

Lehrstuhl für Mikrobiologie  
der Technischen Universität München

**Untersuchungen zur Struktur und Funktion  
Ammoniak oxidierender Bakterien in der Umwelt**

**Justyna Adameczyk**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für  
Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München  
zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Naturwissenschaften**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Höll

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Michael Wagner; Universität Wien/Österreich  
2. Univ.-Prof. Dr. Karl-Heinz Schleifer

Die Dissertation wurde am 19.01.2005 bei der Technischen Universität eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München am 24.04.2005 angenommen.



*meinem Mann, Bassem*



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>A. EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>A.I Bedeutung von Stickstoff in der Landwirtschaft</b> .....	<b>3</b>
<b>A.II Der Stickstoffkreislauf und die Rolle Ammoniak oxidierender Bakterien</b> .....	<b>5</b>
<b>A.III Phylogenie der AOB</b> .....	<b>10</b>
<b>A.IV Methoden zum Nachweis von AOB in der Umwelt</b> .....	<b>12</b>
<b>A.V Ziele dieser Arbeit</b> .....	<b>18</b>
<b>B. MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>19</b>
<b>B.I Verwendete Organismen bzw. deren extrahierte genomische DNS</b> .....	<b>21</b>
<b>B.II Verwendete Medien</b> .....	<b>22</b>
<b>B.III Stammhaltung</b> .....	<b>22</b>
<b>B.IV Untersuchte Umweltproben</b> .....	<b>23</b>
B.IV.1 Kläranlagen .....	23
B.IV.2 Bodenproben .....	23
<b>B.V Fraktionierung von Bodenaggregaten</b> .....	<b>24</b>
<b>B.VI Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren <i>in situ</i></b> .....	<b>24</b>
B.VI.1 Radioaktive Markierung der Reinkultur von <i>N. eutropha</i> (Nm57) .....	24
B.VI.2 Radioaktive Markierung von Belebtschlamm .....	24
<b>B.VII Quantifizierung von Radioaktivität in Biomasse mittels der Filter-Count-Methode</b> .....	<b>25</b>
<b>B.VIII Extraktion von Nukleinsäuren</b> .....	<b>26</b>
B.VIII.1 Extraktion genomischer DNS .....	26
B.VIII.2 RNS-Extraktion nach dem modifizierten RNAwiz™ (Ambion)-Protokoll (Adamczyk <i>et al.</i> , 2003) .....	26
<b>B.IX Quantifizierung der in die rRNS inkorporierten Radioaktivität</b> .....	<b>27</b>
<b>B.X PCR-Amplifikation</b> .....	<b>27</b>
PCR-Amplifikation der 16S-rRNS-Gene .....	27
PCR-Amplifikation der <i>amoA</i> -Gene .....	28
<b>B.XI Auftrennung von <i>amoA</i>-Amplifikaten mittels Gelretardation</b> .....	<b>28</b>
<b>B.XII Klonierung</b> .....	<b>28</b>

<b>B.XIII Sequenzierung .....</b>	<b>29</b>
<b>B.XIV Phylogenetische Analyse von Sequenzen.....</b>	<b>29</b>
B.XIV.1 <i>amoA</i> -basierende Phylogenie.....	30
B.XIV.2 16S-rRNS-basierende Phylogenie .....	31
<b>B.XV <i>In-vitro</i>-Transkription .....</b>	<b>31</b>
<b>B.XVI Markierung von Nukleinsäuren mit Fluoreszenzfarbstoffen.....</b>	<b>31</b>
B.XVI.1 Fluoreszenzmarkierung von PCR-Amplifikaten mittels Random Priming (Loy <i>et al.</i> , 2002).....	31
B.XVI.2 Fluoreszenzmarkierung von RNS (Adamczyk <i>et al.</i> , 2003) .....	32
<b>B.XVII RNS-Fragmentierung.....</b>	<b>33</b>
<b>B.XVIII Herstellung von Mikroarrays.....</b>	<b>33</b>
B.XVIII.1 Der Prototyp des Isotope Arrays (Adamczyk <i>et al.</i> , 2003) .....	33
B.XVIII.2 Der AOB-Mikroarray.....	34
<b>B.XIX Reverse Hybridisierung auf Mikroarrays.....</b>	<b>34</b>
B.XIX.1 Hybridisierung auf Mikroarrays mit PCR-Amplifikaten nach (Loy <i>et al.</i> , 2002).....	34
B.XIX.2 Reverse Hybridisierung auf Mikroarrays mit RNS (Adamczyk <i>et al.</i> , 2003).....	35
<b>B.XX Detektion radioaktiver Signale auf Mikroarrays.....</b>	<b>36</b>
<b>B.XXI Detektion von Fluoreszenzsignalen auf Mikroarrays .....</b>	<b>37</b>
<b>B.XXII Flächenquantifizierung mittels Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH) und konfokaler Laserscanning Mikroskopie (CLSM).....</b>	<b>37</b>
<b>B.XXIII Mikroautoradiographie (MAR).....</b>	<b>38</b>
<b>B.XXIV GenBank-Zugangsdaten (Accession numbers).....</b>	<b>38</b>
<b>C. ERGEBNISSE .....</b>	<b>39</b>
<b>C.I Der Prototyp des AOB-Mikroarrays .....</b>	<b>41</b>
<b>C.II Hybridisierungen mit rRNS von <i>N. eutropha</i> Nm57 auf dem Prototyp des Isotope Arrays.....</b>	<b>43</b>
<b>C.III Versuche mit radioaktiv markierten, nitrifizierenden Belebtschlämmen .....</b>	<b>45</b>
C.III.1 Vergleichende Sequenzanalyse des <i>amoA</i> -Gens.....	46
C.III.2 Quantitative FISH.....	46
C.III.3 FISH-MAR.....	47
C.III.4 Einbaudynamik von <sup>14</sup> C-Bikarbonat in Biomasse von Belebtschlämmen .....	48
<b>C.IV Hybridisierungen mit rRNS aus Belebtschlämmen auf dem Prototyp des Isotope Arrays.....</b>	<b>50</b>
<b>C.V Der AOB-Mikroarray .....</b>	<b>53</b>
C.V.1 Sondendesign und <i>in-silico</i> -Evaluierung .....	53
C.V.2 Evaluierung des AOB-Mikroarrays mit Reinkulturen .....	65

<b>C.VI Der Isotope Array .....</b>	<b>79</b>
C.VI.1 Isotope-Array-Experimente mit rRNS aus der Kläranlage Aalborg West.....	81
C.VI.2 Isotope-Array-Experimente mit rRNS aus der Kläranlage Oberding.....	85
<b>C.VII Untersuchungen zu Auswirkungen von Dauerdüngung mit Stallmist auf AOB-Diversität in Böden bzw. seinen Korngrößenfraktionen .....</b>	<b>91</b>
C.VII.1 AOB-Populationsunterschiede zwischen ungedüngtem und mit Stallmist gedüngtem Boden .....	92
C.VII.2 Unterschiede in der Besiedelung verschiedener Bodenfraktionen durch AOB.....	96
C.VII.3 Vergleich einzelner Fraktionen des gedüngten mit denen des ungedüngten Bodens hinsichtlich ihrer AOB-Besiedlung .....	99
C.VII.4 Phylogenetische Analyse von AOB-Populationen im ungedüngten bzw. gedüngten Boden.....	100
<b>D. DISKUSSION .....</b>	<b>105</b>
<b>D.I Der Prototyp des AOB-Mikroarrays .....</b>	<b>108</b>
D.I.1 Isotope-Array-Experimente mit dem Prototyp des AOB-Mikroarrays mit AOB-Reinkulturen.....	108
D.I.2 Isotope-Array-Experimente mit dem Prototyp des AOB-Mikroarrays mit nitrifizierenden Belebtschlämmen .....	108
<b>D.II Der AOB-Mikroarray .....</b>	<b>111</b>
D.II.1 Sonden-Design für den AOB-Mikroarray.....	111
D.II.2 Evaluierung des AOB-Mikroarrays mit Reinkulturen .....	112
<b>D.III Der Isotope Array: Evaluierung des AOB-Mikroarrays mit komplexen Umweltproben.....</b>	<b>119</b>
D.III.1 Isotope Array mit rRNS aus der Kläranlage Aalborg West.....	119
D.III.2 Isotope Array mit rRNS aus der Kläranlage Oberding.....	121
<b>D.IV Stärken und Grenzen des Isotope Arrays.....</b>	<b>125</b>
<b>D.V Molekulare Analysen zu AOB-Gemeinschaftsstruktur in Böden mit unterschiedlicher Düngungspraxis.....</b>	<b>129</b>
D.V.1 Mikroarray-Untersuchungen zu AOB-Gemeinschaftsstruktur in Böden mit PCR-amplifizierten 16S- rRNS-Genfragmenten.....	132
D.V.2 <i>amoA</i> -basierende Untersuchungen zu AOB-Gemeinschaftsstruktur in Böden.....	134
<b>E. ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY .....</b>	<b>145</b>
<b>F. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>153</b>
<b>G. ANHANG .....</b>	<b>171</b>
<b>H. PUBLIKATIONEN VORTRÄGE POSTER.....</b>	<b>185</b>
<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>189</b>



