999; Rosselló-Mora und Amann 2001). Außerdem wäre die Diversität infolge von PCR- und Sequenzierfehlern (siehe oben, 4.2.2) als zu hoch eingeschätzt worden, wenn die Auswertung auf der Ebene von Sequenzen anstelle von OTUs erfolgt wäre. Insbesondere trifft dies auf Gene wie das der 16S rDNA zu, die oft in mehreren divergenten Operons vorliegen (vergleiche 4.2.9). Auf der anderen Seite bedeutet die Zusammenfassung zu OTUs aber auch einen Verlust an real existierender Diversität, insbesondere auf der Ebene der innerartlichen Diversität (Acinas *et al.* 2004a). Das Kriterium für die Definition von OTUs sollte daher so gewählt werden, dass PCR-Fehler vernachlässigbar sind, die tatsächliche Variabilität in den Sequenzen aber nicht übermäßig reduziert wird.

Da eine einheitliche Definition des OTU-Begriffes fehlt, wurde in der vorliegenden Arbeit als Kriterium eine paarweise Homologie von mindestens 98 % und damit eine Divergenz von bis zu 2 % gewählt. Nach der Abschätzung oben (4.2.2) wäre ein Kriterium von 1 % Divergenz schon zu stringent, da ein solcher Unterschied zwischen Sequenzen bereits in den Bereich der PCR-Fehler fiel (4.2.2 und von Wintzingerode *et al.* 1997; Speksnijder *et al.* 2001). Ein Hinweis hierauf könnte sein, dass die Zahl der OTUs bei einer schrittweisen Erhöhung des Grenzwertes – etwa von 97 % auf 99 % – überproportional ansteigt (Tabelle 24). Andererseits gilt als Faustregel, dass die „Artgrenze“ bei Bakterien um 97,0 % Sequenz-Homologie liegt (Stackebrandt und Goebel 1994; Brenner *et al.* 2001; Schloss und Handelsman 2004); dieser Wert schwankt allerdings sehr stark und kann, je nach Taxon, von unter 95 % bis über 99 % reichen. In der Literatur sind auf 16S rDNA-Sequenzen bezogene OTU-Kriterien zwischen 96 % (Godon *et al.* 1997) und 99 % (Stach *et al.* 2003) zu finden. Häufiger gewählt werden Werte von 98 % (Pidiyar *et al.* 2004) oder 97 % (McCaig *et al.* 1999; Elsaied *et al.* 2002; McGarvey *et al.* 2004).

**Tabelle 24: Anzahl von Dünnwald-OTUs bei unterschiedlicher OTU-Definition**

	Kriterium zur Definition eines OTUs (% paarweise Sequenz-Homologie)		
	≥ 97 %	≥ 98 %	≥ 99 %
16S rDNA:			
Anzahl OTUs für 27F/1495R-Klone	99 (94 %)	<b>105 (100 %)</b>	119 (113 %)
Anzahl OTUs für 63f/1387r-Klone	56 (89 %)	<b>63 (100 %)</b>	92 (146 %)
Anzahl OTUs für 63f/778R-Klone	65 (84 %)	<b>77 (100 %)</b>	111 (144 %)
Anzahl OTUs für alle 3 Primerpaare	184 (87 %)	<b>211 (100 %)</b>	308 (146 %)
Anzahl OTUs für <i>nosZ</i>	45 (92 %)	<b>49 (100 %)</b>	86 (176 %)
Anzahl OTUs für <i>nifH</i>	44 (94 %)	<b>47 (100 %)</b>	88 (187 %)

*Legende zu Tabelle 24:* Die Anzahl der OTUs in einer Klonbibliothek hängt stark von der Definition ab. Für diese Arbeit wurde ein Kriterium von 98 % gewählt (2.11); die entsprechenden Anzahlen wurden für einen Vergleich auf 100 % gesetzt und auf die OTU-Zahlen für zwei andere Kriterien bezogen.

#### 4.2.4 Vergleichende Diskussion der Rarefaction-Analysen für die Dünnwald-Klonbibliotheken von *nosZ*, *nifH* und der 16S rDNA

Mittels der Rarefaction-Analyse (2.13.2) konnte beurteilt werden, wie repräsentativ einzelne Klonbibliotheken waren. Diese *post hoc*-Methode wird angewandt, wenn Daten unter nicht standardisierten Bedingungen erhoben worden sind (Hughes *et al.* 2001; Schloss und Handelsman 2004). Dies war bei den Untersuchungen zum Dünnwaldboden der Fall, da die Klonbibliotheken der einzelnen Zeitpunkte streng genommen jeweils anderen Flächen entstammten und die Größe der Bibliotheken für die einzelnen Zeitpunkte stark schwankte. Letzteres war vor allem auf Schwierigkeiten bei der PCR zurückzuführen.

Rarefaction-Kurven wurden für die kombinierten Klonbibliotheken, also für alle Sequenzen eines Gens zusammen berechnet. Hierbei wurde kein Unterschied zwischen Zeitpunkten und Flächen gemacht. Dieses Vorgehen war gerechtfertigt, da bei jedem der drei Gene weder über die Diversitätsindices, noch die Cluster-Analysen oder die Phylogenien ein signifikanter Unterschied in den Gemeinschaften der gedüngten und der Kontrollfläche nachgewiesen werden konnte (3.2).

Der Vergleich der Rarefaction-Kurven mit den einzelnen Klonbibliotheken (Bilder in 3.2.1.1, 3.2.2.1 und 3.2.3.1) zeigt, dass die verschiedenen 16S rDNA-Klonbibliotheken wahrscheinlich repräsentativer für die Dünnwaldgemeinschaft waren, als die *nifH*- und *nosZ*-Bibliotheken. Die Klonbibliotheken zu *nosZ* und *nifH* waren allgemein zu klein – allerdings nicht die Anzahl der Sequenzen, sondern die der OTUs betreffend. Deswegen schwankten die OTU-Zahlen auch bei vergleichbaren Größen der Klonbibliotheken stark. Einen Düngungseffekt aufgrund von Klonbibliotheken zu untersuchen, verbot sich daher zumindest bei *nosZ* und *nifH*.

#### 4.2.5 Vergleichende Diskussion der Cluster-Analysen zu den drei Genen (*nosZ*, *nifH* und 16S rDNA)

Die Cluster-Analyse (2.12.3) wurde eingesetzt, um die Ähnlichkeit von Klonbibliotheken untereinander aufzuzeigen. Diese Art von Analyse erfordert zumindest eine minimale Übereinstimmung zwischen den zu vergleichenden Einheiten – in der Anwendung auf die Dünnwald-Klonbibliotheken

ken also OTUs, die in mehr als einer Bibliothek vorkommen. Der Großteil der OTUs war aber nur durch eine einzige Sequenz repräsentiert und auch OTUs mit mehr als einer Sequenz traten teils nur in einer Bibliothek auf (Bild 13, S. 44, Bild 17, S. 49 und Bild 21, S. 53). In der Folge beruhte die Cluster-Analyse bei *nosZ* im wesentlichen auf 12 der 49 OTUs. Doch war die Cluster-Analyse die einzige Möglichkeit, die Klonbibliotheken direkt nach Zeitpunkten zu vergleichen und so der Frage nach einem Düngungseffekt auf die Bakteriengemeinschaft auf der Basis von Klonbibliotheken nachzugehen.

Den Cluster-Analysen zufolge gab es nur zwei Fälle, in denen die Klonbibliothek für die gedüngte Fläche stark von der Bibliothek der Kontrollfläche desselben Zeitpunktes abwich: DUN7 bei *nosZ* (Bild 15, S. 45) und DUN3 bei *nifH* (Bild 19, S. 50). Dies deutet eher auf einen jahreszeitlichen als auf einen Düngungseffekt hin. Allerdings zeigten die Rarefaction-Analysen, dass gerade die Klonbibliotheken von *nosZ* und *nifH* nicht repräsentativ und damit für Cluster-Analysen wenig geeignet waren (vergleiche 4.2.4). Die Klonbibliotheken für die 16S rDNA waren jedoch von besserer Qualität (4.2.4) und hier war der „Jahreszeiteffekt“ deutlich ausgeprägt, aber ein Düngungseffekt dagegen nicht festzustellen (Bild 23, S. 55).

#### 4.2.6 Allgemeine Diskussion des TReFID-Verfahrens und der TReFID-Ergebnisse

Bereits im Jahre 2000 verwiesen Osborn *et al.* (2000) auf die Möglichkeit, Peaks in tRFLP-Profilen phylogenetischen Gruppen zuordnen zu können, sobald geeignete Datenbanken hierfür zur Verfügung stünden. Im selben Jahr veröffentlichten Marsh *et al.* (2000) ein Programm<sup>1</sup> für *in silico*-tRFLPs, das bei der Auswahl der Restriktionsenzyme für eine tRFLP helfen sollte. Die Datengrundlage waren die 16S rDNA-Sequenzen aus dem *Ribosomal Database II Project*<sup>2</sup>. Anhand von frei wählbaren Primern wurde der Startpunkt für den virtuellen Restriktionsverdau mit bis zu drei verschiedenen Enzymen festgelegt. Als Ergebnis wurde für jedes tRF eine Liste von Organismen ausgegeben, deren 16S rDNA-Sequenzen das entsprechende tRF erzeugen können. Umgekehrt konnte für experimentell erhaltene tRFs beurteilt werden, welche Organismen in der untersuchten Probe gewesen sein könnten. Diese Zuordnung beruhte jedoch auf einem einzigen Restriktionsenzym und war entsprechend unsicher; denn in der Regel geht ein tRF auf Bakterien völlig verschiedener Verwandtschaftsgruppen zurück (vergleiche TReFID-Datenbanken). Artenlisten wie die beim TReFID-Verfahren erzeugten konnte das Programm von Marsh *et al.* (2000) nicht erstellen. Im Jahr 2003 veröffentlichten Kent *et al.* (2003) ihr *Phylogenetic Assignment Tool* (PAT) genanntes Programm<sup>3</sup>, das, wie TReFID auch, die Erstellung von Artenlisten auf der Basis von tRFLP-Daten aus parallelen Restriktionsverdauen zum Ziel hatte. Allerdings gibt es bedeutende Unterschiede zwischen beiden Programmen: die PAT-Auswertung ist hierarchisch, in dem Sinne, dass

<sup>1</sup> <http://www.wdcm.nig.ac.jp/RDP/trflp/#introduction> (aktualisierte Adresse)

<sup>2</sup> <http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp> (aktualisierte Adresse)

<sup>3</sup> <http://trflp.limnology.wisc.edu/index.jsp>

zunächst eine Liste mit Treffern für das erste Enzym allein erstellt wird. In den folgenden Schritten wird diese Liste verfeinert, indem alle Einträge wieder entfernt werden, die nicht in Einklang mit den tRF-Daten für das zweite, dritte usw. Enzym stehen (Bild 1 in Kent *et al.* 2003). Somit sind in der endgültigen Ergebnisliste nur die Treffer enthalten, für die bei allen Enzymen das erwartete tRF auftrat. Aufgrund dieses Vorgehens hängt das Ergebnis bei Kent *et al.* (2003) davon ab, in welcher Reihenfolge die tRFLP-Profile der verschiedenen Enzyme ausgewertet werden. Die PAT-Datenbank wird mittels MiCA<sup>1</sup> automatisch erzeugt; in Kent *et al.* (2003) wurden Ergebnisse zu einer 8F-Datenbank vorgestellt (vergleiche Abschnitt 4.2.6.2). Im Gegensatz zu TReFID (2.15 und Rösch und Bothe 2005) ist PAT auf das 16S rRNA-Gen beschränkt und kann nicht auf funktionelle Gene wie *nifH* oder *nosZ* angewendet werden. Im Vergleich zu PAT geschieht die Auswertung von tRFLP-Daten mit TReFID parallel: für jeden Organismus in der Datenbank werden die tRFs aller Enzyme gleichzeitig auf Übereinstimmungen mit den Erwartungswerten überprüft (2.15.1). TReFID ist weniger restriktiv als PAT, weil nicht für alle Enzyme Übereinstimmungen gefunden werden müssen, damit ein Treffer in die Ergebnisliste gelangt; denn es kann vorkommen, dass für einen Organismus nicht alle erwarteten tRFs gefunden werden, etwa wenn ein Enzym nicht schneiden kann (DNA-Methylierung an der Schnittstelle oder aus anderen Gründen). Doch auch die Zuordnung von Signalen sehr seltener Organismen bzw. von sehr selten auftretenden PCR-Produkten zu Datenbankeinträgen kann schwierig sein, weil diese oft nur bei einigen Enzymen detektierbar sind. Dies ist ein methodisches Problem, da die maximale DNA-Auftragsmenge begrenzt ist und schwache von starken Signalen überlagert sein können: die Fluoreszenzintensitäten der tRFs schwankten innerhalb eines tRFLP-Profiles teilweise um zwei bis drei Größenordnungen (nicht dokumentiert).

Durch die umfangreichere Datenanalyse ist die Auswertung mit TReFID zwar langsamer als die mit PAT, doch dafür wahrscheinlich weniger fehleranfällig: z. B. sollte der Anteil falsch-negativer Treffer bei TReFID geringer sein. Ein direkter Vergleich beider Methoden war jedoch nicht möglich. Da Kent *et al.* (2003) die tRFLP mit dem Primer 8F durchführten, für den Dünnwald aber der 63f-Primer Verwendung fand (2.14.1), konnten weder die Dünnwald-tRFs mit PAT ausgewertet werden, noch die Daten von Kent *et al.* (2003) mit TReFID. Die verwendeten Datenbanken sind zwangsläufig immer nur für einen bestimmten Primer geeignet, da die tRFs in Abhängigkeit von diesem Primer berechnet werden.

In bisherigen Anwendungen der tRFLP-Methode auf mikrobielle Gemeinschaften stand allein der Vergleich von Profilen verschiedener Proben oder verschiedener Bedingungen im Vordergrund (Liu *et al.* 1997; Dunbar *et al.* 2000; Scala und Kerkhof 2000; Braker *et al.* 2001; LaMontagne *et al.* 2003; Reardon *et al.* 2004; Sanchez *et al.* 2004; Besemer *et al.* 2005; Countway *et al.* 2005; Denaro *et al.* 2005; Noll *et al.* 2005). Teilweise wurden auch Zuordnungen einzelner Peaks zu phylogenetischen Gruppen durchgeführt (z. B. Glissman *et al.* 2004; Hackl *et al.* 2004). Doch nur

---

<sup>1</sup> <http://mica.ibest.uidaho.edu/>

in wenigen Fällen wurde ein anderes Gen als das der 16S rRNA untersucht: *pmoA* in Waldboden (Ricke *et al.* 2005) und Sediment (Pester *et al.* 2004); *nirS* in Sediment (Braker *et al.* 2001); *nosZ* in Waldboden (Rich *et al.* 2003); *nifH* in mikrobiellen Krusten auf Wüstenboden (Yeager *et al.* 2004) und in Reiswurzeln (Tan *et al.* 2003; Miyamoto *et al.* 2004). Matsumoto *et al.* (2005) entwickelten eine Datenbank mit 342 Einträgen zur Identifizierung von Darmbakterien mittels tRFLP-Daten von vier Restriktionsenzymen. Doch weitere Anwendungen dieser Art sind bisher nicht veröffentlicht worden, so dass die vorliegende Arbeit der erste Versuch zu sein scheint, aus der Kombination von tRFLP-Profilen mit Datenbanken die Gemeinschaft denitrifizierender oder N<sub>2</sub>-fixierender Mikroorganismen eines Umweltstandortes zu beschreiben. Außerdem wurde die totale Bakteriengemeinschaft eines Waldbodens bisher nicht mit einem PAT oder TReFID vergleichbaren Verfahren beschrieben. Unabhängig von der vorliegenden Arbeit wurde das TReFID-Verfahren bereits erfolgreich zur Untersuchung der Prokaryotengemeinschaft im Boden einer Binnensalzstelle (S. Eilmus, Diplomarbeit 2005) eingesetzt.

#### 4.2.6.1 Bewertung des TReFID-Verfahrens aufgrund von Kontrollversuchen

Die TReFID-Auswertung resultiert in einer Artenliste, die in diesem Umfang nur mit erheblich größerem Aufwand über den herkömmlichen Weg der Klonierung und Sequenzierung von PCR-Produkten erstellt werden kann. Jedoch ist die TReFID-Identifizierung von Organismen unsicher in dem Sinn, dass sie statistisch auf der Grundlage bekannter Sequenzen erfolgt und keine neuen Sequenzdaten produziert. Daher waren umfangreiche Kontrollversuche nötig, um die Ergebnisse zu überprüfen. Auf die durchgeführten Kontrollexperimente zur tRFLP selbst, etwa zur Genauigkeit der Fragmentlängenbestimmung, der Problematik unvollständiger Restriktionsverdau oder zu tRF-Artefakten, kann an dieser Stelle nicht eingegangen werden. Statt dessen sei auf Liu *et al.* (1997), Osborn *et al.* (2000), Kitts (2001), Egert und Friedrich (2003), sowie Engebretson und Moyer (2003) verwiesen.

In der Kontrolle A zum TReFID-Verfahren wurde der Anteil von Sequenzen aus einer Dünnwald-Klonbibliothek in der TReFID-Ergebnisliste mit dem Anteil der GenBank-Sequenzen in dieser Liste verglichen (3.3.2.1). Erwartungsgemäß lag der Anteil der Dünnwald-Sequenzen unabhängig von der Wahl der beiden Parameter immer erheblich höher: nämlich um einen Faktor von 2 bis 15 (Bild 28, S. 74). Ähnliches wurde auch bei den in Abschnitt 3.3.3 vorgestellten Ergebnissen der TReFID-Auswertungen von Dünnwaldproben beobachtet. Die Standardparameter wurden aufgrund der TReFID-Kontrolle A so festgelegt, dass die Differenz zwischen dem GenBank-Anteil und dem Dünnwald-Anteil maximal war: 0,5 % tRF-Längenabweichung und 2/3 der Restriktionsenzyme müssen eine tRF-Übereinstimmung ergeben (vergleiche Abschnitt 2.15.1). Allerdings waren selbst unter den unspezifischsten Bedingungen höchstens 83 % der Dünnwald-Sequenzen in der Ergebnisliste enthalten. Dies war ein methodisches Problem, da sehr seltene PCR-Produkte mit der tRFLP-Methode schwierig nachzuweisen sind (siehe oben) und weil die PCR kaum reproduzierbar ist und wahrscheinlich bei jedem Versuch PCR-Produkte in leicht variierenden Zusammensetzungen erhalten werden. Letzteres wirkte sich zwar nicht auf die tRFLP aus, für die

Produkte aus vielen PCRs vereinigt wurden (2.14.1), wohl aber auf die Klonbibliotheken, die unabhängig mit Produkten einzelner PCRs erstellt wurden. Um die Variabilität in den tRFLP-Profilen auszugleichen (vergleiche Cluster-Analysen in Abschnitten 3.3.3.1 und 3.3.3.3), wurden die verschiedenen Experimente zu einer Bodenprobe zusammengefasst. Durch dieses Vorgehen sollten zufällige Schwankungen weitgehend ausgeglichen werden.

In einer zweiten Kontrolle (3.3.2.2) wurden aus TReFID-Ergebnissen zur 16S rDNA im Dünwaldboden synthetische tRFLP-Profile rekonstruiert und diese den experimentell erhaltenen Profilen gegenübergestellt (Bild 29, S. 75). Erwartungsgemäß waren die Übereinstimmungen zwischen beiden Profilen groß, obwohl es immer Abweichungen gab (Tabelle 13, S. 75). Diese Abweichungen hatten zweierlei Ursachen: erstens enthielt die Dünwaldgemeinschaft eine Vielzahl unbekannter Bakterien. Von diesen war zwar ein kleiner, in den Klonbibliotheken vertretener, Teil auch in den TReFID-Datenbanken enthalten, doch die Ergebnisse zu den Klonbibliotheken, insbesondere der Rarefaction-Analysen (3.2) wiesen darauf hin, dass die tatsächliche Diversität im Dünwaldboden mit diesen Bibliotheken bei weitem nicht erfasst war. Zweitens wurde bei der TReFID-Identifizierung keine absolute Übereinstimmung in allen eingesetzten Enzymen verlangt (s. o. und 2.15.1). Es konnten also Organismen in der TReFID-Liste vertreten sein, deren Sequenzen bei einzelnen Enzymen tRFs ergeben würden, die nicht nachgewiesen wurden. Die Übereinstimmungen waren aber gerade in den Hauptsignalen außerordentlich gut (Bild 29 und Tabelle 13, S. 75). Die weitgehende Ähnlichkeit in den „Intensitäten“ der tRFs zwischen realem und rekonstruiertem tRFLP-Profil war nicht zu erwarten, da in der TReFID-Analyse nur die Fragmentlänge, nicht aber die Intensität einzelner tRFs ausgewertet wird. Dies kann so interpretiert werden, dass die TReFID-Listen die wichtigsten Gruppen der Bodenbakterien zutreffend beschrieben. Die Abweichungen beruhen wahrscheinlich auf im Boden weniger prominent vertretenen Bakterien(gruppen).

Die Kontrolle C zeigte, dass die TReFID-Identifizierung höchstens bis zur Gattungsebene verlässlich ist (3.3.2). Zwischen einzelnen Arten innerhalb der *A. brasilense*-, *E. coli*- oder *R. leguminosarum*-Cluster konnte nicht unterschieden werden (Bild 30, S. 77). Andererseits liefert aber auch das herkömmliche Verfahren der Sequenzierung von PCR-Produkten selten bessere Ergebnisse hinsichtlich der Identifizierung von Bodenbakterien; denn die Hälfte der OTUs aus den 16S rDNA-Klonbibliotheken war noch nicht einmal bis auf die Ebene der Familie klassifizierbar (Übersicht in Tabelle 29, Anhang). Die bei der Kontrolle C aufgetretenen Artefakte (Tabelle 14, S. 78) stellen ein größeres Problem dar, weil sie zeigen, dass die TReFID-Ergebnisliste in einigen Fällen unzutreffend ist. Doch liegt dies weniger an Defiziten im TReFID-Verfahren selbst, sondern daran, dass auch entfernter verwandte Bakterien, etwa *E. coli* und *S. gelidimarina* (Tabelle 14), sich in ihren tRF-Mustern sehr ähneln können und damit über die tRFLP-Methode schwer, oder bei artenreichen Gemeinschaften gar nicht, unterscheidbar sind.

Die Kontrolle D bestätigte die übrigen Kontrollen darin, dass die TReFID-Ergebnislisten keine zufällige Auswahl der TReFID-Datenbanken enthalten (3.3.2.4). Die 16S rDNA-Datenbank lie-

fernte nur für 16S rDNA-tRFs Treffer in signifikanter Zahl (Tabelle 15, S. 78); die 13 bzw. 26 Treffer in Kombination mit den *nifH*-tRFs sind gegenüber den Zahlen für die 16S-tRFs (mindestens 1600) vernachlässigbar. Dies war keineswegs trivial, da es für tRFs aus einem beliebigen tRFLP-Profil in vielen Fällen Übereinstimmungen in den Datenbanken aller drei Gene gab (nicht dokumentiert); die Wahrscheinlichkeit ist bei komplexen Gemeinschaften groß, dass verschiedene Organismen für unterschiedliche Gene zufällig das gleiche tRF ergeben, z. B. eines mit der Länge 100 nt für Art-A/Gen-X und Art-B/ Gen-Y.

Marsh *et al.* (2000) hielten daher den Einsatz verschiedener PCR-Primerpaare für nötig, um solche Gemeinschaften über eine tRFLP charakterisieren zu können. Die Spezifität der TReFID-Auswertung beruht dagegen auf der Vielzahl der eingesetzten Restriktionsenzyme (in dieser Arbeit maximal 13). Dünnwald-Sequenzen, die wenigstens 98 % homolog waren, wurden zu OTUs zusammengefasst (2.11) und die Klonbibliotheken auf dieser Ebene ausgewertet (3.2). In den TReFID-Datenbanken waren jedoch alle Sequenzen vertreten, da innerhalb einer OTU für ein oder mehrere Enzyme unterschiedliche tRF-Längen auftreten konnten. Dies hatte zur Folge, dass die gleiche OTU in den Datenbanken durch mehrere tRF-Muster vertreten sein konnte (vergleiche Auswertungen zu den Dünnwald-Sequenzen, Abschnitt 3.3.3). Umgekehrt gingen aber identische tRF-Muster ausnahmslos auf Sequenzen aus der gleichen Prokaryotenart zurück. Der Verlust an Vielfalt war daher bei der Erstellung der TReFID-Datenbanken in manchen Fällen geringer als bei der Zusammenfassung von Sequenzen zu OTUs, da sich theoretisch einzelne Sequenzen innerhalb einer OTU unterscheiden ließen. In anderen Fällen trat aber genau das Gegenteil ein (vergleiche Kontrolle C, oben). Welcher Fall eintrat, hing davon ab, ob Restriktionsschnittstellen in konservierten oder variablen Genbereichen lagen und war damit nicht beeinflussbar.

Am Beispiel von *nosZ* wurde untersucht, wie sich die Zahl unterscheidbarer tRF-Muster („Polygone“, vergleiche Bild 6, S. 33) mit der Zahl eingesetzter Restriktionsenzyme veränderte. Die insgesamt 607 Einträge der *nosZ*-Datenbank teilen sich bei Berücksichtigung aller 13 Enzyme auf 295 tRF-Muster auf (nicht dokumentiert). Erwartungsgemäß sinkt dieser Wert mit der Zahl der Enzyme. Doch selbst bei 6 von 13 Enzymen sind noch durchschnittlich 215 tRF-Muster unterscheidbar. Dies zeigt, dass tRFLP-Experimente, die mit unterschiedlich vielen Enzymen durchgeführt wurden, miteinander vergleichbar sind (3.3.3); die Differenz in der Enzymzahl sollte allerdings nicht höher als 3 - 4 sein.

Die Eignung einzelner Restriktionsenzyme für eine tRFLP wurde anhand der tRF-Daten in allen drei TReFID-Datenbanken bewertet (Tabelle 10, S. 69 und Tabelle 11, S. 70). Im Vergleich zu *nifH* und *nosZ* waren die tRFs für die 16S rDNA wesentlich diverser und auch gleichmäßiger über den auswertbaren Bereich verteilt: Die SHANNON-Indices für die 13 Enzyme waren sich untereinander beim 16S rRNA-Gen ( $H_{S, \text{mittel}} = 4,841 \pm 0,196$ ) viel ähnlicher als bei *nifH* ( $2,906 \pm 0,557$ ) oder gar *nosZ* ( $2,043 \pm 0,630$ ). Dies weist darauf hin, dass die Qualität der TReFID-Identifizierung umso besser ist, je größer die zugrundeliegende Datenbank ist, was auch durch die Anwendung auf Dünnwaldproben bestätigt wurde (Abschnitt 4.2.7 und folgende). Der Eignungsgrad ein-

zelner Enzyme gilt freilich nur bezüglich der in der TReFID-Datenbank enthaltenen Sequenzen. Diese sind wahrscheinlich nicht repräsentativ für Umweltproben; tatsächlich könnten als ungeeignet bewertete Enzyme für Umweltproben besser geeignet sein, als die „gut“ eingestuft. Bisher gibt es jedoch nur eine Publikation, in der die Eignung verschiedener Restriktionsenzymen für tRFLP-Experimente systematisch untersucht wird (Engebretson und Moyer 2003).

Zusammen genommen zeigten die verschiedenen Kontrollen auf unabhängige Weise, dass die TReFID-Methode in Ergebnislisten resultierte, die zumindest einen Teil der Bakteriengemeinschaft im untersuchten Standort Dünnwald treffend widerspiegeln dürften. Eine detaillierte Bewertung der in den Listen enthaltenen Organismen ist in den Abschnitten 4.2.7 bis 4.2.9 gegeben, in denen die Gemeinsamkeiten der TReFID-Ergebnisse zu *nifH*, *nosZ* und das 16S rRNA-Gen hervorgehoben werden.

### 4.2.6.2 Beurteilung der TReFID-Datenbanken

Die verwendeten TReFID-Datenbanken waren redundant, das heißt, sie enthielten oftmals mehrere Sequenzen für den gleichen Organismus. Dies war aus zwei Gründen für eine zuverlässige TReFID-Auswertung förderlich. Jede Sequenz in der Datenbank konnte infolge von PCR- oder Sequenzierfehlern (Punktmutationen, Indels) fehlerhaft sein und damit auch zu falschen tRF-Daten führen. Daher wurden aus den Datenbanken keine Sequenzen ausgeschlossen, sofern sie eine bestimmte Mindestqualität aufwiesen, z. B. weniger als ein unsicheres Nukleotid (N, R, Y, S etc.) auf etwa 100 bp. Der zweite Grund sind fehlerhafte GenBank-Annotationen und damit gleichzeitig Einträge in der TReFID-Datenbank, bei denen die Sequenzen falschen Organismen zugeordnet wurden. Hinweise hierauf fanden sich vor allem bei cyanobakteriellen 16S rDNA-Sequenzen (vergleiche Abschnitt 4.2.9). Die Redundanz in der Datenbank war bei der 16S rDNA am größten; bei *nifH* und stärker noch bei *nosZ* war die Datengrundlage aber beschränkt (vergleiche Tabelle 8, S. 65), so dass für viele Organismen nur einzelne Sequenz vorlagen.

### ***Diskussion der TReFID-Datenbank für nosZ***

Die TReFID-Datenbank zu *nosZ* enthielt 244 von insgesamt 428 GenBank-Sequenzen (Tabelle 8, S. 65). Die 184 ungeeigneten Sequenzen stammten vorwiegend aus zwei Umweltproben (Scala und Kerkhof 1999; Stres *et al.* 2004). Sie überschritten sich um etwa 230 nt mit dem 5'-Bereich des in dieser Arbeit untersuchten Genbereichs, enthielten aber nicht die Bindungsstelle für den Primer *nosZ*-R, der für die Fluoreszenz-Markierung der *nosZ*-Amplifikate verwendet wurde. Die TReFID-Datenbank wurde vor allem deswegen für den *nosZ*-R- und nicht den *nosZ*-F-Primer erstellt, da die Bindungsstelle des Reverseprimers nahe des 3'-Terminus lokalisiert ist. Daher lässt sich die Datenbank ebenso gut für andere als den verwendeten Forwardprimer einsetzen. Bei Markierung des Forwardprimers hätte der Reverseprimer kaum variiert werden können, da die 3'-terminale Domäne ( $Cu_A$ ) wenige konservierte Bereiche enthält. Andererseits hätten in diesem Fall die Sequenzen von Scala und Kerkhof (1999) und Stres *et al.* (2004) ebenfalls in die Datenbank aufgenommen werden können. Der für die Bestimmung der tRFs nutzbare Bereich dieser Sequen-

zen wäre jedoch, abzüglich der Primerbindungsstelle, nur etwa 210 nt lang gewesen. Bei derart kurzen Sequenzen ist die Wahrscheinlichkeit für das Fehlen von Schnittstellen für einige der verwendeten Restriktionsenzyme aber groß. So lag die durchschnittliche Länge der tRFs bei 5 von 13 Enzymen über diesem Wert (Tabelle 11, S. 70). Die Sequenzen aus Scala und Kerkhof (1999) und Stres *et al.* (2004) hätten daher über die TReFID-Methode nicht sicher bestimmt werden können.

Unter den 184 ungeeigneten GenBank-Sequenzen waren 11 Sequenzen identifizierter Bakterien, die sich auf 6 Arten aus 5 Gattungen verteilten. Bis auf *Wolinella succinogenes* und *Marinobacter* sp. waren diese Arten aber in der TReFID-Datenbank durch andere Sequenzen vertreten. Die *Wolinella*-Sequenzen konnten nicht in die Datenbank integriert werden, da die Primerbindungsstelle für nosZ-R nicht eindeutig bestimmt werden konnte.

### **Diskussion der TReFID-Datenbank von nifH**

Zur Untersuchung der N<sub>2</sub>-fixierenden Mikroorganismen wurde in der tRFLP ein markierter nifH-F Forwardprimer eingesetzt. Die Bindungsstelle dieses Primers ist nahe des 5'-Terminus von *nifH* lokalisiert (Tabelle 3, S. 18), was die Möglichkeit bietet, den Reverseprimer zu variieren, ohne eine neue TReFID-Datenbank erstellen zu müssen. Im Gegensatz zu *nosZ* und dem 16S rRNA-Gen bestand bei *nifH* aber das Problem, dass der größte Teil der Sequenzen in der TReFID-Datenbank kürzer als 500 nt war: 93 % ohne und 95 % mit Berücksichtigung der Dünnwald-Sequenzen (vergleiche Bild 27, S. 68). Dies wirkte sich auf die TReFID-Auswertung aus, da viele der kurzen Sequenzen kein tRF lieferten (vergleiche Tabelle 10, S. 69) – aber möglicherweise im „fehlenden“ Bereich bis 500 nt eine Schnittstelle gehabt hätten. Daher war gerade bei *nifH* die Auswertung von tRF-Daten möglichst vieler Enzyme erforderlich, um zuverlässige Ergebnisse zu erhalten: für die Proben DUN2 (11 Restriktionsenzyme) wurden deutlich weniger tRF-Muster erhalten als für die Proben DUN1 und DUN7 (beide 13 Enzyme; 3.3.3.1).

Nur 140 der in der Datenbank enthaltenen Sequenzen stammten aus identifizierten Mikroorganismen, was einem Anteil von 11 % entspricht; ohne die Dünnwald-Sequenzen lag der Anteil bei 18 %. Doch diese Sequenzen sind für die TReFID-Analyse entscheidend, da nur durch sie eine Übereinstimmung der untersuchten Umweltprobe mit bekannten Organismen zu finden ist. Unter den nicht für die Datenbank geeigneten GenBank-Sequenzen befanden sich 211 Sequenzen identifizierter Organismen, die aus 64 Gattungen stammten (undokumentiert). Aber 28 dieser Gattungen waren auch in der TReFID-Datenbank vertreten, die Sequenzen aus insgesamt 48 Gattungen umfasste. Im Hinblick auf das TReFID-Verfahren wäre es dennoch ergiebiger gewesen, eine Datenbank für die 3'-terminale anstelle der 5'-terminalen Hälfte des Gens zu erstellen. Der 5'-terminale Primer nifH-F hatte aber den Vorteil in der Arbeitsgruppe etabliert zu sein und ermöglichte das Anknüpfen an frühere Arbeiten (Rösch *et al.* 2002). Außerdem wurde der mit nifH-F/R amplifizierte Genbereich von immerhin 43 % aller GenBank-Sequenzen abgedeckt (3.3.1.1).

Die Sequenzen unidentifizierter Organismen, die nicht in die TReFID-Datenbank aufgenommen werden konnten, waren endophytischen Ursprungs (Engelhard *et al.* 2000; Reiter *et al.* 2003) oder stammten aus Flüssen und Süßwasserseen (Olson *et al.* 1998b; Zani *et al.* 2000; Affourtit *et al.*

2001; MacGregor *et al.* 2001; Steward *et al.* 2004b), Flußsedimenten (Burns *et al.* 2002), der atlantischen und pazifischen Hochsee (Zehr *et al.* 1998; Zehr *et al.* 2001), mikrobiellen Krusten in der Chihuahua-Wüste (Yeager *et al.* 2004) und marinen Cyanobakterien-Matten (Zehr *et al.* 1995; Olson *et al.* 1998a; Steppe und Paerl 2002) oder von Stromatolithen (Steppe *et al.* 2001). Darüber hinaus waren aber auch Sequenzen aus verschiedenen (Wald-)Böden (Widmer *et al.* 1999; Poly *et al.* 2001; Hamelin *et al.* 2002) für die TReFID-Datenbank ungeeignet, so dass die Ergebnisse für diese Böden nur indirekt mit denen zum Dünnwaldboden verglichen werden konnten (4.2.8). Die in der TReFID-Datenbank enthaltenen Sequenzen unidentifizierter Mikroorganismen stammten mit der Ausnahme der Chorbusch-Sequenzen (Rösch *et al.* 2002) aus Umweltproben, die keine Ähnlichkeit zum Dünnwaldboden hatten (vergleiche Bild 27, S. 68). Allein 40 % aller in der TReFID-Datenbank enthaltenen GenBank-Sequenzen stammte aus „Extremstandorten“, wie der Tiefsee, tropischen Seegrasswiesen oder dem Darm verschiedener Termitenarten. Dies war allerdings vor Erstellung der Datenbank nicht abzusehen.

### **Diskussion der TReFID-Datenbank für das 16S rRNA-Gen**

In den tRFLP-Experimenten zur 16S rDNA im Dünnwaldboden wurde ein Fluorochrom-markierter 63f-Primer eingesetzt. Da für jeden weiteren PCR-Primer eine eigene TReFID-Datenbank zu erstellen gewesen wäre, wurde kein anderer 16S rDNA-Primer getestet. Die Auswahl von 63f hatte mehrere Gründe: erstens soll dieser Primer (in Kombination mit 1387r) anderen Primern bei der tRFLP mit DNA aus Umweltproben überlegen sein (Osborn *et al.* 2000). Zweitens war 63f nahe am 5'-Terminus des 16S rRNA-Gen lokalisiert, was die Möglichkeit zur Variation des Reverseprimers bot (778R oder 1387r). Drittens lag unweit der 63f-Bindungsstelle (ab ca. Position 100) ein hypervariabler Bereich, der in einer größeren Variation von tRF-Längen resultierte, als ein stark konservierter Bereich. Viertens enthielt ein Großteil der in der GenBank publizierten 16S rDNA-Sequenzen die 63f-Bindungsstelle, nämlich 55 % der 39.069 überprüften Sequenzen (vergleiche Tabelle 8, S. 65). Allerdings wäre der Primer 27F den Ergebnissen der 16S rDNA-Klonbibliotheken zufolge vermutlich für die tRFLP geeigneter gewesen; denn mit 27F/1495R wurde eine größere Diversität erfasst als mit 63f/778R oder 63f/1387r (vergleiche Bild 22, S. 54). Jedoch bindet dieser Primer etwa 30 bis 40 nt weiter stromaufwärts als der 63f-Primer. Eine TReFID-Datenbank für 27F hätte nur 38 - 75 % der 21.529 in der 63f-Datenbank enthaltenen GenBank-Sequenzen umfasst; ein exakter Anteil kann nicht angegeben werden, da bei der Erstellung der Datenbank nur die 63f-Bindungsstelle berücksichtigt wurde und die Entfernung zwischen 63f und 27F wegen Insertionen/Deletionen im Zwischenbereich schwankt. Die von Kent *et al.* (2003) in ihrem alternativen Ansatz verwandte Datenbank basierte auf dem Primer 8F, der noch näher als 27F am 5'-Terminus des 16S rRNA-Gens liegt. Eine TReFID-Datenbank für diesen Primer würde < 31 % der Einträge in der 63f-Datenbank enthalten. Doch gerade die Größe der Datenbank ist entscheidend, wenn mittels tRFLP-Daten Artenlisten für die untersuchte Gemeinschaft erstellt werden sollen (siehe oben).

Im Gegensatz zu *nosZ* und *nifH* wurden bei der 16S rDNA nicht alle, sondern nur ein Viertel der verfügbaren Sequenzen für die TReFID-Datenbank evaluiert (Tabelle 8, S. 65). Die mehr als 20.000 Einträge in der Datenbank wurden als ausreichend angesehen, um aussagekräftige Ergebnisse für den Dünnwaldboden erzielen zu können – vor allem in Relation zum Umfang der Datenbanken von *nosZ* und *nifH*. Außerdem enthielt die 16S rDNA-Datenbank Sequenzen von beinahe allen beschriebenen Bakterienarten (nicht dokumentiert), so dass eine weitere Vergrößerung vor allem die Redundanz und den Anteil unklassifizierter Sequenzen aus Umweltproben erhöht hätte. Tatsächlich wurden bei der Erstellung der Datenbank Sequenzen identifizierter Bakterien bevorzugt behandelt, da nur diese auch zur Identifizierung von Bakterien in den Dünnwaldproben führen konnten. Trotz ihrer Verwandtschaft zu Cyanobacteria ergaben die 16S rDNA-Klonbibliotheken keine Hinweise auf 16S rDNA-Sequenzen aus Plastiden. Auch zu Mitochondrien gehörende Sequenzen wurden in keinem Fall gefunden. Daher blieben Organellen bei der Erstellung der TReFID-Datenbank unberücksichtigt. Die Identifizierung von Organellen hätte freilich auch keine Information über die Bakteriengemeinschaften erbracht. Als Kontrolle enthielt die TReFID-Datenbank neben den bakteriellen 16S rDNA-Sequenzen auch 239 Sequenzen aus Archaea (Tabelle 12, S. 72). In den TReFID-Ergebnislisten der verschiedenen Dünnwaldproben (Tabelle 23, S. 89) war der Erwartung entsprechend in keinem Fall eine Archaeen-Sequenz vertreten; denn die für die tRFLP verwendeten Primer 63f und 778R bzw. 1387r amplifizierten nur die bakterielle 16S rDNA (vergleiche Tabelle 3, S. 18). Da Archaea in allen Böden verbreitet sind (Bintrim *et al.* 1997; Purdy *et al.* 2004; Sliwinski und Goodman 2004; Treusch *et al.* 2004) und damit sicherlich auch im Dünnwaldboden vorhanden waren, ist dies, wie auch die Ergebnisse der Kontrollversuche (3.3.2), ein Hinweis auf die Validität der TReFID-Ergebnisse.

#### 4.2.6.3 Allgemeine Diskussion der TReFID-Ergebnisse zum Dünnwaldboden

Aus den Ergebnissen zu den Klonbibliotheken konnte abgeleitet werden, dass die *nosZ*- und *nifH*-Diversität im Dünnwaldboden vergleichbar gering waren (3.2.1 und 3.2.2). Trotzdem lieferten die TReFID-Auswertungen für *nifH* (3.3.3.1) besser verwertbare Ergebnisse als für *nosZ* (3.3.3.2). Da die mit der derzeitigen *nosZ*-Datenbank erhaltenen Ergebnisse zumindest fraglich sind und bei der Analyse der Gemeinschaft denitrifizierender Gemeinschaften wenig nützen (4.2.6.2 und siehe unten), wurden nur zwei *nosZ*-tRFLPs ausgewertet. Der Schwerpunkt bei der tRFLP und TReFID-Auswertung wurde auf *nifH* und das 16S rRNA-Gen gelegt.

#### *Allgemeine Diskussion der TReFID-Ergebnisse zu nosZ*

Im Vergleich zu *nifH* oder der 16S rDNA enthielten die Ergebnislisten für die beiden *nosZ*-Proben nur sehr wenige Treffer bzw. tRF-Muster (3.3.3.2 und siehe unten). Dennoch umfassten die 103 Treffer bei DUN+1 immerhin 17 % aller Einträge der TReFID-Datenbank für *nosZ* (607 Einträge; Tabelle 8, S. 65). Der Großteil der Sequenzen in dieser Datenbank stammte allerdings aus dem Dünnwald (60 %; Tabelle 8), während die Ergebnisliste von DUN+1 nur zu einem Drittel Dünnwald-Sequenzen enthielt (Tabelle 19, S. 84). Auf der Ebene von tRF-Mustern entsprach der

Dünnwald-Anteil nur 25 % und damit etwa dem Anteil von 28 %, den tRF-Muster von GenBank-Sequenzen in der TReFID-Datenbank ausmachen (68 von 244 tRF-Muster). Bei der Probe DUN+1 sind die Dünnwald-Sequenzen also unterrepräsentiert, was die TReFID-Ergebnisse zu *nosZ* relativiert. Jedoch kann dies nicht darauf zurückgeführt werden, dass als Kriterium zur Musterübereinstimmung 1/2 anstatt des Standardwertes von 2/3 gewählt wurde; denn die Treffer- und tRF-Musterzahlen waren entgegen der Erwartung bei einem stringenteren Kriterium kaum niedriger (Tabelle 19). Vielmehr zeigt dies, dass die *nosZ*-Datenbank aufgrund ihres geringen Umfangs nur eingeschränkt zur Untersuchung von Denitrifikanten im Dünnwaldboden verwendbar ist (vergleiche aber Diskussion in 4.2.7). Im Falle von DUN+7 enthielt die TReFID-Ergebnisliste für das übliche Kriterium von 2/3 für eine Musterübereinstimmung nur Sequenzen unkultivierter Bakterien aus dem Dünnwald und der Mais-Rhizosphäre (nicht dokumentiert). Aus diesem Grund wurde die Stringenz der Auswertung herabgesetzt (1/2 statt 2/3), um überhaupt Sequenzen identifizierter Bakterien und solche anderer Umweltproben als Treffer zu erhalten. Ziel der Entwicklung der TReFID-Methode war, die langwierige Erstellung von Klonbibliotheken zu umgehen und gleichzeitig umfangreichere Daten über die Zusammensetzung der Gemeinschaft einer Umweltprobe zu erhalten. Letztlich sollte die TReFID-Methode so die Untersuchung der Gemeinschaftszusammensetzung in Umweltstandorten ermöglichen, ohne zusätzlich Klonbibliotheken sequenzieren zu müssen. Das Beispiel *nosZ* zeigt aber – gerade auch im Vergleich zu den beiden anderen Genen – die Abhängigkeit der TReFID-Methode von der Menge verfügbarer Sequenzen: da die Datenbank zu 60 % aus Dünnwald-Sequenzen bestand, konnten auch im günstigsten Fall nicht viele Treffer von GenBank-Sequenzen in den Ergebnislisten erwartet werden.

### **Allgemeine Diskussion der TReFID-Ergebnisse zu *nifH***

Die Ergebnislisten aus der TReFID-Auswertung von tRF-Daten zu *nifH* im Dünnwaldboden beinhalteten 205 bis 396 Treffer (Tabelle 18, S. 81). Dies entsprach 16 - 35 % aller Datenbankeinträge für dieses Gen. Dieser recht hohe Anteil – bei *nosZ* betrug er maximal 17 % (103 von 607) – geht aber vor allem auf die Dünnwald-Sequenzen zurück, die im Vergleich zu den GenBank-Sequenzen überproportional in den Ergebnislisten vertreten waren (Tabelle 18). Bezogen auf die GenBank-Sequenzen allein, lag der Anteil der in den Ergebnislisten enthaltenen Datenbank-Sequenzen zwischen 7 % (DUN-2 und DUN-7) und 22 % (DUN+1 und DUN+7), während der Anteil für die Dünnwald-Sequenzen von 29 % (DUN-7) bis 62 % (DUN-1) reichte. Die jeweiligen Anteile schwankten aber zu stark, als dass daraus ein Trend, etwa nach Zeitpunkten oder Flächen, abgeleitet werden konnte (nicht dokumentiert).

Im Gegensatz zu *nosZ* wurden bei *nifH* – und auch der 16S rDNA – keine einzelnen tRFLP-Experimente mit der TReFID-Methode ausgewertet. Statt dessen wurden die Daten mehrerer Experimente kombiniert (vergleiche 2.15.4), um Zufallseffekte bei den Ergebnissen auszuschließen. Allerdings war die Anzahl der Experimente für die einzelnen Proben verschieden: bei DUN-7 betrug sie 5, bei DUN+7 dagegen 6 (Tabelle 17, S. 80). Gleichzeitig lag auch die Gesamtzahl der tRFs bei DUN+7 (315) höher als bei DUN-7 (287). Doch war der Unterschied zwischen den tRF-Zah-

len bei DUN-1 und DUN+1 viel drastischer (278 gegenüber 419), obwohl für beide Proben jeweils 3 Experimente zusammengefasst wurden. Daher schien es keine Beziehung zwischen der Zahl der Experimente und der Gesamtzahl der tRFs zu geben. Eine Vergleich der tRFLP-Profile zeigte, dass die Unterschiede zwischen einzelnen Experimenten hauptsächlich in den relativen Intensitäten einzelner Peaks lagen, obwohl in zwei unabhängigen Experimenten nie exakt dieselben Peaks auftraten (nicht dokumentiert).

Die Ergebnisse zu DUN2 beruhen auf den tRF-Daten von 11 anstelle von 13 Restriktionsenzymen. Darauf könnte zurückzuführen sein, dass bei DUN2 insgesamt weniger tRF-Muster erhalten wurden und gleichzeitig der Anteil identifizierter Organismen niedriger lag, als bei DUN1 und DUN7 (Bild 32, S. 82). Dennoch waren die relativen Anteile, die tRF-Muster von Sequenzen aus den verschiedenen Umweltproben ausmachten, durchaus vergleichbar (Bild 32) und auch bei den identifizierten Organismen gab es keine Auffälligkeiten. Aus diesem Grunde konnten die DUN2-Ergebnisse denen zu DUN1 und DUN7 gegenübergestellt werden, obwohl sie aufgrund der unterschiedlichen Enzymzahlen nicht direkt vergleichbar waren (siehe aber 4.2.6.1).

#### 4.2.7 Denitrifizierende Mikroorganismen im Dünnwaldboden – Diversität der Gemeinschaft und Einfluß der Düngung auf deren Zusammensetzung

Die Diversität von Denitrifikanten wurde anhand eines einzigen Markergens untersucht, nämlich von *nosZ*, das die N<sub>2</sub>O-Reduktase codiert. Dieses Gen fehlt bei einzelnen Denitrifikanten, z. B. bei *Agrobacterium*-Stämmen, während es nach Wang und Skipper (2004) in seltenen Fällen auch bei nicht-denitrifizierenden Bakterien vorkommen kann. Die Reduktion von N<sub>2</sub>O zu N<sub>2</sub> wurde bereits 1993 bei dem nicht-denitrifizierenden Bakterium *Escherichia coli*, das kein *nosZ*-Gen hat, gaschromatographisch nachgewiesen (Kaldorf *et al.* 1993). Doch wenn N<sub>2</sub>O das Endprodukt der Denitrifikation ist, liegt dies häufig daran, dass das Gen zwar vorhanden, die N<sub>2</sub>O-Reduktase aber nicht exprimiert wird (Greenberg und Becker 1977; Zumft 1992). Da in der vorliegenden Arbeit jedoch das Gen und nicht die mRNA oder das Enzym als Marker diente, ist dies hier ohne Belang. Die Gene der übrigen an der Denitrifikation beteiligten Enzyme – *narGHJI* (dissimilatorische Nitratreduktase), *nirS* und *nirK* (dissimilatorische Nitritreduktase) und *norBC* (NO-Reduktase) – sind in ihrer Eignung zur Untersuchung der denitrifizierenden Gesamtgemeinschaft ebenfalls nur von eingeschränktem Nutzen (Bothe *et al.* 2000). Analog zu *nosZ* fehlt manchen Denitrifikanten *narG* (Gregory *et al.* 2003). Hinzu kommt, dass Denitrifikanten neben dem intrazellulär an die Plasmamembran gebundenen NarGHJI-Komplex zusätzlich das periplasmatische Nap-System zur dissimilatorischen Reduktion von Nitrat und die bei der Nitratammonifikation beteiligte Nitratreduktase aufweisen können (Bothe *et al.* 2000). Auch wurde kürzlich gezeigt, dass die *narG*-Phylogenie nicht mit der 16S rDNA-Phylogenie konsistent ist (Gregory *et al.* 2003) und dass die Evolutionsrate von *nosZ* zumindest bei fluoreszierenden Pseudomonaden höher als die von *narG* ist (Delorme *et al.* 2003). Die Diversität von denitrifizierenden Bodenbakterien sollte sich daher über *nosZ* besser darstellen lassen als über *narG*. Dennoch wurde die Verbreitung von *narG* in Böden

bereits für einige Standorte beschrieben (Philippot *et al.* 2002; Gregory *et al.* 2003; Roussel-Delif *et al.* 2005), in Mounier *et al.* (2004) auch in Kombination mit *nosZ* (siehe unten). Die beiden genetisch nicht verwandten Nitritreduktasen NirK und NirS, die Kupfer bzw. Häm-Eisen im aktiven Zentrum enthalten, schließen sich nach den bisherigen Erkenntnissen gegenseitig aus (Bothe *et al.* 2000; Tabelle 2 in Rösch *et al.* 2002), kommen aber beide bei Bodenbakterien vor (Wang und Skipper 2004). Daher hätte eine Untersuchung von *nirS* die Teilgemeinschaft der *nirK*-aufweisenden Denitrifikanten nicht erfasst und umgekehrt. Eine parallele Untersuchung beider Gene, wie sie für mehrere Standorte durchgeführt worden ist (Braker *et al.* 2000; Prieme *et al.* 2002; Liu *et al.* 2003; Yan *et al.* 2003; Wang und Skipper 2004), hätte aufgrund des erhöhten Aufwandes erfordert, *nifH* für die stickstofffixierenden Mikroorganismen aus der vorliegenden Untersuchung auszuschließen. Daher war auch eine parallele Untersuchung von *narG*, *napA*, *nirK*, *nirS* und *nosZ*, wie sie von Nogales *et al.* (2002) vorgenommen wurde, für den Dünnwaldboden nicht durchführbar. Die Reduktion von NO zu N<sub>2</sub>O wurde bereits an einigen Modellorganismen untersucht (Anjum *et al.* 2002; Kumita *et al.* 2004; Mesa *et al.* 2004; Suharti *et al.* 2004). Denitrifizierende Organismen können eine Häm *bc*- oder eine Chinon-haltige NO-Reduktase enthalten (Braker und Tiedje 2003). Letztere kommt darüber hinaus aber auch bei nicht-denitrifizierenden Organismen vor. Zu Beginn dieses Projektes waren nur sehr wenige Sequenzen der Strukturgene von der Häm *bc*-NO-Reduktase (*norBC*) publiziert. Die Verwendung von *norB* (oder auch *norC*) als Markergen hätte eine zeitaufwendige Entwicklung degenerierter PCR-Primer für Umweltproben erfordert. Mittlerweile sind aber Ergebnisse zur *norB*-Diversität in Sedimenten publiziert worden (Braker und Tiedje 2003).

Aus den aufgeführten Gründen – und wegen der Kontinuität zu früheren Arbeiten (Kloos 1996; Mergel *et al.* 2001a; Rösch *et al.* 2002) – wurde entschieden in der vorliegenden Arbeit, *nosZ* als Markergen zu verwenden. Die Möglichkeit von horizontalem Gentransfer und die geringe Zahl von *nosZ*-Sequenzen aus identifizierten Bakterien (vergleiche Abschnitt 3.3.1.2) verhinderte aber in den meisten Fällen eine Zuordnung der Dünnwald-OTUs zu bekannten Organismen.

### 4.2.7.1 Zusammensetzung der Denitrifikanten-Gemeinschaft im Dünnwaldboden

Über die phylogenetische Auswertung der *nosZ*-Klonbibliotheken konnten nur zwei *nosZ*-OTUs, #01 und #02, bis auf die Gattungsebene (*Pseudomonas*) klassifiziert werden, fünf weitere immerhin bis auf die Ebene der Familie (3.2.1.3 und Tabelle 26, Anhang). Die restlichen 40 *nosZ*-OTUs waren durch den Vergleich mit GenBank-Sequenzen identifizierter Mikroorganismen nicht sicher einzuordnen, repräsentierten dem Phylogramm in Bild 16 (S. 47) zufolge aber wahrscheinlich Proteobacteria. Allerdings standen als Vergleichs-Sequenzen mit der Ausnahme einer Sequenz aus *Haloarcula* (Haloarchaea, Euryarchaeota) auch nur solche aus Proteobacteria zur Verfügung; *nosZ*-Sequenzen denitrifizierender Bakterien aus anderen Phyla, z. B. von *Bacillus* (Firmicutes) (Gokce *et al.* 1989; Suharti und de Vries 2005) oder *Jonesia* (Actinobacteria) (Rainey *et al.* 1995), fehlen bislang. Andererseits enthielt das *nosZ*-Phylogramm (Bild 16) keine tiefwurzelnden Taxa

ohne bekannte Bakterien und gab daher keinen Hinweis auf Sequenzen von anderem als proteobakteriellem Ursprung.

Darüber hinaus wurde die Diversität von Denitrifikanten über das TReFID-Verfahren für die Dünnwald-Proben DUN+1 und DUN+7 untersucht (3.3.3.2). Analog zur phylogenetischen Auswertung war der Anteil bekannter Mikroorganismen in den TReFID-Ergebnislisten gering: bei DUN+7 stammten vier der 36 tRF-Muster aus bekannten Bakterien (Bild 33b). Die Ergebnisliste zu DUN+1 enthielt 61 tRF-Muster, von denen 18 (30 %) zu identifizierten Bakterien gehörten (Bild 33a). Allein neun dieser tRF-Muster repräsentierten aber die gleiche Bakterienart: *Pseudomonas stutzeri*. Insgesamt umfasste die Ergebnisliste zu DUN+1 neun Bakterienarten aus drei Gattungen. Im Vergleich dazu enthielt die TReFID-Datenbank mit 31 Arten aus 17 Gattungen nicht wesentlich mehr identifizierte Organismen (3.3.1.2). Die Eignung dieser Datenbank für die Auswertung von tRFLP-Daten ist in Abschnitt 4.2.6 diskutiert. Von den identifizierten Bakterien in den TReFID-Listen sind *P. stutzeri*, *Azospirillum* sp. A1-3, *A. brasilense* und *A. lipoferum* sowohl zur Denitrifikation als auch zur N<sub>2</sub>-Fixierung fähig. *P. stutzeri* und *P. fluorescens* gehören zu den *plant growth promoting rhizobacteria* (PGPR). *P. stutzeri* konnte über eine *nosZ*-OTU auch für die Probe DUN-5 nachgewiesen werden. Nach der TReFID-Auswertung von tRFLP-Daten kam *P. stutzeri* in den beiden Proben DUN+1 und DUN+7 vor (Bild 33). Neben der Übereinstimmung im Ergebnis der beiden experimentellen Ansätze läßt dieser Befund vermuten, dass Sequenzen aus *P. stutzeri* auch für die übrigen Proben hätten nachgewiesen werden können, wenn die Klonbibliotheken umfassender gewesen wären. Der Vorteil der TReFID-Methode liegt darin, dass die Auswertung von zwei tRFLP-Versuchen zweimal auf das Vorkommen von *P. stutzeri* im Dünnwaldboden hindeutete, der Nachweis über die Sequenzierung aber nur bei einem von 363 sequenzierten Klonen gelang – und dieser Klon stammte aus einer anderen Probe (DUN-5 gegenüber DUN+1 und DUN+7). Zusätzlich enthielten die TReFID-Ergebnislisten aber auch *Paracoccus* und *Azospirillum* spp., die über die Sequenzierung von *nosZ*-Klonen nicht nachgewiesen werden konnten, obwohl es zu einzelnen *Azospirillum*-Sequenzen verwandte Dünnwald-OTUs gab (OTUs #36 und #37; Bild 16, S. 47). Unter Berücksichtigung des Ergebnisses zu *P. stutzeri* kann aber angenommen werden, dass Bakterien dieser beiden Gattungen ebenfalls im Dünnwaldboden vorkommen. Ein zu *Azospirillum* verwandtes Bakterium wurde zumindest auch über eine 16S rDNA-OTU detektiert (3.2.3.4; vergleiche auch Abschnitt 3.2.3.5). Zu *Azospirillum* passende *nifH*-Sequenzen wurden in den Dünnwald-Klonbibliotheken nicht gefunden. Von *Paracoccus* sind keine diazotrophen Stämme bekannt, so dass ein Nachweis über *nifH* nicht zu erwarten war. Dafür war *Paracoccus* in den Ergebnislisten der TReFID-Auswertung von 16S rDNA-tRFs vertreten (aber nicht in den Klonbibliotheken).

Die TReFID-Auswertung zu *nifH* (3.3.3.1) ergab für den Dünnwaldboden die folgenden potentiellen Denitrifikanten (vergleiche Abschnitt 4.2.8): *Bradyrhizobium* spp., *Sinorhizobium* spp., *Pseudomonas* spp., *Alcaligenes faecalis*, *Burkholderia tuberum* und *Rhodobacter sphaeroides* (Duns-

tan *et al.* 1982; Rösch *et al.* 2002; Teixeira und Oliveira 2002). Die ersten fünf Gattungen waren auch in der TReFID-Datenbank zu *nosZ* vertreten (3.3.1.2), so dass sie in den *nosZ*-Ergebnislisten hätten enthalten sein können (vergleiche Bild 33). Möglicherweise war dies eine Folge von zu hoher Spezifität bei den *nosZ*-Primern oder diese Organismen lieferten tRFs schwacher Intensitäten, die im Hintergrund untergingen. Die Auswertung der *nifH*-Sequenzen (3.2.2.2) ergab keine Hinweise auf potentiell denitrifizierende Bakterien.

Die TReFID-Ergebnislisten für das 16S rRNA-Gen (3.3.3.3) beinhalteten die folgenden Gattungen mit potentiell denitrifizierenden Stämmen aus sechs verschiedenen Klassen, darunter alle sechs Gattungen, die oben für *nifH* aufgelistet sind: *Agrobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Brevundimonas*, *Hyphomicrobium*, *Mesorhizobium*, *Methylocystis*, *Methylosinus*, *Ochrobactrum*, *Paracoccus*, *Rhizobium*, *Rhodobacter*, *Rhodopseudomonas* und *Sinorhizobium* (alle Alphaproteobacteria); *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Comamonas*, *Nitrosomonas*, *Ralstonia*, *Thauera* und *Thiobacillus* (Betaproteobacteria); *Pseudomonas*, *Pseudoxanthomonas*, *Shewanella* und *Stenotrophomonas* (Gammaproteobacteria); *Desulfovibrio* (Deltaproteobacteria); *Actinomyces* und *Streptomyces* (Actinobacteria), sowie *Bacillus* (Firmicutes: Bacilli) (Zablotowicz *et al.* 1978; Zumft 1992; Shoun *et al.* 1998; Scholten *et al.* 1999; Bothe *et al.* 2000; Costa *et al.* 2000; Gumaelius *et al.* 2001; Mergaert *et al.* 2001; Chen *et al.* 2002; Kumon *et al.* 2002; Stolz und Basu 2002; Brettar *et al.* 2003; Dyer 2003; Gu *et al.* 2004; Schmidt *et al.* 2004; Suharti und de Vries 2005). Auch von diesen waren einige in der TReFID-Datenbank (*nosZ*) vertreten, aber nicht in den Ergebnislisten zu *nosZ* im Dünnwald. Bei den 16S rDNA-Sequenzen gab es mehrere Kandidaten für potentielle Denitrifikanten, etwa die Rhodospirillaceae repräsentierenden OTUs. Beispielsweise stammte die 16S rDNA-OTU#022 wahrscheinlich aus *Skermanella*, einer erst kürzlich von *Azospirillum* abgespaltenen Gattung (Stoffels *et al.* 2001). Viele *Azospirillum*-Stämme sind aber Denitrifikanten (Kloos *et al.* 2001) und einige Arten waren in den TReFID-Ergebnissen zu *nosZ* auch vertreten (Bild 33). Einzig *Pseudomonas*-Stämme konnten über alle drei Gene gemeinsam nachgewiesen werden, was wahrscheinlich primär eine Folge des geringen Datenbankumfanges bei *nosZ* ist (siehe oben und 4.2.6), aber auch darauf zurückzuführen sein kann, dass nur ein Teil der N<sub>2</sub>-Fixierer denitrifizieren kann. Hinzu kommen die gerade bei den *nosZ*- und *nifH*-PCR-Primern unbekanntenen Selektivitäten bezüglich der Bodenbakterien.

Weitergehende Vergleiche von Ergebnissen aus der Auswertung der *nosZ*-Klonbibliotheken zu den entsprechenden *nifH*- und 16S rDNA-Ergebnissen sind aus zwei Gründen nicht möglich. Die Grundlage für Vergleiche fehlt weitgehend, da nur sehr wenige *nosZ*-Sequenzen identifizierter Denitrifikanten bekannt sind. Außerdem wurde für *nosZ*-Sequenzen bisher nicht gezeigt, dass sie phylogenetisch auswertbare Information enthalten, weshalb im Extremfall selbst solche Sequenzen, die nach der phylogenetischen Analyse hohe Verwandtschaft zu einem bekannten Denitrifikanten zeigen, aus einem völlig anderen Organismus stammen können (horizontaler Gentransfer). Umgekehrt böte auch der Nachweis einer Bakteriengattung, die denitrifizierende Stämme umfasst, keine Gewissheit, dass die entsprechende Sequenz tatsächlich aus einem Denitrifikanten stammt;

denn selbst innerhalb derselben Art sind nicht zwangsläufig alle Stämme zur Denitrifikation fähig (Kloos *et al.* 2001).

#### 4.2.7.2 Vergleich der Denitrifikanten-Gemeinschaften aus dem Dünnwaldboden und anderen Standorten (Literaturdaten)

In den letzten Jahren erschienen einige Arbeiten zur Diversität von *nosZ* in Umweltproben, die Vergleiche zum Dünnwaldboden zulassen (Scala und Kerkhof 1999; Rösch *et al.* 2002; Rich *et al.* 2003; Mounier *et al.* 2004; Stres *et al.* 2004). Ein Teil der publizierten *nosZ*-Sequenzen deckte jedoch nicht den gleichen Bereich wie *nosZ*-Fb/*nosZ*-Rb ab (vgl. Tabelle 3, S. 18), so dass für diese nur indirekte Vergleiche möglich waren. Die betroffenen Sequenzen – sie stammten aus den Arbeiten von Scala und Kerkhof (1999) und Stres *et al.* (2004) – wurden nicht in die phylogenetische Auswertung integriert, da die Überlappung zu den Dünnwald-Sequenzen maximal 230 nt betragen hätte, was für eine solche Auswertung ungenügend gewesen wäre (Rösch *et al.* 2002).

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer basierten auf *nosZ*-F und *nosZ*-R (Rösch *et al.* 2002), deren Eignung zur Amplifizierung von *nosZ* aus Umweltproben unabhängig durch Rich *et al.* (2003), Mounier *et al.* (2004) und Throbäck *et al.* (2004) bestätigt wurde. Rich *et al.* (2003) untersuchten mit diesen Primern die *nosZ*-Diversität in einem Waldboden und einer angrenzenden Weide (Western Cascade Mountains, Oregon). Die dort gefundenen Sequenzen zeigten alle relativ hohe Ähnlichkeit zueinander und ließen sich zu einer distinkten Gruppe zusammenfassen, der auch einige bekannte Alphaproteobacteria angehören (Fig. 5 in Rich *et al.* 2003). In der gleichen Gruppe, von Rich *et al.* (2003) als „A“ bezeichnet, war auch der Großteil der Sequenzen aus einem anderen Waldboden bei Köln (Chorbusch; Rösch *et al.* 2002) zu finden. Da auch die meisten Dünnwald-OTUs in diese Gruppe gehörten (vergleiche Bild 16, S. 47), könnte dies bedeuten, dass es in Waldböden, zumindest der gemäßigten Zone, eine Gruppe relativ nahe verwandter Denitrifikanten gibt, die global verbreitet ist. Aus dem Vergleich mit Sequenzen identifizierter Bakterien scheint diese Gruppe vor allem Rhizobien und nahe verwandte Alphaproteobacteria zu enthalten. Chêneby *et al.* (2004) konnten über die Kultivierung denitrifizierender Bodenbakterien vor allem *Agrobacterium tumefaciens*-Isolate, aber auch *Sinorhizobium* (beide Alphaproteobacteria, Rhizobiaceae), *Achromobacter* (Betaproteobacteria) und *Pseudomonas* (Gammaproteobacteria) nachweisen, was der Hypothese oben zumindest nicht widerspricht. Der bei Chêneby *et al.* (2004) gefundene hohe Anteil von Actinobacteria und Firmicutes dürfte auf die relativ leichte Kultivierbarkeit und weniger auf eine hohe Abundanz im Boden zurückzuführen sein (Rösch *et al.* 2002). Zudem enthielten aber sowohl der Chorbusch- als auch der Dünnwaldboden Sequenzen, die nicht in diese Gruppe „A“ passten. Die *nosZ*-Diversität dieser beiden Standorte war insgesamt höher, als die von Rich *et al.* (2003) festgestellte Diversität.

Neben den eher Waldboden-typischen Denitrifikanten könnte es eine Reihe weiterer, eventuell ubiquitärer Denitrifikanten geben. Außer den Chorbusch- und Dünnwald-Sequenzen waren in der Gruppe „A“ (Rich *et al.* 2003) auch noch solche aus marinen Sedimenten (Scala und Kerkhof 1998, 1999) zu finden. Diese bildeten aber innerhalb von Gruppe „A“ wiederum ein eigenes Clus-

ter ohne Überschneidungen zu den Boden-Sequenzen. Diese Zuordnung konnte aufgrund der Sequenzen einiger identifizierter Bakterien – *Bradyrhizobium japonicum*, *Rhodopseudomonas palustris* und *Sinorhizobium meliloti* – und aufgrund der partiellen Überlappung (ca. 230 nt) der Sediment-Sequenzen mit den Boden-Sequenzen getroffen werden (vergleiche Rösch *et al.* 2002). Auch die *nosZ*-Sequenzen aus einem Ackerboden und einem seit 1958 brachliegenden Boden in Michigan (USA) bildeten ein monophyletisches Cluster in der Gruppe „A“ (Stres *et al.* 2004). Bei den Michigan-Sequenzen wurde eine – wenn auch nicht absolute – Unterteilung in Sequenzen aus dem ungenutzten und aus dem landwirtschaftlich genutzten Boden beobachtet (Stres *et al.* 2004). Die aus einem Atlantik- und einem Pazifik-Sediment stammenden Sequenzen (Scala und Kerkhof 1998, 1999) bildeten daneben jeweils eine weitere monophyletische Gruppe. Zwar könnte es auch beim Dünnwaldboden eine solche spezifische Gruppe geben (3.2.1.3 und Bild 16, Mitte), doch ist diese im NJ-Phylogramm nicht abgesichert (*bootstrap*-Werte 14 - 20 %). Sakano *et al.* (2002) konnten im artifiziellen Ökosystem einer Abwasseraufbereitungsanlage keine spezifische Gruppe von Denitrifikanten feststellen.

Stres *et al.* (2004) führten zudem RFLP-Analysen von *nosZ*-Klonen aus den zwei oben erwähnten Michigan-Böden durch und erhielten insgesamt 182 verschiedene RFLP-Muster. Die Zahl der OTUs für den Dünnwaldboden lag dagegen bei nur 49 (Tabelle 4, S. 42). Bemerkenswerterweise lieferte aber ein Drittel aller Klone des ungenutzten Michigan-Bodens das gleiche RFLP-Muster – im Dünnwaldboden gehörte ein Drittel aller Sequenzen zu OTU#14. Beim Ackerboden dagegen war kein Muster bei mehr als 5 % der Klone vertreten, was (unabhängig von der *species richness*) eine hohe Ebenmäßigkeit in dieser Gemeinschaft impliziert. Stres *et al.* (2004) erhielten nur acht RFLP-Muster, die beiden untersuchten Böden gemeinsam waren, was einem Anteil von 4 % entspricht. Im Vergleich traten elf der Dünnwald-OTUs sowohl in der gedüngten, als auch der ungedüngten Fläche auf (22 % Anteil; Tabelle 5, S. 43). Über die TReFID-Methode konnten drei OTUs sowohl in DUN+1 als auch in DUN+7 nachgewiesen werden (3.3.3.2). Dies entsprach zwar nur 6 % der insgesamt 49 Dünnwald-OTUs, doch bezogen auf die Gesamtzahl der OTUs in den TReFID-Ergebnislisten (16 bei DUN+1 bzw. 11 bei DUN+7) lag der Anteil bei 27 % bzw. 18 % und war damit den 22 % aus der Auswertung der Klonbibliotheken vergleichbar. Der kleinere Anteil bei Stres *et al.* (2004) im Vergleich zum Dünnwald kann auf die größere Entfernung der beiden Versuchsflächen voneinander und/oder auf die verschiedenen Nutzungsformen zurückzuführen sein, in beiden Untersuchungen allerdings auch durch Auswahleffekte erklärt werden (zu kleine Klonbibliotheken). Die landwirtschaftliche Nutzung des Bodens, zu der auch regelmäßiges Düngen gehörte, schien die Diversität von Denitrifikanten zu erhöhen (Stres *et al.* 2004). Möglicherweise reichte die Düngungsdauer im Dünnwald nicht aus, um einen derartigen Effekt hervorzurufen, oder die Düngung selbst ist nicht Ursache der Änderung. Weitere Faktoren von potentielltem Einfluß sind Unterschiede in der Vegetation und der Bodenstruktur (z. B. Pflügen).

Bei den TReFID-Auswertungen zu DUN+1 und DUN+7 stellten tRF-Muster von Sequenzen aus der Mais-Rhizosphäre zusammen mit solchen von Dünnwald-Sequenzen die größten Anteile (Bild 33, S. 85). Dies bedeutet jedoch nicht, dass die Rhizosphären-Sequenzen näher verwandt zu den

Dünnwald-Sequenzen waren, als die Chorbusch- oder Cascade Mountains-Sequenzen, die jeweils geringere Anteile an tRF-Mustern stellten (Bild 33). Dies wäre am Phylogramm (Bild 16, S. 47) an einem gehäuften Auftreten von Rhizosphären-Sequenzen in der Nähe der Dünnwald-OTUs zu erkennen. Tatsächlich aber ließ sich aus den Sequenzdaten keine Ähnlichkeit des Dünnwalds zu einem der anderen Standorte ableiten. Vielmehr waren beispielsweise für DUN+1 die Chorbusch-Sequenzen am relativ stärksten vertreten; denn in der TReFID-Ergebnisliste waren 10 Chorbusch-Sequenzen (8 tRF-Muster) enthalten und damit 31 % der insgesamt 32 Sequenzen dieses Standortes in der TReFID-Datenbank. Im Vergleich hierzu waren die Sequenzen aus den Cascade Mountains (44 Sequenzen in der Datenbank) und der Mais-Rhizosphäre (111 Sequenzen) mit je 16 %, bezogen auf die Zahl der verfügbaren Sequenzen in der Datenbank, gleich stark vertreten. In diesem Sinne waren die Standorte Dünnwald, Chorbusch und „Mais-Rhizosphäre“ in der Probe DUN+7 mit je 15 - 16 % gleich stark vertreten, während die Cascade Mountains mit 5 % unterrepräsentiert waren.

#### 4.2.7.3 Effekt der Stickstoffdüngung auf die Denitrifikanten-Gemeinschaft im Dünnwaldboden

Eine Änderung in der Gemeinschaftszusammensetzung denitrifizierender Bakterien im Dünnwaldboden infolge der Düngung konnte auf der Basis der Klonbibliotheken nicht beurteilt werden, weil die verschiedenen Bibliotheken nicht zuverlässig miteinander verglichen werden konnten (3.2.1). Obwohl für beide Flächen insgesamt 363 Klone sequenziert wurden, war schon die Zahl der OTUs, die in mehr als einer Klonbibliothek vertreten waren, durchweg gering (Bild 13, S. 44). Die Schwankungen in den OTU-Zahlen und Diversitätsindices für die einzelnen Klonbibliotheken sind wahrscheinlich zufälliger Natur (Tabelle 5, S. 43). Den Ergebnissen zufolge scheint die Mindestgröße von *nosZ*-Klonbibliotheken für den Dünnwaldboden bei 150 - 250 Klonen zu liegen, um zuverlässig verschiedene Proben vergleichen zu können. Dies hätte aber die Sequenzierung von zusammen mehr als 2000 *nosZ*-Klonen bedeutet, was finanziell und hinsichtlich des Arbeitsaufwandes nicht zu rechtfertigen war. Zudem ist sehr fraglich, ob bei erheblich größeren Klonbibliotheken ein Düngungseffekt feststellbar gewesen wäre, da dieser methodische Ansatz für solche Fragestellungen ungeeignet zu sein scheint.

Das TReFID-Verfahren (2.15) wurde entwickelt, um die Erstellung der Klonbibliotheken zu umgehen. Doch im Falle von *nosZ* half auch TReFID bei der Beurteilung eines Düngungseffektes nicht weiter. Es schien zwar ein Absinken der Diversität von DUN+1 zu DUN+7 und gleichzeitig Verschiebungen in den Gemeinschaftsanteilen zu geben (Bild 33, S. 85), doch in beiden untersuchten Proben fanden sich die gleichen Bakteriengattungen (die TReFID-Methode erlaubt keine Differenzierung von Organismen unterhalb der Gattungsebene; vergleiche Abschnitt 4.2.6). Diese Ergebnisse beruhen nur auf zwei TReFID-Auswertungen und sind entsprechend unsicher. Wie oben diskutiert, waren die wenigen Treffer in der TReFID-Ergebnislisten zu *nosZ* aber durchaus glaubhaft, da sie im Einklang mit den Ergebnissen der *nosZ*-Klonbibliotheken und den TReFID-Auswertungen zu *nifH* und der 16S rDNA. Für die Beurteilung eines Düngungseffektes auf die Zusammensetzung der Denitrifikanten-Gemeinschaft mit dem TReFID-Verfahren hätte

aber ein wesentlich größerer Teil der Gemeinschaft zugänglich sein müssen. Dies war aber aufgrund der Limitationen der Datenbank (4.2.6.2) nicht zu erreichen war, so dass dieser Ansatz bei *nosZ* nicht weiterverfolgt wurde; denn für die übrigen Proben wären keine qualitativ besseren Ergebnisse zu erwarten gewesen.

Nach der Ausgangshypothese (1.3) sollten denitifizierende Bakterien von einem verbesserten  $\text{NO}_3^-$ -Angebot profitieren, was in einem Anstieg der Diversität innerhalb dieser Gemeinschaft hätte resultieren können. Aus den aufgeführten Gründen konnte dies jedoch weder eindeutig bestätigt noch widerlegt werden, obwohl die Ergebnisse darauf hinweisen, dass höchstens geringfügige Änderungen in der Gemeinschaftszusammensetzung erfolgten.

### **4.2.8 Stickstofffixierende Mikroorganismen im Dünwaldboden – Diversität der Gemeinschaft und Einfluß der Düngung auf deren Zusammensetzung**

Die Diversität von stickstofffixierenden Mikroorganismen wurde über das Markergen *nifH* untersucht. Das Genprodukt, die Dinitrogenase-Reduktase, ist zwar nicht unmittelbar an der Reduktion von  $\text{N}_2$  beteiligt, doch hat sich allgemein durchgesetzt, zum Nachweis von Diazotrophie *nifH* zu verwenden (Hennecke *et al.* 1985; Normand und Bousquet 1989; Zehr und McReynolds 1989; Zehr *et al.* 2003). Im Vergleich zu *nosZ* (4.2.7) ist die Diversität diazotropher Mikroorganismen in Umweltproben umfassender erforscht. So liegen Daten zur *nifH*-Diversität in Gewässern (Olson *et al.* 1998b; Zehr *et al.* 1998; Braun *et al.* 1999; Zani *et al.* 2000; Affourtit *et al.* 2001; MacGregor *et al.* 2001; Zehr *et al.* 2001; Jenkins *et al.* 2004; Steward *et al.* 2004a; Steward *et al.* 2004b), in der Tiefsee (Mehta *et al.* 2003), in Sedimenten (Burns *et al.* 2002), in mikrobiellen Krusten, Matten und Stromatolithen (Zehr *et al.* 1995; Olson *et al.* 1998a; Steppe *et al.* 2001; Steppe und Paerl 2002; Yeager *et al.* 2004) und im Termitendarm (Ohkuma *et al.* 1999) vor. Neben aquatischen Proben wurde die Rhizoplane/Rhizosphäre verschiedener Pflanzen besonders intensiv untersucht (Ueda *et al.* 1995b; Bagwell *et al.* 1998; Piceno *et al.* 1999; Bagwell und Lovell 2000; Lovell *et al.* 2000; Zahran 2001; Hamelin *et al.* 2002). Auch für Acker- oder Weideland (Ueda *et al.* 1995b; Poly *et al.* 2001; Demba Diallo *et al.* 2004b), Sumpfland (Chelius und Lepo 1999; Piceno *et al.* 1999) und Endophyten verschiedener Pflanzen (Engelhard *et al.* 2000; Reiter *et al.* 2003) wurde die *nifH*-Diversität erforscht. Für die vorliegende Arbeit von Bedeutung sind aber vor allem die wenigen Publikationen zur Diversität in Waldböden (Widmer *et al.* 1999; Shaffer *et al.* 2000; Poly *et al.* 2001; Rösch *et al.* 2002).

Bei den rezenten *nifH*-Sequenzen gibt es eine beträchtliche Diversität, da die Diazotrophie vermutlich evolutionär sehr alt ist (Raymond *et al.* 2004). Zudem ist das *nifH*-Gen insgesamt nur  $843 \pm 49$  bp lang (Durchschnitt für 49 *nifH*-Komplettsequenzen, nicht dokumentiert). Beides erschwert die Entwicklung „universeller“ PCR-Primer (Zehr *et al.* 2003; Bürgmann *et al.* 2004) und wie bei allen PCR-Primern muss zwischen Spezifität (zur Vermeidung von Artefakten) und Universalität (zur Erfassung der Gesamtdiversität eines Gens) abgewogen werden. Die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene *nifH*-Diversität war geringer als erwartet, möglicherweise aufgrund

einer zu hohen Selektivität der verwendeten Primer. Mehrere unabhängige Untersuchungen (Piceno *et al.* 1999; Hamelin *et al.* 2002; Rösch *et al.* 2002; Zehr *et al.* 2003) ergaben aber ähnliche Befunde. Bei *nifH* und auch bei *nosZ* hätte eine Vorauswahl der zu sequenzierenden Klone (z. B. über RFLP) sinnvoll sein können, um ein größere Zahl an OTUs zu erhalten. Jedoch hätten durch den zusätzlichen Aufwand auch nicht wesentlich mehr Klone untersucht werden können. Hinzu kommt, dass ähnliche Sequenzen häufig das gleiche RFLP-Muster ergeben.

Die *nifH*-OTU#04, deren Sequenzen nahezu identisch zu *nifH* aus *Chroococcidiopsis* PCC 7203 sind, ist vermutlich ein Artefakt; denn dieses Cyanobacterium ist gewöhnlich an Extremstandorten zu finden (Rezanka *et al.* 2003; Sigler *et al.* 2003; Boison *et al.* 2004). Obwohl diese OTU diejenige mit den meisten *nifH*-Sequenzen war und in unabhängigen Klonbibliotheken nachgewiesen wurde (Bild 17, S. 49), wurde *Chroococcidiopsis* über die TReFID-Methode in keiner Dünnwaldprobe gefunden, weder für *nifH* noch für das 16S rRNA-Gen. Da aber auch eine andere OTU, #40, identisch zu einer bereits in der Datenbank veröffentlichten Sequenz (SE2, Bagwell *et al.* 2002) war, wurde die *Chroococcidiopsis*-OTU (#04) trotzdem in die Auswertung eingeschlossen. Die Entscheidung, ob eine aus Umweltproben erhaltene Sequenz ein Artefakt ist oder nicht, kann grundsätzlich nur mit sehr hohem Aufwand getroffen werden (z. B. über PCR mit spezifischen Primern und *in situ*-Hybridisierungen).

#### 4.2.8.1 Zusammensetzung der Gemeinschaft stickstofffixierender Mikroorganismen im Dünnwaldboden und Vergleich der Gemeinschaften verschiedener Standorte (Literaturdaten)

In diesem Abschnitt wird die Dünnwaldgemeinschaft N<sub>2</sub>-fixierender Mikroorganismen für drei ökologische Gruppen analysiert: symbiontische, assoziative und frei-lebende N<sub>2</sub>-Fixierer. Die phylogenetische Analyse der *nifH*-OTUs (3.2.2.3) lieferte hierzu jedoch kaum Daten, da nur zwei OTUs mit einiger Sicherheit taxonomisch eingeordnet werden konnten (siehe unten). Daher beruhen die Aussagen zur Zusammensetzung der Gemeinschaft im wesentlichen auf den TReFID-Ergebnissen zu *nifH* aber auch zur 16S rDNA.

In Böden sind vor allem „Rhizobien“ als N<sub>2</sub>-Fixierer von Bedeutung. Diese umfassen alle Bakterien, die mit Pflanzen aus der Ordnung der Schmetterlingsblütenartigen (Fabales) eine Knöllchensymbiose ausbilden können. Zur Gruppe der „Rhizobien“ gehören die klassischen Alpha-Rhizobien, deren Vertreter sich auf vier bis fünf Familien innerhalb der Rhizobiales (Alphaproteobacteria) verteilen (Moulin *et al.* 2001; Sy *et al.* 2001; Sawada *et al.* 2003; Garrity *et al.* 2004). Seit wenigen Jahren sind zusätzlich noch die aus den Gattungen *Burkholderia* und *Ralstonia/Cupriavidus* (Betaproteobacteria) stammenden Beta-Rhizobien bekannt (Moulin *et al.* 2001; Chen *et al.* 2003). Zwar wuchsen auf und in der Nähe der Versuchsflächen keine potentiellen Wirtspflanzen (Fabales) (2.2.1), doch kommen Rhizobien auch häufig freilebend im Boden vor und sind gewöhnlich nicht an spezifische Wirte gebunden (Zahran 2001).

Die TReFID-Ergebnislisten für die Dünnwaldproben des ersten, zweiten und siebten Zeitpunktes (Bild 32, S. 82) enthielten *nifH*-Sequenzen der Alpha-Rhizobien *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Methylocystis*, *Methylosinus trichosporium*, sowie aus *Burkholderia tuberum*, einem Beta-Rhizo-

bium, das tropische Pflanzen noduliert (Vandamme *et al.* 2002). *Bradyrhizobium* war mit den gleichen sechs tRF-Mustern in den Proben DUN-1/+1 und DUN-7/+7 vertreten. Somit kann zumindest das Vorkommen von *Bradyrhizobium* im Dünnwaldboden als sicher angenommen werden. Dem entspricht, dass diese Gattung auch in den TReFID-Listen zum 16S rRNA-Gen enthalten war, ebenso wie *Rhodopseudomonas*, eine zu *Bradyrhizobium* nahe verwandte Gattung, die durch mehrere *nifH*-tRF-Muster, aber auch durch ein 16S rDNA-tRF-Muster repräsentiert war. Außerdem waren in den 16S rDNA-Listen die (potentiellen) Alpha-Rhizobien *Azorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Devosia* (Rivas *et al.* 2002; Rivas *et al.* 2003), *Methylobacterium* (Sy *et al.* 2001), *Methylocapsa* und *Methylocella* (Dedysh *et al.* 2002), *Methylocystis/Methylosinus* (Dedysh *et al.* 2004) und *Ochrobactrum* (Ngom *et al.* 2004), sowie die Beta-Rhizobien *Burkholderia* und *Ralstonia* vertreten. Stämme dieser Gattungen kommen symbiontisch, aber auch epiphytisch oder freilebend im Boden vor.

Allerdings enthielten die Klonbibliotheken zu *nifH* keine Sequenzen, die sich Rhizobien zuordnen ließen (Bild 20, S. 51; Tabelle 27, Anhang). Ein zu *B. japonicum* verwandtes Bakterium wurde jedoch über eine *nosZ*-OTU nachgewiesen (Bild 16, S. 47). Außerdem lieferten die 16S rDNA-Sequenzen Hinweise auf Rhizobien-verwandte Bakterien im Dünnwald, ohne dass jedoch identifizierbare Rhizobien-Sequenzen selbst erhalten wurden (Bild 37, S. 4, Anhang).