## ABKÜRZUNGEN

A	Adenin
AMO	Ammoniakmonooxygenase
Amp.	Ampicillin
AOB	Ammoniak oxidierende Bakterien
ARB	<i>arbor</i> (lat. „der Baum“); Software-Paket für phylogenetische Datenanalyse
ATH	Allylthioharnstoff
bp	Basenpaare
C	Cytosin
Ci	Curie
CLSM	konfokale Laserscanning Mikroskopie/ konfokales Laserscanning Mikroskop
Cy5	5,5'-Disulfo-1,1'-di(X-Carbopentyl)-3-3-3'-Tetramethylindol-Cy5.18-Derivat, N-Hydroxysuccimidester
Cy5-dCTP	5-Aminopropagyl-2'-Desoxycytidin-5'-Triphosphat gekoppelt an Cy5-Farbstoff
DGGE	denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dCTP	Desoxycytidin-5'-Triphosphat
dNTP	Desoxynukleotid-Triphosphate
dTTP	Desoxythymidin-5'-Triphosphat
EGW	Einwohnergleichwert
ERG	Eppendorfreaktionsgefäß
<i>et al.</i>	<i>et alli</i> (lat. „und andere“)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FA	Formamid
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
G	Guanin
h	Stunde(n)
J	Joules
kb	Kilobasen
MAR	Mikroautoradiographie
mg	Milligramm
min.	Minute(n)
ml	Milliliter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
N	Stickstoff
<i>N.</i> , <i>Nm</i>	<i>Nitrosomonas</i>
<i>Nc.</i>	<i>Nitrosococcus</i>
ng	Nanogramm
<i>Nsp.</i> , <i>Nsp</i>	<i>Nitrospira</i>
OTU	operational taxonomic unit
PBS	phosphate-buffered saline (Phosphat gepufferte Saline)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PFA	Paraformaldehyd
PLFA	Phospholipid-Fettsäureester-Analyse
pmol	Picomol
RFE	relative Fluoreszenzeinheiten
RNS	Ribonukleinsäure
rRNS	ribosomale Ribonukleinsäure
s	Sekunde(n)
SRG	Schraubdeckelreaktionsgefäß
T	Thymin
t	Tonne(n)
TMAC	Tetramethylammoniumchlorid
T-RFLP	terminaler Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus

TVA	Tierkörperverwertungsanlage
SDS	Sodium(=Natrium)-Dodecylsulfat
U	Uracil
UpM	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

Die Abbildungen dieses Ausdrucks sind schwarz-weiß dargestellt.  
Eine Kopie dieser Arbeit mit Farbabbildungen finden Sie im Internet unter:  
[http://www.ub.tum.de/medien/ediss\\_old/ediss.html](http://www.ub.tum.de/medien/ediss_old/ediss.html)



# **A. EINLEITUNG**



## A.I BEDEUTUNG VON STICKSTOFF IN DER LANDWIRTSCHAFT

Zum 200-jährigen Geburtsjubiläum von Justus von Liebig (\*12.05.1803, †18.04.1873), eines der bedeutendsten deutschen Forscher des 19. Jahrhunderts, ist das Jahr 2003 zum Liebig-Jahr ausgerufen worden. Während seiner langjährigen wissenschaftlichen Laufbahn widmete er sich im besonderen Maße den Fachgebieten der Chemie (Silberspiegel, Chloroform, Liebig'scher Kühler), Ernährungswissenschaft (Fleischextrakt, Muttermilchersatz, Backpulver) und Landwirtschaft (Minimumgesetz, „Patentdünger“) (Kohut, 1904; Strube, 1988; Heilenz, 1994; Brock, 1999). Mit seiner Arbeit strebte er eine Revolutionierung der „Agricultur“ durch gezielte Düngungsmaßnahmen an. Die damals in Europa traditionell praktizierte, jedoch oft unzureichende Bodendüngung mit Stallmist, Ernterückständen sowie Humus konnte immer wiederkehrende Missernten bis hin zu Ernteaussfällen, den Hungersnöte folgten, nicht verhindern.

Das im Jahre 1840 erschienene Werk Liebig's „Die organische Chemie in ihrer Anwendung auf Agricultur und Physiologie“ bedeutete einen Wendepunkt für die damalige Landwirtschaft (Liebig von, 1840). In einer seiner wesentlichen Thesen schrieb er, „...daß der Boden in vollem Maße wieder erhalten muß, was ihm genommen wird, ... In welcher Form dieses Wiedergeben geschieht,..., dies ist wohl ziemlich gleichgültig“. Mit einem weiteren Leitsatz, der später als das „Gesetz des Minimums“ bekannt werden sollte, postulierte er, der Mangel eines Elements im Boden könne nicht durch erhöhte Gabe eines anderen Elements ausgeglichen werden (Liebig von, 1840).

Die durch Liebig's Elementaranalyse gewonnene Erkenntnis, Pflanzen würden zum Wachstum Stickstoff, Phosphor und Kalisalze benötigen, löste im Jahre 1840 massive Importe des bereits zuvor von Alexander von Humboldt untersuchten, jedoch allgemein nicht viel beachteten Guano-Düngers aus Südamerika nach Europa aus. Es handelte sich dabei um N-, P- und K-reiche Seevögelexkreme, die schon die Inkas seit dem 5. Jahrhundert v. Chr. von den Felsen der „Guano-Inseln“ (Chincha- und Lobos-Inseln vor Küste Perus) abgetragen und als Dünger für ihre Felder verwendet hatten (Frank, 1998; Weischedel *et al.*, 2003).

Liebig's zentrale Vision war jedoch der Ersatz organischer Dünger, wie des Stallmistes oder des Guanos, durch synthetisch hergestellte Mineraldünger: „Es wird eine Zeit kommen, wo man den Acker, wo man jede Pflanze, die man darauf erzielen will, mit dem ihr zukommenden Dünger versieht, den man in chemischen Fabriken bereitet“ (Liebig von, 1840; Heilenz, 1994; Brock, 1999). Die Verwirklichung seiner Idee stieß jedoch anfangs auf ungeahnte Hindernisse, als sein 1845 patentierter Mineraldünger keinerlei erwünschte Wirkung auf die Ernteerträge zeigte. Eines der Gründe, die zum Versagen des

„Patentdüngers“ führten, lag in der Unlöslichkeit der darin enthaltenen Salzverbindungen, einer von Liebig getroffenen Vorsichtsmaßnahme, um das Auswaschen des Düngers durch Regenwasser zu verhindern. Der zweite Grund für seinen Misserfolg war Liebigs Annahme, Pflanzen wären in der Lage, den zu 78Vol.-% in der Luft vorhandenen Elementarstickstoff selbst zu fixieren, so dass folglich Stickstoffverbindungen in seinem „Patentdünger“ überflüssig seien. Den langersehten Durchbruch im Jahre 1855 brachte die Umsetzung der Erkenntnisse, dass – anders als ursprünglich angenommen – die Pflanzen große Mengen an löslichen Stickstoffverbindungen zum Wachstum benötigen (Kohut, 1904; Strube, 1988).

Die Weiterentwicklung von preisgünstigen Mineraldüngern wurde zudem durch die relativ hohen Kosten des aus Übersee verschifften und allmählich schwinden Guanos vorangetrieben. Als um 1900 die Guanoablagerungen vorübergehend nahezu vollständig aufgebraucht waren, gewann eine neue Stickstoffquelle, die „Caliche“ oder auch der nach ihrem damaligen Fundort benannte Chilesalpeter aus der Atacama-Wüste (heute Bolivien) an Bedeutung. Sein Hauptbestandteil, das Natriumnitrat (bis zu 75%), wurde erstmals für zivile Zwecke – zur Herstellung von Kunstdüngern – eingesetzt, gewann aber im Laufe des Ersten Weltkrieges große militärische Bedeutung als Ausgangsverbindung für den Sprengstoff Ammoniumnitrat (Moebius, 1930).

Da es sich beim Chilesalpeter gleichermaßen um einen erschöpfbaren Rohstoff handelte, war es also lediglich eine Frage der Zeit, wann auch diese Ressource versiegen würde. Ebenfalls um die Jahrhundertwende arbeitete Fritz Haber an der Darstellung von Ammoniak aus den beiden Elementen Stickstoff und Wasserstoff unter Anwendung von Druck (200 atm) und Hitze (500-600°C). Das vorerst in Labormaßstab gewonnene Gas konnte schon bald durch die von Carl Bosch eingeführten Optimierungen, wie den Einsatz von Katalysatoren, sowie Schaffung stabiler Reaktorbedingungen durch die „Bosch-Bohrungen“ in industriellen Mengen erzeugt werden. Der sog. „Griff in die Luft“ läutete eine neue Ära in zahlreichen Industriezweigen, vor allem aber in der Landwirtschaft ein. So wird bis heute im Zuge des an den Haber-Bosch-Prozess angeschlossenen Ostwald-Verfahrens aus Ammoniak Salpetersäure gewonnen, deren Salze zur Herstellung der von Liebig „prophezeiten“ Kunstdünger verwendet werden (Kiefer, 2001).

Der kurze Abriss über die Geschichte der Mineraldünger ist lediglich ein Beispiel für die zahlreichen Versuche der Menschen, Prozesse der Natur zu imitieren oder aber auch zu korrigieren. Die bis ins 19. Jh. hinein in Europa herrschenden Hungersnöte sind nun mit Hilfe angewandter Wissenschaften verbannt. Die anfängliche Euphorie über die Erfindung der Waffe gegen Hunger führte jedoch über viele Jahrzehnte zu exzessiver Düngung des Bodens.

Der durch die Überdüngung überhöhte Stickstoff- aber auch Phosphoreintrag führte zur Störung empfindlicher, natürlicher Gleichgewichte unzähliger Ökosysteme. Die Folgen sind bis heute an übersäuerten Böden, eutrophierten Gewässern, verunreinigtem Grundwasser und nicht zuletzt Aussterben von Tier- und Pflanzenarten deutlich erkennbar.

Nur sehr mühsam und auf zahlreichen Umwegen erkannte der Mensch die zentrale Rolle des Stickstoffs in der Natur, und es sollte noch Jahrzehnte dauern, bis die wesentlichen Prozesse des Stickstoffkreislaufes verstanden wurden.

## A.II DER STICKSTOFFKREISLAUF UND DIE ROLLE AMMONIAK OXIDIERENDER BAKTERIEN

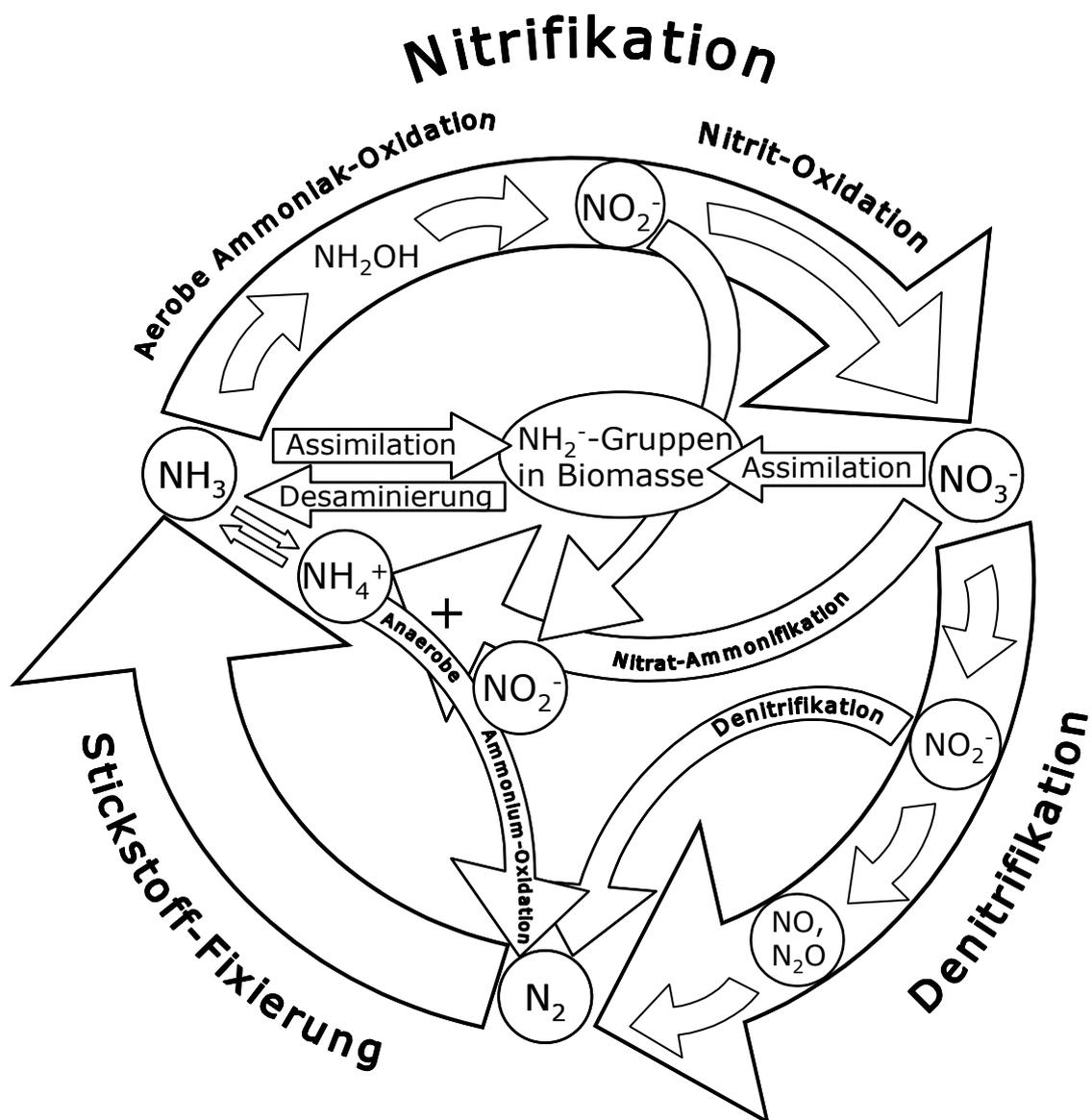


Abb. 1 Schematische Darstellung von Redox-Vorgängen des Stickstoffkreislaufs (mod. nach (Brock *et al.*, 1997))

Das Verständnis komplexer Vorgänge in der Natur gründet auf kumuliertem Wissen über die einzelnen, daran beteiligten Prozesse. Um einen Einblick in die Komplexität solcher Mechanismen zu geben, werden hier die relevanten Einzelabläufe des Stickstoffkreislaufes mit besonderem Fokus auf die Bedeutung Ammoniak oxidierender Bakterien (AOB) dargelegt.

Obwohl unsere Atemluft zum größten Teil (78% (v/v)) aus Stickstoff besteht, kann der N-Bedarf von Tieren und Pflanzen nicht aus diesem Depot gedeckt werden. Da Tiere vorwiegend organische und Pflanzen ausschließlich mineralische Stickstoffverbindungen benötigen, sind sie auf mikrobielle Prozesse angewiesen.

Stickstofffixierung (Abb. 1) Eine Sonderstellung bei der Versorgung mit Stickstoff genießen die in enger Vergesellschaftung mit stickstofffixierenden Mikroorganismen (z.B. *Rhizobium*) lebenden Pflanzen (z.B. Leguminosen). Während die Bakterien den elementaren Stickstoff aus der Luft zu Ammoniak reduzieren und einen Großteil davon an die Wirtspflanze abgeben, werden sie im Gegenzug in stabiler Umgebung (Wurzelknöllchen) mit Kohlenhydraten versorgt. Neben symbiotischen sind auch zahlreiche frei lebende Stickstofffixierer wie beispielsweise Vertreter aus der Gattung *Azotobacter* für einen erhöhten Gehalt an assimilierbarem Stickstoff im Boden verantwortlich (Martinez-Romero, 2003).

Mineralisierung (Abb. 1) Da Pflanzen auf anorganische, im Erdreich verfügbare N-Verbindungen, wie  $\text{NO}_3^-$  oder  $\text{NH}_4^+$ , angewiesen sind, verfügen sie über ein komplexes N-Transportsystem, welches in der Wurzel, insbesondere aber in den Wurzelhaaren (Lauter *et al.*, 1996; Gilroy und Jones, 2000; von Wiren *et al.*, 2000) lokalisiert ist. Sowohl Nitrat als auch Ammonium spielen für den pflanzlichen N-Haushalt eine wichtige Rolle und sind zugleich Produkte mikrobieller Aktivität. Im Zuge der Mineralisierung abgestorbener Biomasse werden beispielsweise Proteine desaminiert und Ammonium freigesetzt, ein Prozess, der auch als Ammonifikation bezeichnet wird. Für Pflanzen stellt Ammonium eine energetisch günstigere, da reduzierte und folglich direkt in Biomasse einzubauende N-Verbindung dar, die jedoch 10- bis 1000-fach seltener als Nitrat im Boden vorkommt (Chapin III *et al.*, 1987; Bloom *et al.*, 1992; Bloom, 1994; Marschner, 1995; Gazzarrini *et al.*, 1999). Zudem tragen nitrifizierende Mikroorganismen zu Verringerung des Ammoniumgehalts im Boden bei, indem sie den aus deprotoniertem Ammonium entstehenden Ammoniak zu Nitrat (s. unten) oxidieren. Es handelt sich dabei um einen in der Landwirtschaft unerwünschten

Prozess, den man durch Zugabe von Nitrifikationshemmstoffen zu Düngern zu minimieren versucht.

Neben Ammonium nimmt Nitrat einen hohen Stellenwert als essentielle, assimilierbare N-Quelle für Pflanzen ein, muss jedoch vor Einbau in die Biomasse unter Energieaufwand zu Ammonium reduziert werden (Chapin III *et al.*, 1987; Bloom *et al.*, 1992). Allerdings ist Nitrat mobiler als Ammonium und kann leichter aus dem Boden ausgewaschen werden, oder von denitrifizierenden Mikroorganismen (s. unten) zu gasförmigen, und damit flüchtigen Verbindungen umgesetzt werden (Hooper, 1968; Remde und Conrad, 1990; Stüven *et al.*, 1992; Bouwman *et al.*, 1993). Ammonium dagegen wird aufgrund seiner positiven Ladung von negativ geladenen (Ton-)Partikeln im Boden zurückgehalten und steht der Pflanze damit länger zu Verfügung.

Im Sinne der Aufrechterhaltung des zellulären Kationen-Anionen-Gleichgewichts ebenso wie eines konstanten pH-Wertes ist eine ausgewogene Aufnahme sowohl von Ammonium als auch Nitrat für die Pflanzen vom Vorteil (Bloom, 1994; Marschner, 1995; Lauter *et al.*, 1996).

Nitrifikation (Abb. 1) Der zweistufige Oxidationsprozess von Ammoniak über Nitrit bis zu Nitrat wird von zwei funktional hochspezialisierten Bakteriengruppen vollzogen (Hooper, 1969; Schmidt, 1982; Wood, 1986). Für den ersten Schritt – die Oxidation von Ammoniak zu Nitrit – ist die Gilde der Ammoniak oxidierenden Bakterien (AOB) aus der Beta- bzw. Gamma-Unterklasse der Proteobakterien verantwortlich (Warrington, 1878; Winogradsky, 1890; Hooper, 1969; Suzuki *et al.*, 1974; Drozd, 1976; Wood, 1986; Koops *et al.*, 2003). Diese sind oft in Kolokalisation (Mobarry *et al.*, 1996; Schramm *et al.*, 1996; Wagner *et al.*, 1996; Juretschko *et al.*, 1998; Schramm *et al.*, 1998; Okabe *et al.*, 1999; Schramm *et al.*, 1999; Daims *et al.*, 2001a; Wagner und Loy, 2002; Wagner *et al.*, 2002) mit der zweiten Nitrifikanten-Gruppe, den Nitrit oxidierenden Bakterien (NOB), die Nitrit zu Nitrat umsetzen, anzutreffen. Die zu diesem Oxidationsschritt befähigten Mikroorganismen gehören der Klasse *Nitrospira* sowie den Unterklassen der Alpha-, Gamma- und Delta-Proteobakterien an.