Neben den Rhizobien gibt es weitere symbiontische N<sub>2</sub>-Fixierer, etwa *Frankia* oder bestimmte Cyanobacteria (Werner 1987; Adams 2000), die im Dünnwaldboden über *nifH*-Sequenzen aber nicht nachgewiesen wurden. Jedoch waren in den TReFID-Ergebnislisten zu DUN1 und DUN7 drei bzw. zwei tRF-Muster aus *Frankia* spp. enthalten. Dieser Organismus ist in Mitteleuropa vor allem als Symbiont der Erle von Bedeutung, die, ebenso wie andere potentielle Symbiosepartner, im Dünnwald jedoch nicht vorhanden war (vergleiche Vegetationsaufnahme, Tabelle 2, S. 14). Es wurde aber gezeigt, dass *Frankia* auch frei im Boden vorkommt (Garbeva *et al.* 2003; Gtari *et al.* 2004). Von den beiden cyanobakteriellen *nifH*-OTUs aus dem Dünnwaldboden konnte eines (#05) nicht näher klassifiziert werden, doch OTU#04 war nahezu identisch zu *Chroococcidiopsis*, einem nicht-symbiontischen Cyanobakterium; dieser Befund ist oben diskutiert. Unabhängig hiervon wurden über die TReFID-Auswertung verschiedene Cyanobacteria im Dünnwaldboden identifiziert: *Cyanothece* ATCC 51142 und „*Plectonema boryanum*“ waren durch je ein tRF-Muster in den Proben zu DUN1 und DUN7 vertreten (Bild 32, S. 82). Das Vorkommen dieser Cyanobakterien war für den Dünnwald nicht zu erwarten: der Stamm ATCC 51142 stammte von der texanischen Küste, während andere *Cyanothece*-Stämme aus Reisfeldern oder Süßwasser-Habitaten (Cluster 1 und 2) bzw. aus marinen Algenmatten (Cluster 3) isoliert worden sind (Castenholz 2001). Eine Ähnlichkeit des tRF-Musters von *Cyanothece* zu den Mustern der anderen Cyanobacteria in der Ergebnisliste war jedoch nicht gegeben (undokumentiert), so dass eine Identifizierung dieses Stammes aufgrund hoher Ähnlichkeit zu den anderen Stämmen ausgeschlossen werden kann. Die Identifizierung von *Cyanothece* könnte daher ein Artefakt sein (vergleiche 3.3.2.3 und Diskussion in 4.2.6). Bei „*Plectonema boryanum*“ ist dagegen von einer Identifizierung aufgrund

der Verwandtschaft zu *Nostoc* auszugehen; denn dieses Cyanobakterium hatte bei 6 bis 7 Enzymen das gleiche tRF, wie zwei ebenfalls in den Ergebnislisten enthaltene *Nostoc*-Stämme. *Nostoc* und *Anabaena*, die mit verschiedenen Stämmen in den Ergebnislisten zu DUN-1, DUN+1 und DUN+2, nicht aber in den Listen zu DUN7 enthalten waren, kommen hauptsächlich in Süßwasser vor, aber auch auf oder in Böden (Castenholz 2001). Daneben ist *Nostoc* insbesondere in Symbiose mit Ascomyceten (Flechten), Moosen oder Farnen zu finden (Adams 2000). Aufgrund der TReFID-Ergebnisse kann das Vorkommen dieser oder nahe verwandter Cyanobakterien im Dünnwaldboden mit Sicherheit angenommen werden, auch wenn keine cyanobakteriellen *nifH*-Sequenzen gefunden wurden.

Cyanobacteria waren in den TReFID-Ergebnislisten zum 16S rRNA-Gen stark vertreten (Tabelle 23, S. 89), unter anderem mit mehreren Gattungen, die wenigstens einen diazotrophen Stamm enthalten: *Xenococcus* (Subsektion 2), *Lyngbya*, *Microcoleus* und *Oscillatoria* (alle Subsektion 3), sowie *Anabaena*, *Cylindrospermopsis*, *Cylindrospermum*, *Nodularia* und *Nostoc* (alle Subsektion 4). Die Gattungen der Subsektionen 2 und 3 sind mehrheitlich weltweit verbreitet, allerdings in marinen, Süß- und Brackwasser-Habitaten oder in mikrobiellen Matten (Castenholz 2001). Nur die Vertreter der Subsektion 4 sind darüber hinaus auch in Böden nachgewiesen worden (Castenholz 2001). Möglicherweise sind die Cyanobacteria der ersten Subsektionen fälschlich identifiziert worden, also Artefakte der TReFID-Auswertung (vergleiche Abschnitt 4.2.6). Gerade bei Cyanobacteria sind jedoch viele Stämme fehlerhaft klassifiziert worden (Willmote und Herdman 2001). Die taxonomische Einordnung (RDP II Classifier) der cyanobakteriellen 16S rDNA-Sequenzen in den TReFID-Ergebnislisten ergab 10 Cyanobacteria-Gattungen mit potentiellen N<sub>2</sub>-Fixierern. Nach den GenBank-Klassifizierungen waren jedoch 20 Gattungen mit potentiell diazotrophen Stämmen vertreten. Eine solche Diskrepanz zwischen den GenBank-Annotationen und den RDP II Classifier-Ergebnissen war für die Cyanobacteria einmalig und trat bei keinem anderen Phylum auf (undokumentiert). Die Identifizierung von Bakterien über die TReFID-Methode hängt letztlich aber von den korrekten Annotationen der Sequenzdaten ab, so dass im Falle der Cyanobacteria nicht zu entscheiden ist, welcher Anteil der möglicherweise falsch identifizierten Bakterien auf die TReFID-Methode selbst oder auf falsch annotierte Sequenzen zurückgeht. Eine systematische Analyse würde die phylogenetische Überprüfung jeder einzelnen Datenbank-Sequenz und einen Abgleich mit den Kultursammlungen erfordern. In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, dass in den 16S rDNA-Klonbibliotheken – wie auch oben für die Rhizobien – keine Sequenzen putativer Cyanobacteria gefunden wurden (Bild 26, S. 64).

Eine weitere wichtige Gruppe von Diazotrophen sind mit Pflanzen assoziierte Bakterien wie *Azospirillum* (Alphaproteobacteria), *Herbaspirillum* (Betaproteobacteria), einige *Pseudomonas*-, *Aeromonas*- oder *Serratia*-Arten (Gammaproteobacteria) und auch *Bacillus*- und *Paenibacillus*-Stämme (Werner 1987; Zhang *et al.* 1996; Cattelan *et al.* 1999; Vavrina 1999; Maier *et al.* 2000; Kuklinsky-Sobral *et al.* 2004). Diese bilden keine feste Symbiose mit den Wirtspflanzen, sondern profitieren von den Wurzelexsudaten während sie gleichzeitig für die Pflanzen Nährstoffe (N, P)

mobilisieren, Schutz vor Phytopathogenen bieten und/oder durch Phytohormone das Wurzelwachstum fördern (Bothe *et al.* 1992). Wie bei den Rhizobien konnten auch assoziative Bakterien über *nifH*-Sequenzen nicht eindeutig nachgewiesen werden, obwohl sie sicherlich im Dünnwaldboden vorkamen. Einen Hinweis hierauf lieferten die TReFID-Ergebnislisten zum 16S rRNA-Gen; denn *Azospirillum* und *Pseudomonas* waren mit insgesamt 53 bzw. 86 tRF-Mustern in allen vier untersuchten Proben (DUN-1, DUN+1, DUN-7 und DUN+7) vertreten (nicht dokumentiert). *Herbaspirillum* kam dort nur mit einem einzigen tRF-Muster in der Probe DUN+7 vor. Immerhin wurden auch einige *nosZ*-Sequenzen von *Pseudomonas* spp. gefunden (Bild 33, S. 85), doch diese müssen nicht unbedingt assoziative Bakterien repräsentieren, da unter den derzeit 153 Arten dieser Gattung (Garrity *et al.* 2004) ebenso Phytopathogene sind. Zumindest *P. stutzeri* A15 (= *nosZ*-OTU#02) kann als assoziatives Bakterium bezeichnet werden, denn dieser Stamm ist als N<sub>2</sub>-fixierender Endophyt in Reisswurzeln bekannt (Rediers *et al.* 2003), kommt aber auch in mitteleuropäischen Böden vor. *Bacillus* und *Paenibacillus* (Firmicutes) wurden nur zwei- bzw. einmal in Dünnwaldproben detektiert, und zwar nur über die TReFID-Auswertung von 16S rDNA-Daten. Zur Diskussion von Bacillen in Böden siehe Abschnitt 4.2.9.

Die Ergebnisse mit den Azospirillen-selektiven PCR-Primern (3.2.3.5) lassen keine Aussage bezüglich assoziativer Bakterien zu, da die erhaltenen Sequenzen näher verwandt zu *Stella humosa*, einem (wahrscheinlich) nicht-assoziativen Bodenbakterium (Fritz *et al.* 2004), als zu *Azospirillum* spp. waren. Mit den universellen 16S rDNA-Primern wurden viele OTUs aus der gleichen Verwandtschaft nachgewiesen – hierunter könnten durchaus assoziative, N<sub>2</sub>-fixierende Bakterien zu finden sein. Möglicherweise sind die in einem sauren Waldboden – wie dem Dünnwaldboden – vorkommenden assoziativen Bakterien noch zu wenig charakterisiert, als dass sie hier über Sequenzen hätten nachgewiesen werden können.

Unter den freilebenden Diazotrophen, die nach der *nifH*-TReFID-Auswertung im Dünnwaldboden vorkommen könnten, sind die durch jeweils mehrere tRF-Muster vertretenen Gattungen *Beijerinckia*, *Rhodovulum*, *Rhodobacter* (alle Alphaproteobacteria) und *Vibrio* (Gammaproteobacteria) hervorzuheben. *Beijerinckia* ist als Bodenbakterium bekannt (Fritsche 1998). Die Gattung *Rhodovulum* wurde 1994 von der *Rhodobacter* abgespalten und enthält marine (oder intertidale), zur Photosynthese fähige Bakterien (Hiraishi und Ueda 1994). Die in den Proben DUN+1 und DUN+7 bzw. DUN-1 und DUN+1 identifizierten Bakterien *Methylococcus capsulatus/vinelandii* bzw. „*Methylobacter chroococcum*“ gehören zu den methanotrophen Gammaproteobacteria (nicht zu verwechseln mit den methanotrophen Alpha-Rhizobien, siehe oben) und sind – ebenso wie *Rhodobacter*-Stämme – überwiegend aus Schlamm- und Süßwasser-Habitaten isoliert worden. Weitere, über die TReFID-Analyse von *nifH*-tRFLPs identifizierte Mikroorganismen waren *Alcaligenes faecalis* (Betaproteobacteria), *Azomonas agilis*, *Klebsiella pneumoniae* (beide Gammaproteobacteria), *Clostridium beijerinckii* (Firmicutes), *Leptospirillum ferrooxidans* (Nitrospirae), sowie *Methanobacterium ivanovii* (Euryarchaeota). *A. faecalis*, *K. pneumoniae* und *C. beijerinckii* sind typische Bodenbakterien. *A. agilis* wurde mehrfach aus Flüssen isoliert, doch

kommen andere Arten der Gattung auch in Böden vor (*A. macrocytogenes*; Jensen 1955). *M. ivanovii* ist ein methanogenes Archaeon, das ursprünglich aus einem russischen Ölfeld stammt; eine in Böden vorkommende Art dieser Gattung ist *M. uliginosum* (König 1984). Dieser Befund ist glaubhaft, weil methanogene und methanotrophe Mikroorganismen meist vergesellschaftet vorkommen und methanotrophe Bakterien mehrfach für die Dünnwaldproben identifiziert wurden (siehe oben). *L. ferrooxidans* kommt ausschließlich in metallreichen, extrem sauren Habitaten vor (Garrity und Holt 2001). Die Identifizierung für den Dünnwaldboden ist daher wahrscheinlich ein Artefakt, zumal es keine zu *L. ferrooxidans* unmittelbar verwandten Diazotrophen gibt.

Für alle diese Gattungen konnten in den Klonbibliotheken keine *nifH*-Sequenzen identifiziert werden (vergleiche Bild 20, S. 51 und Tabelle 27, Anhang), doch waren die meisten auch in den TReFID-Ergebnislisten zur 16S rDNA enthalten (*Alcaligenes*, *Beijerinckia*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Rhodovulum*, *Rhodobacter* und *Vibrio*). *Methanobacterium* oder andere Archaeen traten in den 16S rDNA-Klonbibliotheken nicht auf, da die verwendeten PCR-Primer nur das bakterielle Gen erfassten. Zusätzlich enthielten die 16S rDNA-Ergebnislisten noch die folgenden diazotrophen Gattungen, die in den *nifH*-Listen nicht enthalten waren: *Acetobacter*, *Gluconacetobacter*, *Magnetospirillum*, *Rhodospirillum* und *Sphingomonas* (Alphaproteobacteria); *Azoarcus* (Betaproteobacteria); *Erwinia* und *Enterobacter* (Gammaproteobacteria); *Desulfovibrio* (Deltaproteobacteria); *Streptomyces* (Actinobacteria), sowie *Spirochaeta* und *Treponema* (Spirochaetes). Viele dieser Gattungen sind in Böden bzw. der Rhizosphäre, aber auch Gewässern weit verbreitet. Zu den überwiegend in Schlamm oder Süßwasser vorkommenden Gattungen gehören *Magnetospirillum*, *Rhodospirillum* und *Spirochaeta*. Die Gattung *Enterobacter* umfasst hauptsächlich pathogene (*E. aerogenes*, *E. cloacae* und *E. kobei*) und epiphytische (*E. dissolvens*, *E. pyrinus* und *E. radicincitans*), daneben aber auch frei im Boden lebende Bakterien (*E. amnigenus*, *Enterobacter* sp. DSM 15156 und DSM 15213). *Treponema* ist bislang nur als Parasit (und möglicher Kommensale) in Tieren bekannt und daher wahrscheinlich ein Artefakt der TReFID-Auswertung.

Von den 58 Gattungen mit diazotrophen Stämmen, die nach den oben vorgestellten Ergebnissen (*nifH*-Sequenzen, *nifH*-TReFID und 16S rDNA-TReFID) im Dünnwaldboden vorkommen könnten, sind 42 nach derzeitigem Kenntnisstand überwiegend oder wenigstens mit einigen Arten bzw. Stämmen in Böden verbreitet. Die meisten der übrigen 16 Gattungen umfassten ausschließlich als marin oder limnisch bekannte Mikroorganismen (insbesondere Cyanobacteria). Nur bei wenigen (3 bis 8) Gattungen ist von einer fehlerhaften Identifizierung auszugehen.

Unter den potentiellen N<sub>2</sub>-Fixierern im Dünnwaldboden befanden sich 15 Gattungen, die auch zur Denitrifikation fähige Stämme enthalten: *Azospirillum*, *Bradyrhizobium*, *Methylocystis*, *Methylosinus*, *Ochrobactrum*, *Rhizobium*, *Rhodobacter*, *Rhodopseudomonas* und *Sinorhizobium* (alle Alphaproteobacteria); *Burkholderia* und *Ralstonia* (Betaproteobacteria); *Methylococcus* und *Pseudomonas* (Gammaproteobacteria); *Desulfovibrio* (Deltaproteobacteria); *Bacillus* (Firmicutes) und *Streptomyces* (Actinobacteria) (vergleiche Abschnitt 4.2.7).

Die Gemeinschaften diazotropher Mikroorganismen könnte Habitat-spezifisch sein (Poly *et al.* 2001; Burns *et al.* 2002), allerdings weniger stark ausgeprägt als für die Denitrifikanten postuliert (vergleiche Abschnitt 4.2.7). Gleichzeitig könnte ein Teil der N<sub>2</sub>-Fixierer ubiquitär verbreitet sein – vielleicht mit Ausnahme extremer Nischen wie der Tiefsee. Im heißen Wasser eines Tiefseevulkans fanden Mehta *et al.* (2003) *nifH*-Sequenzen von Clostridien und Sulfat-reduzierenden Bakterien, sowie in geringerem Ausmaß von methanogenen Archaea und Proteobacteria. Die Sulfat-reduzierenden Bakterien, wie die Clostridien obligat anaerob, konnten auch in den Därmen verschiedener Termitenspezies (Ohkuma *et al.* 1999) nachgewiesen werden, nicht aber im Dünnwald. Allerdings besiedeln Sulfat-reduzierenden Bakterien auch Reisswurzeln (Scheid und Stubner 2001). Möglicherweise setzen sich diese Gruppen nur in anoxischem Milieu durch und sind sonst, etwa im gut durchlüfteten Sandboden des Dünnwalds, nur in geringen Zelldichten oder gar nicht zu finden. Clostridien konnten durch DNA-Sequenzen nicht nachgewiesen werden, waren aber in den TReFID-Ergebnislisten zum 16S rRNA-Gen vorhanden (vergleiche Tabelle 23, S. 89).

Widmer *et al.* (1999) untersuchten einen Douglasienwald in den Cascade Mountains (Oregon) und stellten dabei eine recht geringe Diversität diazotropher Bakterien im Boden fest. Eine RFLP-Analyse von 64 Klonen ergab lediglich 13 verschiedene Muster. Mit diesem methodischen Ansatz wird die reale Diversität aber leicht unterschätzt, da verschiedene Sequenzen (oder OTUs) das gleiche RFLP-Muster ergeben können. Den letzten Punkt berücksichtigend entspricht die für den Dünnwaldboden gefundene Diversität dem Douglasienwald. Denn nach der Rarefaction-Analyse sind bei 64 sequenzierten Klonen  $20 \pm 6$  OTUs zu erwarten (Bild 18, S. 49). Widmer *et al.* (1999) sequenzierten für jedes distinkte RFLP-Muster exemplarisch einzelne Klone und die Phylogenie dieser Sequenzen ähnelte der Phylogenie der Dünnwald-OTUs: mit einer Ausnahme waren bei Widmer *et al.* (1999) alle *nifH*-Sequenzen alpha- oder betaproteobakteriellen Ursprungs. Auch beim Dünnwald dürften die meisten der *nifH*-Sequenzen aus diesen Gruppen stammen (3.2.2.2). Dieser Befund war unerwartet, da die Diazotrophie in vielen prokaryotischen Gruppen verbreitet ist – allein die Auswahl in Bild 20 umfasst Sequenzen aus Euryarchaeota, Chlorobi, Firmicutes, Actinobacteria, Cyanobacteria und Proteobacteria. Eine Sequenz bei Widmer *et al.* (1999) konnte keiner bekannten taxonomischen Gruppe zugeordnet werden – ähnlich wie verschiedene Dünnwald-OTUs in dieser Arbeit (z. B. *nifH*-OTUs #43 und #44; Bild 20, S. 51). Jedoch könnten diese OTUs auch Bakterien (oder Archaea) ursprünglicher Abstammungslinien repräsentieren. Bei *nosZ* traten keine tiefwurzelnden OTUs auf, was indirekt den frühen Ursprung des *nifH*-Gens bestätigt.

Bemerkenswert ist, dass sich die Gemeinschaft der N<sub>2</sub>-Fixierer im Dünnwald offenbar stark von der im Chorbusch (Rösch *et al.* 2002) unterschied – trotz der geringen Entfernung beider Standorte (etwa 14 km Luftlinie). Bis auf *nifH*-OTU#39, die identisch zur Chorbusch-Sequenz CF052 war, waren alle Dünnwald-OTUs bestenfalls entfernt verwandt zu einer der Chorbusch-Sequenzen. Beide Standorte sind relativ naturnahe Wälder auf sauren Böden im Großraum Köln. Der für die Gemeinschaft der Diazotrophen wahrscheinlich entscheidende Unterschied lag in der Stickstoff-Verfügbarkeit: der Chorbusch war N-reich (C/N-Verhältnis um 8), während der Dünnwald N-limitiert war (C/N um 18) (vergleiche Abschnitt 4.1).

Im Gegensatz zu diesem Befund war die über *nifH*-RFLP untersuchte Gemeinschaft diazotropher Mikroorganismen nach Poly *et al.* (2001) in einem französischen Erlenwaldboden nicht wesentlich anders als in zwei Ackerböden aus Frankreich und dem Senegal – und das, ganz abgesehen von der geographischen Distanz, trotz großer Unterschiede in N-Gehalt und pH-Wert. Dies würde daher eher auf ubiquitäre und nicht auf Habitat-spezifische N<sub>2</sub>-Fixierer hindeuten. Hingegen fanden Shaffer *et al.* (2000) für den auch von Widmer *et al.* (1999) untersuchten Douglasienwald heraus, dass die Abholzung von Waldflächen in einer Veränderung der Gemeinschaftsstruktur diazotropher Mikroorganismen resultierte, was ähnlich wie der Vergleich Chorbusch/Dünnwald ein Hinweis auf Habitat-spezifische Gemeinschaften ist. Die von Poly *et al.* (2001) zusätzlich untersuchten drei Weideböden unterschieden sich allerdings sowohl von dem Wald- und den Ackerböden als auch untereinander. Die Ergebnisse von Poly *et al.* (2001) beruhen im wesentlichen auf statistischen Auswertungen (PCA) von *nifH*-RFLP-Mustern. Die wenigen sequenzierten Klone ließen sich wie bei Widmer *et al.* (1999) und Rösch *et al.* (2002) den Proteobacteria zuordnen.

Hervorzuheben ist hier, dass die N<sub>2</sub>-Fixierungsrate nicht unbedingt mit der Gemeinschaftsstruktur (und Diversität) diazotropher Mikroorganismen korrelieren muss (Poly *et al.* 2001). Dies könnte eine Folge des von Bagwell und Lovell (2000) beschriebenen Konzepts der funktionellen Redundanz sein. Aus der Rhizosphäre von *Spartina alterniflora* (Poaceae), einem aus Nordamerika stammenden Gras der Salzmarschen, konnten mehrfach entfernt verwandte N<sub>2</sub>-Fixierer isoliert werden, die ähnliches Substratnutzungsverhalten zeigten. Die gleiche ökologische Funktion könnte so von verschiedenen Bakterien ausgeübt werden, was eine kontinuierliche N<sub>2</sub>-Fixierung auch unter sich stark ändernden Umweltbedingungen ermöglichen könnte.

Zusammen genommen deuten die Ergebnisse aus der Auswertung der Dünnwald *nifH*-Klonbibliotheken und die der zitierten Literatur darauf hin, dass die im Dünnwaldboden – und eventuell in allen Böden – dominierenden N<sub>2</sub>-Fixierer (Alpha-)Proteobacteria sind. Über die TReFID-Auswertungen der *nifH*-tRFLPs selbst, sowie der 16S rDNA-tRFLPs, konnte eine Liste von potentiellen N<sub>2</sub>-Fixierern im Dünnwald zusammengestellt werden. Allerdings erlaubt die TReFID-Methode keine Differenzierung von Arten oder Stämmen innerhalb einer Gattung (4.2.6). Die tatsächlich im Boden vorkommenden Mikroorganismen werden daher im seltensten Fall genau die sein, deren Sequenzen in den TReFID-Listen enthalten waren, sondern verwandte Arten oder Stämme. Bei den Organismen aus dem Dünnwaldboden handelte es sich vermutlich nicht um die typischen Laborstämme, sondern um bisher unbekannte Bakterien bzw. um bekannte Bakterien, deren *nifH*-Sequenzen unbekannt sind.

Die Auswertung der zu Beginn dieses Kapitels zitierten Untersuchungen zu Diazotrophen in Umweltproben und die Ergebnisse für den Dünnwald deuten darauf hin, dass die Gemeinschaft der N<sub>2</sub>-Fixierer Habitat-spezifisch, gleichzeitig innerhalb des jeweiligen Habitats aber Veränderungen gegenüber relativ unempfindlich zu sein scheint. Einzelne Arten wie *Azospirillum brasilense* oder *Pseudomonas stutzeri* dürften aber dennoch ubiquitär sein.

#### 4.2.8.2 Effekt der Stickstoff-Düngung auf die Gemeinschaft stickstofffixierender Mikroorganismen

Der Effekt der Stickstoffdüngung auf die Gemeinschaft N<sub>2</sub>-fixierender Mikroorganismen im Dünnwaldboden ließ sich über die Cluster-Analysen der *nifH*-Klonbibliotheken (3.2.2.2) und der tRFLP-Profile (3.3.3.1), sowie über das TReFID-Verfahren bewerten (3.3.3.1). Die Cluster-Analysen der Klonbibliotheken ließen eher einen jahreszeitlichen als einen Düngungseffekt vermuten (4.2.5). Auch bei der Cluster-Analyse der 25 tRFLP-Experimente (Bild 31, S. 80) schien ein möglicher Düngungseffekt durch einen Jahreszeiteffekt überlagert zu sein. Dieser Effekt war bei *nifH* stärker ausgeprägt als bei *nosZ* (vergleiche Bild 15, S. 45), aber resultierte auch hier nicht in einer absoluten Aufspaltung in nach Zeitpunkten oder Flächen getrennte Gemeinschaften. Eine jahreszeitliche Veränderung der Diazotrophen-Gemeinschaft hätte – wie auch im Falle der Denitrifikanten und der Gesamtgemeinschaft – nur durch die Beobachtung der Versuchsflächen über mehrere Jahre bestätigt werden können.

Demgegenüber zeigten die TReFID-Auswertungen der kombinierten tRF-Daten für die einzelnen Proben scheinbar einen deutlichen Düngungseffekt (Bild 32a, S. 82). Die Diversität und die Zusammensetzung der Gemeinschaft war in beiden Flächen vor der ersten Düngung gleich. Außerdem war der größte Teil der tRF-Muster (58 %) in beiden Flächen vertreten. Eine solche Verteilung entsprach der Erwartung für vergleichbare, benachbarte Flächen. Zum zweiten Zeitpunkt war die Verteilung der tRF-Muster auf die Flächen aber bereits völlig anders; denn von den insgesamt 154 verschiedenen tRF-Mustern in DUN2 waren nur 67 in der Kontrollfläche, aber 123 in der gedüngten Fläche vertreten und lediglich ein Viertel der 154 Muster kam in beiden Flächen vor. Die Proben zu DUN2 unterschieden sich von denen zu DUN1 und DUN7 darin, dass nur tRF-Daten von 11 Restriktionsenzymen ausgewertet wurden (Tabelle 17, S. 80). In Abschnitt 4.2.6.1 wurde auf die Vergleichbarkeit von tRFLP-Experimenten mit unterschiedlicher Zahl von Restriktionsenzymen hingewiesen. Die scheinbare Reduzierung der Diversität aufgrund der geringeren tRF-Musterzahlen im Vergleich zu DUN1 ist aber darauf zurückzuführen, dass mit weniger Enzymen auch weniger tRF-Muster unterscheidbar sind (4.2.6.1). Das Ungleichgewicht der Muster-Verteilung verstärkte sich zum letzten Zeitpunkt (DUN7), zu dem von insgesamt 194 tRF-Mustern 183 in der gedüngten und 82 in der Kontrollfläche nachgewiesen wurden. Hervorzuheben ist, dass keineswegs ein Anstieg der Diversität infolge der Düngung erfolgte, sondern dass vielmehr die Diversität in der Kontrollfläche stark absank. Die Zahl der tRF-Muster für die gedüngte Fläche blieb nahezu konstant (189 bei DUN1 und 183 bei DUN7), während die Ergebnislisten für die Kontrollfläche zum letzten Zeitpunkt weniger als die Hälfte der ursprünglichen Muster beinhalteten (180 bei DUN1 und 82 bei DUN7). Erwartet wurde aber eine Konstanz bei der Kontrollfläche und eventuell ein Absinken der Diversität in der gedüngten Fläche. Die Ergebnisse können nur so interpretiert werden, dass die Gemeinschaft in der Kontrollfläche unbekanntem Störungen unterlag, die bei der gedüngten Fläche entweder fehlten oder durch den Eingriff der Düngung ausgeglichen wurden.

Die Anteile verschiedener Organismengruppen änderten sich bei der TReFID-Auswertung von DUN1 zu DUN7 nicht wesentlich. In beiden Proben lag der Anteil der identifizierten Mikroorganismen bei 17 % (Anteil in der TReFID-Datenbank 11 %), auch wenn bei DUN7 viele dieser Organismen nur noch für die gedüngte Fläche nachgewiesen werden konnten (Bild 32). Der Anteil der tRF-Muster von Dünnwaldsequenzen ging von 39 % (DUN1) auf 30 % (DUN7) zurück, während der Anteil der Muster von Sequenzen sonstiger Umweltproben von 45 % auf 52 % anstieg. Dies war eine Folge des Diversitätsverlustes in der Kontrollfläche, doch eine Veränderung in der Zusammensetzung der Gemeinschaft von DUN+1 nach DUN+7 kann daraus nicht gefolgert werden; Bild 32 (S. 82) zeigt im Gegenteil eine zu beiden Zeitpunkten fast identische Zusammensetzung (mittlere und rechte Säulen zusammengenommen).

In allen Proben lag der Anteil der tRF-Muster von Sequenzen unidentifizierter Organismen zwischen 82 - 83 % (DUN-1, DUN+1 und DUN+7) und 94 % (DUN-2 und DUN-7). Diese Muster wurden für Bild 32 (S. 82) nach Herkunft der Sequenzen aufgeschlüsselt. Dabei zeigte sich, dass die aus Dünnwald-Sequenzen stammenden tRF-Muster in jeder Probe die größte Fraktion stellten. Dies weist darauf hin, dass – der Erwartung entsprechend – keiner der anderen untersuchten Standorte größere Ähnlichkeit zum Dünnwald hinsichtlich der Gemeinschaft diazotropher Organismen hatte. In den einzelnen Proben waren allerdings nicht solche tRF-Muster am stärksten vertreten, die Sequenzen der gleichen Proben repräsentierten: Muster von DUN+1-Sequenzen waren nicht bevorzugt in der TReFID-Ergebnisliste zu DUN+1 zu finden. Dies entspricht aber auch der Verteilung der Sequenzen auf die OTUs und damit dem Bild, das sich aus dem Phylogramm (Bild 20, S. 51) ergibt: die Gemeinschaften der beiden Versuchsflächen waren nicht distinkt, sondern überschritten zu einem gewissen Teil. Die zweitgrößte Fraktion in den TReFID-Ergebnislisten stellten tRF-Muster von Sequenzen aus der Rhizosphäre des Schlickgrases *Spartina alterniflora* (Kalifornische Küste). Dieses Habitat war in keiner Beziehung mit dem Dünnwald vergleichbar, doch galt dies ebenso für die übrigen Umweltproben, die in den TReFID-Ergebnislisten vertreten waren (Reiswurzeln, tropische Seegraswiese, Tiefsee und Termitendarm; Bild 32). Einzig der Standort Chorbusch war ein Wald, wenn auch mit anderer Vegetation und anderen Bodeneigenschaften (Rösch *et al.* 2002), und daher mit dem Dünnwald vergleichbar. Dass nur wenige Chorbusch-Sequenzen in den Ergebnislisten enthalten waren lag aber nicht an mangelhafter Übereinstimmung der beiden Standorte, sondern daran, dass es insgesamt nur 12 Chorbusch-Sequenzen gab – im Vergleich zu 500 Dünnwald-Sequenzen (vergleiche Abschnitt 4.2.6).

Nach den Ergebnissen zu den *nifH*-Klonbibliotheken (3.2.2) schien die Diversität in der später gedüngten Fläche vor Beginn des Düngungsversuches höher gewesen zu sein, als die der Kontrollfläche. Im Vergleich mit den TReFID-Ergebnissen könnte dies aber auch so interpretiert werden, dass die Klonbibliotheken nicht repräsentativ – und zu wenig umfangreich – waren (vergleiche Abschnitt 4.2.4) und sich daher der Verlust der Diversität in der Kontrollfläche fälschlicherweise als Anstieg in der gedüngten Fläche darstellte. Da die TReFID-Ergebnisse auf mehrere tRFLP-Experimente zurückgehen (Tabelle 16, S. 80) und die Klonbibliotheken in ihren Eigenschaften

sehr verschieden waren (Tabelle 6, S. 48), scheint das TReFID-Ergebnis zuverlässiger zu sein, obwohl es nicht der Erwartung entspricht.

### 4.2.9 Bakterielle Gesamdiversität im Dünnwaldboden

Die Gesamtdiversität der Bakteriengemeinschaft im Dünnwaldboden wurde anhand des 16S rRNA-Gens untersucht (Woese und Fox 1977; Woese 1987). Dies war erforderlich, weil die Düngung die Diversität der Gesamtgemeinschaft, aber nicht die der Denitrifikanten und N<sub>2</sub>-Fixierer hätte beeinflussen können. In diesem Abschnitt werden die relativen Anteile verschiedener bakterieller Gruppen im Dünnwaldboden analysiert und mit anderen Böden verglichen. Außerdem wird der Effekt der Düngung auf die Gesamtgemeinschaft bewertet. Ergebnisse zu den 16S rDNA-Klonbibliotheken und den TReFID-Auswertungen, die potentielle N<sub>2</sub>-Fixierer und Denitrifikanten betreffen sind in den Abschnitten 4.2.7 und 4.2.8 diskutiert.

Das 16S rRNA-Gen unterscheidet sich von *nosZ* und *nifH* darin, dass ein Bakterienstamm bis zu 15 verschiedene Genkopien enthalten kann (Fogel *et al.* 1999; Acinas *et al.* 2004b), was in entsprechend vielen und in Ausnahmefällen um bis zu 8 % divergierenden 16S rDNA-Sequenzen resultieren kann (Mylvaganam und Dennis 1992; Wang *et al.* 1997; Yap *et al.* 1999; Turova *et al.* 2001). Für die vorliegende Arbeit musste aber angenommen werden, dass jede OTU, also jede Gruppe von Sequenzen, die um höchstens 2 % divergierten, ein anderes Bakterium repräsentierte. Das Ergebnis einer phylogenetischen Analyse von 16S rDNA-Sequenzen wird auch durch die Wahl des Genbereichs beeinflusst, da es innerhalb des Gens hypervariable bis stark konservierte Bereiche gibt. In der vorliegenden Untersuchung wurde der ca. 700 nt lange 63/778-Bereich phylogenetisch ausgewertet (3.2.3.5), um die mit den drei Primerpaaren (27F/1495R, 63f/1387r und 63f/778R; Tabelle 3, S. 18) gewonnenen Sequenzen direkt miteinander vergleichen zu können. Auf die Interpretation von 16S rDNA-Daten bezüglich der Prokaryoten-Phylogenie kann an dieser Stelle nicht eingegangen werden. Statt dessen sei auf Creevey *et al.* (2004) und Acinas *et al.* (2004a) verwiesen.

#### 4.2.9.1 Diskussion der verwendeten PCR-Primer zur partiellen Amplifizierung des 16S rRNA-Gens

Zur Konstruktion der Klonbibliotheken wurden drei verschiedene Primerpaare eingesetzt, die für das bakterielle 16S rRNA-Gen spezifisch waren. Archaea konnten damit nicht erfasst werden. In der Diskussion wird daher nicht auf die Archaea eingegangen, obwohl sie einen bedeutenden Anteil der Mikroorganismen im Boden stellen (Bintrim *et al.* 1997; Purdy *et al.* 2004; Sliwinski und Goodman 2004; Treusch *et al.* 2004). Die Primer 27F und 1495R dienten – teilweise unter anderen Bezeichnungen – bereits mehrfach zur Analyse der Diversität von Bodenbakterien (Kuske *et al.* 1997; Dunbar *et al.* 1999; Nogales *et al.* 2001; Dunbar *et al.* 2002; Liles *et al.* 2003; Demba Diallo *et al.* 2004a). Für andere Untersuchungen wurde der gleiche Reverseprimer, aber ein weiter mittig im 16S rRNA-Gen gelegener Forwardprimer (530F) verwendet (Borneman *et al.* 1996;

Borneman und Triplett 1997). Axelrood *et al.* (2002b), die eine umfangreiche Charakterisierung der Bodenbakterien eines kanadischen Nadelwaldes durchführten, benutzten 7F und 1511R..

In der vorliegenden Arbeit erwies sich das Paar 27F/1495R den beiden anderen Primerpaaren als überlegen, da die Diversität in der 27F/1495R-Klonbibliothek erheblich größer war, als in der 63f/1387r- oder 63f/778R-Bibliothek (3.2.3.3). Das Primerpaar 63f/1387r (Marchesi *et al.* 1998) wurde der Empfehlung von Osborn *et al.* (2000) folgend für die tRFLP eingesetzt. Daher wurde die TReFID-Datenbank zum 16S rRNA-Gen für den 63f-Primer entwickelt (vergleiche Abschnitt 4.2.6.2). Es wurden zusätzlich Klonbibliotheken mit 63f/1387r erstellt, um einen direkten Vergleich von tRFLP- mit Sequenzdaten zu ermöglichen. Der Primer 1387r wurde auch in einer anderen Untersuchung angewendet (McCaig *et al.* 1999). Der Reverseprimer 778R wurde für diese Arbeit entwickelt, liegt aber in einem Bereich, für den es bereits ähnliche Primer gab. Die etwa 700 bp langen 63f/778R-Klone liessen sich in ein oder zwei Sequenzreaktionen komplett sequenzieren – bei 27F/1495R waren dagegen zwei bis vier Sequenzreaktionen nötig. Da nur die ersten 500 nt bei tRFLP-Experimenten ausgewertet werden konnten (2.14), waren die 63f/778R-Sequenzen für Vergleiche ausreichend. Die beiden Primerpaare 63f/1387r und 63f/778R lieferten aber auch eine Vielzahl von Sequenzen (aus 98 verschiedenen OTUs), die nicht mit 27F/1495R erhalten wurden (Bild 24, S. 55). Überhaupt war die Zahl der OTUs, die mit mehr als einem Primerpaar erhalten wurden, erstaunlich gering (3.2.3.3), sicherlich als Folge der hohen Diversität. Möglicherweise hätten nur genügend weitere Klone sequenziert werden müssen, um die erwähnten 98 OTUs mit 27F/1495R auch noch zu finden. Zwar fehlt in den Sequenzen, die mit dem 63f-Primer beginnen, die Bindungsstelle für 27F, doch kann trotzdem davon ausgegangen werden, dass sämtliche Gene, die mit 63f partiell amplifiziert worden sind, auch mit 27F hätten amplifiziert werden können. Zumindest ist umgekehrt die 63f-Bindungsstelle in allen 27F-Sequenzen eindeutig zu identifizieren und die Ergebnisse zur Diversität der Klonbibliotheken implizieren, dass der Primer 27F „universeller“ ist als 63f – oder umgekehrt, dass 63f restriktiver amplifiziert.

Die „Azospirillen“ und „Rhizobien“, die zum großen Teil denitrifizieren und N<sub>2</sub> fixieren können, sollten mit Gruppen-spezifischen PCR-Primern nachgewiesen werden (Tabelle 3, S. 18). Wie zuvor gezeigt worden ist (C. Rösch, Diplomarbeit 2001), sind diese Primer jedoch nicht absolut spezifisch, was unter anderem daran liegt, dass die „Rhizobien“ auch im engeren Sinne kein monophyletisches Taxon darstellen, sondern auf verschiedene Familien innerhalb der Alphaproteobacteria verteilt sind (4.2.8). Mit den selektiven Primern konnten für den Dünnwaldboden keine bekannten *Azospirillum* spp. (Rhodospirillaceae) oder Rhizobien *sensu stricto* (Rhizobiaceae und Bradyrhizobiaceae) nachgewiesen werden, dafür aber einige in diese Verwandtschaft gehörende Bakterien (3.2.3.5). Dies lag wahrscheinlich weniger an einer mangelhaften Eignung der Primer oder am Fehlen dieser Bakterien im Dünnwald, sondern daran, dass nur sehr wenige Sequenzen (je 12) ausgewertet wurden. Vier der fünf „Azospirillen“-OTUs waren verwandt zu *Stella humosa* (Bild 43, S. 10, Anhang). Ob es sich dabei aber um Sequenzen der gleichen Bakterien handelte,

die mit den „universellen“ 16S rDNA-Primern nachgewiesen wurden (Bild 38, S. 5, Anhang), ließ sich nicht feststellen, da die Sequenzen verschiedene Genbereiche abdeckten. Das Vorkommen von Azospirillen und Rhizobien im Dünnwaldboden wurde in den Abschnitten 4.2.7 und 4.2.8 diskutiert.

### 4.2.9.2 Zusammensetzung der bakteriellen Gesamtdiversität im Dünnwaldboden

Die meisten 16S rDNA-OTUs aus dem Dünnwald ließen sich, anders als bei *nosZ* und *nifH*, zweifelsfrei einem der bekannten bakteriellen Phyla zuordnen (Übersicht in Tabelle 29, Anhang; Abschnitt 2.12.1 zur Methode). Auf der Ebene der Ordnung war eine solche Zuordnung noch für drei Viertel der OTUs möglich; bei hoher Sicherheit der Klassifizierung ( $\geq 90\%$ ) nur noch für zwei Drittel der OTUs. Nach Tabelle 29 (Anhang) konnten zwar 33 - 45 % der Dünnwald-OTUs bis zur Gattung klassifiziert werden, doch sind diese Werte durch die Acidobacteria-OTUs verfälscht. *Acidobacterium capsulatum* ist seit etwa 15 Jahren bekannt (Kishimoto *et al.* 1991) und wurde vor zehn Jahren als *type strain* des Phylums Acidobacteria definiert (Hiraishi *et al.* 1995). Nach Garrity *et al.* (2004) umfasst das Phylum Acidobacteria aktuell drei (kultivierte) Arten, die alle in eine Familie (Acidobacteriaceae) gestellt werden: *Acidobacterium capsulatum* (Kishimoto *et al.* 1991), *Geothrix fermentans* (Coates *et al.* 1999) und *Holophaga foetida* (Liesack *et al.* 1994). Der RDP II Classifier ordnete aber alle OTUs, die in das Phylum Acidobacteria gehörten, der Art *A. capsulatum* zu. Wie in Bild 40 (S. 7, Anhang) zu sehen ist, gab es jedoch innerhalb der „Acidobacteria-OTUs“ eine erhebliche Diversität, so dass sie keinesfalls zur gleichen Art gehören können – allein die 47 OTUs, die in der Untergruppe von *A. capsulatum* standen (Untergruppe A), hatten nur eine durchschnittliche Homologie von  $91,9 \pm 2,9\%$  zum *type strain*. Wenn die Werte in Tabelle 29 (Anhang) bezüglich der Acidobacteria bereinigt werden, sind nur noch 7 - 17 % der OTUs bis zur Gattung klassifizierbar.

Selbst auf der Grundlage von 16S rDNA-Sequenzen, die die Hauptrolle bei der modernen bakteriellen Taxonomie spielen (Woese 1987; Ludwig und Klenk 2001), ließ sich also nur ein Bruchteil der Dünnwald-OTUs bekannten Bakterien zuweisen. Krave *et al.* (2002) konnten einen ungewöhnlich hohen Anteil von Sequenzen aus einem Waldboden bis auf die Artebene klassifizieren (24 von 75 Klone). Doch in der Regel liegt der Anteil ähnlich niedrig wie für den Dünnwald (Übersicht in Hugenholtz *et al.* (1998), Buckley und Schmidt (2002) und Schloss und Handelsman (2004). Dennoch waren die 16S rDNA-Bibliotheken wichtig, um neben der Abschätzung der bakteriellen Gesamtdiversität auch einen Einblick in die Zusammensetzung der Gemeinschaft bei der Versuchsflächen zu erhalten (vergleiche Bild 26, S. 64).

Eine alternative Methode, die Zusammensetzung der Gesamtgemeinschaft im Dünnwaldboden darzustellen, bot das TReFID-Verfahren. Hierbei wurden jeweils mehrere tRFLP-Experimente zu den Proben DUN-1/+1 und DUN-7/+7 (Tabelle 20, S. 87) ausgewertet. Abweichend von den Auswertungen zu *nosZ* und *nifH* wurden die Treffer aus den TReFID-Ergebnislisten anhand ihrer Sequenzen mit dem RDP II Classifier taxonomisch eingeordnet (Tabelle 23, S. 89). Die Übersicht in Tabelle 23 spiegelt die Bakteriengemeinschaft des Dünnwaldbodens am umfassendsten und wahr-

scheinlich auch am akkuratesten wider; denn die 16S rDNA-Klonbibliotheken umfassten für alle Dünnwaldproben zusammen nur 211 OTUs aus 11 bakteriellen Klassen (Bild 26, S. 64), während die TReFID-Ergebnisliste für DUN-1 allein schon 814 tRF-Muster von Bakterien aus 16 Klassen beinhaltete (Tabelle 22, S. 87). Bei *nifH* und *nosZ* waren die Referenzdatenbanken weit weniger umfangreich, als bei der 16S rDNA (3.3.1) und deren Sequenzen aus Umweltproben ließen sich in aller Regel keiner taxonomischen Gruppe zuordnen (vergleiche 4.2.7 und 4.2.8).

Für das 16S rRNA-Gen ist aber ein direkter Vergleich der OTU- bzw. tRF-Verteilungen auf die einzelnen Taxa möglich, da die als Ergebnis erhaltenen Sequenzen bei beiden Ansätzen auf gleiche Weise mit dem RDP II Classifier ausgewertet werden konnten. Da für jede einzelne Dünnwaldprobe nur wenige OTUs vorlagen, wurden die Klonbibliotheken für die verschiedenen Zeitpunkte derselben Fläche zusammengefasst (Bild 26b, S. 64). Die TReFID-Ergebnislisten konnten dagegen für jede Probe separat ausgewertet werden (Tabelle 23, S. 89 und Bild 35, S. 91).