Eine Besonderheit der Nitrifikanten ist ihre chemolithoautotrophe Lebensweise (Prosser, 1989). Ihren Kohlenstoffbedarf decken sie durch die sehr energieintensive CO<sub>2</sub>-Fixierung mittels des Calvin-Zyklus (Wallace und Nicholas, 1969; Harms *et al.*, 1981; Belser, 1984). Da sie jedoch ihre Energie ausschließlich aus den Redox-Prozessen der Ammoniak- bzw. Nitrit-Oxidation generieren, und die entsprechenden Energieausbeuten aufgrund der stark positiven Redox-Potentiale von NH<sub>2</sub>OH/NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NH<sub>2</sub>OH bzw. NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> nur sehr gering sind,

setzen sie enorme Substratmengen bei ungewöhnlich langen Generationszeiten von mindestens sieben Stunden um (Wood, 1986; Poughon *et al.*, 2001).

Die hohe Spezialisierung der AOB erlaubt es ihnen einerseits, ökologische Nischen zu besetzen, die für andere Organismen keinen Lebensraum bieten würden, bindet sie andererseits an Standorte mit Vorkommen an reduzierten Stickstoffverbindungen.

So sind bisher Vertreter dieser Bakteriengruppe sowohl in natürlichen als auch anthropogenen aquatischen bzw. terrestrischen Systemen nachgewiesen worden (Belser, 1979; Prosser, 1989; Koops *et al.*, 1991; Wagner *et al.*, 1995; Ward, 1996; Head *et al.*, 1998; Kowalchuk und Stephen, 2001; Prosser und Martin Embley, 2002; Zehr und Ward, 2002; Koops *et al.*, 2003). Die Präsenz von AOB konnte sowohl in natürlichem Erdreich (Hiorns *et al.*, 1995; Kowalchuk *et al.*, 1997; Kowalchuk *et al.*, 1998; Stephen *et al.*, 1998; Bruns *et al.*, 1999; Hastings *et al.*, 2000; Kowalchuk *et al.*, 2000b; Kowalchuk *et al.*, 2000a; Chang *et al.*, 2001; Mintie *et al.*, 2003) als auch in landwirtschaftlich genutzten Böden (Hastings *et al.*, 1997; Stephen *et al.*, 1998; Bruns *et al.*, 1999; Mendum *et al.*, 1999; Campbell, 2000; Phillips *et al.*, 2000; Hermansson und Lindgren, 2001; Oved *et al.*, 2001) demonstriert worden. Selbst extreme Standorte, wie Felsen (Lebedeva *et al.*, 1978) oder Gebäudemauern (Meincke *et al.*, 1989; Bock und Sand, 1993; Wasserbauer *et al.*, 1998; Koops und Pommerening-Röser, 2001), die starken Temperatur- und Feuchtigkeitsschwankungen ausgesetzt sind, dienen einzelnen Vertretern der AOB als Lebensraum. Dabei wird das oft mit harnsäurereichen Vogelextremen besetzte Mauerwerk durch die aus der AOB-Aktivität hervorgehende salpetrige Säure beschädigt (Bock und Sand, 1993).

Bei aquatischen Lebensräumen der AOB reicht die Spannweite (Koops *et al.*, 2003) von oligotrophen (Burrell *et al.*, 2001; Regan *et al.*, 2002; Cebren *et al.*, 2003) über eutrophe Süßwässer und deren Sedimente (Smorzewski und Schmidt, 1991; Hastings *et al.*, 1998; de Bie *et al.*, 2001; Whitby *et al.*, 2001b; Tankere *et al.*, 2002), zu marinen Systemen (Ward und Carlucci, 1985; McCaig *et al.*, 1994; Alzerreca *et al.*, 1999; Nold *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2001; Nicolaisen und Ramsing, 2002; Ward und O'Mullan, 2002; Freitag und Prosser, 2003) bis hin zu hypersalinen Salzseen (Ward *et al.*, 2000; Sorokin *et al.*, 2001). Zudem bieten künstliche Wassersysteme mit erhöhtem Ammoniakgehalt, wie Kläranlagen, günstige Lebensbedingungen für zahlreiche Vertreter der AOB z. B. (Juretschko *et al.*, 1998; Purkhold *et al.*, 2000; Wagner *et al.*, 2002; Harms *et al.*, 2003). Ihre Fähigkeit, beachtliche Ammoniak-Mengen autotroph zu oxidieren, und relativ hohe Ammoniak-Konzentrationen zu tolerieren, macht diese Organismengruppe zu einem unentbehrlichen Bestandteil in der biologischen Reinigungsstufe moderner Kläranlagen (Painter, 1986; Eighmy und Bishop, 1989).

Denitrifikation (Abb. 1) Das aus der Nitrifikation im Erdreich oder aquatischen Systemen resultierende Nitrat stellt für Pflanzen eine essenzielle Stickstoffquelle dar, die bei Abwesenheit zu Mangelerscheinungen führen kann. Herrschen in einem Lebensraum, wie Boden bei z.B. stagnierender Nässe, sauerstofflimitierte Bedingungen, so werden Nitrat aber auch Nitrit zu begehrten terminalen Elektronenakzeptoren für fakultativ anaerobe Mikroorganismen, mit denen die Pflanzen um das Nitrat konkurrieren müssen. Die zu anaerober Atmung befähigten Organismen – u. a. auch AOB (Schmidt und Bock, 1997; Zart und Bock, 1998) – setzen im Zuge der sog. Denitrifikation Nitrat- sowie Nitrit-Salze aus dem Boden zu gasförmigen Verbindungen um und führen somit zu der in der Landwirtschaft unerwünschten Umwandlung von N-Düngern in gasförmigen Stickstoff (Conrad, 1996). Tritt zudem eine nur unvollständige Umsetzung des Nitrats bzw. Nitrits ein, so werden problematische, den Treibhauseffekt begünstigende, gasförmige Zwischenverbindungen wie NO sowie N<sub>2</sub>O gebildet (Bremner und Blackmer, 1978; Goreau *et al.*, 1980; Conrad, 1996; Colliver und Stephenson, 2000). Wird hingegen elementarer Stickstoff in die Atmosphäre freigesetzt, so schließt sich der Stickstoffkreislauf (Hooper, 1968; Remde und Conrad, 1990; Stüven *et al.*, 1992; Bouwman *et al.*, 1993). Denselben Prozess der Denitrifikation macht man sich in der Trink- und Abwasseraufbereitung zunutze (Sutton *et al.*, 1975; Krogulska und Mycielski, 1979), um das von den Nitrifikanten aerob gebildete, und die Eutrophierung von Gewässern begünstigende (Schwoerbel, 1993) Nitrat zu entfernen. Dabei wird das Nitrat unter Sauerstoffausschluss von Denitrifikanten zu elementarem Stickstoff (im Optimalfall) umgesetzt, der schließlich in die Atmosphäre entweichen kann (Knowles, 1982; Zumft, 1997).

ANAMMOX-Prozess (Abb. 1) Nicht zuletzt soll im Zusammenhang mit dem Stickstoffkreislauf der erst kürzlich entdeckte sog. ANAMMOX-Prozess, der für anaerobe Ammoniumoxidation steht, erwähnt werden. Es handelt sich hierbei um eine Komproportionierungsreaktion, bei der aus Ammonium und Nitrit elementarer Stickstoff autotroph gebildet wird (Strous *et al.*, 1999; Egli *et al.*, 2001; Jetten *et al.*, 2001; Schmid *et al.*, 2001; Freitag und Prosser, 2003). Für die Abwasserreinigung ist dieser Stoffwechselweg von besonderem Interesse, da er Nitrifikation mit Denitrifikation zu einem Prozessschritt vereinigt und somit Perspektiven auf eine kostengünstigere Alternative zu Stickstoffentfernung eröffnet (Jetten *et al.*, 2001; Jetten *et al.*, 2003).

Erst kürzlich wurde die Bedeutung von ANAMMOX-Organismen auch für natürliche, marine Habitate am Beispiel des Schwarzen Meeres, des weltgrößten, natürlichen anoxischen Wasserbeckens, erkannt (Kuypers *et al.*, 2003). Bei der Mineralisierung von Phytoplankton werden beträchtliche Mengen an Ammonium freigesetzt, das in der oxischen Wasserschicht von aeroben Nitrifikanten zu Nitrat oxidiert wird, und, gemeinsam mit dem nicht umgesetzten Ammonium, in die tieferen Wasserschichten absinkt. Während in den suboxischen Wasserschichten, bei ca. 80 m Tiefe sowohl das Ammonium als auch das von Denitrifikanten zu Nitrit reduzierte Nitrat Konzentrationen von bis zu 100  $\mu\text{M}$  erreichen, nehmen ihre Konzentrationen in den darunter liegenden Wasserschichten rapide ab, und fehlen bei ca. 100 m Tiefe praktisch ganz. Als Erklärung für den gleichzeitigen Nitrit- und Ammonium-Abbau kam nur mikrobielle Aktivität in Frage. Die Beteiligung aerober AOB konnte jedoch mangels Sauerstoff in dieser Wassertiefe ausgeschlossen werden. Das Phänomen wurde schließlich durch den Nachweis der Präsenz und Aktivität von ANAMMOX-Organismen in der unteren suboxischen Wasserschicht geklärt (Kuypers *et al.*, 2003). Die zu dieser Komproportionierungsreaktion befähigten Organismen wurden als bislang nicht kultivierte, tiefzweigende Vertreter der Ordnung *Planctomycetales* identifiziert (Strous *et al.*, 1999; Jetten *et al.*, 2001; Schmid *et al.*, 2001; Jetten *et al.*, 2003; Schmid *et al.*, 2003).