Der Anteil der unklassifizierbaren OTUs betrug für beide Flächen 13 %. Bei den tRF-Mustern lag der entsprechende Anteil in den vier Proben (DUN-1, +1, -7 und +7) zwischen 6 % und 7 % und war damit nur halb so groß, wie für die OTUs. Dies war aber darauf zurückzuführen, dass die Sequenzen identifizierter Bakterien in der TReFID-Datenbank gegenüber der GenBank überrepräsentiert waren (Tabelle 12, S. 72). Bei den OTU-Auswertungen (Bild 26b) waren vor allem die hohen Anteile der Alphaproteobacteria und Acidobacteria auffällig: 43 % bzw. 27 % bei der Kontrollfläche (DUN-) und 39 % bzw. 30 % bei der gedüngten Fläche (DUN+). Die Dominanz der Alphaproteobacteria konnte zumindest für die Kontrollfläche über die TReFID-Auswertungen bestätigt werden; denn der Anteil von tRF-Mustern dieser Klasse betrug 62 % bei DUN-1 und 43 % bei DUN-7. Die Acidobacteria waren allerdings mit je 11 % zu beiden Zeitpunkten weniger stark repräsentiert, als nach den OTU-Verteilungen zu erwarten war. Dies kann daran gelegen haben, dass ein einziges OTU mehrere tRF-Muster umfassen kann, insbesondere in Taxa wie den Alphaproteobacteria, die viele nahe verwandte Organismen umfassen (siehe auch Abschnitt 4.2.6). Die Divergenz zwischen zwei zufällig ausgewählten Acidobacteria-Sequenzen ist im Durchschnitt größer, als zwischen zwei Alphaproteobacteria-Sequenzen, was bedeutet, dass letztere eher das gleiche tRF-Muster ergeben (nicht dokumentiert). Allerdings könnte das Mißverhältnis auch auf die unterschiedlichen Anteile von Sequenzen dieser beiden Klassen in der TReFID-Datenbank zurückzuführen sein; denn der Anteil der Alphaproteobacteria in der Datenbank lag den GenBank-Annotationen der entsprechenden Sequenzen zufolge bei 9,5 % (2.019 von 21.290 Einträgen), der der Acidobacteria aber nur bei 2,4 % (509 Einträge) (Tabelle 12, S. 72). In jedem Fall waren aber sowohl die Alphaproteobacteria als auch die Acidobacteria in den TReFID-Listen zu DUN-1 und DUN-7 überproportional vertreten. Das bedeutet, dass solche Organismen im Dünnwaldboden in größerer Diversität vorkommen, als nach den GenBank-Daten zu erwarten gewesen wäre.

Während sich die OTU-Verteilungen der beiden Flächen sehr ähnelten (Bild 26b), gab es bei den tRF-Mustern aber einen sehr deutlichen Unterschied zwischen der gedüngten und der ungedüng-

ten Fläche. In den Proben DUN+1 und DUN+7 stellten tRF-Muster von Betaproteobacteria 8,8 % und 17,2 % der Ergebnislisten; dies entsprach dem 18- bzw. 13-fachen der Anteile für DUN-1 und DUN-7. Gammaproteobacteria waren in DUN+1 mit 14,2 % und in DUN+7 mit 14,7 % vertreten, was etwa dem doppelten Anteil von DUN-1 und DUN-7 entsprach. Der Gesamtanteil der Proteobacteria war in den Proben der gedüngten Fläche aber ebenso hoch wie in denen der Kontrollfläche, da der Anteil der Alphaproteobacteria bei DUN+1 und DUN+7 entsprechend geringer war (vergleiche Tabelle 25, unten). Bezüglich der Gammaproteobacteria war auffallend, dass die Anteile an tRF-Mustern in der Kontrollfläche (DUN-1 und DUN-7) genauso hoch waren, wie die Anteile der OTUs in beiden Flächen (DUN- und DUN+), nämlich immer ~ 7 %. Das gleiche galt für die Betaproteobacteria, nur lag der Anteil hier zwischen 0 % und 1,7 %. Diese Anteile von ~ 7 % bzw. < 2 % entsprachen eher den zu erwartenden Anteilen, als die mit dem TReFID-Verfahren für DUN+1 und DUN+7 festgestellten (vergleiche Tabelle 25, unten). Doch ähnelten sich die Verteilungen für DUN+1 und DUN+7 zu sehr, als dass die Abweichungen zu den Verteilungen für die Kontrollfläche Folge zufälliger oder systematischer Auswertefehler gewesen sein konnten. Hinzu kommt, dass die Ergebnisse von DUN+1 und DUN+7 unabhängig voneinander erhalten wurden: die Bodenproben stammten von verschiedenen Zeitpunkten, die PCRs wurden mit zeitlichem Abstand durchgeführt, bei der tRFLP zu DUN+1 wurden 9 im Gegensatz zu 13 Restriktionsenzymen bei DUN+7 verwendet und die Ergebnisse zu DUN+1 basierten auf drei, die zu DUN+7 aber auf sechs verschiedenen tRFLP-Experimenten (Tabelle 21, S. 87). Daher mußte davon ausgegangen werden, dass die TReFID-Ergebnisse die reale Zusammensetzung der Gemeinschaft im Boden der gedüngten Fläche wirklichkeitsnäher wiedergaben, als die in Bild 26b (S. 64) dargestellten OTU-Auswertungen. Jedenfalls waren die beiden Flächen den TReFID-Ergebnissen zufolge keineswegs miteinander vergleichbar – was im Widerspruch zu den Ergebnissen der Bodenanalysen (4.1) aber auch der TReFID-Auswertungen zu *nifH* steht (4.2.8).

Die in der Literatur angegebenen Anteile bakterieller Phyla an der Gesamtgemeinschaft der Bodenbakterien schwanken stark. In Tabelle 25 ist ein Vergleich der Anteile für den Dünnwaldboden mit den gemittelten Anteilen anderer mesophiler Böden dargestellt – die ausgewerteten Publikationen sind in der Legende zu Tabelle 25 aufgeführt (vergleiche auch Bild 26, S. 64). Ähnliche Übersichten sind bei Hugenholtz *et al.* (1998) und Buckley und Schmidt (2002) zu finden. Für *nosZ* (4.2.7) und *nifH* (4.2.8) waren solche Vergleiche aufgrund der geringen Datengrundlage und der Schwierigkeiten bei der Klassifizierung von Sequenzen aus Umweltproben nicht möglich.

Die hohen Standardabweichungen bei den Vergleichswerten (Tabelle 25) spiegeln die extremen Unterschiede zwischen den einzelnen Publikationen wider. Diese sind darauf zurückzuführen, dass zur Erstellung der Klonbibliotheken verschiedene Verfahren zur DNA-Extraktion, teilweise andere PCR-Primer (vergleiche oben) und andere PCR-Bedingungen Verwendung fanden. Auch beeinflusste die Größe der Klonbibliothek das Ergebnis. Bei der Kultivierung hing das Ergebnis vor allem von der Wahl des Mediums (C- und N-Quellen, pH-Wert, Spurenelemente) und den Inkubationsbedingungen ab (aerob/mikroaerob/anaerob, Temperatur). Nicht zuletzt erfolgte die

Klassifizierung der erhaltenen Sequenzen oder Isolate nach unterschiedlichen Methoden (für die Dünnwald-Sequenzen und tRF-Muster: RDP II Classifier, 2.12.1). Direkte Vergleiche zwischen Standorten sind daher schwierig und für niedere taxonomische Ebenen wie Ordnungen oder Familien unmöglich (vergleiche Unsicherheit der Klassifizierung von Sequenzen, Tabelle 29, Anhang). Dies zeigt den dringenden Bedarf nach einer Methode zur reproduzierbaren und umfassenden Charakterisierung von Bakteriengemeinschaften aus Umweltproben. Hierzu sollte die Entwicklung des TReFID-Verfahrens beitragen.

In den meisten Böden dominieren Proteo- und Acidobacteria (Tabelle 25, unten) – im Dünnwaldboden waren dies gleichzeitig auch die Gruppen mit der höchsten Diversität. Die Acidobacteria *sensu lato* gehören zu den „unkultivierbaren“ (vergleiche Abschnitt 1.1.3) Bakterien, so dass über diese Gruppe wenig bekannt ist (Buckley und Schmidt 2002). Felske *et al.* (2000) bestimmten den Anteil von Acidobacteria-Ribosomen in einem Graslandboden (Niederlande) zu 7 - 14 % aller bakterieller Ribosomen. Nach den Literaturdaten (Tabelle 25) stellen Acidobacteria mit  $32 \pm 23$  % etwa ein Drittel der Sequenzen in 16S rDNA-Klonbibliotheken. Dem entspricht der Anteil von 28,9 % für die Dünnwald-Bibliothek. Aber in den TReFID-Auswertungen lag der Acidobacteria-Anteil mit 8,4 - 10,7 % deutlich niedriger als erwartet. Wie bereits an anderer Stelle in diesem Abschnitt diskutiert wurde (siehe oben), war dies vermutlich darauf zurückzuführen, dass die TReFID-Datenbank bevorzugt identifizierte Bakterien enthielt. Die Alphaproteobacteria hingegen sind sehr gut charakterisiert und etwa drei Viertel aller publizierten 16S rDNA-Sequenzen dieser Gruppe stammen von kultivierten Bakterien (Buckley und Schmidt 2002). In Abschnitt 4.2.8 wurde die Hypothese aufgestellt, dass der Großteil der N<sub>2</sub>-Fixierer zu den Alphaproteobacteria gehören könnte. Umgekehrt dürfte aber der Großteil der Alphaproteobacteria kein *nifH* haben; denn nur sehr wenige der Sequenzen aus Umweltproben zeigen Verwandtschaft zu bekannten Diazotrophen. Bisher scheinen alle molekularen Daten darauf hinzudeuten, dass die meisten Bodenbakterien nicht die Fähigkeit zur N<sub>2</sub>-Fixierung oder zu Denitrifikation haben (vergleiche Rösch *et al.* 2002). Die Anteile der Alphaproteobacteria in der Dünnwald-Klonbibliothek (39,8 %) und bei den TReFID-Ergebnissen (31,8 % bzw. 52,4 %) lagen aber deutlich über dem Vergleichswert von  $10 \pm 14$  % (Tabelle 25). Diese Diskrepanz könnte auf den geringen Anteil der Gram-positiven Bakterien im Dünnwald zurückzuführen sein. Die Firmicutes und Actinobacteria schienen im Dünnwaldboden beide unterrepräsentiert zu sein: deren Anteile betragen bei der Klonbibliothek 0,9 % bzw. 5,7 % und bei den TReFID-Ergebnissen 1,1 - 2,9 % bzw. 0,4 - 1,9 %. In den Klonbibliotheken der Vergleichsböden (Tabelle 25) hatten diese Gruppen mit  $10 \pm 14$  % bzw.  $7 \pm 13$  % oft größere Anteile (vergleiche auch Hugenholtz *et al.* 1998 und Buckley und Schmidt 2002). Das Beispiel der Gram-positiven Bakterien zeigt, welche große Unterschiede bei den Anteilen bakterieller Phyla auftreten können, auch wenn dies im wesentlichen methodisch bedingt sein kann, da die Diversität in jedem Boden unter anderen Bedingungen bestimmt wurde (eine oder wiederholte Bodenentnahme, beprobte Fläche und Bodentiefe, Rhizosphäre oder *bulk soil*, Auswahl der PCR-Primer, Selektierung zu sequenzierender Klone über RFLP, Auswertung von Sequenzen oder OTUs, OTU-Kriterium etc.).

Die zwei Dünnwald-OTUs aus der Gruppe der Firmicutes gehörten in die Klasse Clostridia und nicht in die *Bacillus/Paenibacillus*-Gruppe, deren Vertreter im Boden häufig vorkommen sollen (Felske *et al.* 2003; Felske *et al.* 2004; Heyrman *et al.* 2004; Tzeneva *et al.* 2004). Allerdings ver-

**Tabelle 25: Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft im Dünnwaldboden im Vergleich mit anderen Böden (Literaturdaten)**

Phylum	Anteil an der Gesamtgemeinschaft				
	Dünnwald		Literaturdaten (14 Publikationen)		
	Klonbib.	TReFID (- / +)	Klonbib.	Isolate	Referenz <sup>1, 2</sup>
Thermomicrobia	0,5 %	--- / < 0,1 %	---	---	---
Nitrospira	---	0,1 % / 0,2 %	0 ± 1 %	---	effff / ---
Cyanobacteria (inkl. Plastiden)	---	9,1 % / 6,3 %	1 ± 1 %	---	abcijm / ---
Proteobacteria <sup>3</sup>	47,4 %	64,8 % / 62,8 %	29 ± 21 %	43 ± 39 %	abbcdeffffjjkkllmn / aeh
– Alphaproteobacteria	39,8 %	52,4 % / 31,8 %	10 ± 14 %	8 ± 16 %	abbcddikkllmn / h
– Betaproteobacteria	0,9 %	0,9 % / 13,0 %	4 ± 6 %	2 ± 3 %	acddikkllm / ah
– Gammaproteobacteria	6,6 %	7,0 % / 14,5 %	5 ± 11 %	9 ± 17 %	abcdikkllmn / ah
– Deltaproteobacteria	---	0,3 % / 0,3 %	1 ± 2 %	---	abbcikk / ---
Firmicutes	0,9 %	1,1 % / 2,9 %	10 ± 14 %	28 ± 43 %	abbcddijjkklln / ahn
Actinobacteria	5,7 %	0,4 % / 1,9 %	7 ± 13 %	17 ± 20 %	abcdijjkl / ah
Planctomycetes	0,5 %	0,2 % / 0,6 %	1 ± 2 %	< 1 %	abeffffijkm / h
Chlamydia	---	< 0,1 % / ---	0 ± 1 %	---	bc / ---
Acidobacteria	28,9 %	10,7 % / 8,4 %	32 ± 23 %	5 ± 6 %	abbcdeffffjjkkllmn / hn
Bacteroidetes	1,9 %	2,0 % / 5,0 %	6 ± 6 %	3 ± 2 %	abbcffffjjkkll / aeh
Verrucomicrobia	---	< 0,1% / < 0,1%	5 ± 5 %	< 1 %	abbeffffkkl / h
Gemmatimonadetes	1,4 %	0,2 % / 0,2 %	0 ± 1 %	< 1 %	kk / h
andere Phyla (nur für TReFID)	---	5,0 % / 4,9 %	---	---	---
unklassifiziert	12,8 %	6,4 % / 6,8 %	8 ± 9 %	5 ± 10 %	abbcffffijlm / a

*Legende zu Tabelle 25:* Für den Dünnwaldboden ist links die Verteilung der insgesamt 211 OTUs aus der für beide Versuchsfelder kombinierten 16S rDNA-Klonbibliothek (Klonbib.) auf die verschiedenen bakteriellen Phyla bzw. die proteobakteriellen Klassen angegeben (zwischen der gedüngten und der ungedüngten Fläche gab es nur geringfügige Unterschiede; vergleiche Bild 26, S. 64). Die rechte Dünnwald-Spalte zeigt die mittleren Anteile der tRF-Muster aus den TReFID-Auswertungen für die Kontrollfläche (DUN-1 und DUN-7; vor dem Schrägstrich) bzw. die gedüngte Fläche (DUN+1 und DUN+7; nach dem Schrägstrich) (vergleiche Bild 35, S. 91). Unter den „anderen Phyla“ waren Epsilonproteobacteria und Spirochaetes am stärksten vertreten (vergleiche Tabelle 23, S. 89). Den Dünnwaldwerten gegenübergestellt sind die mittleren Anteile (mit Standardabweichung), die aus den Angaben in 14 Veröffentlichungen berechnet wurden. Diese Daten stammten überwiegend aus Wald- oder Waldlandböden. Die Angaben für kultivierte Bakterien (Isolate) beruhen auf nur vier der 14 Veröffentlichungen. Für nähere Angaben siehe Literaturnachweise unten. Die Bezeichnungen der Phyla folgen den Empfehlungen von Garrity *et al.* (2004).

<sup>1</sup> a Axelrood *et al.* 2002a und Axelrood *et al.* 2002b – b Borneman *et al.* 1996 – c Borneman und Triplett 1997 – d Demba Diallo *et al.* 2004a – e Dunbar *et al.* 1999 – f Dunbar *et al.* 2002 – h Joseph *et al.* 2003 – i Krave *et al.* 2002 – j Kuske *et al.* 1997 – k Liles *et al.* 2003 – l McCaig *et al.* 1999 – m Nogales *et al.* 2001 – n Rösch *et al.* 2002.

<sup>2</sup> In einigen Publikationen wurden mehr als ein Standort/eine Probe untersucht. Aus diesem Grunde können einzelne Kürzel mehrfach bei einem Phylum auftreten.

---

<sup>3</sup> Angaben zu den proteobakteriellen Klassen fehlten in manchen Publikationen.

---

glichen Liles *et al.* (2003) für dieselbe Bodenprobe eine 16S rDNA- und eine BAC-Bibliothek und fanden dabei *Bacillus* spp. in der 16S rDNA-Bibliothek stark überrepräsentiert. Obwohl den Gram-positiven Bakterien im Dünnwald mit 14 von 211 OTUs nur wenige OTUs zugerechnet werden konnten, wurde innerhalb dieser Gruppe eine erhebliche Diversität abgedeckt: die mittlere paarweise Homologie betrug lediglich  $78,6 \pm 7,2$  % (3.2.3.4). Bemerkenswert ist auch die Diskrepanz zwischen den Anteilen dieser Gruppe in Klonbibliotheken und bei den kultivierten Isolaten. Dies ist sicher eine Folge der relativ problemlosen Isolierung von vielen Bacillen und Actinobacteria (Dunbar *et al.* 1999; Felske *et al.* 1999; Rösch *et al.* 2002). Dennoch deutet ein Vergleich mit 16S rRNA-Klonbibliotheken darauf hin, dass die Actinobacteria im Boden dominanter sind, als über die 16S rDNA-Bibliotheken zu erwarten wäre (Gremion *et al.* 2003) und Aktivität von Actinobacteria in Böden wurde auch von Felske *et al.* (1997) berichtet.

Die Anteile der übrigen Phyla entsprachen mit drei Ausnahmen den Erwartungen. Die Thermomicrobia, im Dünnwald über eine einzige OTU und ein tRF-Muster nachgewiesen, waren in den Klonbibliotheken der übrigen Böden nicht vertreten (Tabelle 25). Ähnliches galt für die Chlamydiae, die mit einem tRF-Muster in der Probe DUN-7 vertreten waren, aber in keinem anderen Boden nachgewiesen wurden. Andererseits waren die Verrucomicrobia für den Dünnwaldboden nur durch zwei tRF-Muster und keine Sequenz vertreten, obwohl sie in den meisten der Vergleichsböden in Anteilen von  $5 \pm 5$  % vorkamen (Tabelle 25; siehe auch Hugenholtz *et al.* 1998 und Buckley und Schmidt 2002). Es ist auffällig, dass Cyanobacteria-Sequenzen nur sehr selten in Böden nachgewiesen werden (Tabelle 25 und Hugenholtz *et al.* 1998). Den TReFID-Auswertungen zufolge lag deren tRF-Musteranteil im Dünnwaldboden bei 6 - 9 %. Die Klonbibliotheken enthielten keine cyanobakteriellen 16S rDNA-Sequenzen, doch dafür zu zwei Cyanobacteria-OTUs gehörende *nifH*-Sequenzen (4.2.8). Dass Cyanobacteria bei Untersuchungen zur Gesamtdiversität selten in Böden nachgewiesen werden, obwohl sie ubiquitär, auch in Waldböden der gemäßigten Klimazone, vorkommen (Maier *et al.* 2000; Castenholz 2001; Dyer 2003), könnte unter anderem an geringen Zelldichten liegen. Unerwartet war auch, dass im Dünnwald keine Plastiden- oder Mitochondriensequenzen gefunden wurden. Möglicherweise lag dies daran, dass die Menge bakterieller DNA in wurzelfreiem Boden wesentlich höher liegt als die aller Eukaryoten; die Biomasse von Pilzen ist zwar höher als die der Bakterien, doch enthalten Pilzhyphen auf die Masse bezogen viel weniger DNA als Bakterien (Zitat Borneman *et al.* 1996). In keiner der ausgewerteten Studien wurden Vertreter der Aquificae, Thermotogae, Thermodesulfobacteria, Chrysiogenetes, Fusobacteria oder Dictyoglomi gefunden. Bakterien aus diesen Phyla kommen daher möglicherweise nicht in mesophilen Böden vor. Auf der anderen Seite wurden Sequenzen von Chloroflexi, Spirochaeten oder von Bakterien aus dem Phylum „Deinococcus-Thermus“ in wenigen Studien in Böden nachgewiesen (Hugenholtz *et al.* 1998). Die ersten beiden Phyla waren auch in den TReFID-Ergebnislisten zum Dünnwaldboden (Tabelle 23), aber nicht in den Klonbibliotheken vertreten. Daher erscheint es durchaus möglich, dass in Böden alle bekannten – inklusive der nicht

zu erwartenden genannten – Phyla vertreten sein könnten, nur in sehr unterschiedlich starken Anteilen. Die in Tabelle 25 als „unklassifiziert“ bezeichneten Sequenzen könnten überdies neue, noch nicht benannte oder im Falle vom Dünnwald bisher gänzlich unbekannte Phyla repräsentieren (vergleiche auch Tabelle 29, Anhang).

### 4.2.9.3 Effekt der Stickstoffdüngung auf die Zusammensetzung der bakteriellen Gesamtgemeinschaft im Dünnwaldboden

Nach der Cluster-Analyse von 16S rDNA-Klonbibliotheken hatte die Düngung keinen Einfluß auf die Zusammensetzung der Gemeinschaften (4.2.5). Dem entsprachen im wesentlichen die Verteilungen der OTUs verschiedener bakterieller Klassen auf die gedüngte bzw. ungedüngte Fläche (Bild 26, S. 64). Dort gab es allenfalls minimale Unterschiede in den Anteilen der verschiedenen Klassen. Es wäre aber auch nicht zu erwarten, dass durch die Düngung Taxa auf so hoher taxonomischer Ebene (Klasse) neu auftreten bzw. verschwinden würden. Vielmehr sollte sich ein Düngungseffekt auf niedrigerer Ebene nachweisen lassen. Ein wie in Bild 26 gezeigter Vergleich für Familien oder gar Gattungen war im Falle der Klonbibliotheken aber nicht durchführbar, weil es zu wenige Gemeinsamkeiten zwischen den einzelnen Bibliotheken gab (3.2.3). Dass der Acidobacteria-Anteil in der gedüngten Fläche auf Kosten des Alphaproteobacteria-Anteils etwas erhöht war (Bild 26, S. 64), könnte bedeuten, dass die Alphaproteobacteria als Gruppe durch die Düngung beeinträchtigt wurden, doch kann die Ursache dieses Effekts auch in nicht-repräsentativen Klonbibliotheken liegen und damit zufallsbedingt sein (siehe oben).

Das Ergebnis der Cluster-Analyse von verschiedenen tRFLP-Experimenten zur 16S rDNA im Dünnwaldboden (Bild 34, S. 87) entsprach dem der Cluster-Analyse von Klonbibliotheken (Bild 23, S. 55) darin, dass es auch hier einen jahreszeitlichen Effekt zu geben schien. Bezüglich der tRFLP-Experimente war auffällig, dass die Proben der Kontrollfläche zum siebten Zeitpunkt einander ähnlicher waren, als die der gedüngten Fläche und von diesen auch überwiegend getrennt gruppierten. Allerdings gab es nach der Cluster-Analyse auch schon erhebliche Unterschiede zwischen den Proben des ersten Zeitpunktes. Die TReFID-Analyse ergab jedoch ein überraschendes Bild: während die 16S rDNA-Diversität, gemessen an der Zahl unterschiedlicher tRF-Muster in den TReFID-Ergebnislisten, zum ersten Zeitpunkt für die später gedüngte Fläche erheblich größer war, als für die Kontrollfläche, gab es zum siebten Zeitpunkt diesbezüglich keinen Unterschied mehr (Tabelle 22, S. 87; Bild 35, S. 91). Allein die Anzahl der tRF-Muster betrachtend, spiegelt der siebte Zeitpunkt den Zustand wieder, der vor der Düngung erwartet worden wäre; denn in beiden Flächen waren gleich viele tRF-Muster vertreten und der Anteil der beiden Flächen gemeinsamen Muster war mit 23 % relativ gering. Ein ähnliches Bild ergab sich bei der *nifH*-Auswertung für den ersten Zeitpunkt (Bild 32a, S. 82), wobei dort der gemeinsame Anteil mit 58 % erheblich höher war. Da die Gesamtdiversität bei der 16S rDNA im Vergleich zu *nifH* aber wesentlich höher war (vergleiche Rarefaction-Analysen und Diversitätsindices in Abschnitt 3.2), entsprach dies ganz der Erwartung.

Aufschluß über einen Düngungseffekt bietet auch die Verteilung der aus Dünnwald-Sequenzen abgeleiteten tRF-Muster in den TReFID-Ergebnislisten (Bild 36, S. 93). In den Proben des ersten Zeitpunktes waren noch drei Viertel dieser Muster sowohl in der Liste zu DUN-1 als auch in der zu DUN+1 vertreten. Zum letzten Zeitpunkt war dieser Anteil jedoch auf 40 % geschrumpft. Hingegen änderten sich die tRF-Muster der GenBank-Sequenzen nur wenig bezüglich des beiden Flächen gemeinsamen Anteils; dafür ist an letzteren deutlich der Rückgang der Diversität in der Kontrollfläche von DUN-1 nach DUN-7 zu erkennen: der Anteil der tRF-Muster, die nur in der Kontrollfläche vorkamen ging stark zurück (Bild 36). Offensichtlich gab es hier also eine Störung in der gedüngten Fläche, die eindeutig auf die Düngung zurückzuführen war.

Den TReFID-Auswertungen zur 16S rDNA zufolge schien sich die Düngung also negativ auf die Diversität der Bodenbakterien ausgewirkt zu haben, während die Kontrollfläche unbeeinflusst blieb (vergleiche Tabelle 22). Möglicherweise war es Zufall, dass die tRF-Musterzahl für die gedüngte Fläche zum siebten Zeitpunkt beinahe gleich hoch war wie der er. Doch ist nicht zu erklären, warum die Diversität in der später gedüngten Fläche zum ersten Zeitpunkt um so viel höher lag, als die der Kontrollfläche. Nach den Bodenanalysen waren die Flächen völlig vergleichbar (4.1) und unterschieden sich auch in der Vegetation kaum (Tabelle 2, S. 14). Wie in Bild 35 (S. 91) zu erkennen ist, unterschied sich die Gemeinschaft der gedüngten Fläche aber stark in ihrer Zusammensetzung von der der Kontrollfläche, etwa im Anteil der Gammaproteobacteria. Da diese Unterschiede bei beiden Zeitpunkten gleichermaßen auftraten, war ein Düngungseffekt hier auszuschließen (vergleiche 4.2.9.2). Auch eine falsche Auswertung aufgrund von tRFLP- und/oder TReFID-Artefakten sollte hier auszuschließen sein; denn die Unterschiede in den Anteilen bakterieller Klassen wurden für beide Flächen völlig unabhängig erhalten (3.3.3.3).

Ein Vergleich mit Literaturdaten hätte Aufschluss geben können, welcher Einfluß auf die Zusammensetzung der Gemeinschaften infolge der Düngung zu erwarten gewesen wäre. Doch wurde für Waldböden bisher nicht untersucht, wie sich Stickstoffdüngung diesbezüglich auswirkt. Die Ergebnisse für den Dünnwald konnten daher nicht mit anderen Waldböden verglichen, sondern nur an der Ausgangshypothese gemessen werden (vergleiche Abschnitt 1.3).

Eine vergleichbare Untersuchung gab es allerdings für Graslandböden (McCaig *et al.* 1999). Bohannon und Hughes (2003) leiteten aus den Ergebnisse von McCaig *et al.* (1999) ab, dass es keinen Düngungseffekt gab. Die Diversität der Bakteriengemeinschaft war nicht beeinflusst, jedoch könnte sich die Zusammensetzung der Gemeinschaft infolge der Düngung leicht verschoben haben. Diese Schlußfolgerung beruhte – ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit – auf verschiedenen Methoden (siehe Tabelle 1 in Bohannon und Hughes 2003) und entspricht dem Ergebnis für den Dünnwaldboden. Die Gemeinschaft nitrifizierender Bakterien in einem Graslandboden (California) reagierte auf N-Düngung mit veränderten Nitrifikationsraten aber auch durch Verschiebungen in der Zusammensetzung der Gemeinschaft (Horz *et al.* 2004). Infolge der Düngung er-

langten Bakterien aus der Verwandtschaft von *Nitrospira* Dominanz, was einen Verlust an Diversität bedeutete. In einer anderen Arbeit (Gulledge *et al.* 2004) wurde die Methan-Aufnahme in gedüngten Waldböden untersucht. Dabei wurden zwar Aktivitätsänderungen infolge der Düngung gemessen (der Methankonsum sank), doch Diversität und Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft wurden nicht untersucht.

---

## 5 Zusammenfassung

Im Vordergrund dieser Arbeit stand die Entwicklung einer neuartigen Methode, um mikrobielle Gemeinschaften aus Umweltproben schnell und umfassend charakterisieren zu können. Die bisherigen methodischen Ansätze lieferten entweder Informationen über die Identität der Organismen in einer kleinen Stichprobe (z. B. Sequenzieren von Klonbibliotheken), oder sie demonstrierten die Diversität, ohne dass die Organismen identifiziert werden können (z. B. Erstellen von Gemeinschafts-Profilen). In dem hier vorgestellten Ansatz wurde eine Methode zur Erstellung solcher Profile (tRFLP) mit einer automatisierten Auswertung über das hierfür entwickelte Computerprogramm (TReFID) verbunden. In der Auswertung werden die experimentell erhaltenen Profile mit eigens erstellten Datenbanken abgeglichen, um Organismenlisten von untersuchten Proben zu erstellen. Es wurden drei Datenbanken erstellt:

- (1) zur Charakterisierung denitrifizierender Mikroorganismen: *nosZ*-Datenbank (607 Einträge)
- (2) zur Charakterisierung stickstofffixierender Mikroorganismen: *nifH*-Datenbank (1318 Einträge)
- (3) zur Charakterisierung der bakteriellen Gesamtgemeinschaft: 16S rDNA-Datenb. (22145 Einträge)

Speziell für das 16S rRNA-Gen wurde somit einumfangreicher Datensatz erarbeitet. Damit ist es jetzt unter Verwendung der TReFID-Programms möglich geworden, mikrobielle Lebensgemeinschaften von beliebigen Standorten umfassend zu charakterisieren. Eine Evaluierung der TReFID-Methode anhand verschiedener Kontrollen zeigte, dass die Methode zur Analyse von (Umwelt-)Gemeinschaften geeignet ist. Die TReFID-Methode wurde exemplarisch auf einen Waldboden angewandt, um dort den Effekt von Stickstoffdüngung auf die mikrobielle Gemeinschaft zu untersuchen. Hierfür wurden zwei Versuchsflächen im Dünnwald (Köln) ausgewählt, dessen Boden Stickstoff-limitiert war. Eine der beiden Versuchsflächen wurde mehrfach gedüngt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde Bodenproben entnommen und analysiert. Mit der TReFID-Methode wurde der Effekt der Düngung auf die bakterielle Gesamtgemeinschaft und auf die Teilgemeinschaften stickstofffixierender und denitrifizierender Mikroorganismen untersucht.

Die Anwendung auf den Dünnwaldboden ergab unerwartete Befunde:

Die *nifH*-Diversität war in beiden Versuchsflächen anfangs gleich; doch nach der Düngung war die Diversität in der Kontrollfläche herabgesetzt und in der gedüngten Fläche unverändert. Im Falle der 16S rDNA wies die später gedüngte Fläche anfangs eine wesentlich höhere Diversität auf, aber infolge der Düngung sank diese auf das Niveau der Kontrollfläche. Zur Charakterisierung der Diversität von Denitrifikanten war die TReFID-Methode nur eingeschränkt geeignet, da zu wenige Sequenzen dieses Gens bekannt sind und die Datengrundlage für TReFID entsprechend klein war.

Da jedoch bisher keine vergleichbaren Untersuchungen durchgeführt wurden, ist eine objektive Bewertung dieser Befunde nicht möglich. Die vorliegende Arbeit ist ein erster Versuch, aus der Kombination von tRFLP-Profilen mit Datenbanken die Gemeinschaft denitrifizierender oder N<sub>2</sub>-fixierender Mikroorganismen eines Umweltstandortes zu beschreiben. Das TReFID-Verfahren wurde inzwischen mit Erfolg zur Charakterisierung der mikrobiellen Gemeinschaft im Salzgradienten einer Binnensalzstelle angewandt (Diplomarbeit S. Eilmus, 2005).

## 6 Literatur

- ACINAS, S. G., V. KLEPAC-CERAJ, D. E. HUNT, C. PHARINO, I. CERAJ, D. L. DISTEL und M. F. POLZ (2004a). Fine-scale phylogenetic architecture of a complex bacterial community. *Nature*. **430**(6999): 551-4.
- ACINAS, S. G., L. A. MARCELINO, V. KLEPAC-CERAJ und M. F. POLZ (2004b). Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple *rrn* operons. *J Bacteriol*. **186**(9): 2629-35.
- ADAMS, D. G. (2000). Symbiotic Interactions. In: The Ecology of Cyanobacteria. B. A. Whitton und M. Potts, Kluwer: 523-61.
- AFFOURTIT, J., J. P. ZEHR und H. W. PAERL (2001). Distribution of Nitrogen-Fixing Microorganisms along the Neuse River Estuary, North Carolina. *Microb Ecol*. **41**(2): 114-23.
- ALFREIDER, A., C. VOGT und W. BABEL (2002). Microbial diversity in an in situ reactor system treating monochlorobenzene contaminated groundwater as revealed by 16S ribosomal DNA analysis. *Syst Appl Microbiol*. **25**(2): 232-40.
- ALTSCHUL, S. F., W. GISH, W. MILLER, E. W. MYERS und D. J. LIPMAN (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. **215**(3): 403-10.
- AMANN, R. L., W. LUDWIG und K. H. SCHLEIFER (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev*. **59**(1): 143-69.
- ANJUM, M. F., T. M. STEVANIN, R. C. READ und J. W. MOIR (2002). Nitric oxide metabolism in *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol*. **184**(11): 2987-93.
- AXELROOD, P. E., M. L. CHOW, C. S. ARNOLD, K. LU, J. M. MCDERMOTT und J. DAVIES (2002a). Cultivation-dependent characterization of bacterial diversity from British Columbia forest soils subjected to disturbance. *Can J Microbiol*. **48**(7): 643-54.
- AXELROOD, P. E., M. L. CHOW, C. C. RADOMSKI, J. M. MCDERMOTT und J. DAVIES (2002b). Molecular characterization of bacterial diversity from British Columbia forest soils subjected to disturbance. *Can J Microbiol*. **48**(7): 655-74.
- BAGWELL, C. E., J. R. LA ROCQUE, G. W. SMITH, S. W. POLSON, M. J. FRIEZ, J. W. LONGSHORE und C. R. LOVELL (2002). Molecular diversity of diazotrophs in oligotrophic tropical seagrass bed communities. *FEMS Microbiol Ecol*. **39**(2): 113-9.
- BAGWELL, C. E. und C. R. LOVELL (2000). Microdiversity of Culturable Diazotrophs from the Rhizoplanes of the Salt Marsh Grasses *Spartina alterniflora* and *Juncus roemerianus*. *Microb Ecol*. **39**(2): 128-36.
- BAGWELL, C. E., Y. M. PICENO, A. ASHBURNE-LUCAS und C. R. LOVELL (1998). Physiological diversity of the rhizosphere diazotroph assemblages of selected salt marsh grasses. *Appl Environ Microbiol*. **64**(11): 4276-82.
- BAKERMANS, C. und E. L. MADSEN (2002). Diversity of 16S rDNA and naphthalene dioxygenase genes from coal-tar-waste-contaminated aquifer waters. *Microb Ecol*. **44**(2): 95-106.
- BEGON, M., J. L. HARPER und C. R. TOWNSEND (1991). Ökologie. Basel, Birkhäuser.
- BENHIZIA, Y., H. BENHIZIA, A. BENGUEDOUAR, R. MURESU, A. GIACOMINI und A. SQUARTINI (2004). Gamma proteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. *Syst Appl Microbiol*. **27**(4): 462-8.
- BENSON, D. A., I. KARSCH-MIZRACHI, D. J. LIPMAN, J. OSTELL, B. A. RAPP und D. L. WHEELER (2000). GenBank. *Nucl Acids Res*. **28**(1): 15-8.
- BESEMER, K., M. M. MOESENEDER, J. M. ARRIETA, G. J. HERNDL und P. PEDUZZI (2005). Complexity of bacterial communities in a river-floodplain system (Danube, Austria). *Appl Environ Microbiol*. **71**(2): 609-20.
- BINTRIM, S. B., T. J. DONOHUE, J. HANDELSMAN, G. P. ROBERTS und R. M. GOODMAN (1997). Molecular phylogeny of Archaea from soil. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **94**(1): 277-82.
- BIRNBOIM, H. C. und J. DOLY (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*. **7**(6): 1513-23.

- BOHANNAN, B. J. M. und J. HUGHES (2003). New approaches to analyzing microbial biodiversity data. *Curr Opin Microbiol.* **6**: 282-7.
- BOISON, G., A. MERGEL, H. JOLKVER und H. BOTHE (2004). Bacterial life and dinitrogen fixation at a gypsum rock. *Appl Environ Microbiol.* **70**(12): 7070-7.
- BOND, P. L., S. P. SMRIGA und J. F. BANFIELD (2000). Phylogeny of microorganisms populating a thick, subaerial, predominantly lithotrophic biofilm at an extreme acid mine drainage site. *Appl Environ Microbiol.* **66**(9): 3842-9.
- BORNEMAN, J., P. W. SKROCH, K. M. O'SULLIVAN, J. A. PALUS, N. G. RUMJANEK, J. L. JANSEN, J. NIENHUIS und E. W. TRIPLETT (1996). Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. *Appl Environ Microbiol.* **62**(6): 1935-43.
- BORNEMAN, J. und E. W. TRIPLETT (1997). Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Appl Environ Microbiol.* **63**(7): 2647-53.
- BOTERO, L. M., M. D. BURR, D. WILLITS, J. G. ELKINS, W. P. INSKEEP und T. R. MCDERMOTT (2001). Prokaryote diversity in an extreme thermal soil. *Unveröffentlicht. (GenBank-Eintrag)*.
- BOTHE, H. (1999). Photosynthetischer Stickstoff-, Schwefel- und Wasserstoffmetabolismus. *In: Photosynthese. D.-P. Häder.* Stuttgart, Thieme: 183-93.
- BOTHE, H., G. JOST, M. SCHLOTTER, B. B. WARD und K.-P. WITZEL (2000). Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments. *FEMS Microbiology Reviews.* **24**(5): 673-90.
- BOTHE, H., H. KÖRSGEN, T. LEHMACHER und H. HUNDESHAGEN (1992). Differential effects of *Azospirillum*, auxin and combined nitrogen on growth of the roots of wheat. *Symbiosis.* **13**(167-179).
- BRAKER, G., H. L. AYALA-DEL-RIO, A. H. DEVOL, A. FESEFELDT und J. M. TIEDJE (2001). Community Structure of Denitrifiers, Bacteria, and Archaea along Redox Gradients in Pacific Northwest Marine Sediments by Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Amplified Nitrite Reductase (*nirS*) and 16S rRNA Genes. *Appl Environ Microbiol.* **66**(5): 2096-104.
- BRAKER, G. und J. M. TIEDJE (2003). Nitric oxide reductase (*norB*) genes from pure cultures and environmental samples. *Appl Environ Microbiol.* **69**(6): 3476-83.
- BRAKER, G., J. ZHOU, L. WU, A. H. DEVOL und J. M. TIEDJE (2000). Nitrite Reductase Genes (*nirK* and *nirS*) as Functional Markers To Investigate Diversity of Denitrifying Bacteria in Pacific Northwest Marine Sediment Communities. *Appl Environ Microbiol.* **66**(5): 2096-104.
- BRAUN-BLANQUET, J. (1964). Pflanzensoziologie - Grundzüge der Vegetationskunde. Heidelberg, Springer.
- BRAUN, S., L. PROCTOR, S. ZANI, M. T. MELLON und J. P. ZEHR (1999). Molecular evidence for zooplankton-associated nitrogen-fixing anaerobes based on amplification of the *nifH* gene. *FEMS Microbiol Ecol.* **28**(3): 273-9.
- BRENNER, D. J., J. T. STALEY und N. R. KRIEG (2001). Classification of Prokaryotic Organisms and the Concept of Bacterial Speciation. *In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* D. R. Boone und R. W. Castenholz. New York, Heidelberg, Berlin, Springer. **1**: 27-31.
- BRETTAR, I., R. CHRISTEN und M. G. HOFLE (2003). *Shewanella denitrificans* sp. nov., a vigorously denitrifying bacterium isolated from the oxic-anoxic interface of the Gotland Deep in the central Baltic Sea. *Int J Syst Evol Microbiol.* **552**(2211-2217).
- BROFFT, J. E., J. V. MCARTHUR und L. J. SHIMKETS (2002). Recovery of novel bacterial diversity from a forested wetland impacted by reject coal. *Environ Microbiol.* **4**(11): 764-9.
- BROWN, M. M., M. J. FRIEZ und C. R. LOVELL (2003). Expression of *nifH* genes by diazotrophic bacteria in the rhizosphere of short form *Spartina alterniflora*. *FEMS Microbiol Ecol.* **43**: 411-7.
- BRUNS, J. (2004). Biodiversität von Bodenbakterien in einem Stickstoff-gedüngten - sowie in einem Kontroll-Waldboden der Mittelterrasse des Rheins. *Schriftliche Hausarbeit im Rahmen der Ersten Staatsprüfung für die Lehramter*, Botanisches Institut. Köln, Universität zu Köln.

- BUCKLEY, D. H. und T. M. SCHMIDT (2002). Exploring the diversity of soil - a microbial rainforest. *In: Biodiversity of Microbial Life: Foundation of Earth's Biosphere.* J. T. Staley und A.-L. Reysenbach. New York, Wiley-Liss: 183-208.
- BÜRGMANN, H., F. WIDMER, W. VON SIGLER und J. ZEYER (2004). New molecular screening tools for analysis of free-living diazotrophs in soil. *Appl Environ Microbiol.* **70**(1): 240-7.
- BURNS, J. A., J. P. ZEHR und D. G. CAPONE (2002). Nitrogen-fixing phylotypes of Chesapeake Bay and Neuse River estuary sediments. *Microb Ecol.* **44**(4): 336-43.
- CABELLO, P., M. D. ROLDÁN und C. MORENO-VIVIÁN (2004). Nitrate reduction and the nitrogen cycle in archaea. *Microbiology.* **150**(Pt 11): 3527-46.
- CASTENHOLZ, R. W. (2001). Phylum BX. Cyanobacteria - Oxygenic Photosynthetic Bacteria. *In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* D. R. Boone, R. W. Castenholz und G. M. Garrity. New York, Heidelberg, Berlin, Springer: 473-600.
- CATTELAN, A. J., P. G. HARTEL und J. J. FUHRMANN (1999). Screening for Plant Growth-Promoting Rhizobacteria to Promote Early Soybean Growth. *Soil Science Society of America Journal.* **63**(1670-1680).
- CHATZINOTAS, A., D. HAHN und J. ZEYER (2000). Distribution of uncultured planctomycete in forest soils. *Unveröffentlicht. (GenBank-Eintrag).*
- CHATZINOTAS, A., R. A. SANDAA, W. SCHONHUBER, R. AMANN, F. L. DAAE, V. TORSVIK, J. ZEYER und D. HAHN (1998). Analysis of broad-scale differences in microbial community composition of two pristine forest soils. *Syst Appl Microbiol.* **21**(4): 579-87.
- CHELIUS, M. K. und J. E. LEPO (1999). Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified *nifH* Sequences from Wetland Plant Rhizosphere Communities. *Environ Technol.* **20**(8): 883-9.
- CHEN, M. Y., S. S. TSAY, K. Y. CHEN, Y. C. SHI, Y. T. LIN und G. H. LIN (2002). *Pseudoxanthomonas taiwanensis* sp. nov., a novel thermophilic, N<sub>2</sub>O-producing species isolated from hot springs. *Int J Syst Evol Microbiol.* **52**(Pt 6): 2155-61.
- CHEN, W. M., L. MOULIN, C. BONTEMPS, P. VANDAMME, G. BENA und C. BOIVIN-MASSON (2003). Legume symbiotic nitrogen fixation by beta-proteobacteria is widespread in nature. *J Bacteriol.* **185**(24): 7266-72.
- CHÈNEBY, D., S. PERREZ, C. DEVROE, S. HALLET, Y. COUTON, F. BIZOUARD, G. IURETIG, J. C. GERMON und L. PHILIPPOT (2004). Denitrifying bacteria in bulk and maize-rhizospheric soil: diversity and N<sub>2</sub>O-reducing abilities. *Can J Microbiol.* **50**(7): 469-74.
- CHO, H. Y., J. H. HYUN und J. H. LEE (2004). Bacterial community structure in the intertidal flat of Ganghwa island by 16S rRNA gene analysis. *Unveröffentlicht. (GenBank-Eintrag).*
- CHOU, Q., M. RUSSELL, D. E. BIRCH, J. RAYMOND und W. BLOCH (1992). Prevention of pre-PCR mis-priming and primer demerization improves low-copy-number amplifications. *Nucleic Acids Res.* **20**(7): 17-23.
- CLADERA, A. M., A. BENNASAR, M. BARCELO, J. LALUCAT und E. GARCIA-VALDES (2004). Comparative genetic diversity of *Pseudomonas stutzeri* genomovars, clonal structure, and phylogeny of the species. *J Bacteriol.* **186**(16): 5239-48.
- CLINE, J., J. C. BRAMAN und H. H. HOGREFE (1996). PCR fidelity of *Pfu* DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucl Acids Res.* **24**(18): 3546-51.
- COATES, J. D., D. J. ELLIS, C. V. GAW und D. R. LOVLEY (1999). *Geothrix fermentans* gen. nov., sp. nov., a novel Fe(III)-reducing bacterium from a hydrocarbon-contaminated aquifer. *Int J Syst Bacteriol.* **49**(Pt 4): 1615-22.
- COLWELL, R. R. (1996). Microbial Biodiversity - Global Aspects. *In: Microbial Diversity in Time and Space.* R. R. Colwell, U. Simidu und K. Ohwada. New York, Plenum Press: 1-11.
- COLWELL, R. R. und D. J. GRIMES, (Hrsg.) (2000). Nonculturable Microorganisms in the Environment. Washington, ASM Press.
- COSTA, C., C. DIKEMA, M. FRIEDRICH, P. GARCIA-ENCINA, F. FERNANDEZ-POLANCO und A. J. STAMS (2000). Denitrification with methane as electron donor in oxygen-limited bioreactors. *Appl Microbiol Biotechnol.* **53**(6): 754-62.