### **A.III PHYLOGENIE DER AOB**

Anders als in der „Makrobiologie“ liefern äußere Merkmale der Mikroorganismen kaum zuverlässige Hinweise hinsichtlich ihrer Phylogenie. Es galt folglich, Kriterien zu finden, die auch für Mikroorganismen eine fundierte Klassifizierung erlauben würden (Fox *et al.*, 1980). 1984 schlug Woese (Woese *et al.*, 1984; Woese *et al.*, 1985) die ribosomale RNS – einen in bisher allen bekannten Lebewesen vorgefundenen, zellulären Bestandteil – als sog. phylogenetischen Universalmarker vor. Die vergleichende Sequenzanalyse der RNS der kleinen ribosomalen Untereinheit ermöglicht es, die stammesgeschichtliche Entwicklung in der Mikrobiologie zu beleuchten (Hugenholtz *et al.*, 1998; Rappe und Giovannoni, 2003), und zudem die vorhandene Systematik von Tieren und Pflanzen neu zu evaluieren (Woese *et al.*, 1985; Woese, 1987; Woese *et al.*, 1990).

Basierend auf der vergleichenden Sequenzanalyse der 16S rRNS erfolgte die Zuordnung der AOB in zwei monophyletische Gruppen innerhalb der Beta- bzw. Gamma-Unterklasse der Proteobakterien (Woese *et al.*, 1984; Head *et al.*, 1993; Teske *et al.*, 1994; Stehr *et al.*, 1995a; Utaaker *et al.*, 1995; Pommerening-Röser *et al.*, 1996; Purkhold *et al.*, 2000; Purkhold *et al.*, 2003).

Die in die Beta-Proteobakterien eingegliederte Gruppe der AOB umfasst 14 beschriebene Spezies, zahlreiche noch nicht beschriebene Umweltisolate sowie eine Vielzahl an 16S-rRNS-Gensequenzen aus der Umwelt von bislang nicht kultivierten AOB-Vertretern. Beta-AOB können in die *Nitrosomonas*- sowie *Nitrospira*-Gruppe unterteilt werden (Koops *et al.*, 2003). Obwohl ursprünglich, aufgrund morphologischer sowie physiologischer Unterschiede innerhalb der Nitrospiren drei Gattungen – *Nitrospira*, *Nitrosolobus* und *Nitrosovibrio* – geläufig waren (Watson, 1974), spiegelt sich diese Feinauftrennung in der 16S-rRNS-basierenden Phylogenie nicht wider (Koops *et al.*, 2003; Purkhold *et al.*, 2003). Aus diesem Grund wurde vorgeschlagen, diese Organismengruppe zu einer Gattung *Nitrospira* zusammenzufassen (Head *et al.*, 1993; Purkhold *et al.*, 2003). Anders hingegen verhält sich die Lage innerhalb der Nitrosomonaden. Diese weit heterogenere Gruppe kann anhand von 16S-rRNS-Gensequenzen kultivierter Vertreter in sechs distinkte Entwicklungslinien (*N. europaea*/*Nc. mobilis*-; *N. communis*-; *N. oligotropha*-; *N. marina*-, *N. cryotolerans*- und Nm143-Linie) aufgeteilt werden (Koops *et al.*, 2003; Purkhold *et al.*, 2003).

Darüber hinaus wurden 16S-rRNS-Gensequenzen aus der Umwelt gewonnen, die aufgrund von Sequenzunterschieden jeweils eine neue Entwicklungslinie innerhalb der *Nitrospira*- (sog. „Cluster 1“) bzw. *Nitrosomonas*-Gruppe (sog. „Cluster 5“) bilden, welche jedoch bisher keinem kultivierten Organismus zugeordnet werden konnten (Stephen *et al.*, 1996; Purkhold *et al.*, 2000; Hollibaugh *et al.*, 2002; Koops *et al.*, 2003; Purkhold *et al.*, 2003).

Die Gruppe der AOB innerhalb der Gamma-Proteobakterien umfasst lediglich zwei beschriebene Spezies (*Nitrosococcus halophilus* und *Nitrosococcus oceanii*) monophyletischen Ursprungs, die bisher nur aus salinen Habitaten isoliert wurden (Watson und Remsen, 1970; Koops *et al.*, 1990; Ward und O'Mullan, 2002).

Zu Schaffung eines weiteren, geeigneten Klassifizierungs- und Identifizierungssystems für AOB wurde die das aktive Zentrum tragende Untereinheit des AOB-Schlüsselenzyms, der Ammoniakmonooxygenase, als phylogenetisches Markermolekül herangezogen (Rotthauwe *et al.*, 1997; Purkhold *et al.*, 2000). Relativ betrachtet, weist *amoA* bzw. AmoA sowohl auf Nuklein- (50,8%) als auch Aminosäuresequenzebene (64,2%) einen geringeren Konservierungsgrad als die 16S rRNS (85,5%) auf und verfügt somit theoretisch über ein höheres, phylogenetisches Auflösungspotential innerhalb der AOB. Da jedoch für die phylogenetischen Analysen eine 453 Basen bzw. 151 Aminosäuren lange Teilsequenz der *amoA*- bzw. AmoA-Untereinheit verwendet wurde, ist ihr phylogenetischer Informationsgehalt im Vergleich zu dem der 1509 Basen langen 16S-rRNS-Vollsequenz

limitiert. Dies wird besonders deutlich, wenn nur die phylogenetisch (tatsächlich) informativen, da nicht vollständig konservierten Positionen der beiden phylogenetischen Marker betrachtet werden. Während auf der 16S rRNS bei mindestens 98% aller untersuchten AOB-Reinkulturen 327 variable Positionen mit jeweils theoretisch vier Basenpermutationen pro Position verfügbar sind, bietet die *amoA*-Nukleinsäuresequenz 223 solche variablen Positionen. Wird die Nukleinsäuresequenz eines Funktionsgens, wie *amoA*, für phylogenetische Analysen herangezogen, so ist dabei die durch den degenerierten, genetischen Code bedingte Sonderstellung der Basen an dritter Codonposition, die einer höheren Mutationsrate als jene an erster bzw. zweiter Position unterliegen, zu berücksichtigen. Schließt man diese Positionen aus, so bleiben noch 82 variable – also phylogenetisch informative – Positionen auf dem *amoA*-Genfragment zu Verfügung. Werden hingegen Aminosäuresequenzen, wie AmoA, für phylogenetische Analysen herangezogen, so ist zunächst zu beachten, dass, anders als bei Nukleinsäuren, pro Position theoretisch 20 Aminosäure-Permutationen möglich sind, demzufolge eine höheres Auflösungspotential zu erwarten sei. Bei Betrachtung von AmoA-Aminosäuresequenzen erweisen sich jedoch nur 54 Positionen als tatsächlich informativ, da die verbleibenden 97 Positionen bei 98% aller untersuchten AOB-Reinkulturen größtenteils konserviert sind.

Obwohl die 16S rRNS mehr stammesgeschichtliche Information aufgrund ihrer Sequenzlänge und insbesondere mehr phylogenetisch informativer Basenpositionen enthält, und somit eine höhere Auflösung innerhalb der AOB zulässt, liefern beide phylogenetische Marker – 16S rRNS wie *amoA* bzw. AmoA – weitestgehend vergleichbare Ergebnisse hinsichtlich der AOB-Phylogenie (Rotthauwe *et al.*, 1997; Purkhold *et al.*, 2000). Beide Phylogenie-Ansätze erweisen sich also als geeignet, um einerseits ein molekulares Klassifizierungssystem für die Gruppe der AOB zu etablieren, und andererseits neue Umweltsequenzen in dieses System einzuordnen.

#### **A.IV METHODEN ZUM NACHWEIS VON AOB IN DER UMWELT**

Die Erforschung mikrobieller Lebensgemeinschaften hinsichtlich ihrer Struktur und Funktion ist ein Hauptziel der mikrobiellen Ökologie. Eine Vielzahl von Ansätzen stützte sich dabei auf kultivierungsbedingte Methoden, die jedoch für die Mehrheit von Umweltorganismen mit bisher unbekanntem Wachstumsanforderungen und/oder sehr langen Generationszeiten, wie z.B. AOB, ungeeignet sind (Wagner *et al.*, 1993; Wagner *et al.*, 1994b; Amann, 1995; Torsvik *et al.*, 1996; Hugenholtz *et al.*, 1998). Vielmehr erwiesen sich die in den letzten Jahrzehnten entwickelten, molekularen Techniken zur Untersuchung komplexer

Lebensgemeinschaften als das Mittel der Wahl. Ihr Einsatz in der mikrobiellen Ökologie erweist sich als unerlässlich, um umfangreichere, und somit genauere Bestandsaufnahmen mikrobieller Lebensgemeinschaften durchzuführen, sowie um ein Grundverständnis von Funktionen einzelner Gemeinschaftsmitglieder und Prozesse innerhalb eines Ökosystems zu erlangen.

### **Methoden zu Untersuchung der Populationsstruktur von AOB**

PCR-Techniken Eine breite Anwendung zum Nachweis von AOB in der Umwelt fanden PCR-basierende Techniken. Dafür wurden zahlreiche Primerpaare zur gezielten Amplifikation von Regionen der 16S-rRNS-Gene von AOB konstruiert (McCaig *et al.*, 1994; Hiorns *et al.*, 1995; Chandler *et al.*, 1997; Hastings *et al.*, 1997; Kowalchuk *et al.*, 1997; Burrell *et al.*, 2001; Hollibaugh *et al.*, 2002; Koops *et al.*, 2003). Die Mehrzahl dieser Primer fokussiert jedoch nur auf einzelne Vertreter dieser Organismengruppe und ermöglicht daher nur den Nachweis eines Teils der tatsächlichen AOB-Populationsstruktur einer Umweltprobe. Zudem werden meist nur Fragmente der 16S-rRNS-Gene amplifiziert, deren begrenzter Informationsgehalt eine nur eingeschränkte, phylogenetische Aussagekraft enthält (Hiorns *et al.*, 1995; Chandler *et al.*, 1997; Hastings *et al.*, 1997; Kowalchuk *et al.*, 1997; Burrell *et al.*, 2001; Hollibaugh *et al.*, 2002).

Neben den 16S-rRNS-Genen wird das Funktionsgen der Ammoniakmonooxygenase (*amoA*) zum spezifischen Nachweis von AOB in verschiedenen Umwelthabitaten erfolgreich herangezogen. Unter den publizierten, jedoch unterschiedlich spezifischen PCR-Primern für das *amoA*-Gen existiert ein degeneriertes Primerpaar (*amo1F/amo2R*), mit dem nahezu alle bisher bekannten, betaproteobakteriellen AOB erfasst werden können (Rotthauwe *et al.*, 1997; Stephen *et al.*, 1999). Für die Vertreter der Gamma-AOB wurde ebenso ein spezifisches Primerpaar entworfen (Purkhold *et al.*, 2000).

Zur Analyse von PCR-Amplifikaten von AOB wurden in zahlreichen Studien sog. Fingerprinting-Techniken, wie z.B. die Denaturierende Gradient-Gelelektrophorese (DGGE) (Muyzer *et al.*, 1993; Kowalchuk *et al.*, 1997; Kowalchuk *et al.*, 1998; Stephen *et al.*, 1998; Bruns *et al.*, 1999; McCaig *et al.*, 1999; Bano und Hollibaugh, 2000; Ivanova *et al.*, 2000; Kowalchuk *et al.*, 2000b; Kowalchuk *et al.*, 2000a; Phillips *et al.*, 2000; Oved *et al.*, 2001; Nicolaisen und Ramsing, 2002; Boon *et al.*, 2003; Cytryn *et al.*, 2003; Freitag und Prosser, 2003; You *et al.*, 2003) oder die Analyse des Längenpolymorphismus terminaler Restriktionsfragmente (T-RFLP) (Horz *et al.*, 2000; Regan *et al.*, 2002; Sakano *et al.*, 2002; Mintie *et al.*, 2003) eingesetzt. DGGE ist eine sehr effektive Methode zur Auftrennung von

DNS-Fragmenten gleicher Länge und eignet sich deshalb zur relativ schnellen Diversitätsanalyse von AOB. Andererseits liegt ihr optimales Auflösungsvermögen bei max. 500 Basenpaaren, was insbesondere für die 16S-rRNS-Analyse eine starke Reduzierung des phylogenetischen Informationsgehalts bedeutet.

Bei T-RFLP werden ebenfalls gleich lange PCR-Amplifikate auf Unterschiede in ihren Sequenzen analysiert, indem die Präsenz bzw. Absenz von Schnittstellen für ausgewählte Restriktionsendonukleasen detektiert wird. Auch diese Technik bietet eine relativ schnelle und elegante Möglichkeit zum Aufzeigen von AOB-Diversität innerhalb eines Systems. Demgegenüber steht jedoch der Bedarf an einem umfangreichen Referenzdatensatz. Ferner können Punktmutationen die Interpretation von Schnittmustern erhebliches behindern und das Bild der tatsächlichen AOB-Zusammensetzung *in situ* verzerren.

Basierend auf der Amplifikation von 16S-rRNS- bzw. *amoA*-Genen wurden zudem quantitative PCR-Systeme (kompetitive und Real-Time-PCR) zur Erfassung von AOB in der Umwelt erarbeitet (Mendum *et al.*, 1999; Stephen *et al.*, 1999; Kowalchuk *et al.*, 2000b; Kowalchuk *et al.*, 2000a; Phillips *et al.*, 2000; Dionisi *et al.*, 2002), (Hermansson und Lindgren, 2001; Dionisi *et al.*, 2003; Okano *et al.*, 2004). Allerdings sind bei Einsatz PCR-abhängiger Methoden stets die damit verbundenen Verzerrungseffekte zu berücksichtigen, die zu einem verfälschten Bild der tatsächlichen Gemeinschaftsstruktur *in situ* führen (Suzuki und Giovannoni, 1996; von Wintzingerode *et al.*, 1997; Polz und Cavanaugh, 1998; Becker *et al.*, 2000; Crosby und Criddle, 2003; Lueders und Friedrich, 2003). Um dieses Problem in der mikrobiellen Ökologie zu minimieren, sollten Studien zu Gemeinschaftsstruktur nach Möglichkeit PCR-unabhängige Methoden miteinbeziehen.

Full-Cycle-16S-rRNS-Ansatz Durch Isolierung von AOB bzw. deren Nukleinsäuren aus unterschiedlichsten Lebensräumen wurde ein umfangreicher 16S-rRNS-Sequenzdatensatz geschaffen, der das Entwerfen von AOB-spezifischen Oligonukleotidsonden ermöglichte. Der Einsatz solcher Sonden für Techniken wie FISH (z.B. Juretschko *et al.*, 1998; Daims *et al.*, 2001b; Juretschko *et al.*, 2002) oder Slot-/Dot-Blot (Mobarry *et al.*, 1996) liefert kultivierungsunabhängige, qualitative Informationen über die Zusammensetzung unterschiedlichster mikrobieller Lebensgemeinschaften. Durch geeignete Erweiterung solcher Sondentechniken (Daims *et al.*, 2001b); (Stahl *et al.*, 1988) kann zudem die Gemeinschaftsstruktur quantitativ erfasst werden (z.B. Juretschko *et al.*, 1998; Schmid *et al.*, 2000; Juretschko *et al.*, 2002; Nogueira *et al.*, 2002; Wagner und Loy, 2002; Wagner *et al.*, 2002).

Die Stärke dieser Techniken liegt im direkten Nachweis ribosomaler RNS, also ohne eine vorangehende Amplifikation des Zielmoleküls, so dass durch die PCR bzw. den Klonierungsschritt bedingte Verfälschungen der AOB-Populationsstruktur ausgeschlossen werden können. Gleichzeitig beschränkt sich der Einsatz dieser Sondentechniken auf Lebensräume mit aktiven bzw. über einen hohen Ribosomengehalt verfügenden Organismen. Ein Nachteil dieser Sondentechniken ist die stark begrenzte Anzahl an parallel durchführbaren Experimenten bzw. der große zeitlichen Aufwand, der für die umfassende Untersuchung einer Umweltprobe anfällt.

Mikroarrays Dieses Problem kann jedoch mit der sog. Mikroarray-Technik, einer relativ jungen, anfänglich für die eukaryontische Genexpressionsanalyse (Schena *et al.*, 1996) entwickelten Methode, durch reverse Hybridisierung auf Glasobjektträgern gelöst werden. Dabei können in einem miniaturisierten Format gleichzeitig Hunderte (bis Tausende) von Hybridisierungen zwischen den auf dem Objektträger fixierten Sonden und ihren markierten Zielsequenzen aus dem untersuchten Probenmaterial stattfinden (Ye *et al.*, 2001; Gibson, 2002; Zhou und Thompson, 2002). Durch die Verwendung von hierarchischen sowie parallelen, gegen die 16S rRNS oder ihre Gene gerichteten Oligonukleotidsonden können gemäß des sog. Mehrfachsondenkonzeptes (Amann *et al.*, 1995; Behr *et al.*, 2000) Mikroorganismen spezifisch identifiziert werden (Guschin *et al.*, 1997; Bavykin *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2001; Small *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2001; Busti *et al.*, 2002; Koizumi *et al.*, 2002; Loy *et al.*, 2002; Wilson *et al.*, 2002b; Wilson *et al.*, 2002c; El Fantroussi *et al.*, 2003; Peplies *et al.*, 2003; Reyes-Lopez *et al.*, 2003).

Trotz ihres immensen Potentials, umfangreiche Populationsanalysen von jeder erdenklichen Probe effizient durchzuführen, fand die Mikroarray-Technik bisher nur in einem relativ begrenzten Umfang Anwendung in der mikrobiellen Ökologie. Dies liegt vor allem daran, dass wesentliche Fragestellungen bezüglich der Spezifität und Sensitivität in Umweltproben noch nicht hinreichend geklärt sind (Wu *et al.*, 2001; Busti *et al.*, 2002; Koizumi *et al.*, 2002; Loy *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2002; Wilson *et al.*, 2002a; El Fantroussi *et al.*, 2003). Zudem erfordert die Mikroarray-Technik einen hohen finanziellen sowie gerätetechnischen Aufwand.