- COUNTWAY, P. D., R. J. GAST, P. SAVAI und D. A. CARON (2005). Protistan Diversity Estimates Based on 18S rDNA from Seawater Incubations in the Western North Atlantic. *J Eukaryot Microbiol.* **52**(2): 95-106.
- CREEVEY, C. J., D. A. FITZPATRICK, G. K. PHILIP, R. J. KINSELLA, M. J. O'CONNELL, M. M. PENTONY, S. A. TRAVERS, M. WILKINSON und J. O. MCINERNEY (2004). Does a tree-like phylogeny only exist at the tips in the prokaryotes? *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* **271**(1557): 2551-8.
- CURL, E. A. und B. TRUELOVE (1986). *The Rhizosphere*. Berlin, Springer.
- CURTIS, T. P., W. T. SLOAN und J. W. SCANNELL (2002). Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**(16): 10494-9.
- DECKER, P. V., C. E. BAGWELL und C. R. LOVELL (2002). Comparison of Two Methods for Characterization of Natural Assemblages of Diazotrophic Bacteria. *Unveröffentlicht. (GenBank-Eintrag)*.
- DEDYSH, S. N., V. N. KHMELLENINA, N. E. SUZINA, Y. A. TROTSSENKO, J. D. SEMRAU, W. LIESACK und J. M. TIEDJE (2002). *Methylocapsa acidiphila* gen. nov., sp. nov., a novel methane-oxidizing and dinitrogen-fixing acidophilic bacterium from Sphagnum bog. *Int J Syst Evol Microbiol.* **52**(Pt 1): 251-61.
- DEDYSH, S. N., P. RICKE und W. LIESACK (2004). NifH and NifD phylogenies: an evolutionary basis for understanding nitrogen fixation capabilities of methanotrophic bacteria. *Microbiology.* **150**(Pt 5): 1301-13.
- DELORME, S., L. PHILIPPOT, V. EDEL-HERMANN, C. DEULVOT, C. MOUGEL und P. LEMANCEAU (2003). Comparative genetic diversity of the *narG*, *nosZ*, and 16S rRNA genes in fluorescent pseudomonads. *Appl Environ Microbiol.* **69**(2): 1004-12.
- DEMBA DIALLO, M., M. MARTENS, N. VLOEMANS, S. COUSIN, T. T. M. VANDEKERCKHOVE, M. NEYRA, P. DE LAJUDIE, A. WILLEMS, M. GILLIS, W. VYVERMAN und K. VAN DER GUCHT (2004a). Phylogenetic analysis of partial bacterial 16S rDNA sequences of tropical grass pasture soil under *Acacia tortilis* subsp. *raddiana* in Senegal. *Syst Appl Microbiol.* **27**(2): 238-52.
- DEMBA DIALLO, M., A. WILLEMS, N. VLOEMANS, S. COUSIN, T. T. VANDEKERCKHOVE, P. DE LAJUDIE, M. NEYRA, W. VYVERMAN, M. GILLIS und K. VAN DER GUCHT (2004b). Polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the N<sub>2</sub>-fixing bacterial diversity in soil under *Acacia tortilis* ssp. *raddiana* and *Balanites aegyptiaca* in the dryland part of Senegal. *Environ Microbiol.* **6**(4): 400-15.
- DENARO, R., G. D'AURIA, G. DI MARCO, M. GENOVESE, M. TROUSSELLIER, M. M. YAKIMOV und L. GIULIANO (2005). Assessing terminal restriction fragment length polymorphism suitability for the description of bacterial community structure and dynamics in hydrocarbon-polluted marine environments. *Environ Microbiol.* **7**(1): 78-87.
- DON, R. H., P. T. COX, B. J. WAINWRIGHT, K. BAKER und J. S. MATTIK (1991). Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res.* **19**: 4008.
- DONACHIE, S. P., S. HOU und M. ALAM (2002). Diverse uncultured and cultured bacteria in inland waters of remote Hawaiian islands: Hypersaline Lake Laysan and a brackish pond on Pearl and Hermes Atoll. *Unveröffentlicht. (GenBank-Eintrag)*.
- DONACHIE, S. P., S. HOU, K. S. LEE, C. W. RILEY, A. PIKINA, J. LIU, S. KEMPE, T. S. GREGORY, A. BOSSUYT, J. BOEREMA, A. MALAHOFF und M. ALAM (2003). Microbial Communities in the Hawaiian Archipelago: A Microbial Diversity Hotspot. *Unveröffentlicht. (GenBank-Eintrag)*.
- DSMZ (2001). *Catalogue of Strains*. Braunschweig, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen.
- DSMZ (2004). *Bacterial Nomenclature Up-To-Date (Approved Lists, Validations Lists)*. Braunschweig, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen.
- DUINEVELD, B. M., A. S. ROSADO, J. D. VAN ELSAS und J. A. VAN VEEN (1998). Analysis of the dynamics of bacterial communities in the rhizosphere of the chrysanthemum via denaturing gradient gel electrophoresis and substrate utilization patterns. *Appl Environ Microbiol.* **64**(12): 4950-7.

- DUNBAR, J., S. M. BARNES, L. O. TICKNOR und C. R. KUSKE (2002). Empirical and theoretical bacterial diversity in four Arizona soils. *Appl Environ Microbiol.* **68**(6): 3035-45.
- DUNBAR, J., S. TAKALA, S. M. BARNES, J. A. DAVIS und C. R. KUSKE (1999). Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning. *Appl Environ Microbiol.* **65**(4): 1662-9.
- DUNBAR, J., L. O. TICKNOR und C. R. KUSKE (2000). Assessment of microbial diversity in four southwestern United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis. *Appl Environ Microbiol.* **66**(7): 2943-50.
- DUNGER, W. und H. J. FIEDLER, (Hrsg.) (1997). Methoden der Bodenbiologie. Jena, Gustav Fischer.
- DUNSTAN, R. H., B. C. KELLEY und D. J. NICHOLAS (1982). Fixation of dinitrogen derived from denitrification of nitrate in a photosynthetic bacterium, *Rhodospseudomonas sphaeroides* forma sp. *denitrificans*. *J Bacteriol.* **150**(1): 100-4.
- DYER, B. D. (2003). A Field Guide to Bacteria. Ithaca, NY, Cornell University Press.
- DYKHUIZEN, D. E. (1998). Santa Rosalia revisited: why are there so many species of bacteria? *Antonie van Leeuwenhoek.* **73**(1): 25-33.
- EDWARDS, K. J., B. M. GOEBEL, T. M. RODGERS, M. O. SCHRENK, T. M. GIHRING, M. M. CARDONA, B. HU, M. M. MCGUIRE, R. J. HAMERS, N. R. PACE und J. F. BANFIELD (1998). Geomicrobiology of pyrite (FeS<sub>2</sub>) dissolution: a case study at Iron Mountain, California. *Unveröffentlicht. (GenBank-Eintrag)*.
- EDWARDS, M. L., A. K. LILLEY, T. H. TIMMS-WILSON, I. P. THOMPSON und I. COOPER (2001). Characterisation of the culturable heterotrophic bacterial community in a small eutrophic lake (Priest Pot). *FEMS Microbiol Ecol.* **35**(3): 295-304.
- EGERT, M. und M. W. FRIEDRICH (2003). Formation of Pseudo-Terminal Restriction Fragments, a PCR-Related Bias Affecting Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Microbial Community Structure. *Appl Environ Microbiol.* **69**(5): 2555-62.
- EILMUS, S. (2005). Diversität von Prokaryoten einer Binnensalzstelle. *Diplomarbeit*, Botanisches Institut. Köln, Universität zu Köln.
- EISEN, M. B. (1999). Cluster v2.11 (Computerprogramm, Windows PC).
- EISEN, M. B. (2002). TreeView v1.60 (Computerprogramm, Windows PC).
- ELSAIED, H., H. KIMURA und T. NAGANUMA (2002). Molecular characterization and endosymbiotic localization of the gene encoding D-ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase (RuBisCO) form II in the deep-sea vestimentiferan trophosome. *Microbiology.* **148**(Pt 6): 1947-57.
- ENGBRETSON, J. J. und C. L. MOYER (2003). Fidelity of select restriction endonucleases in determining microbial diversity by terminal-restriction fragment length polymorphism. *Appl Environ Microbiol.* **69**(8): 4823-9.
- ENGELHARD, M., T. HUREK und B. REINHOLD-HUREK (2000). Preferential occurrence of diazotrophic endophytes, *Azoarcus* spp., in wild rice species and land races of *Oryza sativa* in comparison with modern races. *Environ Microbiol.* **2**(2): 131-41.
- FELSKE, A. (1997). (ohne Titel). *Unveröffentlicht. (GenBank-Eintrag)*.
- FELSKE, A., W. M. DE VOS und A. D. L. AKKERMANS (2000). Spatial distribution of 16S rRNA levels from uncultured acidobacteria in soil. *Lett Appl Microbiol.* **31**(2): 118-22.
- FELSKE, A., H. RHEIMS, A. WOLTERINK, E. STACKEBRANDT und A. D. L. AKKERMANS (1997). Ribosome analysis reveals prominent activity of an uncultured member of the class Actinobacteria in grassland soils. *Microbiology.* **143**(Pt 9): 2983-9.
- FELSKE, A., A. WOLTERINK, R. VAN LIS und A. D. L. AKKERMANS (1998). Phylogeny of the main bacterial 16S rRNA sequences in Drentse A grassland soils (The Netherlands). *Appl Environ Microbiol.* **64**(3): 871-9.
- FELSKE, A., A. WOLTERINK, R. VAN LIS, W. M. DE VOS und A. D. L. AKKERMANS (1999). Searching for predominant soil bacteria: 16S rDNA cloning versus strain cultivation. *FEMS Microbiol Ecol.* **30**(2): 137-45.
- FELSKE, A. D., J. HEYRMAN, A. BALCAEN und P. DE VOS (2003). Multiplex PCR screening of soil isolates for novel *Bacillus*-related lineages.

- FELSKE, A. D., V. TZENEVA, J. HEYRMAN, M. A. LANGEVELD, A. D. AKKERMANS und P. DE VOS (2004). Isolation and biodiversity of hitherto undescribed soil bacteria related to *Bacillus niacini*. *Microb Ecol.* **48**(1): 111-9.
- FOGEL, G. B., C. R. COLLINS, J. LI und C. F. BRUNK (1999). Prokaryotic Genome Size and SSU rDNA Copy Number: Estimation of Microbial Relative Abundance from a Mixed Population. *Microb Ecol.* **38**: 93-113.
- FRITSCH, W. (1998). Umwelt-Mikrobiologie. Jena, Gustav Fischer.
- FRITZ, I., C. STROMPL und W. R. ABRAHAM (2004). Phylogenetic relationships of the genera *Stella*, *Labrys* and *Angulomicrobium* within the 'Alphaproteobacteria' and description of *Angulomicrobium amanitifforme* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* **54**(Pt 3): 651-7.
- FUJITA, Y., Y. TAKAHASHI, F. SHONAI, Y. OGURA und H. MATSUBARA (1991). Cloning, nucleotide sequences and differential expression of the *nifH* and *nifH*-like (*frxC*) genes from the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Plectonema boryanum*. *Plant Cell Physiol.* **32**: 1093-106.
- GALTIER, N., M. GOUY und C. GAUTIER (1996). SeaView and Phylo\_win, two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput Applic Biosci.* **12**(543-548).
- GARBEVA, P., J. A. VAN VEEN und J. D. VAN ELSAS (2003). Predominant *Bacillus* spp. in agricultural soil under different management regimes detected via PCR-DGGE. *Microb Ecol.* **45**(3): 302-16.
- GARRITY, G. M., J. A. BELL und T. G. LILBURN (2004). Taxonomic Outline of the Prokaryotes - Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition, Bergey's Manual Trust.
- GARRITY, G. M. und J. G. HOLT (2001). Phylum BVIII. Nitrospirae *phy. nov.* In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. D. R. Boone, R. W. Castenholz und G. M. Garrity. New York, Heidelberg, Berlin, Springer: 451-64.
- GEISSLER, A., T. TZVETKOVA, K. FLEMMING und S. SELENSKA-POBELL (2002). Comparison of natural bacterial communities found in uranium mining waste piles and mill tailings. *Unveröffentlicht. (GenBank-Eintrag)*.
- GIHRING, T. M., J. K. FREDRICKSON, J. P. MCKINLEY, T. C. WILSON und P. E. LONG (2004). Subsurface microbial communities and geochemistry within a vertical transect of a uranium-contaminated aquifer. *Unveröffentlicht. (GenBank-Eintrag)*.
- GLISSMAN, K., K. J. CHIN, P. CASPER und R. CONRAD (2004). Methanogenic pathway and archaeal community structure in the sediment of eutrophic Lake Dagow: effect of temperature. *Microb Ecol.* **48**(3): 389-99.
- GODON, J. J., E. ZUMSTEIN, P. DABERT, F. HABOUZIT und R. MOLETTA (1997). Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Appl Environ Microbiol.* **63**(7): 2802-13.
- GOKCE, N., T. HOLLOCHER, D. BAZYLINSKI und H. JANNASCH (1989). Thermophilic *Bacillus* sp. that shows the denitrification phenotype of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol.* **55**(4): 1023-5.
- GOMEZ-ALVAREZ, V., G. M. KING und K. NUSSLEIN (2003). Environmental Parameters That Influence Community Succession and Diversity on Hawaiian volcanic Deposits. *Unveröffentlicht. (GenBank-Eintrag)*.
- GRAYSTON, S. J., S. WANG, C. D. CAMPBELL und A. C. EDWARDS (1998). Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biol Biochem.* **30**(3): 369-78.
- GREENBERG, E. P. und G. E. BECKER (1977). Nitrous oxide as end product of denitrification by strains of fluorescent pseudomonads. *Can J Microbiol.* **23**(7): 903-7.
- GREGORY, L. G., P. L. BOND, D. J. RICHARDSON und S. SPIRO (2003). Characterization of a nitrate-respiring bacterial community using the nitrate reductase gene (*narG*) as a functional marker. *Microbiology.* **149**(Pt 1): 229-37.
- GREMION, F., A. CHATZINOTAS und H. HARMS (2003). Comparative 16S rDNA and 16S rRNA sequence analysis indicates that Actinobacteria might be a dominant part of the metabolically active bacteria in heavy metal-contaminated bulk and rhizosphere soil. *Environ Microbiol.* **5**(10): 896-907.

- GRIFFITHS, B. S., K. RITZ, N. EBBLEWHITE und G. DOBSON (1999). Soil microbial community structure: Effects of substrate loading rates. *Soil Biol Biochem.* **31**(1): 145-53.
- GTARI, M., L. BRUSETTI, G. SKANDER, D. MORA, A. BOUDABOUS und D. DAFFONCHIO (2004). Isolation of *Elaeagnus*-compatible *Frankia* from soils collected in Tunisia. *FEMS Microbiol Lett.* **234**(2): 349-55.
- GU, J. D., W. QIU, A. KOENIG und Y. FAN (2004). Removal of high NO<sub>3</sub><sup>-</sup> concentrations in saline water through autotrophic denitrification by the bacterium *Thiobacillus denitrificans* strain MP. *Water Sci Technol.* **45**(5-6): 105-12.
- GUEST, H. (1999). Bacterial classification and taxonomy: a 'primer' for the new millenium. *Microbiology Today.* **26**: 70-2.
- GULLEDGE, J., Y. HRYWNA, C. CAVANAUGH und P. A. STEUDLER (2004). Effects of long-term nitrogen fertilization on the uptake kinetics of atmospheric methane in temperate forest soils. *FEMS Microbiol Ecol.* **49**(3): 389-400.
- GUMAELIUS, L., G. MAGNUSSON, B. PETTERSSON und G. DALHAMMAR (2001). *Comamonas denitrificans* sp. nov., an efficient denitrifying bacterium isolated from activated sludge. *Int J Syst Evol Microbiol.* **51**(Pt 3): 999-1006.
- HACKL, E., S. ZECHMEISTER-BOLTENSTERN, L. BODROSSY und A. SESSITSCH (2004). Comparison of diversities and compositions of bacterial populations inhabiting natural forest soils. *Appl Environ Microbiol.* **70**(9): 5057-65.
- HALL, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser.* **41**: 95-8.
- HAMELIN, J., N. FROMIN, S. TARNAWSKI, S. TEYSSIER-CUVELLE und M. ARAGNO (2002). *nifH* gene diversity in the bacterial community associated with the rhizosphere of *Molinia coerulea*, an oligonitrophilic perennial grass. *Environ Microbiol.* **4**(8): 477-81.
- HENNECKE, H., K. KALUZA, B. THONY, M. FUHRMANN, W. LUDWIG und E. STACKEBRANDT (1985). Concurrent evolution of nitrogenase genes and 16S ribosomal-RNA in *Rhizobium* species and other nitrogen-fixing Bacteria. *Arch Microbiol.* **142**: 342-8.
- HENSON, B. J., L. E. WATSON und S. R. BARNUM (2004). The evolutionary history of nitrogen fixation, as assessed by NifD. *J Mol Evol.* **58**(4): 390-9.
- HEYRMAN, J., B. VANPARYS, N. A. LOGAN, A. BALCAEN, M. RODRIGUEZ-DIAZ, A. FELSKE und P. DE VOS (2004). *Bacillus novalis* sp. nov., *Bacillus vireti* sp. nov., *Bacillus soli* sp. nov., *Bacillus bataviensis* sp. nov. and *Bacillus drentensis* sp. nov., from the Drentse A grasslands. *Int J Syst Evol Microbiol.* **54**(Pt 1): 47-57.
- HIRAISHI, A., N. KISHIMOTO, Y. KOSAKO, N. WAKAO und T. TANO (1995). Phylogenetic position of the menaquinone-containing acidophilic chemo-organotroph *Acidobacterium capsulatum*. *FEMS Microbiol Lett.* **132**(1-2): 91-4.
- HIRAISHI, A. und Y. UEDA (1994). Intrageneric structure of the genus *Rhodobacter*: transfer of *Rhodobacter sulfidophilus* and related marine species to the genus *Rhodovulum* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol.* **44**: 15-23.
- HOFMANN, K. und M. D. BARON (o. A.). The PASCAL program Boxshade (Computerprogramm).
- HOLLAND, S. M. (2003). Analytic Rarefaction (Computerprogramm, Windows PC).
- HONGO, Y., M. OHKUMA und T. KUDO (2003). Molecular analysis of bacterial microbiota in the gut of the termite *Reticulitermes speratus* (Isoptera; Rhinotermitidae). *FEMS Microbiol Ecol.* **44**: 231-42.
- HORZ, H. P., A. BARBROOK, C. B. FIELD und B. J. BOHANNAN (2004). Ammonia-oxidizing bacteria respond to multifactorial global change. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**(42): 15136-41.
- HU, G. (1993). DNA polymerase-catalyzed addition of non-templated extra nucleotides to the 3' end of a DNA fragment. *DNA Cell Biol.* **12**: 763-70.
- HUBER, T., G. FAULKNER und P. HUGENHOLTZ (2004). Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. *Bioinformatics.* **20**(14): 2317-9.
- HUGENHOLTZ, P., B. M. GOEBEL und N. R. PACE (1998). Impact of Culture-Independent Studies on the Emerging Phylogenetic View of Bacterial Diversity. *J Bacteriol.* **180**(18): 4765-74.

- HUGHES, J. B., J. J. HELLMANN, T. H. RICKETTS und B. J. M. BOHANNAN (2001). Counting the Uncountable: Statistical Approaches to Estimating Microbial Diversity. *Appl Environ Microbiol.* **67**(10): 4399-406.
- HUMAYOUN, S. B., N. BANO, G. LECLEIR und J. T. HOLLIBAUGH (2001). Composition of bacterial assemblages from alkaline, hypersaline Mono Lake, California. *Unveröffentlicht. (GenBank-Eintrag)*.
- HURLBERT, S. H. (1971). The nonconcept of species diversity: a critique and alternative parameters. *Ecology.* **52**(577-586).
- JENKINS, B. D., G. F. STEWARD, S. M. SHORT, B. B. WARD und J. P. ZEHR (2004). Fingerprinting diazotroph communities in the Chesapeake Bay by using a DNA macroarray. *Appl Environ Microbiol.* **70**(3): 1767-76.
- JENSEN, H. (1955). *Azotobacter macrocytogenes* n. sp., a nitrogen-fixing bacterium resistant to acid reaction. *Acta Agric Scand.* **5**: 280-94.
- JOSEPH, S. J., P. HUGENHOLTZ, P. SANGWAN, C. A. OSBORNE und P. H. JANSSEN (2003). Laboratory cultivation of widespread and previously uncultured soil bacteria. *Appl Environ Microbiol.* **69**(12): 7210-5.
- JURETSCHKO, S., A. LOY, A. LEHNER und M. WAGNER (2002). The microbial community composition of a nitrifying-denitrifying activated sludge from an industrial sewage treatment plant analyzed by the full-cycle rRNA approach. *Syst Appl Microbiol.* **25**(1): 84-99.
- KALDORF, M., K. H. LINNE VON BERG, U. MEIER, U. SERVOS und H. BOTHE (1993). The reduction of nitrous oxide to dinitrogen by *Escherichia coli*. *Arch Microbiol.* **160**(6): 432-9.
- KANEKO, H. und Y. SAKIHAMA (2000). *Unveröffentlicht. (GenBank-Eintrag)*.
- KANEKO, T., Y. NAKAMURA, C. P. WOLK, T. KURITZ, S. SASAMOTO, A. WATANABE, M. IRIGUCHI, A. ISHIKAWA, K. KAWASHIMA, T. KIMURA, *et al.* (2001). Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *DNA Res.* **8**(5): 205-13; 27-53.
- KENT, A. D., D. J. SMITH, B. J. BENSON und E. W. TRIPLETT (2003). Web-based phylogenetic assignment tool for analysis of terminal restriction fragment length polymorphism profiles of microbial communities. *Appl Environ Microbiol.* **69**(11): 6768-76.
- KIM, J.-S. und D. E. CROWLEY (2003). Bacterial diversity of Amazon soil by oligonucleotide fingerprinting of rRNA genes. *Unveröffentlicht. (GenBank-Eintrag)*.
- KISHIMOTO, N., Y. KOSAKO und T. TANO (1991). *Acidobacterium capsulatum* gen. nov., sp. nov.: an acidophilic chemoorganotrophic bacterium containing menaquinone from acidic mineral environment. *Curr Microbiol.* **22**: 1-7.
- KITTS, C. L. (2001). Terminal restriction fragment patterns: a tool for comparing microbial communities and assessing community dynamics. *Curr Issues Intest Microbiol.* **2**(1): 17-25.
- KLOOS, K. (1996). Untersuchungen zur Verbreitung und Verteilung von Denitrifikanten, Nitrifikanten und Stickstofffixierern in ausgewählten Böden und Gewässern und molekularbiologische Charakterisierungen der Denitrifikation in der Gattung *Azospirillum*. Inaugural-Dissertation, Mathematische-Naturwissenschaftliche Fakultät. Köln, Universität zu Köln.
- KLOOS, K., A. MERGEL, C. RÖSCH und H. BOTHE (2001). Denitrification within the genus *Azospirillum* and other associative bacteria. *Aust J Plant Physiol.* **28**(9): 991-8.
- KÖNIG, H. (1984). Isolation and characterization of *Methanobacterium uliginosum* sp. nov., from a marshy soil. *Can J Microbiol.* **30**: 1477-81.
- KRAVE, A. S., B. LIN, M. BRASTER, A. M. LAVERMAN, N. M. VAN STRAALLEN, W. F. RÖLING und H. W. VAN VERSEVELD (2002). Stratification and seasonal stability of diverse bacterial communities in a *Pinus merkusii* (pine) forest soil in central Java, Indonesia. *Environ Microbiol.* **4**(6): 361-73.
- KUENEN, J. G. (1999). Oxidation of Inorganic Compounds by Chemolithotrophs. In: Biology of the Prokaryotes. J. W. Lengeler, G. Drews und H. G. Schlegel. Stuttgart, Thieme: 234-60.
- KUKLINSKY-SOBRAI, J., W. L. ARAUJO, R. MENDES, I. O. GERALDI, A. A. PIZZIRANI-KLEINER und J. L. AZEVEDO (2004). Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environ Microbiol.* **6**(12): 1244-51.

- KUMITA, H., K. MATSUURA, T. HINO, S. TAKAHASHI, H. HORI, Y. FUKUMORI, I. MORISHIMA und Y. SHIRO (2004). NO reduction by nitric-oxide reductase from denitrifying bacterium *Pseudomonas aeruginosa*: characterization of reaction intermediates that appear in the single turnover cycle. *J Biol Chem.* **279**(53): 55247-54.
- KUMON, Y., Y. SASAKI, I. KATO, N. TAKAYA, H. SHOUN und T. BEPPU (2002). Codenitrification and denitrification are dual metabolic pathways through which dinitrogen evolves from nitrate in *Streptomyces antibioticus*. *J Bacteriol.* **184**(11): 2963-8.
- KUSKE, C. R., S. M. BARNES und J. D. BUSCH (1997). Diverse uncultivated bacterial groups from soils of the arid southwestern United States that are present in many geographic regions. *Appl Environ Microbiol.* **63**(9): 3614-21.
- LAMONTAGNE, M. G., J. P. SCHIMEL und P. A. HOLDEN (2003). Comparison of subsurface and surface soil bacterial communities in California grassland as assessed by terminal restriction fragment length polymorphisms of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Microb Ecol.* **46**(2): 216-27.
- LANOIL, B. D., R. SASSEN, M. T. LA DUC, S. T. SWEET und K. H. NEALSON (2001). Bacteria and Archaea physically associated with Gulf of Mexico gas hydrates. *Appl Environ Microbiol.* **67**(11): 5143-53.
- LARSEN, N. CHIMERA\_CHECK 2.7 (Computerprogramm, Internet-basiert).
- LEIGH, J. A. (2000). Nitrogen fixation in methanogens: the archaeal perspective. *Curr Issues Mol Biol.* **2**(4): 125-31.
- LI, L., C. KATO und K. HORIKOSHI (1999). Microbial Diversity in Sediments Collected from the Deepest Cold-Seep Area, the Japan Trench. *Mar Biotechnol.* **1**(4): 391-400.
- LIESACK, W., F. BAK, J.-U. KREFT und E. STACKEBRANDT (1994). *Holophaga foetida* gen. nov., sp. nov., a new, homoacetogenic bacterium degrading methoxylated aromatic compounds. *Arch Microbiol.* **162**(1-2): 85-90.
- LILES, M. R., B. F. MANSKE, S. B. BINTRIM, J. HANDELSMAN und R. M. GOODMAN (2003). A Census of rRNA Genes and Linked Genomic Sequences within a Soil Metagenomic Library. *Appl Environ Microbiol.* **69**(5): 2684-91.
- LILJEROTH, E., S. L. G. E. BURGERS und J. A. VAN VEEN (1991). Changes in bacterial populations along roots of wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *Biol Fertil Soils.* **10**: 276-80.
- LINNE VON BERG, K. H. und H. BOTHE (1992). The distribution of denitrifying bacteria in soils monitored by DNA-probing. *FEMS Microbiol Ecol.* **86**: 331-40.
- LIU, W.-T., T. L. MARSH, H. CHENG und L. J. FORNEY (1997). Characterization of Microbial Diversity by Determining Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisms of Genes Encoding 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol.* **63**(11): 4516-22.
- LIU, X., S. M. TIQUIA, G. HLGUIN, L. WU, S. C. NOLD, A. H. DEVOL, K. LUO, A. V. PALUMBO, J. M. TIEDJE und J. ZHOU (2003). Molecular Diversity of Denitrifying Genes in Continental Margin Sediments within the Oxygen-Deficient Zone of the Pacific Coast of Mexico. *Appl Environ Microbiol.* **69**(6): 3549-60.
- LLEDO, B., R. M. MARTINEZ-ESPINOSA, F. C. MARHUENDA-EGEA und M. J. BONETE (2004). Respiratory nitrate reductase from haloarchaeon *Haloferax mediterranei*: biochemical and genetic analysis. *Biochim Biophys Acta.* **1674**(1): 50-9.
- LOVELL, C. R., M. J. FRIEZ, J. W. LONGSHORE und C. E. BAGWELL (2001). Recovery and phylogenetic analysis of *nifH* sequences from diazotrophic bacteria associated with dead aboveground biomass of *Spartina alterniflora*. *Appl Environ Microbiol.* **67**(11): 5308-14.
- LOVELL, C. R., Y. M. PICENO, J. M. QUATTRO und C. E. BAGWELL (2000). Molecular analysis of diazotroph diversity in the rhizosphere of the smooth cordgrass, *Spartina alterniflora*. *Appl Environ Microbiol.* **66**(9): 3814-22.
- LOY, A., M. WAGNER, W. BEISKER und H. MEIER (2002). Monitoring the Development of the Planktonic Microbial Community Composition in a Non-carbonated Natural Mineral Water after Bottling by the Full-Cycle rRNA Approach. *Unveröffentlicht. (GenBank-Eintrag).*

- LUDWIG, W. und H.-P. KLENK (2001). Overview: A Phylogenetic Backbone and Taxonomic Framework for Prokaryotic Systematics. *In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. D. R. Boone, R. W. Castenholz und G. M. Garrity. New York, Heidelberg, Berlin, Springer. **1**: 49-65.
- LUKOW, T. (1999). Vergleichende Charakterisierung der bakteriellen Rhizosphären-gemeinschaften transgener versus nicht-transgener Kartoffelpflanzen. *Unveröffentlicht. (GenBank-Eintrag)*.
- LYNCH, J. M. und J. M. WHIPPS (1990). Substrate flow in the rhizosphere. *Plant and Soil*. **129**: 1-10.
- MACGREGOR, B. J., B. VAN MOOY, B. J. BAKER, M. MELLON, P. H. MOISANDER, H. W. PAERL, J. ZEHR, D. HOLLANDER und D. A. STAHL (2001). Microbiological, molecular biological and stable isotopic evidence for nitrogen fixation in the open waters of Lake Michigan. *Environ Microbiol.* **3**(3): 205-19.
- MAIER, R. M., I. L. PEPPER und C. P. GERBA (2000). *Environmental Microbiology*. San Diego, CA, Academic Press.
- MARCHESE, J. R., T. SATO, A. WEIGHTMAN, T. A. MARTIN, J. C. FRY, S. J. HIOM und W. G. WADE (1998). Design and Evaluation of Useful Bacterium-Specific PCR Primers That Amplify Genes Coding for Bacterial 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol.* **64**(2): 795-9.
- MARSH, T. L., R. L. KURZHALS, M. A. DOJKA, G. ICOPINI, D. T. LONG und N. R. PACE (1999). Molecular diversity of a soil bacterial community from a metal contaminated super fund site. *Unveröffentlicht. (GenBank-Eintrag)*.
- MARSH, T. L., P. SAXMAN, J. COLE und J. TIEDJE (2000). Terminal restriction fragment length polymorphism analysis program, a web-based research tool for microbial community analysis. *Appl Environ Microbiol.* **66**(8): 3616-20.
- MATSUMOTO, M., M. SAKAMOTO, H. HAYASHI und Y. BENNO (2005). Novel phylogenetic assignment database for terminal-restriction fragment length polymorphism analysis of human colonic microbiota. *J Microbiol Methods.* **61**(3): 305-19.
- MCCAIG, A. E., L. A. GLOVER und J. I. PROSSER (1999). Molecular analysis of bacterial community structure and diversity in unimproved and improved upland grass pastures. *Appl Environ Microbiol.* **65**(4): 1721-30.
- MCCAIG, A. E., S. J. GRAYSTON, J. I. PROSSER und L. A. GLOVER (2001). Impact of cultivation on characterisation of species composition of soil bacterial communities. *FEMS Microbiol Ecol.* **35**(1): 37-48.
- MCGARVEY, J. A., W. G. MILLER, S. SANCHEZ und L. STANKER (2004). Identification of bacterial populations in dairy wastewaters by use of 16S rRNA gene sequences and other genetic markers. *Appl Environ Microbiol.* **70**(7): 4267-75.
- MEHTA, M. P., D. A. BUTTERFIELD und J. A. BAROSS (2003). Phylogenetic diversity of nitrogenase (*nifH*) genes in deep-sea and hydrothermal vent environments of the Juan de Fuca Ridge. *Appl Environ Microbiol.* **69**(2): 960-70.
- MERGAERT, J., A. BOLEY, M. C. CNOCKAERT, W. R. MULLER und J. SWINGS (2001). Identity and potential functions of heterotrophic bacterial isolates from a continuous-upflow fixed-bed reactor for denitrification of drinking water with bacterial polyester as source of carbon and electron donor. *Syst Appl Microbiol.* **24**(2): 303-10.
- MERGEL, A., K. KLOOS und H. BOTHE (2001a). Seasonal fluctuations in the population of denitrifying and N<sub>2</sub>-fixing bacteria in an acid soil of a Norway spruce forest. *Plant and Soil*. **230**: 145-60.
- MERGEL, A., O. SCHMITZ, T. MALLMANN und H. BOTHE (2001b). Relative abundance of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in layers of a forest soil. *FEMS Microbiol Ecol.* **36**(1): 33-42.
- MESA, S., J. J. ALCHE, E. BEDMAR und M. J. DELGADO (2004). Expression of *nir*, *nor* and *nos* denitrification genes from *Bradyrhizobium japonicum* in soybean root nodules. *Physiol Plant.* **120**(2): 205-11.
- MIYAMOTO, T., M. KAWAHARA und K. MINAMISAWA (2004). Novel endophytic nitrogen-fixing clostridia from the grass *Miscanthus sinensis* as revealed by terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *Appl Environ Microbiol.* **70**(11): 6580-6.
- MOHAN, S. B., M. SCHMID, M. JETTEN und J. COLE (2004). Detection and widespread distribution of the *nrfA* gene encoding nitrite reduction to ammonia, a short circuit in the biological nitrogen cycle that competes with denitrification. *FEMS Microbiol Ecol.* **49**: 433-43.

- MORAN, M. A., W. B. WHITMAN und W. YE (2004). Diversity of salt marsh prokaryotes. *Unveröffentlicht. (GenBank-Eintrag)*.
- MOULIN, L., A. MUNIVE, B. DREYFUS und C. BOIVIN-MASSON (2001). Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. *Nature*. **411**(6840): 948-50.
- MOUNIER, E., S. HALLET, D. CHÈNEBY, E. BENIZRI, Y. GRUET, C. NGUYEN, S. PIUTTI, C. ROBIN, S. SLEZACK-DESCHAUMES, F. MARTIN-LAURENT, J. C. GERMON und L. PHILIPPOT (2004). Influence of maize mucilage on the diversity and activity of the denitrifying community. *Environ Microbiol.* **6**(3): 301-12.
- MÜHLHARDT, C. (1999). Der Experimentator: Molekularbiologie. Stuttgart, Gustav Fischer.
- MUMMEY, D. L. und P. D. STAHL (2003). Candidate division BD: phylogeny, distribution and abundance in soil ecosystems. *Syst Appl Microbiol.* **26**(2): 228-35.
- MYLVAGANAM, S. und P. P. DENNIS (1992). Sequence heterogeneity between the two genes encoding 16S rRNA from the halophilic archaeobacterium *Haloarcula marismortui*. *Genetics*. **130**(3): 399-410.
- MYROLD, D. D. (1998). Transformations of Nitrogen. *In: Principles and Applications of Soil Microbiology*. D. M. Sylvia, J. J. Fuhrmann, P. G. Hartel und D. A. Zuberer. Upper Saddle River, NJ, Prentice-Hall: 218-58.
- NGOM, A., Y. NAKAGAWA, H. SAWADA, J. TSUKAHARA, S. WAKABAYASHI, T. UCHIUMI, A. NUNTAGIJ, S. KOTEPONG, A. SUZUKI, S. HIGASHI und M. ABE (2004). A novel symbiotic nitrogen-fixing member of the *Ochrobactrum* clade isolated from root nodules of *Acacia mangium*. *J Gen Appl Microbiol.* **50**(1): 17-27.
- NODA, S., M. OHKUMA und T. KUDO (2002). Nitrogen fixation genes expressed in the symbiotic microbial community in the gut of the termite *Coptotermes formosanus*. *Unveröffentlicht. Direct Submission to GenBank*.
- NODA, S., M. OHKUMA, R. USAMI, K. HORIKOSHI und T. KUDO (1999). Culture-independent characterization of a gene responsible for nitrogen fixation in the symbiotic microbial community in the gut of the termite *Neotermes kosshunensis*. *Appl Environ Microbiol.* **65**(11): 4935-42.
- NOGALES, B., E. R. MOORE, E. LLOBET-BROSSA, R. ROSSELLO-MORA, R. AMANN und K. N. TIMMIS (2001). Combined use of 16S ribosomal DNA and 16S rRNA to study the bacterial community of polychlorinated biphenyl-polluted soil. *Appl Environ Microbiol.* **67**(4): 1874-84.
- NOGALES, B., K. N. TIMMIS, D. B. NEDWELL und A. M. OSBORN (2002). Detection and diversity of expressed denitrification genes in estuarine sediments after reverse transcription-PCR amplification from mRNA. *Appl Environ Microbiol.* **68**(10): 5017-25.
- NOLL, M., D. MATTHIES, P. FRENZEL, M. DERAKSHANI und W. LIESACK (2005). Succession of bacterial community structure and diversity in a paddy soil oxygen gradient. *Environ Microbiol.* **7**(3): 382-95.
- NORMAND, P. und J. BOUSQUET (1989). Phylogeny of nitrogenase sequences in Frankia and other nitrogen-fixing microorganisms. *J Mol Evol.* **29**(5): 436-47.
- NORRIS, T. B., J. M. WRAITH, R. W. CASTENHOLZ und T. R. MCDERMOTT (2002). Soil Microbial Community Structure across a Thermal Gradient following a Geothermal Heating Event. *Appl Environ Microbiol.* **68**(12): 6300-9.
- OHKUMA, M., S. NODA und T. KUDO (1999). Phylogenetic diversity of nitrogen fixation genes in the symbiotic microbial community in the gut of diverse termites. *Appl Environ Microbiol.* **65**(11): 4926-34.
- OHKUMA, M., S. NODA, R. USAMI, K. HORIKOSHI und T. KUDO (1996). Diversity of nitrogen fixation genes in the symbiotic intestinal microflora of the termite *Reticulitermes speratus*. *Appl Environ Microbiol.* **62**: 2747-52.
- OLSEN, R. A. und L. R. BAKKEN (1987). Viability of soil bacteria: optimization of plate-counting technique and comparison between total counts and plate counts within different size groups. *Microb Ecol.* **13**: 59-74.
- OLSON, J. B., R. W. LITAKER und H. W. PAERL (1998a). Ubiquity of heterotrophic diazotrophs in marine microbial mats. *Unveröffentlicht. (GenBank-Eintrag)*.

- OLSON, J. B., T. F. STEPPE, R. W. LITAKER und H. W. PAERL (1998b). N<sub>2</sub>-Fixing Microbial Consortia Associated with the Ice Cover of Lake Bonney, Antarctica. *Microb Ecol.* **36**(3): 231-8.
- OSBORN, A. M., E. R. MOORE und K. N. TIMMIS (2000). An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environ Microbiol.* **2**(1): 39-50.
- PACE, N. R. (1997). A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science.* **276**(5313): 734-40.
- PAGE, R. D. (1996). TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci.* **12**(4): 357-8.
- PAUL, E. A. und F. E. CLARK (1989). Soil microbiology and biochemistry. New York, Academic Press.
- PESTER, M., M. W. FRIEDRICH, B. SCHINK und A. BRUNE (2004). pmoA-based analysis of methanotrophs in a littoral lake sediment reveals a diverse and stable community in a dynamic environment. *Appl Environ Microbiol.* **70**(5): 3138-42.
- PFENNIG und H. G. TRÜPER (1981). In: The Prokaryotes. M. P. Starr, H. Stolp, H. G. Trüper, A. Balows und H. G. Schlegel. Berlin - Heidelberg - New York, Springer. **Vol. I:** 279-89.
- PHILIPPOT, L. (2002). Denitrifying genes in bacterial and Archaeal genomes. *Biochim Biophys Acta.* **1577**(3): 355-76.
- PHILIPPOT, L., S. PIUTTI, F. MARTIN-LAURENT, S. HALLET und J. C. GERMON (2002). Molecular analysis of the nitrate-reducing community from unplanted and maize-planted soils. *Appl Environ Microbiol.* **68**(12): 6121-8.
- PICENO, Y. M., P. A. NOBLE und C. R. LOVELL (1999). Spatial and Temporal Assessment of Diazotroph Assemblage Composition in Vegetated Salt Marsh Sediments Using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis. *Microb Ecol.* **38**(2): 157-67.
- PIDIYAR, V. J., K. JANGID, M. S. PATOLE und Y. S. SHOUCHE (2004). Studies on cultured and uncultured microbiota of wild *Culex quinquefasciatus* mosquito midgut based on 16S ribosomal RNA gene analysis. *Am J Trop Med Hyg.* **70**(6): 597-603.
- POLY, F., L. RANJARD, S. NAZARET, F. GOURBIÈRE und L. J. MONROZIER (2001). Comparison of *nifH* gene pools in soils and soil microenvironments with contrasting properties. *Appl Environ Microbiol.* **67**(5): 2255-62.
- POLZ, M. F. und C. M. CAVANAUGH (1998). Bias in Template-to-Product Ratios in Multitemplate PCR. *Appl Environ Microbiol.* **64**(10): 3724-30.
- POLZ, M. F., C. HARBISON und C. M. CAVANAUGH (1999). Diversity and heterogeneity of epibiotic bacterial communities on the marine nematode *Eubostrichus diana*. *Appl Environ Microbiol.* **65**(9): 4271-5.
- PRIEME, A., G. BRAKER und J. M. TIEDJE (2002). Diversity of Nitrite Reductase (*nirK* and *nirS*) Gene Fragments in Forested Upland and Wetland Soils. *Appl Environ Microbiol.* **68**(4): 1893-900.
- PURDY, K. J., T. D. CRESSWELL-MAYNARD, D. B. NEDWELL, T. J. MCGENITY, W. D. GRANT, K. N. TIMMIS und T. M. EMBLEY (2004). Isolation of haloarchaea that grow at low salinities. *Environ Microbiol.* **6**(6): 591-5.
- RADAJEWSKI, S., P. INESON, N. R. PAREKH und J. C. MURRELL (2000). Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature.* **403**(6770): 646-9.
- RAINEY, F., N. WEISS und E. STACKEBRANDT (1995). Phylogenetic analysis of the genera *Cellulomonas*, *Promicromonospora*, and *Jonesia* and proposal to exclude the genus *Jonesia* from the family Cellulomonadaceae. *Int J Syst Bacteriol.* **45**(4): 649-52.
- RAPPE, M. S. und S. J. GIOVANNONI (2003). The uncultured microbial majority. *Annu Rev Microbiol.* **57**: 369-94.
- RAPPE, M. S., P. F. KEMP und S. J. GIOVANNONI (1997). Phylogenetic diversity of marine coastal picoplankton 16S rRNA genes cloned from the continental shelf off Cape Hatteras, North Carolina. *Limnol Oceanogr.* **42**(5): 811-26.
- RAVENSCHLAG, K., K. SAHM, J. PERNTHALER und R. AMANN (1999). High Bacterial Diversity in Permanently Cold Marine Sediments. *Appl Environ Microbiol.* **65**(9): 3982-9.