Abgesehen von Studien mit 16S-rRNS-Mikroarrays wurden vereinzelt Versuche unternommen, Mikroorganismen auf Mikroarrays mit Sonden gegen ausgewählte Funktionsgene zu identifizieren (Bodrossy *et al.*, 2003; Deneff *et al.*, 2003; Taroncher-Oldenburg *et al.*, 2003; Stralis-Pavese *et al.*, 2004). Prinzipiell kann das

Mehrfachsondenprinzip auch auf diesen Ansatz angewendet werden. Allerdings wirkt sich der geringe Konservierungsgrad der sog. Wobble-Basen an dritter Position im Codon sowohl auf den Design von Gruppensonden als auch auf die Detektion von nahe verwandten Zielorganismen mit Gruppensonden in der Umwelt erschwerend aus. Andererseits bietet die hohe Variabilität der Wobble-Basen die Möglichkeit zum Design von hochspezifischen Sonden für nahe verwandte Gildenmitglieder. Zudem müssen bei diesem Ansatz evtl. stattgefundenere laterale Gentransferereignisse von Funktionsgenen berücksichtigt werden. Zwar können mit einem spezifischen SONDENSATZ bestimmte Funktionsgene in der Umwelt nachgewiesen werden, eine eindeutige Identifizierung von Gildenmitgliedern anhand dieser Funktionsgene ist jedoch nicht zweifelsfrei möglich, da aufgrund des lateralen Gentransfers Organismen unterschiedlicher, ribosomaler Entwicklungslinien Funktionsgene monophyletischen Ursprungs besitzen können.

Obwohl die bislang entwickelten Mikroarray-Techniken keine quantitativen Daten zu Abundanz nachgewiesener Mikroorganismen liefern, so sind diese Verfahren doch optimal geeignet, ein schnelles, hochauflösendes Fingerprinting durchzuführen, um relevante Sonden für anschließende quantitative Analysen mittels FISH oder Dot-Blot auszuwählen.

### **Methoden zu Untersuchung der Funktion von Mitgliedern innerhalb mikrobieller Lebensgemeinschaften**

Mit der Identifizierung von Mitgliedern mikrobieller Lebensgemeinschaften stellt sich in der Ökologie stets die Frage nach deren Funktion, welche man in der Vergangenheit klassischerweise durch Kultivierung zu beantworten suchte. Kultivierte Organismen werden nach wie vor im Labor hinsichtlich ihrer Physiologie eingehend untersucht, was jedoch nicht unbedingt Aufschlüsse über ihre tatsächliche Rolle in der Umwelt liefert. Da die Mehrzahl von Mikroorganismen aus natürlichen oder anthropogenen Systemen (noch) nicht kultivierbar ist (Wagner *et al.*, 1993; Amann *et al.*, 1995; Schleifer, 2004), mussten andere Wege beschritten werden. Es wurden daher in den vergangenen Jahren große Anstrengungen unternommen, um kultivierungsunabhängige Methoden zum Zwecke der Funktionsanalyse von Mikroorganismen zu entwickeln (Gray und Head, 2001).

Einer der ersten Versuche war die Messung des Ribosomengehalts in der Zelle, mit dessen Hilfe man sich eine Korrelation zum physiologischen Status erhoffte (Poulsen *et al.*, 1993; Kerkhof und Kemp, 1999). Wenn auch für viele heterotrophe Organismen ein solcher Zusammenhang tatsächlich besteht, existiert er bei langsam wachsenden Chemolithoautotrophen, wie AOB, nicht, da diese trotz Inhibition (Wagner *et al.*, 1995;

Schmid *et al.*, 2001) oder während Hungerperioden (Morgenroth *et al.*, 2000) ihren Ribosomengehalt nahezu konstant aufrechterhalten. Zudem scheinen einige Mikroorganismen über eine Art „physiologisches Gedächtnis“ zu verfügen, das einen wesentlichen Einfluss auf ihren Ribosomengehalt ausübt (Oda *et al.*, 2000). Es ist daher für eine Vielzahl von Organismen einschließlich AOB nicht möglich, vom zellulären Ribosomengehalt auf den physiologischen Status eines Organismus zu schließen.

Ein weiterer Ansatz zur Untersuchung der Funktion einzelner Mitglieder innerhalb mikrobieller Lebensgemeinschaften war die Markierung von zellulären Bestandteilen mit Hilfe Isotop-substituierter Substrate. Durch den Einbau von stabilen sowie radioaktiven Isotopen in die Polarlipid-Fettsäureester bzw. Biphytanyl-Membranlipide können diese bereits bekannten Organismen zugeordnet werden (Boschker *et al.*, 1998; Roslev *et al.*, 1998; Roslev und Iversen, 1999; Johnsen *et al.*, 2002; Knief *et al.*, 2003). Die Auswertbarkeit solcher Ansätze hängt somit stark vom Umfang der Referenzdatenbank ab. Zudem bleiben markierte, jedoch nicht kultivierte Organismen unidentifiziert. Werden hingegen Nukleinsäuren der untersuchten Organismen durch Einbau stabiler Isotope markiert, so können diese mittels Ultrazentrifugation von unmarkierten Nukleinsäuren getrennt werden. Durch eine anschließende phylogenetische Sequenzanalyse ist eine Zuordnung der markierten und detektierten Nukleinsäuren zu einer Organismengruppe möglich (Radajewski *et al.*, 2000; Whitby *et al.*, 2001a; Manefield *et al.*, 2002a; Manefield *et al.*, 2002b; Morris *et al.*, 2002; Radajewski *et al.*, 2002; Ginige *et al.*, 2004).

Die aufwendige Identifizierung Isotop-markierter Mikroorganismen mittels Sequenzanalyse kann durch die Kombination von FISH und Mikroautoradiographie (MAR) umgangen werden (Lee *et al.*, 1999; Ouverney und Fuhrman, 1999; Cottrell und Kirchman, 2000; Gray *et al.*, 2000). Zellen, die in der Lage sind, Radionuklid-markierte Substrate aufzunehmen, werden einerseits durch Bildung von Silberpartikeln in der photographischen Emulsion detektiert und zugleich mit fluoreszenzmarkierten Sonden *in situ* identifiziert. Obwohl diese Methode bereits erfolgreich zur Untersuchung der Ökophysiologie kultivierter wie nicht kultivierter Organismen eingesetzt wurde (Nielsen *et al.*, 1999; Daims *et al.*, 2001a; Nielsen *et al.*, 2002; Cottrell und Kirchman, 2003; Nielsen *et al.*, 2003; Ginige *et al.*, 2004), ist FISH-MAR, ebenso wie FISH, durch die geringe Anzahl parallel durchführbarer Experimente limitiert.

## **A.V ZIELE DIESER ARBEIT**

Die Identifizierung von Organismen in ihren Habitaten einerseits und die Zuordnung ihrer Funktion innerhalb einer Lebensgemeinschaft andererseits werden stets zu den zentralen Fragestellungen der mikrobiellen Ökologie gehören. Die Beantwortung solcher Fragen stellt hohe methodische Anforderungen an ein Nachweissystem. Da die gegenwärtigen Methoden nur unzureichend oder mit sehr viel Aufwand für Untersuchungen von Struktur-Funktions-Zusammenhängen geeignet sind, sollte ein neuer, auf der Mikroarray-Technik basierender Ansatz zum Nachweis und gleichzeitiger Analyse der Funktion von Mikroorganismen in Umweltproben entwickelt werden. Zu diesem Zweck sollten die Vorteile zweier Techniken – der gezielten Markierung von Organismen mit radioaktiven Substraten, sowie der schnellen, da hoch parallelen Identifizierung von (mikrobiellen) Nukleinsäuren mit Hilfe von Mikroarrays – zu einer neuen Methode, dem sog. Isotope Array, vereinigt werden.

Eine der ersten Aufgaben war es, die Realisierbarkeit dieses Ansatzes („proof of principle“) mit Hilfe eines Mikroarray-Prototyps mit einer geringen Anzahl an Sonden zu überprüfen. Dazu sollten Hybridisierungen auf dem Mikroarray-Prototyp mit radioaktiv markierten AOB-Reinkulturen sowie geeigneten Umweltproben durchgeführt werden. Die Erweiterung eines solchen Detektionssystems erforderte dann die Konstruktion eines umfassenden, gegen die 16S-rRNS bzw. ihre Gene gerichteten SONDENSATZES, der die Erfassung aller bisher bekannten AOB ermöglichen würde.

Die Eignung des neuen, zu entwickelnden AOB-Mikroarrays für komplexe Struktur-Funktions-Analysen sollte zunächst durch seine Anwendbarkeit als Inventarisierungswerkzeug unterschiedlicher Habitats unter Beweis gestellt werden. Als Referenz für die neue Technik sollten unabhängige, bereits etablierte (Fingerprinting-) Methoden, wie z. B. die vergleichende *amoA*-Gensequenzanalyse oder FISH dienen.

Als geeignetes Versuchssystem boten sich dafür Bodenproben eines Langzeitfeldexperiments aus dem ca. 150 Jahre alten Julius-Kühn-Versuchsareal bei Halle an. Im Rahmen dieser Arbeit sollten ausführliche Diversitätsprofile zweier Böden mit unterschiedlicher Düngungspraxis hinsichtlich ihrer AOB-Besiedlung mit Hilfe der vergleichenden *amoA*-Gensequenzanalyse erstellt werden. Ein besonderes Augenmerk galt dabei der bislang noch nicht untersuchten AOB-Mikrodiversität innerhalb einzelner Korngrößenfraktionen wie Grob- und Feinsand, Schluff und Ton der beiden Böden. Zudem sollten markierte Nukleinsäuren aus diesen Bodenproben auf dem neu entworfenen AOB-Mikroarray hybridisiert, und die erzielten Resultate im Anschluss mit denen der vergleichenden *amoA*-Gensequenzanalyse verglichen und evaluiert werden.

## **B. MATERIAL UND METHODEN**



**B.I VERWENDETE ORGANISMEN BZW. DEREN EXTRAHIERTE GENOMISCHE DNS**

Die verwendeten AOB bzw. deren DNS sind in Tab. 1 aufgelistet. Die Organismen entstammten der Stammsammlung der Mikrobiologischen Abteilung der Universität Hamburg und wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. H.-P. Koops zur Verfügung gestellt. Die Anzucht erfolgte durch Frau Dr. Gabriele Timmermann nach (Koops *et al.*, 1991).