- RAYMOND, J., J. L. SIEFERT, C. R. STAPLES und R. E. BLANKENSHIP (2004). The natural history of nitrogen fixation. *Mol Biol Evol.* **21**(3): 541-54.
- REARDON, C. L., D. E. CUMMINGS, L. M. PETZKE, B. L. KINSALL, D. B. WATSON, B. M. PEYTON und G. G. GEESEY (2004). Composition and diversity of microbial communities recovered from surrogate minerals incubated in an acidic uranium-contaminated aquifer. *Appl Environ Microbiol.* **70**(10): 6037-46.
- REDIERS, H., V. BONNECARRERE, P. B. RAINEY, K. HAMONTS, J. VANDERLEYDEN und R. DE MOT (2003). Development and application of a *dapB*-based in vivo expression technology system to study colonization of rice by the endophytic nitrogen-fixing bacterium *Pseudomonas stutzeri* A15. *Appl Environ Microbiol.* **69**(11): 6864-74.
- REITER, B., H. BÜRGMANN, K. BURG und A. SESSITSCH (2003). Endophytic *nifH* gene diversity in African sweet potato. *Can J Microbiol.* **49**(9): 549-55.
- REYSENBACH, 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**(10): 3417-8.
- REZANKA, T., I. VIDEN, J. V. GO, I. DOR und V. M. DEMBITSKY (2003). Polar lipids and fatty acids of three wild cyanobacterial strains of the genus *Chroococcidiopsis*. *Folia Microbiol (Praha).* **48**(6): 787-6.
- RHEIMS, H., F. A. RAINEY und E. STACKEBRANDT (1996). A molecular approach to search for diversity among bacteria in the environment. *J Ind Microbiol.* **17**: 159-69.
- RIBBE, M., D. GADKARI und O. MEYER (1997). N<sub>2</sub> fixation by *Streptomyces thermoautotrophicus* involves a molybdenum-dinitrogenase and a manganese-superoxide oxidoreductase that couple N<sub>2</sub> reduction to the oxidation of superoxide produced from O<sub>2</sub> by a molybdenum-CO dehydrogenase. *J Biol Chem.* **272**(42): 26627-33.
- RICH, J. J., R. S. HEICHEN, P. J. BOTTOMLEY, K. CROMACK, JR. und D. D. MYROLD (2003). Community Composition and Functioning of Denitrifying Bacteria from Adjacent Meadow and Forest Soils. *Appl Environ Microbiol.* **69**(10): 5974-82.
- RICKE, P., S. KOLB und G. BRAKER (2005). Application of a newly developed ARB software-integrated tool for in silico terminal restriction fragment length polymorphism analysis reveals the dominance of a novel *pmoA* cluster in a forest soil. *Appl Environ Microbiol.* **71**(3): 1671-3.
- RIVAS, R., E. VELAZQUEZ, A. WILLEMS, N. VIZCAINO, N. S. SUBBA-RAO, P. F. MATEOS, M. GILLIS, F. B. DAZZO und E. MARTINEZ-MOLINA (2002). A new species of *Devosia* that forms a unique nitrogen-fixing root-nodule symbiosis with the aquatic legume *Neptunia natans* (L.f.) druce. *Appl Environ Microbiol.* **68**(11): 5217-22.
- RIVAS, R., A. WILLEMS, N. S. SUBBA-RAO, P. F. MATEOS, F. B. DAZZO, R. M. KROPPESTEDT, E. MARTINEZ-MOLINA, M. GILLIS und E. VELAZQUEZ (2003). Description of *Devosia neptuniae* sp. nov. that nodulates and fixes nitrogen in symbiosis with *Neptunia natans*, an aquatic legume from India. *Syst Appl Microbiol.* **26**(1): 47-53.
- ROBERTSON, L. A. und J. G. KUENEN (1984). Aerobic denitrification – old wine in new bottles? *Antonie van Leeuwenhoek.* **50**(5-6): 525-44.
- RÖSCH, C. (2001). Molekularbiologische Untersuchungen zur Diversität denitrifizierender und stickstofffixierender Bakterien in Waldböden. *Diplomarbeit*, Botanisches Institut. Köln, Universität zu Köln.
- RÖSCH, C. (2004). Erfassung der Biodiversität bakterieller Gemeinschaften. In: Treffpunkt Biologische Vielfalt IV. H. Korn und U. Feit. Bonn, Bundesamt für Naturschutz: 65-70.
- RÖSCH, C. und H. BOTHE (2005). Improved assessment of denitrifying, N<sub>2</sub>-fixing, and total-community bacteria by terminal restriction fragment length polymorphism analysis using multiple restriction enzymes. *Appl Environ Microbiol.* **71**(4): 2026-35.
- RÖSCH, C., A. MERGEL und H. BOTHE (2002). Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil. *Appl Environ Microbiol.* **68**(8): 3818-29.
- ROSSELLÓ-MORA, R. und R. AMANN (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev.* **25**(1): 39-67.

- ROUSSEL-DELIF, L., S. TARNAWSKI, J. HAMELIN, L. PHILIPPOT, M. ARAGNO und N. FROMIN (2005). Frequency and Diversity of Nitrate Reductase Genes among Nitrate-Dissimilating *Pseudomonas* in the Rhizosphere of Perennial Grasses Grown in Field Conditions. *Microb Ecol.*
- SACANSKA, G. (2003). Bacteria found in heavy metal contaminated environments and their application for bioremediation. *Unveröffentlicht. (GenBank-Eintrag).*
- SAIT, M., P. HUGENHOLTZ und P. H. JANSSEN (2002). Cultivation of globally distributed soil bacteria from phylogenetic lineages previously only detected in cultivation-independent surveys. *Environ Microbiol.* **4**(11): 654-66.
- SAITOU, N. und M. NEI (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* **4**(4): 406-25.
- SAKANO, Y., K. D. PICKERING, P. F. STROM und L. J. KERKHOF (2002). Spatial Distribution of Total, Ammonia-Oxidizing, and Denitrifying Bacteria in Biological Wastewater Treatment Reactors for Bioregenerative Life Support. *Appl Environ Microbiol.* **68**(5): 2285-93.
- SAMBROOK, J., E. F. FRITSCH und T. MANIATIS (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, CSHL Press.
- SANCHEZ, M. A., M. VASQUEZ und B. GONZALEZ (2004). A previously unexposed forest soil microbial community degrades high levels of the pollutant 2,4,6-trichlorophenol. *Appl Environ Microbiol.* **70**(12): 7567-70.
- SANDERS, H. L. (1968). Marine benthic diversity: a comparative study. *Am Natur.* **102**(243-282).
- SANGER, F., S. NICKLEN und A. R. COULSON (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **74**: 5463-7.
- SATCHANSKA, G., K. FLEMMING und S. SELENSKA-POBELL (2003). Comparative molecular analysis of bacterial diversity in soil samples of uranium wastes by using different 16S rDNA amplification primer pairs. *Unveröffentlicht. (GenBank-Eintrag).*
- SAWADA, H., L. D. KUYKENDALL und J. M. YOUNG (2003). Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *J Gen Appl Microbiol.* **49**(3): 155-79.
- SCALA, D. J. und L. J. KERKHOF (1998). Nitrous oxide reductase (*nosZ*) gene-specific PCR primers for detection of denitrifiers and three *nosZ* genes from marine sediments. *FEMS Microbiol Lett.* **162**(1): 61-8.
- SCALA, D. J. und L. J. KERKHOF (1999). Diversity of nitrous oxide reductase (*nosZ*) genes in continental shelf sediments. *Appl Environ Microbiol.* **65**(4): 1681-7.
- SCALA, D. J. und L. J. KERKHOF (2000). Horizontal heterogeneity of denitrifying bacterial communities in marine sediments by terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *Appl Environ Microbiol.* **66**(5): 1980-6.
- SCHEFFER, F. und P. SCHACHTSCHNABEL (2002). Lehrbuch der Bodenkunde. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.
- SCHEID, D. und S. STUBNER (2001). Structure and diversity of Gram-negative sulfate-reducing bacteria on rice roots. *FEMS Microbiol Ecol.* **36**(2-3): 175-38.
- SCHLOSS, P. D. und J. HANDELSMAN (2004). Status of the microbial census. *Microbiol Mol Biol Rev.* **68**(4): 686-91.
- SCHMIDT, I., C. HERMELINK, K. VAN DE PAS-SCHOONEN, M. STROUS, H. J. OP DEN CAMP, J. G. KUENEN und M. S. JETTEN (2002). Anaerobic ammonia oxidation in the presence of nitrogen oxides (NO(x)) by two different lithotrophs. *Appl Environ Microbiol.* **68**(11): 5351-7.
- SCHMIDT, I., R. J. VAN SPANING und M. S. JETTEN (2004). Denitrification and ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea* wild-type, and NirK<sup>-</sup> and NorB<sup>-</sup> deficient mutants. *Microbiology.* **150**(Pt 12): 4107-14.
- SCHOENBORN, L., M. SAIT, P. HUGENHOLTZ und P. H. JANSSEN (2003). Major groups of bacteria in a pasture soil. *Unveröffentlicht. (GenBank-Eintrag).*
- SCHOLTEN, E., T. LUKOW, G. AULING, R. M. KROPPESTEDT, F. A. RAINEY und H. DIEKMANN (1999). *Thauera mechernichensis* sp. nov., an aerobic denitrifier from a leachate treatment plant. *Int J Syst Bacteriol.* **49**(Pt 3): 1045-51.
- SCHROEDER, D. (1992). Bodenkunde in Stichworten. Stuttgart, Ferdinand Hirt.

- SCHULTZ, L. C., M. D. ZWOLINSKI, B. M. MILLER und S. C. NOLD (2003). Community composition of methane-oxidizing bacteria in northern peatlands. *Unveröffentlicht. (GenBank-Eintrag)*.
- SELENSKA-POBELL, S. (2002). Diversity and activity of bacteria in uranium mining waste piles. *In: Radioactivity In the Environment Vol. 22: Interactions Of Microorganisms With Radionuclides*. M. J. Keith-Roach und F. R. Lievens, Elsevier: 225-54.
- SELENSKA-POBELL, S., K. FLEMMING, T. TZVETKOVA, J. RAFF, M. SCHNORPFEIL und A. GEISSLER (2002). Bacterial communities in uranium mining waste piles and their interactions with heavy metals. *In: Uranium In the Aquatic Environment*. B. J. Merkel, Springer: 455-64.
- SELENSKA-POBELL, S., G. KAMPF, K. HEMMING, G. RADEVA und G. SATCHANSKA (2001). Bacterial diversity in soil samples from two uranium waste piles as determined by rep-APD, RISA and 16S rDNA retrieval. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **79**(2): 149-61.
- SHAFFER, B. T., F. WIDMER, L. A. PORTEOUS und R. J. SEIDLER (2000). Temporal and Spatial Distribution of the *nifH* Gene of N<sub>2</sub> Fixing Bacteria in Forests and Clearcuts in Western Oregon. *Microb Ecol*. **39**(1): 12-21.
- SHANNON, C. E. (1948). A mathematical theory of communication. *Bell System Technical Journal*. **27**(July and October): 379-423 and 623-56.
- SHOUN, H., M. KANO, I. BABA, N. TAKAYA und M. MATSUO (1998). Denitrification by actinomycetes and purification of dissimilatory nitrite reductase and azurin from *Streptomyces thioluteus*. *J Bacteriol*. **180**(17): 4413-5.
- SHOUN, H., D. H. KIM, H. UCHIYAMA und J. SUGIYAMA (1992). Denitrification by fungi. *FEMS Microbiol Lett*. **73**(3): 277-81.
- SIGLER, W. V., R. BACHOFEN und J. ZEYER (2003). Molecular characterization of endolithic cyanobacteria inhabiting exposed dolomite in central Switzerland. *Environ Microbiol*. **5**(7): 618-27.
- SINGLETON, D. R., P. F. HENDRIX, D. C. COLEMAN und W. B. WHITMAN (2003). Identification of uncultured bacteria tightly associated with the intestine of the earthworm *Lumbricus rubellus* (Lumbricidae; Oligochaeta). *Soil Biol Biochem*. **35**(12): 1547-55.
- SLIWINSKI, M. K. und R. M. GOODMAN (2004). Spatial heterogeneity of crenarchaeal assemblages within mesophilic soil ecosystems as revealed by PCR-single-stranded conformation polymorphism profiling. *Appl Environ Microbiol*. **70**(3): 1811-20.
- SMALLA, K., G. WIELAND, A. BUCHNER, A. ZOCK, J. PARZY, S. KAISER, N. ROSKOT, H. HEUER und G. BERG (2001). Bulk and Rhizosphere Soil Bacterial Communities Studied by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis: Plant-Dependent Enrichment and Seasonal Shifts Revealed. *Appl Environ Microbiol*. **67**(10): 4742-51.
- SPANNEVELLO, M. D. und B. K. C. PATEL (2001). Phylogenetic characterization of microbial communities from Australia's Great Artesian Basin. *Unveröffentlicht. (GenBank-Eintrag)*.
- SPEKSNIJDER, A. G. C. L., G. A. KOWALCHUK, S. D. JONG, E. KLINE, J. R. STEPHEN und H. J. LAANBROEK (2001). Microvariation Artifacts Introduced by PCR and Cloning of Closely Related 16S rRNA Gene Sequences. *Appl Environ Microbiol*. **67**(1): 469-72.
- SPRING, S., U. JACKEL, M. WAGNER und P. KAMPFER (2004). *Ottowia thiooxydans* gen. nov., sp. nov., a novel facultatively anaerobic, N<sub>2</sub>O-producing bacterium isolated from activated sludge, and transfer of *Aquaspirillum gracile* to *Hylemonella gracilis* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. **54**(Pt 1): 99-106.
- STACH, J. E. M., L. A. MALDONADO, D. G. MASSON, A. C. WARD, M. GOODFELLOW und A. T. BULL (2003). Statistical Approaches for Estimating Actinobacterial Diversity in Marine Sediments. *Appl Environ Microbiol*. **69**(10): 6189-200.
- STACKEBRANDT, E. und B. M. GOEBEL (1994). Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol*. **44**: 846-9.
- STALEY, J. T. (1997). Biodiversity: are microbial species threatened? *Curr Opin Biotechnol*. **8**(3): 340-5.
- STALEY, J. T. (2002). A Microbial Perspective of Biodiversity. *In: Biodiversity of Microbial Life: Foundation of Earth's Biosphere*. J. T. Staley und A.-L. Reysenbach. New York, Wiley-Liss: 3-23.

- STEIN, L. Y., M. T. LA DUC, T. J. GRUNDL und K. H. NEALSON (2001). Bacterial and archaeal populations associated with freshwater ferromanganous micronodules and sediments. *Environ Microbiol.* **3**(1): 10-8.
- STEPPE, T. F. und H. W. PAERL (2002). Ecophysiology of N<sub>2</sub> fixation in a marine microbial mat. *Unveröffentlicht. (GenBank-Eintrag).*
- STEPPE, T. F., J. L. PINCKNEY, J. DYBLE und H. W. PAERL (2001). Diazotrophy in Modern Marine Bahamian Stromatolites. *Microb Ecol.* **41**(1): 36-44.
- STEWART, G. F., B. D. JENKINS, B. B. WARD und J. P. ZEHR (2004a). Development and testing of a DNA macroarray to assess nitrogenase (*nifH*) gene diversity. *Appl Environ Microbiol.* **70**(3): 1455-65.
- STEWART, G. F., J. P. ZEHR, R. JELLISON, J. P. MONTOYA und J. T. HOLLIBAUGH (2004b). Vertical distribution of nitrogen-fixing phylotypes in a meromictic, hypersaline lake. *Microb Ecol.* **47**(1): 30-40.
- STOFFELS, M., T. CASTELLANOS und A. HARTMANN (2001). Design and application of new 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes for the *Azospirillum-Skermanella-Rhodocista*-cluster. *Syst Appl Microbiol.* **24**(1): 83-97.
- STOLZ, J. F. und P. BASU (2002). Evolution of nitrate reductase: molecular and structural variations on a common function. *Chembiochem.* **3**(2-3): 198-206.
- STRES, B., I. MAHNE, G. AVGUSTIN und J. M. TIEDJE (2004). Nitrous oxide reductase (*nosZ*) gene fragments differ between native and cultivated Michigan soils. *Appl Environ Microbiol.* **70**(1): 301-9.
- SUHARTI und S. DE VRIES (2005). Membrane-bound denitrification in the Gram-positive bacterium *Bacillus azotoformans*. *Biochem Soc Trans.* **33**(Pt 1): 130-3.
- SUHARTI, H. A. HEERING und S. DE VRIES (2004). NO reductase from *Bacillus azotoformans* is a bifunctional enzyme accepting electrons from menaquinol and a specific endogenous membrane-bound cytochrome c551. *Biochemistry.* **43**(42): 13487-95.
- SUHARTI, M. J. STRAMPRAAD, I. SCHRODER und S. DE VRIES (2001). A novel copper A containing menaquinol NO reductase from *Bacillus azotoformans*. *Biochemistry.* **40**(8): 2632-9.
- 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**(2): 625-30.
- SY, A., E. GIRAUD, P. JOURAND, N. GARCIA, A. WILLEMS, P. DE LAJUDIE, Y. PRIN, M. NEYRA, M. GILLIS, C. BOIVIN-MASSON und B. DREYFUS (2001). Methylophilic Methylobacterium bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. *J Bacteriol.* **183**(1): 214-20.
- TAJIMA, F. und M. NEI (1984). Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. *Mol Biol Evol.* **1**(3): 269-85.
- TAN, Z., T. HUREK und B. REINHOLD-HUREK (2003). Effect of N-fertilization, plant genotype and environmental conditions on *nifH* gene pools in roots of rice. *Environ Microbiol.* **5**(10): 1009-15.
- TEIXEIRA, P. und R. OLIVEIRA (2002). Metabolism of *Alcaligenes denitrificans* in biofilm vs planktonic cells. *J Appl Microbiol.* **92**(2): 256-60.
- THOMPSON, J. D., T. J. GIBSON, F. PLEWNIK, F. JEANMOUGIN und D. G. HIGGINS (1997). The Clustal\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **24**: 4876-82.
- THROBÄCK, I. N., K. ENWALL, Å. JARVIS und S. HALLIN (2004). Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. *FEMS Microbiol Ecol.* **49**(3): 401-17.
- TORSVIK, V., J. GOKSØYR und F. L. DAAE (1990). High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl Environ Microbiol.* **56**(3): 782-7.
- TREUSCH, A. H., A. KLETZIN, G. RADDATZ, T. OCHSENREITER, A. QUAISER, G. MEURER, S. C. SCHUSTER und C. SCHLEPER (2004). Characterization of large-insert DNA libraries from soil for environmental genomic studies of Archaea. *Environ Microbiol.* **6**(9): 970-80.

- TUROVA, T. P., B. B. KUZNETSOV, E. V. NOVIKOVA, A. B. POLTARAUS und T. N. NAZINA (2001). Heterogeneity of nucleotide sequences of 16S ribosomal RNA genes from the *Desulfotomaculum kuznetsovii* type strain. *Mikrobiologiya*. **70**(6): 788-95.
- TZENEVA, V. A., Y. LI, A. D. FELSKE, W. M. DE VOS, A. D. AKKERMANS, E. E. VAUGHAN und H. SMIDT (2004). Development and application of a selective pcr-denaturing gradient gel electrophoresis approach to detect a recently cultivated Bacillus group predominant in soil. *Appl Environ Microbiol*. **70**(10): 5801-9.
- UEDA, T., Y. SUGA, N. YAHIRO und T. MATSUGUCHI (1995a). Genetic diversity of N<sub>2</sub>-fixing bacteria associated with rice roots by molecular evolutionary analysis of a *nifD* library. *Can J Microbiol*. **41**(3): 235-40.
- UEDA, T., Y. SUGA, N. YAHIRO und T. MATSUGUCHI (1995b). Remarkable N<sub>2</sub>-fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of *nifH* gene sequences. *J Bacteriol*. **177**(5): 1414-7.
- ULRICH, A. und R. BECKER (2004). Variability of the bacterial community structure in potato fields revealed by T-RFLP and sequencing of amplified 16S rDNA. *Unveröffentlicht. (GenBank-Eintrag)*.
- VANDAMME, P., J. GORIS, W. M. CHEN, P. DE VOS und A. WILLEMS (2002). Burkholderia tuberum sp. nov. and Burkholderia phymatum sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. *Syst Appl Microbiol*. **25**(4): 507-12.
- VASQUEZ, M., C. GRUTTNER, B. MOELLER und E. R. MOORE (2002). Limited selection of sodium channel blocking toxin-producing bacteria from paralytic shellfish toxin-contaminated mussels (*Aulacomya ater*). *Res Microbiol*. **153**(6): 333-8.
- VAVRINA, C. S. (1999). Plant growth promoting rhizobacteria via a transplant plug delivery system in the production of drip irrigated pepper. Thesis Paper, Institute of Food And Agricultural Sciences. Immokalee, Institute of Food And Agricultural Sciences, University of Florida.
- VINCENT, J. M. (1971). A manual for the practical study of root-nodule bacteria. Berkshire (UK), Burgess and Son LTB.
- VON WINTZINGERODE, F., U. B. GÖBEL und E. STACKEBRANDT (1997). Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol Rev*. **21**(3): 213-29.
- VON WINTZINGERODE, F., B. SELENT, W. HEGEMANN und U. B. GÖBEL (1998). Nitrogen-fixing microbial diversity detected in an anaerobic bioreactor community by analysis of partial *nifH* gene sequences. *Unveröffentlicht. Direct Submission to GenBank*.
- WANG, G. und H. D. SKIPPER (2004). Identification of denitrifying rhizobacteria from bentgrass and bermudagrass golf greens. *J Appl Microbiol*. **97**(4): 827-37.
- WANG, Y., Z. ZHANG und N. RAMANAN (1997). The actinomycete *Thermobispora bispora* contains two distinct types of transcriptionally active 16S rRNA genes. *J Bacteriol*. **179**(10): 3270-6.
- WASHINGTON, H. G. (1984). Diversity, biotic and similarity indices. *Water Res*. **18**(653-694).
- WATMOUGH, N. J., G. BUTLAND, M. R. CHEESMAN, J. W. MOIR, D. J. RICHARDSON und S. SPIRO (1999). Nitric oxide in bacteria: synthesis and consumption. *Biochim Biophys Acta*. **1411**(2-3): 456-74.
- WATSON, R. J. und B. BLACKWELL (2000). Purification and characterization of a common soil component which inhibits the polymerase chain reaction. *Can J Microbiol*. **46**(7): 633-42.
- WEISBURG, W. G., S. M. BURNS, D. A. PELLETIER und D. J. LANE (1991). 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *Journal of Bacteriology*. **173**(2): 697-703.
- WERNER, D. (1987). Pflanzliche und mikrobielle Symbiosen. Stuttgart, Thieme.
- WHITMAN, W. B., D. C. COLEMAN und W. J. WIEBE (1998). Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **95**(12): 6578-83.
- WIDMER, F., B. T. SHAFFER, L. A. PORTEOUS und R. J. SEIDLER (1999). Analysis of *nifH* gene pool complexity in soil and litter at a Douglas fir forest site in the Oregon cascade mountain range. *Appl Environ Microbiol*. **65**(2): 374-80.

- WILLMOTTE, A. und M. HERDMAN (2001). Phylogenetic Relationships Among the Cyanobacteria Based on 16S rRNA Sequences. *In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. D. R. Boone, R. W. Castenholz und G. M. Garrity. New York, Heidelberg, Berlin, Springer: 487-93.
- WILSON, E. O. (1992). *The Diversity of Life*. London, Penguin Books.
- WOESE, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol Rev.* **51**(2): 221-71.
- WOESE, C. R. (2002). Perspective: Microbiology in Transition. *In: Biodiversity of Microbial Life: Foundation of Earth's Biosphere*. J. T. Staley und A.-L. Reysenbach. New York, Wiley-Liss: XVII-XXXII.
- WOESE, C. R. und G. E. FOX (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **74**(11): 5088-90.
- XU, H. S., N. ROBERT, F. L. SINGLETON, R. W. ATTWELL, D. J. GRIMES und R. R. COLWELL (1982). Survival and viability of non culturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microb Ecol.* **8**: 313-23.
- XU, M. X., P. WANG, F. P. WANG und X. XIAO (2003). Microbial diversity in a deep-sea station of Pacific Nodule Province, studied via 16S rRNA gene sequences and extremophiles cultivation. *Unveröffentlicht. (GenBank-Eintrag)*.
- YAN, T., M. W. FIELDS, L. WU, Y. ZU, J. M. TIEDJE und J. ZHOU (2003). Molecular diversity and characterization of nitrite reductase gene fragments (*nirK* and *nirS*) from nitrate- and uranium-contaminated groundwater. *Environ Microbiol.* **5**(1): 13-24.
- YAP, W. H., Z. ZHANG und Y. WANG (1999). Distinct types of rRNA operons exist in the genome of the actinomycete *Thermomonospora chromogena* and evidence for horizontal transfer of an entire rRNA operon. *J Bacteriol.* **181**(17): 5201-9.
- YEAGER, C. M., J. L. KORNOSEK, D. C. HOUSMAN, E. E. GROTE, J. BELNAP und C. R. KUSKE (2004). Diazotrophic community structure and function in two successional stages of biological soil crusts from the Colorado Plateau and Chihuahuan Desert. *Appl Environ Microbiol.* **70**(2): 973-83.
- YOSHIDA, H., K. YAMAMOTO, Y. MURAKAMI, D. HOSHII, Y. NISHIKAWA, T. MIYOSHI, T. NAGANUMA, A. E. MILODOWSKI und R. METCALFE (2004). Biogenic redox front formation: microbial consortium involved in reduction and oxidation of iron in siliceous sedimentary rock. *Unveröffentlicht. (GenBank-Eintrag)*.
- YOUNG, J. P. W. (1992). Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. *In: Biological nitrogen fixation*. G. Stacey, R. H. Burris und H. J. Evans. New York, Chapman and Hall: 43-86.
- ZABLOTOWICZ, R. M., D. L. ESKEW und D. D. FOCHT (1978). Denitrification in *Rhizobium*. *Can J Microbiol.* **24**(6): 757-60.
- ZAHN, H. H. (2001). Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. *J Biotechnol.* **91**(2-3): 143-453.
- ZANI, S., M. T. MELLON, J. L. COLLIER und J. P. ZEHR (2000). Expression of *nifH* genes in natural microbial assemblages in Lake George, New York, detected by reverse transcriptase PCR. *Appl Environ Microbiol.* **66**(7): 3119-24.
- ZEHR, J. P., B. D. JENKINS, S. M. SHORT und G. F. STEWARD (2003). Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Environ Microbiol.* **5**(7): 539-54.
- ZEHR, J. P. und L. A. MCREYNOLDS (1989). Use of degenerate oligonucleotides for amplification of the *nifH* gene from the marine cyanobacterium *Trichodesmium thiebautii*. *Appl Environ Microbiol.* **55**(10): 2522-6.
- ZEHR, J. P., M. MELLON, S. T. BRAUN, W. LITAKER, T. STEPPE und H. W. PAERL (1995). Diversity of Heterotrophic Nitrogen Fixation Genes in a Marine Cyanobacterial Mat. *Unveröffentlicht. (Direct Submission to GenBank)*.
- ZEHR, J. P., M. T. MELLON und S. ZANI (1998). New nitrogen-fixing microorganisms detected in oligotrophic oceans by amplification of Nitrogenase (*nifH*) genes. *Appl Environ Microbiol.* **64**(9): 3444-50.

- ZEHR, J. P., J. B. WATERBURY, P. J. TURNER, J. P. MONTOYA, E. OMOREGIE, G. F. STEWARD, A. HANSEN und D. M. KARL (2001). Unicellular cyanobacteria fix N<sub>2</sub> in the subtropical North Pacific Ocean. *Nature*. **412**: 635-8.
- ZENGLER, K., G. TOLEDO, M. RAPPE, J. ELKINS, E. J. MATHUR, J. M. SHORT und M. KELLER (2002). Cultivating the uncultured. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **99**(24): 15681-6.
- ZHANG, F., N. DASHTI, R. K. HYNES und D. L. SMITH (1996). Plant Growth Promoting Rhizobacteria and Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] Nodulation and Nitrogen Fixation at Suboptimal Root Zone Temperatures. *Annals of Botany*. **77**: 453-60.
- ZHANG, L., N. TAKAYA, T. KITAZUME, T. KONDO und H. SHOUN (2001). Purification and cDNA cloning of nitric oxide reductase cytochrome P450nor (CYP55A4) from *Trichosporon cutaneum*. *Eur J Biochem*. **268**(11): 3198-204.
- ZHANG, Y. G., H. M. WANG, D. Q. LI und Q. M. XIAO (2004). Molecular diversity of the dinitrogenase reductase gene (*nifH*) in soil microorganisms in Qing-Zang Plateau. *Unveröffentlicht. (GenBank-Eintrag)*.
- ZHOU, J., B. XIA, H. HUANG, D. S. TREVES, L. J. HAUSER, R. J. MURAL, A. V. PALUMBO und J. M. TIEDJE (2003). Bacterial phylogenetic diversity and a novel candidate division of two humid region, sandy surface soils. *Soil Biol Biochem*. **35**(7): 915-24.
- ZUMFT, W. G. (1992). The denitrifying procaryotes. *In: The Procaryotes*. A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder und K.-H. Schleifer. Heidelberg, Berlin, New York, Springer: 443-582.
- ZUMFT, W. G. (1997). Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol Mol Biol Rev*. **61**(4): 533-616.

---

## 7 Anhang

Tabelle 26: Übersicht der *nosZ*-OTUs aus dem Dünnwaldboden

Tabelle 27: Übersicht der *nifH*-OTUs aus dem Dünnwaldboden

Bild 37: Phylogramm von 16S rDNA-Sequenzen – Gruppe I: Alphaproteobacteria, Pt. a

Bild 38: Phylogramm von 16S rDNA-Sequenzen – Gruppe I: Alphaproteobacteria, Pt. B

Bild 39: Phylogramm von 16S rDNA-Sequenzen – Gruppe II: Beta- u. Gammaproteobacteria

Bild 40: Phylogramm von 16S rDNA-Sequenzen – Gruppe III: Acidobacteria

Bild 41: Phylogramm von 16S rDNA-Sequenzen – Gruppe IV: Actinobacteria/Firmicutes

Bild 42: Phylogramm von 16S rDNA-Sequenzen – Gruppe V: diverse Kleingruppen

Bild 43: Phylogramm von 16S rDNA-Sequenzen aus dem Dünnwaldboden, die mit Azospirillen- bzw. Rhizobien-selektiven Primern erhalten wurden

Tabelle 28: Übersicht der 16S rDNA-OTUs aus dem Dünnwaldboden

Tabelle 29: Übersicht der Klassifizierung von Dünnwald-OTUs mit dem RDP II Classifier

---

*Legende zu Tabelle 26 (S. 2):* Die 363 partiellen *nosZ*-Sequenzen aus dem Dünnwald wurden zu 49 OTUs (2.11) zusammengefasst (Tabelle 4, S. 42). Die Stellvertretersequenz jeder OTU kann unter der angegebenen Bezeichnung aus der GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) heruntergeladen werden kann. Die Zahl der durch eine OTU vertretenen Sequenzen ist in der dritten Spalte angegeben; für OTUs mit mehr als einer Sequenz ist die mittlere paarweise Sequenzhomologie (MPSH) zusammen mit der Stichproben-Standardabweichung in der vierten Spalte zu finden. Die Einträge unter „gedüngte Fläche“ und „Kontrollfläche“ symbolisieren die Nummern der Bodenproben, in welchen die jeweilige OTU nachgewiesen wurde: - - - - - **7** - - **3** - - - - steht für eine OTU, die durch Sequenzen in den Proben DUN+7 (21.09.2003) und DUN-3 (02.11.2002) vertreten ist (vergleiche Bild 4, S. 15). Die taxonomische Zuordnung erfolgte durch den Vergleich mit GenBank-Sequenzen (Bild 16, S. 47).

---

*Legende zu Tabelle 27 (S. 3):* Die 500 partiellen *nifH*-Sequenzen aus dem Dünnwald wurden zu 47 OTUs (2.11) zusammengefasst (Tabelle 4, S. 42). Die Stellvertretersequenz jeder OTU kann unter der angegebenen Bezeichnung aus der GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) heruntergeladen werden kann. Die Zahl der durch eine OTU vertretenen Sequenzen ist in der dritten Spalte angegeben; für OTUs mit mehr als einer Sequenz ist die mittlere paarweise Sequenzhomologie (MPSH) zusammen mit der Stichproben-Standardabweichung in der vierten Spalte zu finden. Die Einträge unter „gedüngte Fläche“ und „Kontrollfläche“ symbolisieren die Nummern der Bodenproben, in welchen die jeweilige OTU nachgewiesen wurde: - - - - - **7** - - **3** - - - - steht für eine OTU, die durch Sequenzen in den Proben DUN+7 (21.09.2003) und DUN-3 (02.11.2002) vertreten ist (vergleiche Bild 4, S. 15). Die taxonomische Zuordnung erfolgte anhand von Referenzsequenzen aus der GenBank (Bild 20, S. 51).

---

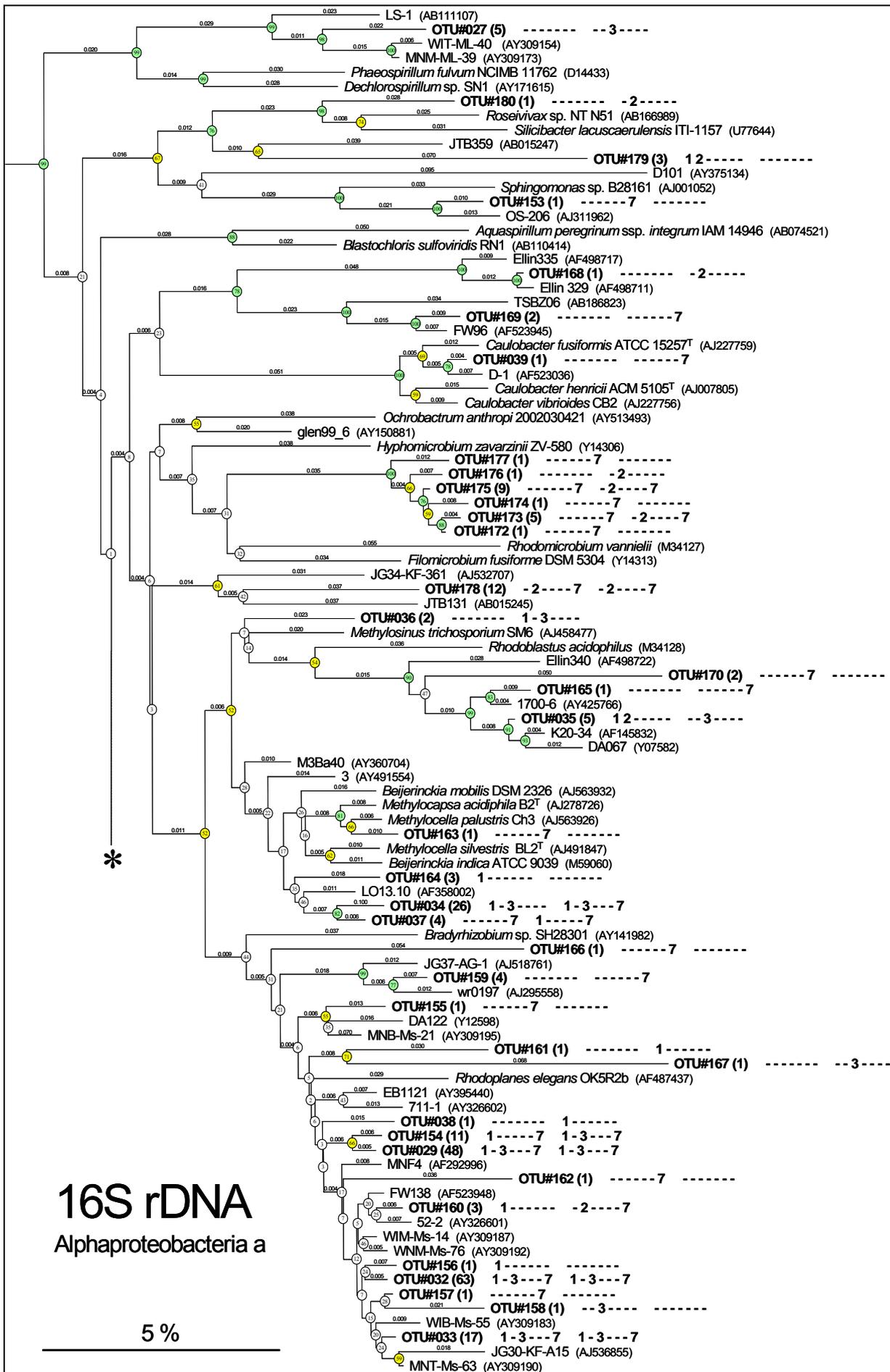
**Tabelle 26: Übersicht der *nosZ*-OTUs aus dem Dünnwaldboden**

Bezeichnung	Prototyp	Sequenzen	MPSH [%]	Gedüngte Fläche	Kontrollfläche	Taxonomische Zuordnung
<i>nosZ</i> -OTU#01	DUNnos001	1		1 - - - - -	- - - - -	<i>Pseudomonas</i> sp.
<i>nosZ</i> -OTU#02	DUNnos002	1		- - - - -	- - - - 5 - -	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
<i>nosZ</i> -OTU#03	DUNnos003	1		- - 3 - - - -	- - - - -	Gammaproteobacteria(?)
<i>nosZ</i> -OTU#04	DUNnos004	1		- - - - -	- - 3 - - - -	Gammaproteobacteria(?)
<i>nosZ</i> -OTU#05	DUNnos005	1		- - - - -	- - 3 - - - -	Gammaproteobacteria(?)
<i>nosZ</i> -OTU#06	DUNnos007	5	98,6 ± 0,8	- - - - - 7	- - 3 - - - -	Gammaproteobacteria(?)
<i>nosZ</i> -OTU#07	DUNnos011	1		- - 3 - - - -	- - - - -	Gammaproteobacteria(?)
<i>nosZ</i> -OTU#08	DUNnos012	1		- - 3 - - - -	- - - - -	Gammaproteobacteria(?)
<i>nosZ</i> -OTU#09	DUNnos015	23	99,4 ± 0,3	1 - - 4 - - -	- - - - 5 - -	Bradyrhizobiaceae
<i>nosZ</i> -OTU#10	DUNnos037	7	99,8 ± 0,2	1 - - - - -	- - - - - 7	Bradyrhizobiaceae
<i>nosZ</i> -OTU#11	DUNnos055	27	99,2 ± 0,4	- - 3 4 - 6 7	- - 3 - 5 6 -	Bradyrhizobiaceae
<i>nosZ</i> -OTU#12	DUNnos070	2	99,7	- - - - -	- - - - - 6 -	Bradyrhizobiaceae
<i>nosZ</i> -OTU#13	DUNnos072	3	98,8 ± 0,4	- - - - -	- - - - - 7	Bradyrhizobiaceae
<i>nosZ</i> -OTU#14	DUNnos089	119	99,2 ± 0,4	1 - 3 - - 6 7	1 - 3 - - 6 7	Proteobacteria(?)
<i>nosZ</i> -OTU#15	DUNnos194	1		- - 3 - - - -	- - - - -	Proteobacteria(?)
<i>nosZ</i> -OTU#16	DUNnos195	2	100	- - - - -	- - - - - 6 -	Proteobacteria(?)
<i>nosZ</i> -OTU#17	DUNnos197	2	100	- - - - -	- - - - - 6 -	Proteobacteria(?)
<i>nosZ</i> -OTU#18	DUNnos199	2	99,1	- - - - - 7	- - - - - 6 -	Proteobacteria(?)
<i>nosZ</i> -OTU#19	DUNnos201	1		- - - - -	- - - - - 7	Proteobacteria(?)
<i>nosZ</i> -OTU#20	DUNnos202	4	98,9 ± 0,2	- - - - - 7	- - 3 - - - -	Proteobacteria(?)
<i>nosZ</i> -OTU#21	DUNnos206	4	99,6 ± 0,2	- - - - - 7	- - - - -	Proteobacteria(?)
<i>nosZ</i> -OTU#22	DUNnos210	1		- - - - -	- - - - - 7	Proteobacteria(?)
<i>nosZ</i> -OTU#23	DUNnos211	2	100	- - - - -	- - - - - 6 -	Proteobacteria(?)
<i>nosZ</i> -OTU#24	DUNnos217	13	99,3 ± 0,4	- - - - - 6 7	- - - - - 6 7	Proteobacteria(?)
<i>nosZ</i> -OTU#25	DUNnos226	1		- - - - -	- - - - - 6 -	Proteobacteria(?)
<i>nosZ</i> -OTU#26	DUNnos227	1		- - 3 - - - -	- - - - -	Proteobacteria(?)
<i>nosZ</i> -OTU#27	DUNnos228	1		- - - - -	- - 3 - - - -	Proteobacteria(?)
<i>nosZ</i> -OTU#28	DUNnos229	1		- - - - - 6 -	- - - - -	Proteobacteria(?)
<i>nosZ</i> -OTU#29	DUNnos230	1		- - - - -	- - 3 - - - -	Proteobacteria(?)
<i>nosZ</i> -OTU#30	DUNnos231	2	100	- - 3 - - - -	- - - - -	Proteobacteria(?)
<i>nosZ</i> -OTU#31	DUNnos233	1		- - 3 - - - -	- - - - -	Proteobacteria(?)
<i>nosZ</i> -OTU#32	DUNnos234	1		- - - - -	- - 3 - - - -	Proteobacteria(?)
<i>nosZ</i> -OTU#33	DUNnos235	1		- - - - -	- - 3 - - - -	Proteobacteria(?)
<i>nosZ</i> -OTU#34	DUNnos236	4	99,4 ± 0,7	- - - - -	- - - - - 7	Proteobacteria(?)
<i>nosZ</i> -OTU#35	DUNnos240	2	100	- - - - -	- - - - - 6 -	Proteobacteria(?)
<i>nosZ</i> -OTU#36	DUNnos242	3	99,1 ± 0,8	- - - - -	- - 3 - - - -	Proteobacteria(?)
<i>nosZ</i> -OTU#37	DUNnos245	3	100	1 - - - - -	- - - - - 7	Proteobacteria(?)
<i>nosZ</i> -OTU#38	DUNnos252	57	98,9 ± 0,5	- - 3 - - 6 7	- - - - - 6 7	Proteobacteria(?)
<i>nosZ</i> -OTU#39	DUNnos305	1		- - - - - 6 -	- - - - -	Proteobacteria(?)
<i>nosZ</i> -OTU#40	DUNnos307	5	99,8 ± 0,2	1 - - - - -	- - - - - 7	Proteobacteria(?)
<i>nosZ</i> -OTU#41	DUNnos311	3	100	- - - - - 6 -	- - - - -	Proteobacteria(?)
<i>nosZ</i> -OTU#42	DUNnos314	1		1 - - - - -	- - - - -	Proteobacteria(?)
<i>nosZ</i> -OTU#43	DUNnos315	3	99,4 ± 0,2	1 - - - - -	- - - - -	Proteobacteria(?)
<i>nosZ</i> -OTU#44	DUNnos318	1		1 - - - - -	- - - - -	Proteobacteria(?)
<i>nosZ</i> -OTU#45	DUNnos335	37	99,3 ± 0,4	- - - - -	- - 3 - 5 - -	Proteobacteria(?)
<i>nosZ</i> -OTU#46	DUNnos356	2	99,1	- - 3 - - - -	- - - - -	Burkholderiales(?)
<i>nosZ</i> -OTU#47	DUNnos358	2	99,7	- - - - -	- - 3 - - - -	Burkholderiales(?)
<i>nosZ</i> -OTU#48	DUNnos360	2	98,4	- - - - -	- - 3 - - - -	Burkholderiales(?)
<i>nosZ</i> -OTU#49	DUNnos362	2	99,7	- - - - -	- - 3 - - - -	Proteobacteria(?)

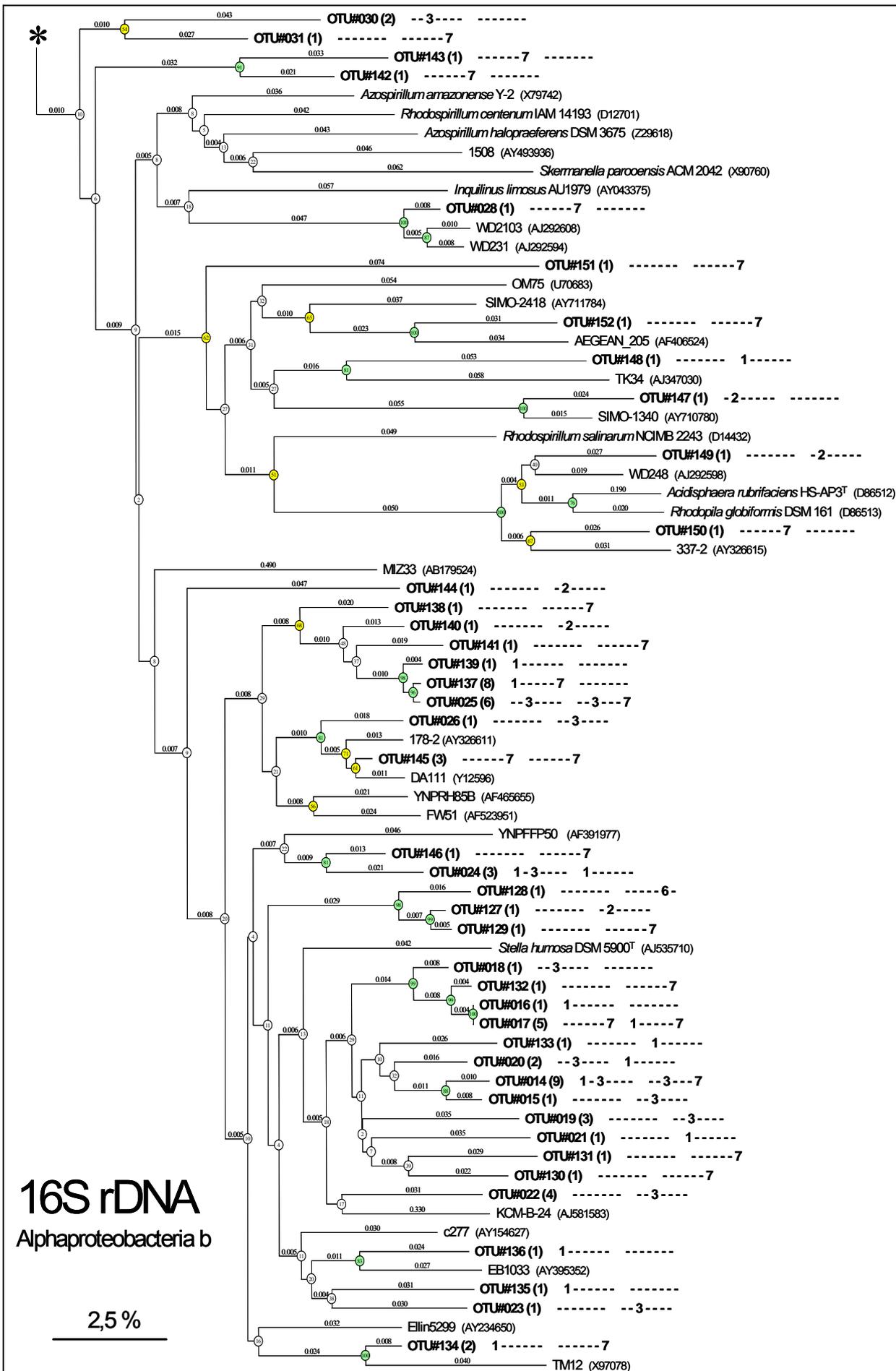
**Tabelle 27: Übersicht der *nifH*-OTUs aus dem Dünnwaldboden**

Bezeichnung	Prototyp	Sequenzen	MPSH [%]	Gedüngte Fläche	Kontrollfläche	Taxonomische Zuordnung
<i>nifH</i> -OTU#01	DUNnif513	7	99,6 ± 0,3	1 - - - - -	1 - - - - -	?
<i>nifH</i> -OTU#02	DUNnif495	34	99,4 ± 0,4	1 - - - - - 7	- - 3 - - - 7	?
<i>nifH</i> -OTU#03	DUNnif514	1		1 - - - - -	- - - - -	?
<i>nifH</i> -OTU#04	DUNnif316	115	99,5 ± 0,6	- - 3 - - - -	- - 3 - - - -	Cyanobacteria
<i>nifH</i> -OTU#05	DUNnif033	2	100	1 - - - - - 7	- - - - -	Cyanobacteria
<i>nifH</i> -OTU#06	DUNnif003	4	98,6 ± 0,4	1 2 3 - - - -	- - - - -	Bacteria
<i>nifH</i> -OTU#07	DUNnif286	2	99,4	- - - - - 7	- - 3 - - - -	Bacteria
<i>nifH</i> -OTU#08	DUNnif160	11	99,5 ± 0,5	- 2 - - - - -	1 2 - - - - -	Bacteria
<i>nifH</i> -OTU#09	DUNnif368	11	98,7 ± 0,6	- - 3 - - 6 -	- - 3 - - - -	Bacteria
<i>nifH</i> -OTU#10	DUNnif146	10	99,2 ± 0,6	1 2 3 - - - -	- - - - -	Bacteria
<i>nifH</i> -OTU#11	DUNnif024	25	99,0 ± 0,5	1 - - - - 6 -	1 - - - - 6 -	Bacteria
<i>nifH</i> -OTU#12	DUNnif243	1		- - 3 - - - -	- - - - -	Bacteria
<i>nifH</i> -OTU#13	DUNnif459	2	99,4	- - - - -	- - - - - 7	Bacteria
<i>nifH</i> -OTU#14	DUNnif370	1		- - - - - 6 -	- - - - -	Bacteria
<i>nifH</i> -OTU#15	DUNnif015	2	99,7	1 - - - - -	- - - - -	Bacteria
<i>nifH</i> -OTU#16	DUNnif423	18	99,5 ± 0,4	- 2 3 - - 6 7	- - - - - 6 -	Bacteria
<i>nifH</i> -OTU#17	DUNnif040	1		1 - - - - -	- - - - -	Bacteria
<i>nifH</i> -OTU#18	DUNnif451	1		- - - - -	- - - - - 7	Bacteria
<i>nifH</i> -OTU#19	DUNnif216	1		- - 3 - - - -	- - - - -	Bacteria
<i>nifH</i> -OTU#20	DUNnif470	3	99,6 ± 0,3	- 2 - - - - -	- - - - - 7	Bacteria
<i>nifH</i> -OTU#21	DUNnif139	2	100	- 2 - - - - -	- - - - -	Bacteria
<i>nifH</i> -OTU#22	DUNnif190	1		- - - - -	- 2 - - - - -	Bacteria
<i>nifH</i> -OTU#23	DUNnif425	1		- - - - - 7	- - - - -	Bacteria
<i>nifH</i> -OTU#24	DUNnif037	1		1 - - - - -	- - - - -	Bacteria
<i>nifH</i> -OTU#25	DUNnif238	1		- - 3 - - - -	- - - - -	Bacteria
<i>nifH</i> -OTU#26	DUNnif237	1		- - 3 - - - -	- - - - -	Bacteria
<i>nifH</i> -OTU#27	DUNnif109	17	99,4 ± 0,4	1 2 3 - - - -	1 - - - - -	Proteobacteria
<i>nifH</i> -OTU#28	DUNnif487	1		- - 3 - - - -	- - - - -	Gamma(?) - Proteobacteria
<i>nifH</i> -OTU#29	DUNnif154	10	97,4 ± 1,0	1 2 3 - - - -	- 2 3 - - - -	Proteobacteria
<i>nifH</i> -OTU#30	DUNnif083	99	99,3 ± 0,8	1 2 3 - - 6 7	1 2 - - - - 7	Bacteria
<i>nifH</i> -OTU#31	DUNnif377	1		- - - - - 6 -	- - - - -	Alpha(?) - Proteobacteria
<i>nifH</i> -OTU#32	DUNnif020	10	99,1 ± 0,5	1 2 - - - - -	- 2 - - - - -	Alpha(?) - Proteobacteria
<i>nifH</i> -OTU#33	DUNnif417	26	99,0 ± 0,8	1 2 - - - - 7	- 2 - - - - 7	Alpha(?) - Proteobacteria
<i>nifH</i> -OTU#34	DUNnif390	12	99,2 ± 0,5	- - - - - 6 -	- - - 4 - 6 7	Alpha(?) - Proteobacteria
<i>nifH</i> -OTU#35	DUNnif151	1		- 2 - - - - -	- - - - -	Proteobacteria
<i>nifH</i> -OTU#36	DUNnif342	5	99,6 ± 0,3	- 2 3 - - - -	- - 3 - - - -	Alpha(?) - Proteobacteria
<i>nifH</i> -OTU#37	DUNnif364	2	99,7	- - - - -	- - - 4 - - -	Alpha(?) - Proteobacteria
<i>nifH</i> -OTU#38	DUNnif442	5	99,4 ± 0,3	- 2 - - - - -	- - - - - 7	Proteobacteria
<i>nifH</i> -OTU#39	DUNnif319	2	99,4	- - - - -	- - 3 - - - -	Proteobacteria
<i>nifH</i> -OTU#40	DUNnif489	23	99,4 ± 0,5	- - 3 - - - 7	- - 3 - - - -	Proteobacteria
<i>nifH</i> -OTU#41	DUNnif282	2	99,1	- - 3 - - - -	- - - - -	Alpha(?) - Proteobacteria
<i>nifH</i> -OTU#42	DUNnif437	1		- - - - - 7	- - - - -	Alpha(?) - Proteobacteria
<i>nifH</i> -OTU#43	DUNnif494	19	98,1 ± 3,1	1 - - - - -	1 - - - - -	?
<i>nifH</i> -OTU#44	DUNnif511	1		- - - - -	1 - - - - -	?
<i>nifH</i> -OTU#45	DUNnif153	2	99,2	- 2 3 - - - -	- - - - -	Proteobacteria
<i>nifH</i> -OTU#46	DUNnif005	1		1 - - - - -	- - - - -	Proteobacteria
<i>nifH</i> -OTU#47	DUNnif385	1		- - - - -	- - - - - 6 -	Alpha(?) - Proteobacteria

**Bild 37: Phylogramm von 16S rDNA-Sequenzen – Gruppe I: Alphaproteobacteria, Pt. a**



**Bild 38: Phylogramm von 16S rDNA-Sequenzen – Gruppe I: Alphaproteobacteria, Pt. B**



**Bild 39: Phylogramm von 16S rDNA-Sequenzen – Gruppe II: Beta- u. Gammaproteobacteria**

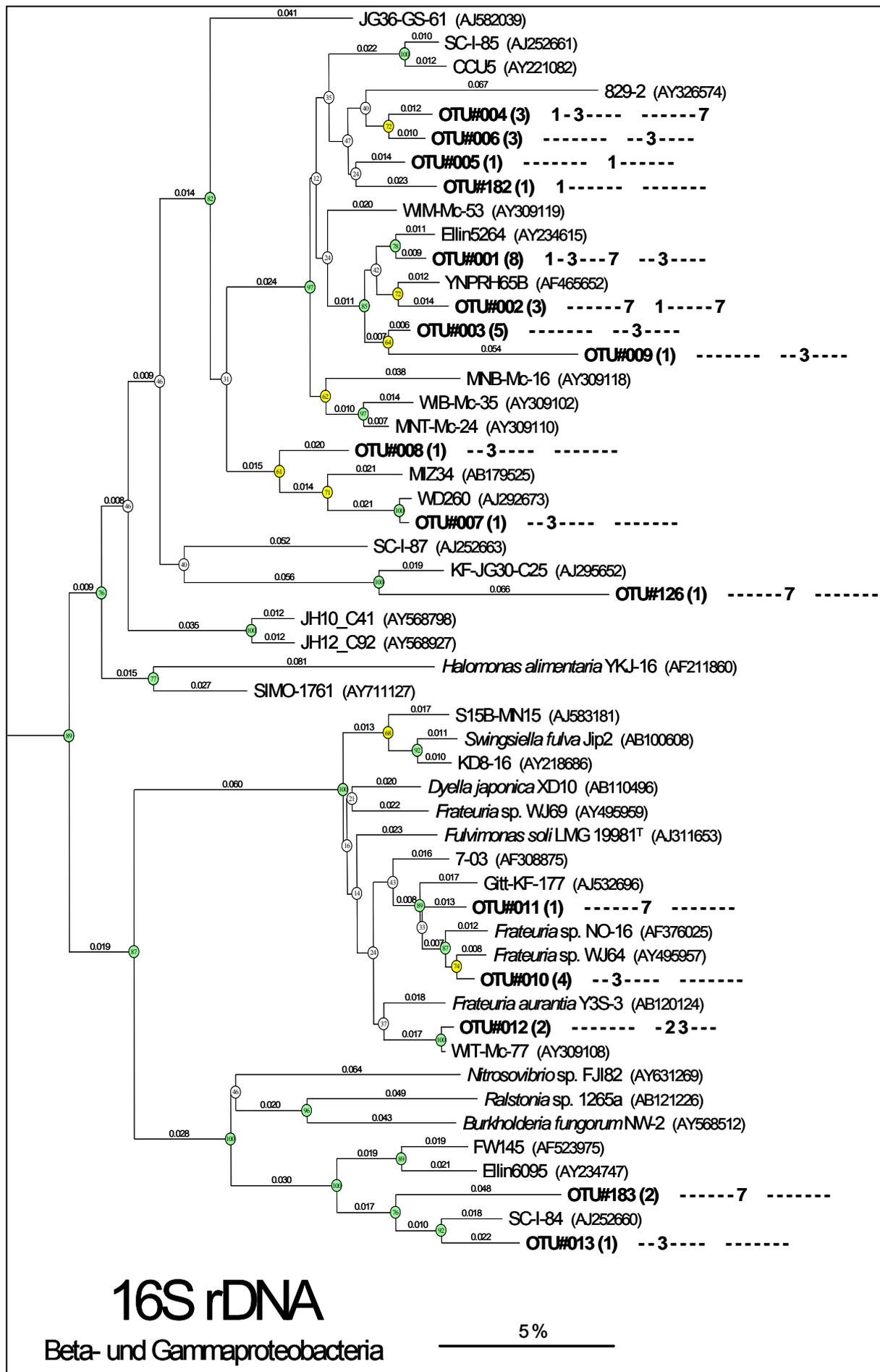
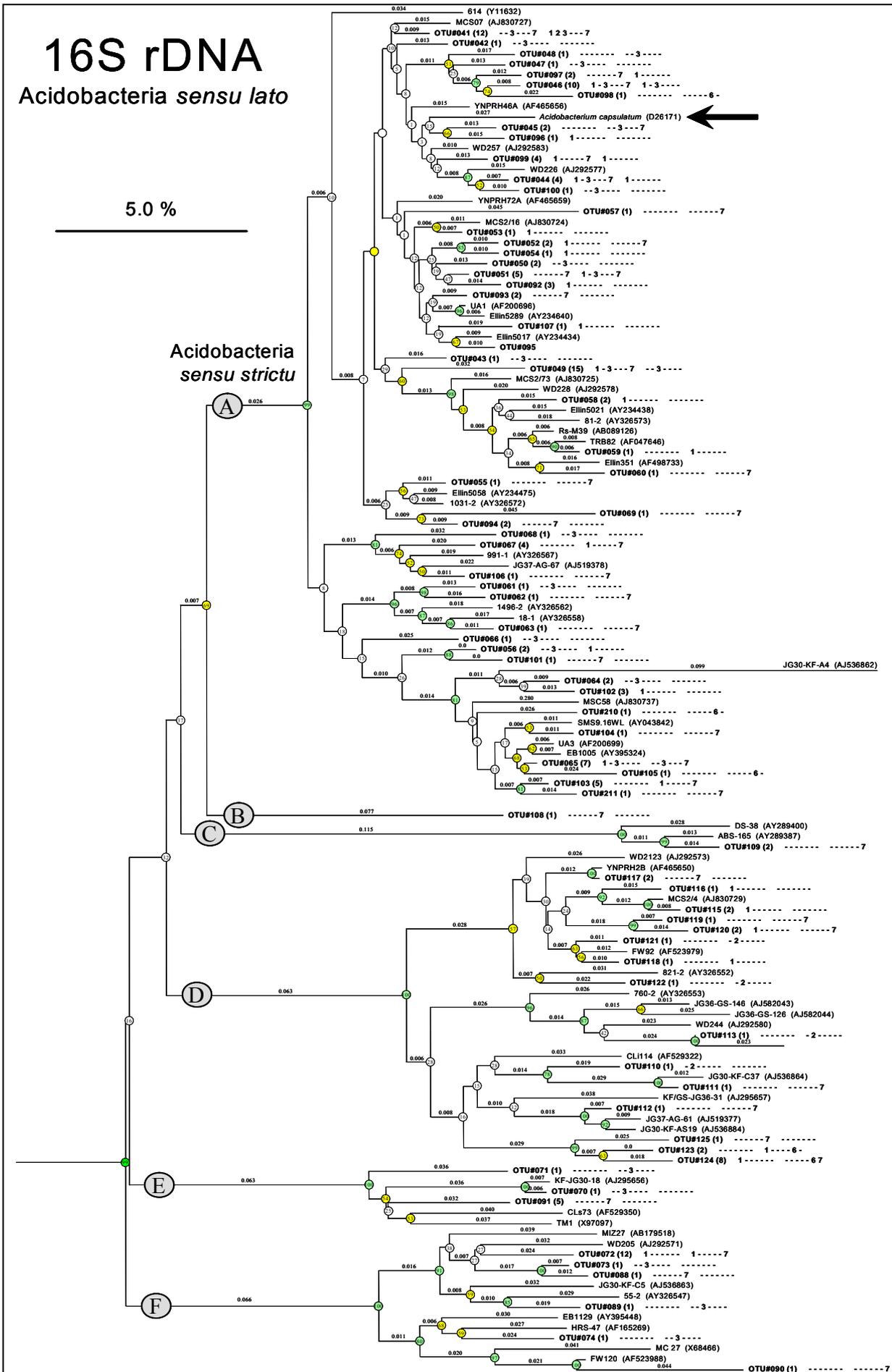
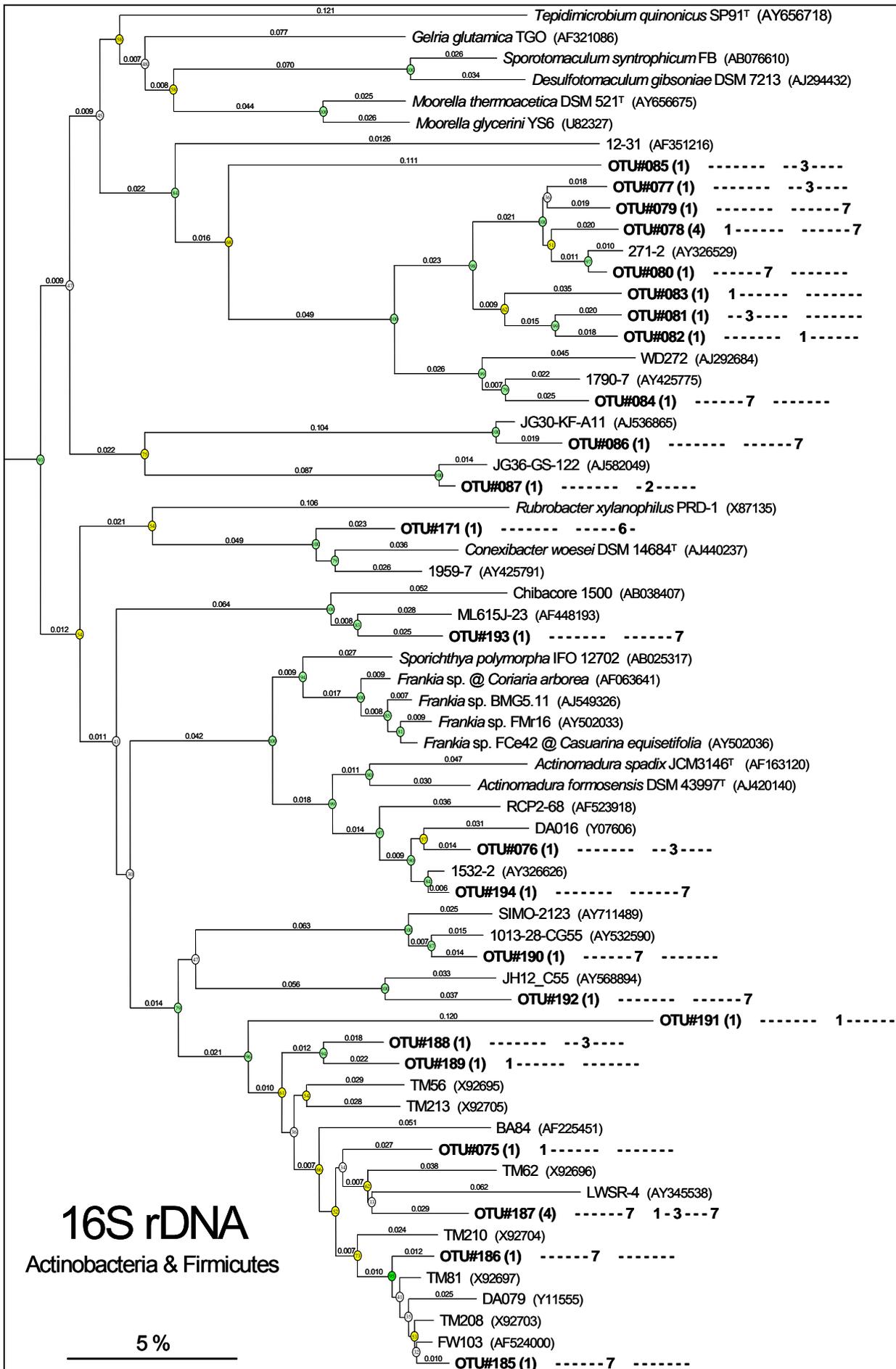


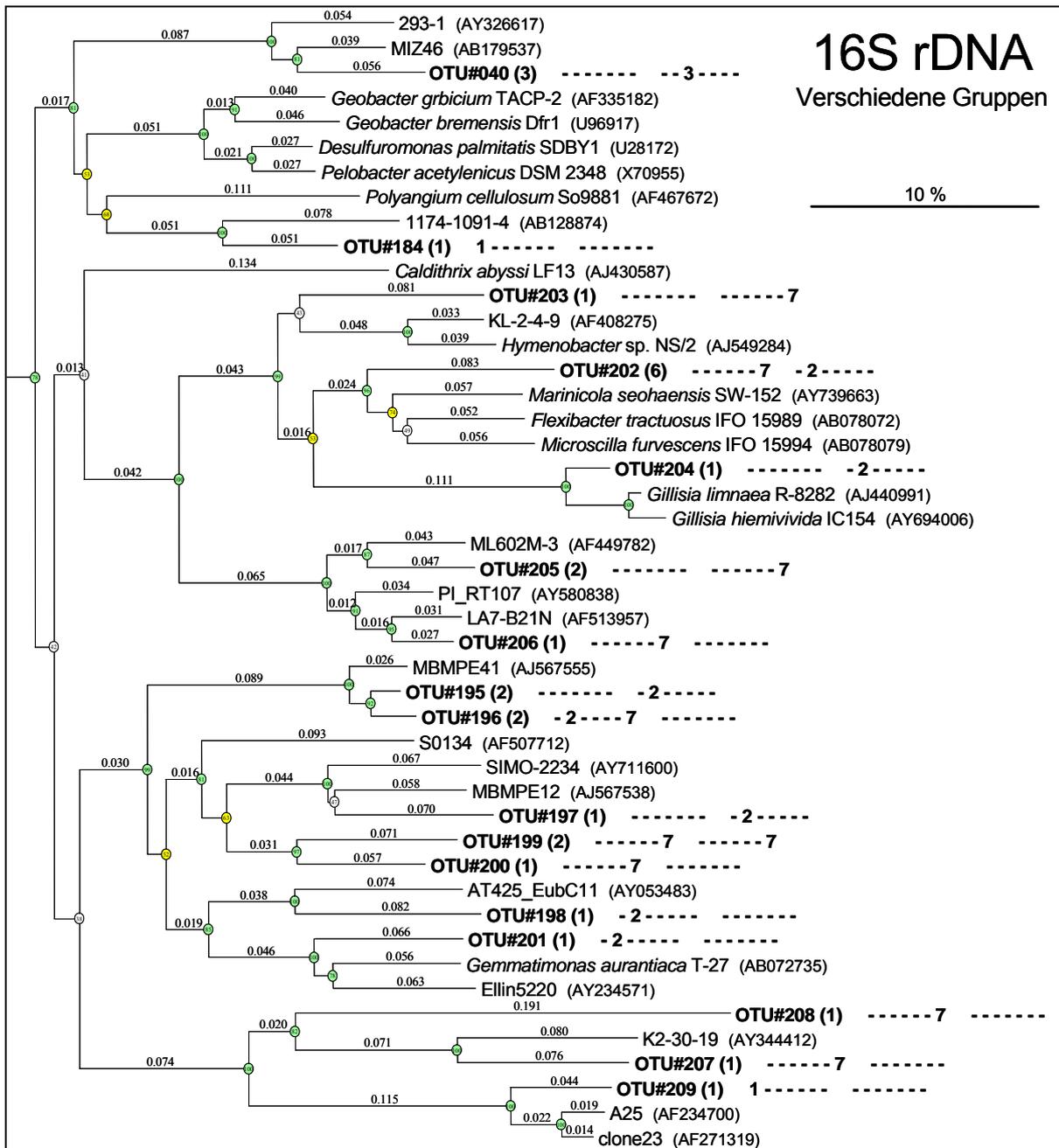
Bild 40: Phylogramm von 16S rDNA-Sequenzen – Gruppe III: Acidobacteria



**Bild 41: Phylogramm von 16S rDNA-Sequenzen – Gruppe IV: Actinobacteria/Firmicutes**

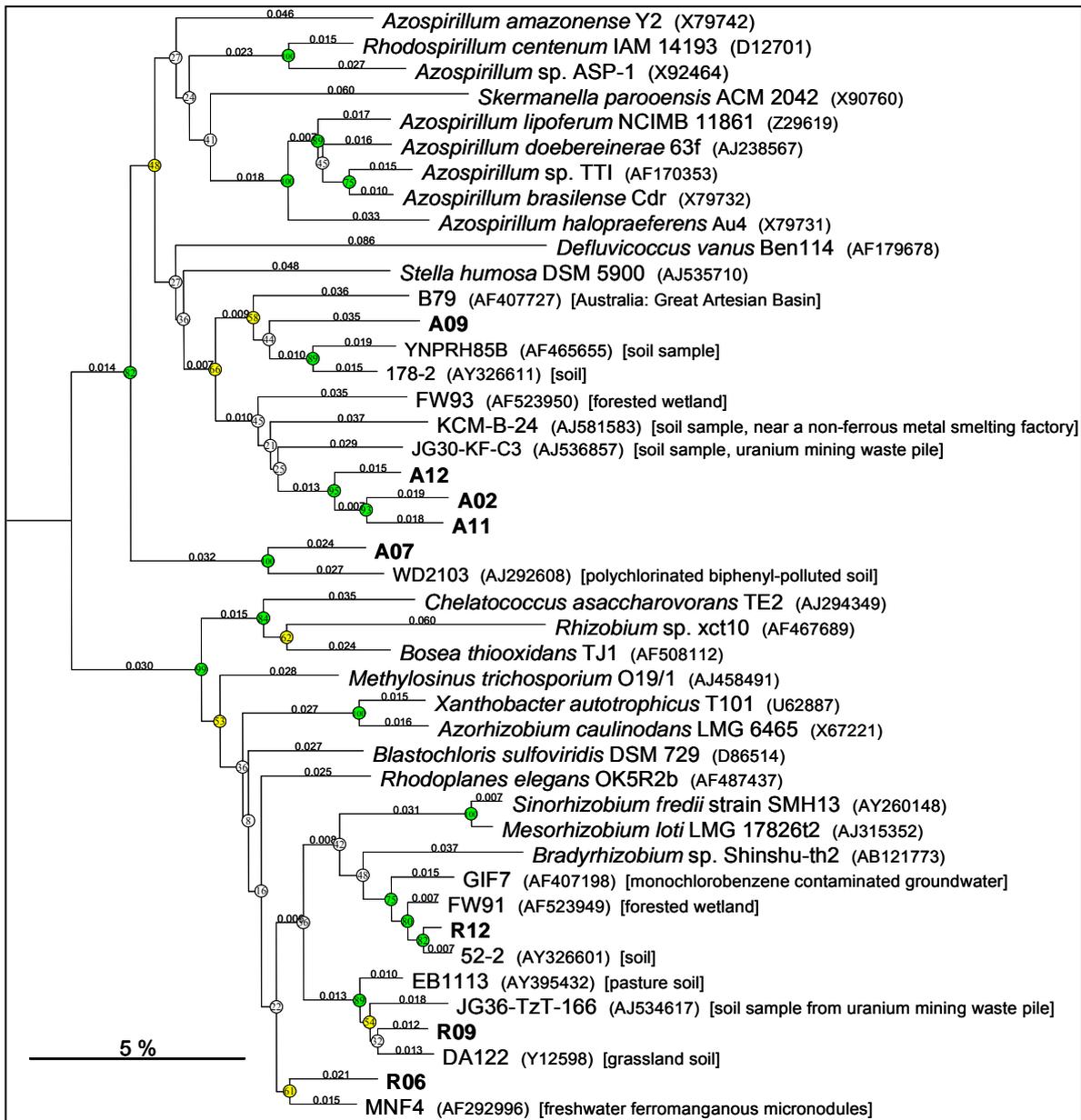


**Bild 42: Phylogramm von 16S rDNA-Sequenzen – Gruppe V: diverse Kleingruppen**



*Legende zu Bild 37 bis Bild 42:* Die einzelnen NJ-Phylogramme (2.12.2) entsprechen den in der Übersicht (Bild 25) definierten Gruppen, wurden aber separat berechnet. Die auf 1000 Replikate bezogenen *bootstrap*-Werte sind an den Knoten prozentual angegeben. Die genetische Distanz ist als Anzahl von Basenaustauschen pro Position im Alignment durch den Maßstab und die Zahlen über den Ästen gegeben. Die durchschnittliche Anzahl an Positionen im Alignment betrug 622 (Bild 37 und Bild 38), 648 (Bild 39), 631 (Bild 40), 642 (Bild 41) und 634 (Bild 42). Jedes der Phylogramme wurde durch 10 - 20 Sequenzen aus einer jeweils anderen Gruppe gewurzelt. Die Trennung des Alphaproteobacteria in Part a (Bild 37) und Part b (Bild 38) – symbolisiert durch das Sternchen (\*) – erfolgte willkürlich und nur der Darstellung wegen. Für Erläuterungen zu den einzelnen Phylogrammen siehe Text.

**Bild 43: Phylogramm von 16S rDNA-Sequenzen aus dem Dünnwaldboden, die mit Azospirillen- bzw. Rhizobien-selektiven Primern erhalten wurden**



Legende zu Bild 43: Das NJ-Phylogramm zeigt die mit den Azospirillen- und Rhizobien-selektiven PCR-Primern erhaltenen Sequenzen aus dem Dünnwaldboden. In allen Fällen waren die nächst-verwandten Sequenzen solche unkultivierter Bakterien. Als Vergleich sind noch einige Sequenzen von Referenzstämmen eingefügt. Wegen der Lage der Primer (vergleiche Tabelle 3, S. 18), gilt das Phylogramm nur für den Bereich 379 - 1150 (*E. coli*). Das Phylogramm wurde mit der 16S rDNA-Sequenz aus *E. coli* (NC\_000913, Gen *rrsH*) gewurzelt. Der Maßstab entspricht 5 % Nukleotidaustauschen.

Sequenzen aus unkultivierten Bakterien: **GIF7**: Alfreider *et al.* 2002 – **FW91**, **FW93**: Brofft *et al.* 2002 – **DA122**: Felske 1997 – **JG36-TzT-166**: Geissler *et al.* 2002 – **52-2**, **178-2**: Kim und Crowley 2003 – **WD2103**: Nogales *et al.* 2001 – **YNPRH85B**: Norris *et al.* 2002 – **KCM-B-24**: Satchanska *et al.* 2003 – **JG30-KF-C3**: Sacanska 2003 – **EB1113**: Schoenborn *et al.* 2003 – **B79**: Spanevello und Patel 2001 – **MNF4**: Stein *et al.* 2001.

**Tabelle 28: Übersicht der 16S rDNA-OTUs aus dem Dünnwaldboden**

Bezeichnung	Prototyp	Sequenzen	MPSH [%]	Gedüngte Fläche	Kontrollfläche	Taxonomie (RDP II Classifier)	Bild
OTU#001	DUNssu543	8	98,1 ± 0,9	1 - 3 - - - 7	- - 3 - - - -	Proteobacteria[100%] Gammaproteobacteria[79%] Oceanospirillales[22%] Saccharospirillaceae[17%] Saccharospirillum[17%]	Bild 39
OTU#002	DUNssu542	3	98,5 ± 0,4	- - - - - 7	1 - - - - - 7	Proteobacteria[100%] Gammaproteobacteria[74%] Thiotrichales[27%] Thiotrichaceae[27%] Beggiatoa[21%]	Bild 39
OTU#003	DUNssu601	5	99,4 ± 0,6	- - - - -	- - 3 - - - -	Proteobacteria[100%] Gammaproteobacteria[84%] Oceanospirillales[33%] Saccharospirillaceae[21%] Saccharospirillum[21%]	Bild 39
OTU#004	DUNssu229	3	98,5 ± 1,0	1 - 3 - - - -	- - - - - 7	Proteobacteria[100%] Gammaproteobacteria[100%] Oceanospirillales[64%] Hahellaceae[60%] Zooshikella[60%]	Bild 39
OTU#005	DUNssu584	1		- - - - -	1 - - - - -	Proteobacteria[100%] Gammaproteobacteria[97%] Oceanospirillales[58%] Hahellaceae[44%] Zooshikella[44%]	Bild 39
OTU#006	DUNssu622	3	99,5 ± 0,4	- - - - -	- - 3 - - - -	Proteobacteria[100%] Gammaproteobacteria[96%] Oceanospirillales[36%] Saccharospirillaceae[21%] Saccharospirillum[21%]	Bild 39
OTU#007	DUNssu251	1		- - 3 - - - -	- - - - -	Proteobacteria[100%] Gammaproteobacteria[85%] Alteromonadales[31%] Alteromonadaceae[31%] Microbulbifer[27%]	Bild 39
OTU#008	DUNssu255	1		- - 3 - - - -	- - - - -	Proteobacteria[100%] Gammaproteobacteria[90%] Oceanospirillales[25%] Saccharospirillaceae[14%] Saccharospirillum[14%]	Bild 39
OTU#009	DUNssu591	1		- - - - -	- - 3 - - - -	Proteobacteria[99%] Gammaproteobacteria[74%] Thiotrichales[29%] Thiotrichaceae[29%] Beggiatoa[19%]	Bild 39
OTU#010 *	DUNssu520	4	100 ± 0	- - 3 - - - -	- - - - -	Proteobacteria[100%] Gammaproteobacteria[100%] Xanthomonadales[100%] Xanthomonadaceae[100%] Rhodanobacter[52%]	Bild 39
OTU#011 **	DUNssu555	1		- - - - - 7	- - - - -	Proteobacteria[100%] Gammaproteobacteria[100%] Xanthomonadales[100%] Xanthomonadaceae[100%] Rhodanobacter[88%]	Bild 39
OTU#012 ***	DUNssu594	2	98,8	- - - - -	- 2 3 - - - -	Proteobacteria[100%] Gammaproteobacteria[100%] Xanthomonadales[100%] Xanthomonadaceae[100%] Frateriella[100%]	Bild 39
OTU#013	DUNssu252	1		- - 3 - - - -	- - - - -	Proteobacteria[100%] Betaproteobacteria[100%] Burkholderiales[68%] Incertae sedis[48%] Schlegelella[47%]	Bild 39
OTU#014 *	DUNssu590	9	99,5 ± 0,4	1 - 3 - - - -	- - 3 - - - 7	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhodospirillales[98%] Rhodospirillaceae[88%] Skermanella[51%]	Bild 38
OTU#015 *	DUNssu588	1		- - - - -	- - 3 - - - -	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhodospirillales[100%] Rhodospirillaceae[92%] Skermanella[35%]	Bild 38
OTU#016 *	DUNssu514	1		1 - - - - -	- - - - -	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhodospirillales[99%] Rhodospirillaceae[86%] Skermanella[36%]	Bild 38

(Tabelle 28, fortgesetzt)

Bezeichnung	Prototyp	Sequenzen	MPSH [%]	Gedüngte Fläche	Kontrollfläche	Taxonomie (RDP II Classifier)	Bild
OTU#017	DUNssu635	5	99,3 ± 0,9	----- 7	1 ----- 7	Proteobacteria[99%] Alphaproteobacteria[98%] Rhodospirillales[97%] Rhodospirillaceae[76%] Skermanella[33%]	Bild 38
OTU#018 *	DUNssu228	1		-- 3 -----	-----	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhodospirillales[100%] Rhodospirillaceae[85%] Tistrella[31%]	Bild 38
OTU#019 *	DUNssu604	3	99,5 ± ,04	-----	-- 3 -----	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[99%] Rhodospirillales[96%] Rhodospirillaceae[84%] Inquilius[39%]	Bild 38
OTU#020 *	DUNssu253	2		-- 3 -----	1 -----	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhodospirillales[100%] Rhodospirillaceae[94%] Inquilius[47%]	Bild 38
OTU#021	DUNssu571	1		-----	1 -----	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhodospirillales[100%] Rhodospirillaceae[78%] Inquilius[55%]	Bild 38
OTU#022 *	DUNssu625	4	100,0 ± 0,1	-----	-- 3 -----	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhodospirillales[99%] Rhodospirillaceae[97%] Skermanella[54%]	Bild 38
OTU#023	DUNssu593	1		-----	-- 3 -----	Proteobacteria[99%] Alphaproteobacteria[98%] Rhodospirillales[98%] Rhodospirillaceae[64%] Inquilius[46%]	Bild 38
OTU#024	DUNssu234	3	99,6 ± 0,2	1 - 3 -----	1 -----	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[94%] Rhodospirillales[90%] Acetobacteraceae[61%] Craurococcus[30%]	Bild 38
OTU#025	DUNssu651	6	99,5 ± 0,3	-- 3 -----	-- 3 --- 7	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[99%] Rhodospirillales[80%] Rhodospirillaceae[55%] Azospirillum[23%]	Bild 38
OTU#026	DUNssu294	1		-----	-- 3 -----	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[97%] Rhodospirillales[89%] Rhodospirillaceae[63%] Inquilius[53%]	Bild 38
OTU#027 *	DUNssu607	5	100 ± 0	-----	-- 3 -----	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhodospirillales[97%] Rhodospirillaceae[97%] Magnetospirillum[68%]	Bild 37
OTU#028	DUNssu554	1		----- 7	-----	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[99%] Rhodospirillales[86%] Rhodospirillaceae[76%] Skermanella[49%]	Bild 38
OTU#029 **	DUNssu526	48	98,8 ± 0,7	1 - 3 --- 7	1 - 3 --- 7	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhizobiales[100%] Hyphomicrobiaceae[88%] Rhodoplanes[88%]	Bild 37
OTU#030	DUNssu644	2	100	-- 3 -----	-----	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhodospirillales[71%] Rhodospirillaceae[60%] Skermanella[30%]	Bild 38
OTU#031	DUNssu650	1		-----	----- 7	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhizobiales[65%] Hyphomicrobiaceae[52%] Rhodoplanes[52%]	Bild 38
OTU#032 ***	DUNssu652	63	98,3 ± 0,8	1 - 3 --- 7	1 - 3 --- 7	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhizobiales[100%] Hyphomicrobiaceae[100%] Rhodoplanes[100%]	Bild 37

(Tabelle 28, fortgesetzt)

Bezeichnung	Prototyp	Sequenzen	MPSH [%]	Gedüngte Fläche	Kontrollfläche	Taxonomie (RDP II Classifier)	Bild
OTU#033 **	DUNssu519	17	98,4 ± 0,6	1 - 3 - - - 7	1 - 3 - - - 7	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhizobiales[100%] Hyphomicrobiaceae[95%] Rhodoplanes[95%]	Bild 37
OTU#034	DUNssu574	26	99,1 ± 0,4	1 - 3 - - - -	1 - 3 - - - 7	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhizobiales[100%] Beijerinckiaceae[79%] Beijerinckia[79%]	Bild 37
OTU#035	DUNssu292	5	99,5 ± 0,3	1 2 - - - - -	- - 3 - - - -	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhizobiales[100%] Beijerinckiaceae[59%] Beijerinckia[59%]	Bild 37
OTU#036	DUNssu579	2	98,9	- - - - - - -	1 - 3 - - - -	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhizobiales[100%] Beijerinckiaceae[46%] Beijerinckia[46%]	Bild 37
OTU#037	DUNssu546	4	98,6 ± 0,8	- - - - - - 7	1 - - - - - 7	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhizobiales[100%] Hyphomicrobiaceae[64%] Rhodoplanes[64%]	Bild 37
OTU#038	DUNssu560	1		- - - - - - -	1 - - - - - -	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhizobiales[100%] Hyphomicrobiaceae[32%] Rhodoplanes[30%]	Bild 37
OTU#039 ***	DUNssu642	1		- - - - - - -	- - - - - - 7	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Caulobacteriales[100%] Caulobacteraceae[100%] Caulobacter[98%]	Bild 37
OTU#040	DUNssu624	3	99,0 ± ,06	- - - - - - -	- - 3 - - - -	Proteobacteria[82%] Deltaproteobacteria[63%] Desulfobacteriales[32%] Desulfobacteraceae[32%] Desulforegula[13%]	Bild 42
OTU#041 ---	DUNssu654	9	99,0 ± 0,6	- - 3 - - - 7	1 2 3 - - - 7	Acidobacteria[100%] Acidobacteria[100%] Acidobacteriales[100%] Acidobacteriaceae[100%] Acidobacterium[100%]	Bild 40
OTU#042 ---	DUNssu247	1		- - 3 - - - -	- - - - - - -	Acidobacteria[100%] Acidobacteria[100%] Acidobacteriales[100%] Acidobacteriaceae[100%] Acidobacterium[100%]	Bild 40
OTU#043 ---	DUNssu216	1		- - 3 - - - -	- - - - - - -	Acidobacteria[100%] Acidobacteria[100%] Acidobacteriales[100%] Acidobacteriaceae[100%] Acidobacterium[100%]	Bild 40
OTU#044 ---	DUNssu237	7	99,5 ± 0,6	1 - 3 - - - 7	1 - - - - - -	Acidobacteria[100%] Acidobacteria[100%] Acidobacteriales[100%] Acidobacteriaceae[100%] Acidobacterium[100%]	Bild 40
OTU#045 ---	DUNssu660	2	99,7	- - - - - - -	- - 3 - - - 7	Acidobacteria[100%] Acidobacteria[100%] Acidobacteriales[100%] Acidobacteriaceae[100%] Acidobacterium[100%]	Bild 40
OTU#046 ---	DUNssu225	10	98,7 ± 0,8	1 - 3 - - - 7	1 - 3 - - - -	Acidobacteria[100%] Acidobacteria[100%] Acidobacteriales[100%] Acidobacteriaceae[100%] Acidobacterium[100%]	Bild 40
OTU#047 ---	DUNssu217	1		- - 3 - - - -	- - - - - - -	Acidobacteria[100%] Acidobacteria[100%] Acidobacteriales[100%] Acidobacteriaceae[100%] Acidobacterium[100%]	Bild 40
OTU#048 ---	DUNssu293	1		- - - - - - -	- - 3 - - - -	Acidobacteria[100%] Acidobacteria[100%] Acidobacteriales[100%] Acidobacteriaceae[100%] Acidobacterium[100%]	Bild 40

(Tabelle 28, fortgesetzt)

Bezeichnung	Prototyp	Sequenzen	MPSH [%]	Gedüngte Fläche	Kontrollfläche	Taxonomie (RDP II Classifier)	Bild
OTU#049 ---	DUNssu518	15	98,9 ± 0,7	1 - 3 - - - 7	- - 3 - - - -	Acidobacteria[100%] Acidobacteria[100%] Acidobacteriales[100%] Acidobacteriaceae[100%] Acidobacterium[100%]	Bild 40
OTU#050 ---	DUNssu233	2	99,9	- - 3 - - - -	- - - - - - - -	Acidobacteria[100%] Acidobacteria[100%] Acidobacteriales[100%] Acidobacteriaceae[100%] Acidobacterium[100%]	Bild 40
OTU#051 ---	DUNssu648	5	98,5 ± 0,5	- - - - - - 7	1 - 3 - - - 7	Acidobacteria[100%] Acidobacteria[100%] Acidobacteriales[100%] Acidobacteriaceae[100%] Acidobacterium[100%]	Bild 40
OTU#052 ---	DUNssu568	2	97,9	1 - - - - - -	- - - - - - 7	Acidobacteria[100%] Acidobacteria[100%] Acidobacteriales[100%] Acidobacteriaceae[100%] Acidobacterium[100%]	Bild 40
OTU#053 ---	DUNssu495	1		1 - - - - - -	- - - - - - - -	Acidobacteria[100%] Acidobacteria[100%] Acidobacteriales[100%] Acidobacteriaceae[100%] Acidobacterium[100%]	Bild 40
OTU#054 ---	DUNssu494	1		1 - - - - - -	- - - - - - - -	Acidobacteria[100%] Acidobacteria[100%] Acidobacteriales[100%] Acidobacteriaceae[100%] Acidobacterium[100%]	Bild 40
OTU#055 ---	DUNssu662	1		- - - - - - - -	- - - - - - 7	Acidobacteria[100%] Acidobacteria[100%] Acidobacteriales[100%] Acidobacteriaceae[100%] Acidobacterium[100%]	Bild 40
OTU#056 ---	DUNssu242	2	98,4	- - 3 - - - -	1 - - - - - -	Acidobacteria[100%] Acidobacteria[100%] Acidobacteriales[100%] Acidobacteriaceae[100%] Acidobacterium[100%]	Bild 40
OTU#057 ---	DUNssu631	1		- - - - - - - -	- - - - - - 7	Acidobacteria[100%] Acidobacteria[100%] Acidobacteriales[100%] Acidobacteriaceae[100%] Acidobacterium[100%]	Bild 40
OTU#058 ---	DUNssu483	2	98,5	1 - - - - - -	- - - - - - - -	Acidobacteria[100%] Acidobacteria[100%] Acidobacteriales[100%] Acidobacteriaceae[100%] Acidobacterium[100%]	Bild 40
OTU#059 ---	DUNssu566	1		- - - - - - - -	1 - - - - - -	Acidobacteria[100%] Acidobacteria[100%] Acidobacteriales[100%] Acidobacteriaceae[100%] Acidobacterium[100%]	Bild 40
OTU#060 ---	DUNssu655	1		- - - - - - - -	- - - - - - 7	Acidobacteria[100%] Acidobacteria[100%] Acidobacteriales[100%] Acidobacteriaceae[100%] Acidobacterium[100%]	Bild 40
OTU#061 ---	DUNssu222	1		- - 3 - - - -	- - - - - - - -	Acidobacteria[100%] Acidobacteria[100%] Acidobacteriales[100%] Acidobacteriaceae[100%] Acidobacterium[100%]	Bild 40
OTU#062 ---	DUNssu649	1		- - - - - - - -	- - - - - - 7	Acidobacteria[100%] Acidobacteria[100%] Acidobacteriales[100%] Acidobacteriaceae[100%] Acidobacterium[100%]	Bild 40
OTU#063 ---	DUNssu630	1		- - - - - - - -	- - - - - - 7	Acidobacteria[100%] Acidobacteria[100%] Acidobacteriales[100%] Acidobacteriaceae[100%] Acidobacterium[100%]	Bild 40
OTU#064 ---	DUNssu532	2	99,9	- - 3 - - - -	- - - - - - - -	Acidobacteria[99%] Acidobacteria[99%] Acidobacteriales[99%] Acidobacteriaceae[99%] Acidobacterium[99%]	Bild 40

(Tabelle 28, fortgesetzt)

Bezeichnung	Prototyp	Sequenzen	MPSH [%]	Gedüngte Fläche	Kontrollfläche	Taxonomie (RDP II Classifier)	Bild
OTU#065 ---	DUNssu501	7	98,7 ± 0,7	1 - 3 - - - -	- - 3 - - - 7	Acidobacteria[100%] Acidobacteria[100%] Acidobacteriales[100%] Acidobacteriaceae[100%] Acidobacterium[100%]	Bild 40
OTU#066 ---	DUNssu531	1		- - 3 - - - -	- - - - - - - -	Acidobacteria[100%] Acidobacteria[100%] Acidobacteriales[100%] Acidobacteriaceae[100%] Acidobacterium[100%]	Bild 40
OTU#067 ---	DUNssu578	4	98,7 ± 0,7	- - - - - - - -	1 - - - - - 7	Acidobacteria[100%] Acidobacteria[100%] Acidobacteriales[100%] Acidobacteriaceae[100%] Acidobacterium[100%]	Bild 40
OTU#068 ---	DUNssu241	1		- - 3 - - - -	- - - - - - - -	Acidobacteria[100%] Acidobacteria[100%] Acidobacteriales[100%] Acidobacteriaceae[100%] Acidobacterium[100%]	Bild 40
OTU#069 ---	DUNssu640	1		- - - - - - - -	- - - - - - 7	Acidobacteria[100%] Acidobacteria[100%] Acidobacteriales[100%] Acidobacteriaceae[100%] Acidobacterium[100%]	Bild 40
OTU#070	DUNssu227	1		- - 3 - - - -	- - - - - - - -	Acidobacteria[51%] Acidobacteria[51%] Acidobacteriales[51%] Acidobacteriaceae[51%] Acidobacterium[51%]	Bild 40
OTU#071	DUNssu295	1		- - - - - - - -	- - 3 - - - -	Acidobacteria[48%] Acidobacteria[48%] Acidobacteriales[48%] Acidobacteriaceae[48%] Acidobacterium[48%]	Bild 40
OTU#072	DUNssu512	12	98,6 ± 0,6	1 - - - - - -	1 - - - - - 7	Firmicutes[50%] Clostridia[49%] Clostridiales[48%] Clostridiaceae[33%] Thermobrachium[27%]	Bild 40
OTU#073	DUNssu220	1		- - 3 - - - -	- - - - - - - -	Firmicutes[49%] Clostridia[49%] Clostridiales[46%] Clostridiaceae[31%] Thermobrachium[31%]	Bild 40
OTU#074	DUNssu301	1		- - - - - - - -	- - 3 - - - -	Proteobacteria[48%] Deltaproteobacteria[46%] Syntrophobacteriales[45%] Syntrophobacteriaceae[45%] Desulfacinum[33%]	Bild 40
OTU#075	DUNssu502	1		1 - - - - - -	- - - - - - - -	Actinobacteria[100%] Actinobacteria[100%] Actinomycetales[58%] Frankiaceae[22%] Frankia[22%]	Bild 41
OTU#076	DUNssu619	1		- - - - - - - -	- - 3 - - - -	Actinobacteria[100%] Actinobacteria[100%] Actinomycetales[100%] Thermomonosporaceae[35%] Spirillospora[29%]	Bild 41
OTU#077	DUNssu611	1		- - - - - - - -	- - 3 - - - -	Firmicutes[59%] Clostridia[58%] Thermoanaerobacteriales[42%] Thermoanaerobacteriaceae[42%] Thermanaeromonas[22%]	Bild 41
OTU#078	DUNssu479	4	98,9 ± 0,6	1 - - - - - -	- - - - - - 7	Firmicutes[54%] Clostridia[54%] Thermoanaerobacteriales[27%] Thermoanaerobacteriaceae[27%] Gelria[14%]	Bild 41
OTU#079	DUNssu450	1		- - - - - - - -	- - - - - - 7	Firmicutes[48%] Clostridia[48%] Thermoanaerobacteriales[32%] Thermoanaerobacteriaceae[32%] Thermanaeromonas[21%]	Bild 41
OTU#080	DUNssu375	1		- - - - - - 7	- - - - - - - -	Firmicutes[53%] Clostridia[53%] Clostridiales[37%] Peptococcaceae[21%] Pelotomaculum[20%]	Bild 41

(Tabelle 28, fortgesetzt)

Bezeichnung	Prototyp	Sequenzen	MPSH [%]	Gedüngte Fläche	Kontrollfläche	Taxonomie (RDP II Classifier)	Bild
OTU#081	DUNssu259	1		-- 3 ----	-----	Firmicutes[70%] Clostridia[70%] Clostridiales[51%] Peptococcaceae[39%] Pelotomaculum[33%]	Bild 41
OTU#082	DUNssu421	1		-----	1 -----	Firmicutes[72%] Clostridia[72%] Clostridiales[37%] Peptococcaceae[24%] Pelotomaculum[20%]	Bild 41
OTU#083	DUNssu320	1		1 -----	-----	Firmicutes[49%] Clostridia[49%] Thermoanaerobacteriales[37%] Thermoanaerobacteriaceae[37%] Gelria[27%]	Bild 41
OTU#084	DUNssu391	1		----- 7	-----	Firmicutes[51%] Clostridia[50%] Thermoanaerobacteriales[27%] Thermoanaerobacteriaceae[27%] Thermanaeromonas[17%]	Bild 41
OTU#085	DUNssu279	1		-----	-- 3 ----	Proteobacteria[99%] Alphaproteobacteria[99%] Rhizobiales[99%] Methylocystaceae[75%] Methylocystis[75%]	Bild 41
OTU#086	DUNssu189	1		-----	----- 7	Actinobacteria[44%] Actinobacteria[44%] Rubrobacterales[41%] Rubrobacteraceae[41%] Conexibacter[41%]	Bild 41
OTU#087	DUNssu055	1		-----	- 2 -----	Thermomicrobia[79%] Thermomicrobia[79%] Thermomicrobiales[79%] Thermomicrobiaceae[79%] Thermomicrobium[79%]	Bild 41
OTU#088	DUNssu338	1		----- 7	-----	Acidobacteria[57%] Acidobacteria[57%] Acidobacteriales[57%] Acidobacteriaceae[57%] Acidobacterium[57%]	Bild 40
OTU#089	DUNssu273	1		-----	-- 3 ----	Acidobacteria[75%] Acidobacteria[75%] Acidobacteriales[75%] Acidobacteriaceae[75%] Acidobacterium[75%]	Bild 40
OTU#090	DUNssu173	1		-----	----- 7	Acidobacteria[66%] Acidobacteria[66%] Acidobacteriales[66%] Acidobacteriaceae[66%] Acidobacterium[66%]	Bild 40
OTU#091 ---	DUNssu336	5	99,8 ± 0,1	----- 7	-----	Acidobacteria[98%] Acidobacteria[98%] Acidobacteriales[98%] Acidobacteriaceae[98%] Acidobacterium[98%]	Bild 40
OTU#092 ---	DUNssu002	3	99,1 ± 1,0	1 -----	-----	Acidobacteria[100%] Acidobacteria[100%] Acidobacteriales[100%] Acidobacteriaceae[100%] Acidobacterium[100%]	Bild 40
OTU#093 ---	DUNssu353	2	99,7	----- 7	-----	Acidobacteria[100%] Acidobacteria[100%] Acidobacteriales[100%] Acidobacteriaceae[100%] Acidobacterium[100%]	Bild 40
OTU#094 ---	DUNssu349	2	98,5	----- 7	-----	Acidobacteria[100%] Acidobacteria[100%] Acidobacteriales[100%] Acidobacteriaceae[100%] Acidobacterium[100%]	Bild 40
OTU#095 ---	DUNssu190	2	99,0	-----	----- 7	Acidobacteria[100%] Acidobacteria[100%] Acidobacteriales[100%] Acidobacteriaceae[100%] Acidobacterium[100%]	Bild 40
OTU#096 ---	DUNssu021	1		1 -----	-----	Acidobacteria[100%] Acidobacteria[100%] Acidobacteriales[100%] Acidobacteriaceae[100%] Acidobacterium[100%]	Bild 40

(Tabelle 28, fortgesetzt)

Bezeichnung	Prototyp	Sequenzen	MPSH [%]	Gedüngte Fläche	Kontrollfläche	Taxonomie (RDP II Classifier)	Bild
OTU#097 ---	DUNssu152	2	99,9	----- 7	1 -----	Acidobacteria[100%] Acidobacteria[100%] Acidobacteriales[100%] Acidobacteriaceae[100%] Acidobacterium[100%]	Bild 40
OTU#098 ---	DUNssu075	1		-----	----- 6 -	Acidobacteria[100%] Acidobacteria[100%] Acidobacteriales[100%] Acidobacteriaceae[100%] Acidobacterium[100%]	Bild 40
OTU#099 ---	DUNssu356	4	97,9 ± 0,5	1----- 7	1-----	Acidobacteria[100%] Acidobacteria[100%] Acidobacteriales[100%] Acidobacteriaceae[100%] Acidobacterium[100%]	Bild 40
OTU#100 ---	DUNssu264	1		-- 3 ----	-----	Acidobacteria[100%] Acidobacteria[100%] Acidobacteriales[100%] Acidobacteriaceae[100%] Acidobacterium[100%]	Bild 40
OTU#101 ---	DUNssu379	1		----- 7	-----	Acidobacteria[100%] Acidobacteria[100%] Acidobacteriales[100%] Acidobacteriaceae[100%] Acidobacterium[100%]	Bild 40
OTU#102 ---	DUNssu127	3	99,9 ± 0,0	1-----	-----	Acidobacteria[100%] Acidobacteria[100%] Acidobacteriales[100%] Acidobacteriaceae[100%] Acidobacterium[100%]	Bild 40
OTU#103 ---	DUNssu477	5	98,8 ± 0,7	-----	1----- 7	Acidobacteria[100%] Acidobacteria[100%] Acidobacteriales[100%] Acidobacteriaceae[100%] Acidobacterium[100%]	Bild 40
OTU#104 ---	DUNssu183	1		-----	----- 7	Acidobacteria[100%] Acidobacteria[100%] Acidobacteriales[100%] Acidobacteriaceae[100%] Acidobacterium[100%]	Bild 40
OTU#105 --	DUNssu070	1		-----	----- 6 -	Acidobacteria[95%] Acidobacteria[95%] Acidobacteriales[95%] Acidobacteriaceae[95%] Acidobacterium[95%]	Bild 40
OTU#106 ---	DUNssu467	1		-----	----- 7	Acidobacteria[100%] Acidobacteria[100%] Acidobacteriales[100%] Acidobacteriaceae[100%] Acidobacterium[100%]	Bild 40
OTU#107 ---	DUNssu095	1		1-----	-----	Acidobacteria[100%] Acidobacteria[100%] Acidobacteriales[100%] Acidobacteriaceae[100%] Acidobacterium[100%]	Bild 40
OTU#108 ---	DUNssu334	1		----- 7	-----	Acidobacteria[100%] Acidobacteria[100%] Acidobacteriales[100%] Acidobacteriaceae[100%] Acidobacterium[100%]	Bild 40
OTU#109	DUNssu476	2	99,6	-----	----- 7	Acidobacteria[63%] Acidobacteria[63%] Acidobacteriales[63%] Acidobacteriaceae[63%] Acidobacterium[63%]	Bild 40
OTU#110 --	DUNssu029	1		- 2 -----	-----	Acidobacteria[93%] Acidobacteria[93%] Acidobacteriales[93%] Acidobacteriaceae[93%] Acidobacterium[93%]	Bild 40
OTU#111 --	DUNssu164	1		-----	----- 7	Acidobacteria[93%] Acidobacteria[93%] Acidobacteriales[93%] Acidobacteriaceae[93%] Acidobacterium[93%]	Bild 40
OTU#112 **	DUNssu167	1		-----	----- 7	Gemmatimonadetes[86%] Gemmatimonadetes[86%] Gemmatimonadales[86%] Gemmatimonadales[86%] Gemmatimonas[86%]	Bild 40

(Tabelle 28, fortgesetzt)

Bezeichnung	Prototyp	Sequenzen	MPSH [%]	Gedüngte Fläche	Kontrollfläche	Taxonomie (RDP II Classifier)	Bild
OTU#113 --	DUNssu051	1		-----	- 2 -----	Acidobacteria[81%] Acidobacteria[81%] Acidobacteriales[81%] Acidobacteriaceae[81%] Acidobacterium[81%]	Bild 40
OTU#114 --	DUNssu174	1		-----	----- 7	Acidobacteria[85%] Acidobacteria[85%] Acidobacteriales[85%] Acidobacteriaceae[85%] Acidobacterium[85%]	Bild 40
OTU#115 --	DUNssu012	2	100	1-----	-----	Acidobacteria[91%] Acidobacteria[91%] Acidobacteriales[91%] Acidobacteriaceae[91%] Acidobacterium[91%]	Bild 40
OTU#116 --	DUNssu010	1		1-----	-----	Acidobacteria[94%] Acidobacteria[94%] Acidobacteriales[94%] Acidobacteriaceae[94%] Acidobacterium[94%]	Bild 40
OTU#117 --	DUNssu154	2	100	----- 7	-----	Acidobacteria[91%] Acidobacteria[91%] Acidobacteriales[91%] Acidobacteriaceae[91%] Acidobacterium[91%]	Bild 40
OTU#118	DUNssu116	1		-----	1-----	Acidobacteria[21%] Acidobacteria[21%] Acidobacteriales[21%] Acidobacteriaceae[21%] Acidobacterium[21%]	Bild 40
OTU#119 --	DUNssu180	1		-----	----- 7	Acidobacteria[94%] Acidobacteria[94%] Acidobacteriales[94%] Acidobacteriaceae[94%] Acidobacterium[94%]	Bild 40
OTU#120	DUNssu188	2	99,4	1-----	----- 7	Proteobacteria[47%] Alphaproteobacteria[43%] Rhodospirillales[38%] Acetobacteraceae[38%] Muricoccus[13%]	Bild 40
OTU#121 --	DUNssu045	1		-----	- 2 -----	Acidobacteria[83%] Acidobacteria[83%] Acidobacteriales[83%] Acidobacteriaceae[83%] Acidobacterium[83%]	Bild 40
OTU#122 --	DUNssu053	1		-----	- 2 -----	Acidobacteria[87%] Acidobacteria[87%] Acidobacteriales[87%] Acidobacteriaceae[87%] Acidobacterium[87%]	Bild 40
OTU#123	DUNssu114	2	99,6	-----	1----- 6 -	Acidobacteria[26%] Acidobacteria[26%] Acidobacteriales[26%] Acidobacteriaceae[26%] Acidobacterium[26%]	Bild 40
OTU#124	DUNssu110	8	99,2 ± 0,6	1-----	----- 6 7	Actinobacteria[28%] Actinobacteria[28%] Actinomycetales[23%] Acidotherrmaceae[20%] Acidotherrmus[20%]	Bild 40
OTU#125 --	DUNssu143	1		----- 7	-----	Acidobacteria[84%] Acidobacteria[84%] Acidobacteriales[84%] Acidobacteriaceae[84%] Acidobacterium[84%]	Bild 40
OTU#126	DUNssu339	1		----- 7	-----	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[87%] Rhizobiales[85%] Methylocystaceae[35%] Methylocystis[35%]	Bild 39
OTU#127 *	DUNssu056	1		-----	- 2 -----	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhodospirillales[100%] Rhodospirillaceae[87%] Tistrella[53%]	Bild 38
OTU#128 **	DUNssu071	1		-----	----- 6 -	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhizobiales[96%] Methylocystaceae[89%] Methylocystis[87%]	Bild 38

(Tabelle 28, fortgesetzt)

Bezeichnung	Prototyp	Sequenzen	MPSH [%]	Gedüngte Fläche	Kontrollfläche	Taxonomie (RDP II Classifier)	Bild
OTU#129 *	DUNssu454	1		-----	----- 7	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhodospirillales[100%] Rhodospirillaceae[91%] Inquilinus[44%]	Bild 38
OTU#130 *	DUNssu452	1		-----	----- 7	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhodospirillales[100%] Rhodospirillaceae[84%] Skermanella[38%]	Bild 38
OTU#131 *	DUNssu172	1		-----	----- 7	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhodospirillales[100%] Rhodospirillaceae[97%] Skermanella[47%]	Bild 38
OTU#132	DUNssu198	1		-----	----- 7	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhodospirillales[100%] Rhodospirillaceae[63%] Skermanella[33%]	Bild 38
OTU#133 *	DUNssu408	1		-----	1 -----	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhodospirillales[100%] Rhodospirillaceae[88%] Skermanella[47%]	Bild 38
OTU#134	DUNssu169	2	98,0	1 -----	----- 7	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhodospirillales[98%] Rhodospirillaceae[77%] Tistrella[55%]	Bild 38
OTU#135 *	DUNssu024	1		1 -----	-----	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhodospirillales[98%] Rhodospirillaceae[90%] Inquilinus[61%]	Bild 38
OTU#136	DUNssu015	1		1 -----	-----	Proteobacteria[99%] Alphaproteobacteria[99%] Rhodospirillales[98%] Rhodospirillaceae[73%] Skermanella[36%]	Bild 38
OTU#137	DUNssu011	8	99,5 ± 0,3	1 ----- 7	-----	Proteobacteria[82%] Alphaproteobacteria[77%] Rhodospirillales[59%] Acetobacteraceae[31%] Acidisphaera[17%]	Bild 38
OTU#138	DUNssu440	1		-----	----- 7	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhizobiales[99%] Methylocystaceae[67%] Methylocystis[63%]	Bild 38
OTU#139	DUNssu324	1		1 -----	-----	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhodospirillales[100%] Rhodospirillaceae[69%] Inquilinus[39%]	Bild 38
OTU#140	DUNssu049	1		-----	- 2 -----	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhodospirillales[100%] Rhodospirillaceae[73%] Inquilinus[35%]	Bild 38
OTU#141	DUNssu478	1		-----	----- 7	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhodospirillales[98%] Rhodospirillaceae[61%] Inquilinus[38%]	Bild 38
OTU#142 *	DUNssu155	1		----- 7	-----	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhodobacterales[97%] Rhodobacteraceae[97%] Roseobacter[40%]	Bild 38
OTU#143	DUNssu163	1		----- 7	-----	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhodospirillales[68%] Rhodospirillaceae[50%] Tistrella[28%]	Bild 38
OTU#144	DUNssu052	1		-----	- 2 -----	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhodospirillales[82%] Rhodospirillaceae[44%] Tistrella[20%]	Bild 38

(Tabelle 28, fortgesetzt)

Bezeichnung	Prototyp	Sequenzen	MPSH [%]	Gedüngte Fläche	Kontrollfläche	Taxonomie (RDP II Classifier)	Bild
OTU#145	DUNssu202	3	99,8 ± 0,2	----- 7	----- 7	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhodospirillales[88%] Acetobacteraceae[54%] Acidisphaera[36%]	Bild 38
OTU#146	DUNssu468	1		-----	----- 7	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhodospirillales[100%] Rhodospirillaceae[60%] Inquilinus[27%]	Bild 38
OTU#147	DUNssu035	1		- 2 -----	-----	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhodospirillales[93%] Rhodospirillaceae[54%] Tistrella[40%]	Bild 38
OTU#148	DUNssu404	1		-----	1 -----	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[92%] Rhodospirillales[91%] Rhodospirillaceae[65%] Rhodovibrio[40%]	Bild 38
OTU#149 *	DUNssu054	1		-----	- 2 -----	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhodospirillales[100%] Acetobacteraceae[100%] Rhodopila[69%]	Bild 38
OTU#150 **	DUNssu146	1		----- 7	-----	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhodospirillales[100%] Acetobacteraceae[100%] Acidisphaera[83%]	Bild 38
OTU#151	DUNssu191	1		-----	----- 7	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhodospirillales[78%] Rhodospirillaceae[41%] Inquilinus[37%]	Bild 38
OTU#152	DUNssu165	1		-----	----- 7	Proteobacteria[99%] Alphaproteobacteria[95%] Rhodospirillales[71%] Rhodospirillaceae[66%] Inquilinus[45%]	Bild 38
OTU#153 *	DUNssu153	1		----- 7	-----	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Sphingomonadales[100%] Sphingomonadaceae[100%] Porphyrobacter[60%]	Bild 37
OTU#154 **	DUNssu117	11	99,1 ± 0,5	1 ----- 7	1 - 3 --- 7	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhizobiales[100%] Hyphomicrobiaceae[93%] Rhodoplanes[91%]	Bild 37
OTU#155 **	DUNssu382	1		----- 7	-----	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhizobiales[100%] Hyphomicrobiaceae[91%] Rhodoplanes[91%]	Bild 37
OTU#156 **	DUNssu312	1		1 -----	-----	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhizobiales[100%] Hyphomicrobiaceae[92%] Rhodoplanes[92%]	Bild 37
OTU#157 ***	DUNssu394	1		----- 7	-----	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhizobiales[100%] Hyphomicrobiaceae[99%] Rhodoplanes[99%]	Bild 37
OTU#158 **	DUNssu261	1		-- 3 ----	-----	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhizobiales[100%] Hyphomicrobiaceae[95%] Rhodoplanes[95%]	Bild 37
OTU#159	DUNssu471	4	99,5 ± 0,6	-----	----- 7	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhizobiales[100%] Methylocystaceae[55%] Methylocystis[50%]	Bild 37
OTU#160 ***	DUNssu047	3	99,3 ± 0,5	1 -----	- 2 ---- 7	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhizobiales[100%] Hyphomicrobiaceae[100%] Rhodoplanes[100%]	Bild 37

(Tabelle 28, fortgesetzt)

Bezeichnung	Prototyp	Sequenzen	MPSH [%]	Gedüngte Fläche	Kontrollfläche	Taxonomie (RDP II Classifier)	Bild
OTU#161	DUNssu121	1		-----	1-----	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhizobiales[100%] Hyphomicrobiaceae[58%] Rhodoplanes[58%]	Bild 37
OTU#162	DUNssu396	1		-----7	-----	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhizobiales[100%] Methylocystaceae[66%] Methylosinus[45%]	Bild 37
OTU#163 ***	DUNssu333	1		-----7	-----	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhizobiales[100%] Beijerinckiaceae[99%] Beijerinckia[99%]	Bild 37
OTU#164	DUNssu100	3	99,2 ± 0,7	1-----	-----	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhizobiales[100%] Beijerinckiaceae[51%] Beijerinckia[51%]	Bild 37
OTU#165	DUNssu177	1		-----	-----7	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhizobiales[100%] Methylocystaceae[54%] Methylocystis[44%]	Bild 37
OTU#166	DUNssu397	1		-----7	-----	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhizobiales[100%] Hyphomicrobiaceae[57%] Rhodoplanes[56%]	Bild 37
OTU#167	DUNssu283	1		-----	--3----	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhizobiales[100%] Hyphomicrobiaceae[75%] Rhodoplanes[75%]	Bild 37
OTU#168	DUNssu061	1		-----	-2-----	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhodospirillales[54%] Rhodospirillaceae[28%] Inquilinus[15%]	Bild 37
OTU#169 **	DUNssu171	2	99,7	-----	-----7	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhizobiales[96%] Methylocystaceae[86%] Methylocystis[86%]	Bild 37
OTU#170 *	DUNssu158	2	100	-----7	-----	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhizobiales[100%] Methylocystaceae[92%] Methylocystis[47%]	Bild 37
OTU#171 ***	DUNssu069	1		-----	-----6-	Actinobacteria[100%] Actinobacteria[100%] Rubrobacterales[100%] Rubrobacteraceae[100%] Conexibacter[100%]	Bild 41
OTU#172	DUNssu129	1		-----7	-----	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhizobiales[99%] Rhodobiaceae[53%] Rhodobium[53%]	Bild 37
OTU#173	DUNssu046	5	99,2 ± 0,4	-----7	-2----7	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhizobiales[95%] Hyphomicrobiaceae[32%] Starkeya[14%]	Bild 37
OTU#174	DUNssu134	1		-----7	-----	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhizobiales[87%] Hyphomicrobiaceae[42%] Starkeya[22%]	Bild 37
OTU#175	DUNssu182	9	98,3 ± 0,9	-----7	-2----7	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhizobiales[100%] Hyphomicrobiaceae[31%] Rhodomicrobium[26%]	Bild 37
OTU#176	DUNssu042	1		-----	-2-----	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhizobiales[94%] Rhodobiaceae[69%] Rhodobium[69%]	Bild 37

(Tabelle 28, fortgesetzt)

Bezeichnung	Prototyp	Sequenzen	MPSH [%]	Gedüngte Fläche	Kontrollfläche	Taxonomie (RDP II Classifier)	Bild
OTU#177	DUNssu131	1		----- 7	-----	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhizobiales[91%] Rhodobiaceae[72%] Rhodobium[72%]	Bild 37
OTU#178	DUNssu083	12	99,2 ± 0,4	- 2 - - - - 7	- 2 - - - - 7	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhizobiales[92%] Brucellaceae[29%] Mycoplana[29%]	Bild 37
OTU#179 *	DUNssu025	3	99,8 ± 0,2	1 2 - - - - -	-----	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhodobacterales[96%] Rhodobacteraceae[96%] Albidovulum[67%]	Bild 37
OTU#180 *	DUNssu050	1		-----	- 2 - - - - -	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhodobacterales[100%] Rhodobacteraceae[100%] Roseovarius[73%]	Bild 37
OTU#181	DUNssu039	1		-----	- 2 - - - - -	Proteobacteria[100%] Gammaproteobacteria[72%] Chromatiales[43%] Ectothiorhodospiraceae[33%] Alcalilimnicola[16%]	Bild 39
OTU#182	DUNssu093	1		1 - - - - -	-----	Proteobacteria[100%] Gammaproteobacteria[94%] Chromatiales[40%] Ectothiorhodospiraceae[40%] Alcalilimnicola[35%]	Bild 39
OTU#183	DUNssu141	2	100	----- 7	-----	Proteobacteria[100%] Betaproteobacteria[100%] Burkholderiales[68%] Alcaligenaceae[32%] Pigmentiphaga[32%]	Bild 39
OTU#184 *	DUNssu103	1		1 - - - - -	-----	Proteobacteria[98%] Alphaproteobacteria[86%] Rhodospirillales[86%] Acetobacteraceae[86%] Acidisphaera[44%]	Bild 42
OTU#185 **	DUNssu365	1		----- 7	-----	Actinobacteria[100%] Actinobacteria[100%] Acidimicrobiales[86%] Acidimicrobiaceae[86%] Acidimicrobium[86%]	Bild 41
OTU#186 **	DUNssu392	1		----- 7	-----	Actinobacteria[100%] Actinobacteria[100%] Acidimicrobiales[84%] Acidimicrobiaceae[84%] Acidimicrobium[84%]	Bild 41
OTU#187 **	DUNssu289	4	98,0 ± 0,5	----- 7	1 - 3 - - - 7	Actinobacteria[100%] Actinobacteria[100%] Acidimicrobiales[82%] Acidimicrobiaceae[82%] Acidimicrobium[82%]	Bild 41
OTU#188 **	DUNssu275	1		-----	- - 3 - - - -	Actinobacteria[100%] Actinobacteria[100%] Acidimicrobiales[93%] Acidimicrobiaceae[93%] Acidimicrobium[93%]	Bild 41
OTU#189	DUNssu310	1		1 - - - - -	-----	Actinobacteria[100%] Actinobacteria[100%] Acidimicrobiales[72%] Acidimicrobiaceae[72%] Acidimicrobium[72%]	Bild 41
OTU#190	DUNssu130	1		----- 7	-----	Actinobacteria[100%] Actinobacteria[100%] Actinomycetales[80%] Williamsiaceae[17%] Williamsia[17%]	Bild 41
OTU#191 **	DUNssu112	1		-----	1 - - - - -	Actinobacteria[96%] Actinobacteria[96%] Acidimicrobiales[80%] Acidimicrobiaceae[80%] Acidimicrobium[80%]	Bild 41
OTU#192	DUNssu197	1		-----	----- 7	Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Rhizobiales[97%] Methylocystaceae[69%] Methylocystis[69%]	Bild 41

(Tabelle 28, fortgesetzt)

Bezeichnung	Prototyp	Sequenzen	MPSH [%]	Gedüngte Fläche	Kontrollfläche	Taxonomie (RDP II Classifier)	Bild
OTU#193	DUNssu208	1		-----	----- 7	Actinobacteria[96%] Actinobacteria[96%] Actinomycetales[91%] Frankiaceae[42%] Frankia[42%]	Bild 41
OTU#194	DUNssu196	1		-----	----- 7	Actinobacteria[100%] Actinobacteria[100%] Actinomycetales[100%] Thermomonosporaceae[35%] Spirillospora[35%]	Bild 41
OTU#195	DUNssu058	2	100	-----	- 2 -----	Firmicutes[74%] Clostridia[42%] Thermoanaerobacteriales[28%] Thermoanaerobacteriaceae[28%] Thermanaeromonas[28%]	Bild 42
OTU#196	DUNssu026	2	99,6	- 2 ---- 7	-----	Firmicutes[46%] Clostridia[38%] Thermoanaerobacteriales[31%] Thermoanaerobacteriaceae[31%] Thermanaeromonas[31%]	Bild 42
OTU#197	DUNssu040	1		-----	- 2 -----	Proteobacteria[98%] Alphaproteobacteria[94%] Rhodospirillales[52%] Rhodospirillaceae[37%] Inquilinus[19%]	Bild 42
OTU#198	DUNssu028	1		- 2 -----	-----	Gemmatimonadetes[71%] Gemmatimonadetes[71%] Gemmatimonadales[71%] Gemmatimonadales[71%] Gemmatimonas[71%]	Bild 42
OTU#199	DUNssu137	2	98,9	----- 7	----- 7	Deinococcus-Thermus[44%] Deinococci[44%] Thermales[44%] Thermaceae[44%] Marinithermus[16%]	Bild 42
OTU#200	DUNssu145	1		----- 7	-----	Gemmatimonadetes[50%] Gemmatimonadetes[50%] Gemmatimonadales[50%] Gemmatimonadales[50%] Gemmatimonas[50%]	Bild 42
OTU#201 ***	DUNssu032	1		- 2 -----	-----	Gemmatimonadetes[100%] Gemmatimonadetes[100%] Gemmatimonadales[100%] Gemmatimonadales[100%] Gemmatimonas[100%]	Bild 42
OTU#202	DUNssu048	6	99,7 ± 0,1	----- 7	- 2 -----	Bacteroidetes[100%] Sphingobacteria[100%] Sphingobacteriales[100%] Flexibacteraceae[74%] Sporocytophaga[32%]	Bild 42
OTU#203 *	DUNssu192	1		-----	----- 7	Bacteroidetes[100%] Sphingobacteria[100%] Sphingobacteriales[100%] Flexibacteraceae[88%] Cyclobacterium[35%]	Bild 42
OTU#204 **	DUNssu064	1		-----	- 2 -----	Bacteroidetes[100%] Flavobacteria[99%] Flavobacteriales[99%] Flavobacteriaceae[99%] Salegentibacter[88%]	Bild 42
OTU#205	DUNssu194	2	99,0	-----	----- 7	Bacteroidetes[99%] Sphingobacteria[65%] Sphingobacteriales[65%] Crenotrichaceae[37%] Salinibacter[21%]	Bild 42
OTU#206	DUNssu140	1		----- 7	-----	Bacteroidetes[96%] Sphingobacteria[78%] Sphingobacteriales[78%] Crenotrichaceae[29%] Rhodothermus[25%]	Bild 42
OTU#207	DUNssu128	1		----- 7	-----	Bacteroidetes[25%] Sphingobacteria[20%] Sphingobacteriales[20%] Crenotrichaceae[16%] Rhodothermus[15%]	Bild 42
OTU#208	DUNssu138	1		----- 7	-----	Acidobacteria[56%] Acidobacteria[56%] Acidobacteriales[56%] Acidobacteriaceae[56%] Acidobacterium[56%]	Bild 42

(Tabelle 28, fortgesetzt)

Bezeichnung	Prototyp	Sequenzen	MPSH [%]	Gedüngte Fläche	Kontrollfläche	Taxonomie (RDP II Classifier)	Bild
OTU#209 **	DUNssu001	1		1 - - - - -	- - - - -	Planctomycetes[100%] Planctomycetacia[100%] Planctomycetales[100%] Planctomycetaceae[100%] Pirellula[89%]	Bild 42
OTU#210 ---	DUNssu077	1		- - - - -	- - - - - 6 -	Acidobacteria[100%] Acidobacteria[100%] Acidobacteriales[100%] Acidobacteriaceae[100%] Acidobacterium[100%]	Bild 40
OTU#211 ---	DUNssu466	1		- - - - -	- - - - - 7	Acidobacteria[100%] Acidobacteria[100%] Acidobacteriales[100%] Acidobacteriaceae[100%] Acidobacterium[100%]	Bild 40

*Legende zu Tabelle 28:* Charakterisierung der 211 OTUs von partiellen 16S rDNA-Sequenzen aus dem Dünnwaldboden (zur Definition der OTUs siehe Abschnitt 2.11.). Die Bezeichnung der OTU-Prototypen ermöglicht das Herunterladen der entsprechenden Sequenzen aus der GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Für OTUs mit mehr als einer Sequenz ist die mittlere paarweise Sequenzhomologie (MPSH) für den 63/778-Bereich angegeben (vergleiche 3.2.3.4). Zur Erläuterung der Symbole in den Spalten „gedüngte Fläche“ und „Kontrollfläche“ siehe Legende zu Tabelle 26.

Die taxonomische Einordnung erfolgte mit dem RDP II Classifier (2.12.2). Hierfür wurde die Sequenz jedes Protoyps in voller Länge (exklusive Primer) eingesetzt – und nicht nur der 63/778-Bereich wie für die Phylogramme. Auf diese Weise konnten insgesamt 26 OTUs bis auf die Gattungsebene bestimmt werden ( $\geq 80\%$ ), acht davon mit großer Sicherheit ( $> 95\%$ ) – diese OTUs sind mit \*\* bzw. \*\*\* gekennzeichnet. Die *Acidobacterium*-Sequenzen wurden hierbei nicht mitgezählt (Erklärung in Abschnitt 4.2.9); sie sind in der Tabelle entsprechend mit --- und -- gekennzeichnet. Weitere 22 OTUs (\*) waren bis zur Familie sicher einzuordnen ( $\geq 80\%$ ; davon 9 mit  $> 95\%$ ). In der letzten Spalte ist die Bildnummer des Phylogramms angegeben, in dem das jeweilige OTU zu finden ist.

Für weitere Informationen zu den OTUs siehe Abschnitt 3.2.3.4.

**Tabelle 29: Übersicht der Klassifizierung von Dünnwald-OTUs mit dem RDP II Classifier**

Taxonomische Ebene	Sicherheit der Klassifizierung (RDP II Classifier)		
	$\geq 70\%$ Sicherheit	$\geq 80\%$ Sicherheit	$\geq 90\%$ Sicherheit
Phylum	187 OTUs (89 %)	181 OTUs (86 %)	173 OTUs (82 %)
Klasse	184 OTUs (87 %)	173 OTUs (82 %)	163 OTUs (77 %)
Ordnung	163 OTUs (77 %)	155 OTUs (73 %)	136 OTUs (64 %)
Familie	124 OTUs (59 %)	109 OTUs (52 %)	87 OTUs (41 %)
Gattung	96 OTUs (45 %)	87 OTUs (41 %)	70 OTUs (33 %)
Gattung <sup>1</sup>	35 OTUS (17 %)	27 OTUS (13 %)	15 OTUS ( 7 %)

*Legende zu Tabelle 29:* Die Taxonomie der insgesamt 211 Dünnwald-OTUs der 16S rDNA-Klonbibliotheken wurde mit dem RDP II Classifier (2.12.1) bestimmt. Die Prozentzahlen hinter den OTU-Zahlen geben den Anteil bezogen auf die insgesamt 211 Dünnwald-OTUs an. Die meisten OTUs konnten einem bekannten Phylum zugeordnet werden. Aber selbst bei der unsichersten Klassifizierung (70 %) konnten nur 96 von 211 OTUs (45 %) bis auf die Gattungsebene bestimmt werden.

<sup>1</sup> ohne die Gattung *Acidobacterium* (vergleiche Diskussion in Abschnitt 4.2.9).

---

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Botanischen Institut der Universität zu Köln unter der Anleitung von Herrn **Prof. Dr. H. Bothe** angefertigt.

Herrn **Prof. Dr. H. Bothe** danke ich für die Überlassung des Themas und die große Freiheit, die mir bei der Bearbeitung zuteil geworden ist. Sehr herzlich bedanke ich mich für seine fortwährende Unterstützung, sein Engagement für dieses Projekt und für zahlreiche Anregungen und Diskussionen.

Herrn **Prof. Dr. D. Schomburg** danke ich für die Übernahme des Coreferats,

Herrn Dr. **Arnd Kuhn** für die Bodenanalysen,

Frau **Mirela Stecki** und Frau **Karin Otto** für ihre Hilfe bei DNA-Sequenzierung und tRFLP,

Herrn Dr. **Arne Nolte** und Frau **Susanne Krächter** für ihre Hilfe bei tRFLP-Versuchen.

**Stefanie Backhausen** danke ich für die technische Assistenz.

Für ihre unverzichtbare Hilfe bei der Erstellung der Klonbibliotheken danke ich ganz besonders **Jürgen Bruns**, der auch großen Anteil an der Auswertung der Daten für den letzten Zeitpunkt hatte, und **Emmanuelle Mounier**.

Noch ein spezieller Dank an **Sascha Eilmus** für die inspirierende Zusammenarbeit und seinen Mut, das TReFID-Programm anzuwenden!

Nicht zuletzt danke ich allen Kollegen in der Arbeitsgruppe Bothe für die gute Zusammenarbeit: Dr. Gudrun Boison, Dr. Ulrich Hildebrandt, Helena Jolkver, Sandra Knolle, Astrid Manal, Dr. Alexander Mergel, Dr. Fouad Ouziad, Caroline Steingen, Marc Stodden, Petra Wilde

Für zahlreiche Anregungen und Verbesserungsvorschläge bin ich **Caroline Steingen** und **Petra Wilde** sehr dankbar!

\*\*\*

---

---

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Hermann Bothe betreut worden.

Bonn, 04. Mai 2005

Christopher Rösch

Teile der Arbeit wurden veröffentlicht:

RÖSCH, C. (2004). Erfassung der Biodiversität bakterieller Gemeinschaften. *In: Treffpunkt Biologische Vielfalt IV*. H. Korn und U. Feit. Bonn, Bundesamt für Naturschutz: 65-70.

RÖSCH, C. und H. BOTHE (2005). Improved assessment of denitrifying, N<sub>2</sub>-fixing, and total-community bacteria by terminal restriction fragment length polymorphism analysis using multiple restriction enzymes. *Appl Environ Microbiol.* **71**(4): 2026-35

GenBank Zugriffsnummern (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

AY723961 - AY724250 und AY912515 - AY913753

Internetseite für das TReFID-Programm:

[www.trefid.net](http://www.trefid.net)

Diese Arbeit wurde ermöglicht durch ein Promotionsstipendium der Deutschen Bundesstiftung Umwelt (DBU), Osnabrück (01. August 2001 bis 31. Juli 2004) und Förderung durch die GEW-Stiftung, Köln im selben Zeitraum.

---

---

## Lebenslauf

Name: Christopher Rösch  
Anschrift: Römerstraße 268, 53117 Bonn  
Geburtsdatum: 18. August 1974  
Geburtsort: München  
Eltern: Magnus Rösch und Antonia Rösch geb. Linnhoff  
Familienstand: ledig  
Konfession: römisch-katholisch  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Ausbildung

07.1981 Einschulung Josef-Schaeben-Grundschule Weilerswist  
07.1985 Einschulung am Ville-Gymnasium Erftstadt-Liblar  
03.06.1994 allgemeine Hochschulreife (Ville Gymnasium Erftstadt-Liblar)  
01.10.1995 Immatrikulation an der Universität zu Köln, Fachrichtung Biologie  
02.10.2000 – 31.03.2001 Studentische Hilfskraft am Botanischen Institut der Universität zu Köln  
07.08.2001 Studienabschluß: Dipl.-Biologe am Botanischen Institut, Uni. Köln  
01.08.2001 – 31.07.2004 Promotionsstipendium der Deutschen Bundesstiftung Umwelt DBU (Osnabrück)  
02.08.2004 – 31.03.2005 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Botanischen Institut der Universität zu Köln  
02.05.2005 – Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Botanischen Institut der Universität zu Köln

Christopher Rösch

---