Tab. 1 Verwendete Bakterienstämme

<b>Organismus</b>	<b>Referenz</b>	<b>Herkunft</b>
<i>Nitrosococcus mobilis</i> Nc2 <sup>T</sup>	(Koops <i>et al.</i> , 1976)	Nordsee, Deutschland
<i>Nitrosococcus halophilus</i> Nc4 <sup>T</sup>	(Koops <i>et al.</i> , 1990)	Salz-Lagune, Sardinien, Italien
<i>Nitrosomonas aestuarii</i> Nm36 <sup>T</sup>	(Koops <i>et al.</i> , 1991)	Brackwasser, Nordsee, DK
<i>Nitrosomonas cryotolerans</i> Nm55 <sup>T</sup>	(Koops <i>et al.</i> , 1991)	Kasitsna Bucht, Alaska
<i>Nitrosomonas communis</i> Nm2 <sup>T</sup>	(Koops <i>et al.</i> , 1991)	Boden, Korfu, Griechenland
<i>Nitrosomonas halophila</i> Nm1 <sup>T</sup>	(Koops <i>et al.</i> , 1991)	Nordsee
<i>Nitrosomonas marina</i> Nm22 <sup>T</sup>	(Koops <i>et al.</i> , 1991)	Großes Barriere-Riff, Australien
<i>Nitrosomonas nitrosa</i> Nm90 <sup>T</sup>	(Koops <i>et al.</i> , 1991)	Kläranlage, Deutschland
<i>Nitrosomonas oligotropha</i> Nm45 <sup>T</sup>	(Koops <i>et al.</i> , 1991)	Boden, Deutschland
<i>Nitrosomonas sp.</i> Nm41	(Koops <i>et al.</i> , 1991)	Boden, Russland
<i>Nitrosomonas sp.</i> Nm51	(Koops <i>et al.</i> , 1991)	Meerwasser, Peru
<i>Nitrosomonas ureae</i> Nm10 <sup>T</sup>	(Koops <i>et al.</i> , 1991)	Boden, Sardinien, Italien
<i>Nitrosomonas sp.</i> Nm47	(Purkhold <i>et al.</i> , 2003)	Kläranlage, Deutschland
<i>Nitrosomonas europaea</i> Nm50 <sup>T</sup>	(Winogradsky, 1890)	Boden, USA
<i>Nitrosomonas eutropha</i> Nm57 <sup>T</sup>	(Koops und Harms, 1985)	Kläranlage, USA
<i>Nitrosomonas sp.</i> Nm58	(Stehr <i>et al.</i> , 1995a)	Elbsediment, Deutschland
<i>Nitrosomonas sp.</i> Nm59	(Purkhold <i>et al.</i> , 2003)	Kläranlage, Deutschland
<i>Nitrosomonas sp.</i> Nm84	(Stehr <i>et al.</i> , 1995a)	Schwebstoffe, Elbe, Deutschland
<i>Nitrosomonas sp.</i> Nm93	(Juretschko <i>et al.</i> , 1998)	Kläranlage, Deutschland
<i>Nitrosomonas sp.</i> Nm103	(Juretschko <i>et al.</i> , 1998)	Kläranlage, Deutschland
<i>Nitrosomonas sp.</i> Nm143	(Purkhold <i>et al.</i> , 2003)	Meerwasser, Dom. Republik
<i>Nitrospira sp.</i> Nsp1	(Koops und Harms, 1985)	Boden, Sardinien, Italien
<i>Nitrospira sp.</i> Nsp5	(Koops und Harms, 1985)	Höhlensee, Sardinien, Italien
<i>Nitrospira briensis</i> Nsp10 <sup>T</sup>	(Koops und Harms, 1985)	Boden, Kreta, Griechenland
<i>Nitrospira sp.</i> Nsp12	(Koops und Harms, 1985)	Boden, Deutschland
<i>Nitrospira sp.</i> Nsp17	(Koops und Harms, 1985)	Boden, Island
<i>Nitrospira sp.</i> Nsp40	(Purkhold <i>et al.</i> , 2003)	Boden, Deutschland
<i>Nitrospira sp.</i> Nsp41	(Purkhold <i>et al.</i> , 2003)	Boden, Malta
<i>Nitrospira sp.</i> Nsp58	(Purkhold <i>et al.</i> , 2003)	Mauerwerk, Deutschland
<i>Nitrospira sp.</i> Nsp65	(Purkhold <i>et al.</i> , 2003)	Mauerwerk, Deutschland
<i>Nitrospira tenuis</i> Nv1 <sup>T</sup>	(Koops und Harms, 1985)	Boden, Hawaii
<i>Nitrospira sp.</i> NL5	(Koops und Harms, 1985)	Kläranlage, Saudi-Arabien
<i>Nitrospira multififormis</i> NL13 <sup>T</sup>	(Koops und Harms, 1985)	Boden, Indien
<i>Nitrospira sp.</i> L115	(Utaaker <i>et al.</i> , 1995)	Torfmoor, Finnland
<i>Nitrospira sp.</i> III7	(Utaaker und Nes, 1998)	Fichtenwald, Norwegen
<i>Nitrospira sp.</i> Ka3	(Aakra <i>et al.</i> , 1999)	Boden, Norwegen
<i>Escherichia coli</i> TOP10		Invitrogen

<sup>T</sup>: Typstamm

## B.II VERWENDETE MEDIEN

Tab. 2 Verwendete Medien

Medienbezeichnung	Anwendung	Referenz
Luria-Bertani (LB)	Anzucht von <i>E. coli</i>	Sambrook und Russell, 2001
LB-Amp. (flüssig/fest)	Anzucht rekombinanter <i>E. coli</i>	Sambrook und Russell, 2001
SOC	Transformation rekombinanter <i>E. coli</i>	Sambrook und Russell, 2001
Liquid Mineral (LM)	Anzucht von Nm50, Nm57	Donaldson, 1989

## B.III STAMMHALTUNG

Die Stämme von *Nm. eutropha* sowie *Nm. europaea* wurden im mineralischen Flüssigmedium (liquid mineral = LM) nach (Donaldson, 1989), mit 0.5 g/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anstatt 1,0 g/l, aerob, bei 30°C und unter Lichtausschluss kultiviert. Zur Stammerhaltung wurden die spät logarithmischen Kulturen in Abständen von zwei Wochen in ein frisches LM-Flüssigmedium überimpft.

Für die langfristige Haltung von rekombinanten *E. coli*-Stämmen wurden Glycerinkulturen im 2,0-ml-ERG- bzw. 150-µl-Mikrotiterplatten-Format angelegt. Zum Ansetzen einzelner Glycerinstocks im 2,0-ml-ERG-Format wurden bis zu OD<sub>260</sub> von 1,0 bewachsene Kulturen mit einem 50%-igen (v/v) Glycerol-PBS-Gemisch auf eine Glycerin-Endkonzentration von 7,5% (v/v) eingestellt, eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend in einem Trockeneis-Ethanol-Gemisch schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Für das Anlegen von Glycerinkulturen im Mikrotiterformat wurden je 150 µl Ampicillin (100 µg/ml)- sowie Glycerin-haltigen (7,5% v/v) LB-Flüssigmediums steril in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte überführt, mit einer Kolonie des rekombinanten Stamms beimpft, bei 37°C ÜN inkubiert, am folgenden Tag in einem Trockeneis-Ethanol-Gemisch schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Mindestens eine Vertiefung mit unbeimpftem Medium wurde als Kontaminationskontrolle mitgeführt.

## B.IV UNTERSUCHTE UMWELTPROBEN

### B.IV.1 Kläranlagen

Tab. 3 Beprobte Kläranlagen \*EGW: Einwohnergleichwert

Kläranlage	Abwasserart	Verfahren	Probenahme aus Prozessstufe	Weitere Angaben
Aalborg West (Dänemark)	kommunal/industriell (Fischverarbeitungs-, Schlacht-, Brauerei-, und Molkereibetriebe)	Anaerobe Vorklämung, intermittierende anaerob/aerobe Denitrifikation/Nitrifikation, biologisch-chemische P-Entfernung	aerobe Nitrifikation	EGW 300 000*
Oberding (Deutschland)	industriell (Speisereste- und Tierkörper-Verwertungsanlage)	Denitrifikation, aerobe Nitrifikation, Rücklauf Nitrat zu Denitrifikation unter Zufuhr von Rohabwasser	aerobe Nitrifikation	7,5 t h <sup>-1</sup> Schlacht-/Tierkörperabfälle, 12 t h <sup>-1</sup> Speisereste

### B.IV.2 Bodenproben

Die Bodenproben für dieses Experiment wurden im Herbst 2000 aus dem Versuchsgelände der Universität Halle (Julius-Kühn-Feld) entnommen, das sich entlang eines ca. 15-km-breiten Sandlößgürtels nördlich von Halle erstreckt. Der Boden, auf dem seit 1878 Ewiger Roggen (*Secale cereale* L.) in Monokultur angebaut wird, ist aufgrund seiner Zusammensetzung (8% Ton, 20% Schluff, und 72% Sand) gemäß der Kriterien der Food and Agriculture Organization (FAO) als Luvisches Phäozem klassifiziert worden. Phäozeme zeichnen sich durch ihre humusreiche Deckschicht aus, und werden in nativem Zustand von Gras oder Laubwaldvegetation bewachsen. Aufgrund ihrer hohen Fruchtbarkeit werden sie oft in der Landwirtschaft für Weizenanbau, aber auch als Weideflächen genutzt. Die Temperatur des Bodens betrug im Jahresdurchschnitt 9,2°C, und die Niederschlagsrate belief sich auf 501 mm pro Jahr. Für die Untersuchung wurden Bodenproben aus Arealen mit unterschiedlicher Düngungspraxis herangezogen. Während das eine Areal jährlich mit 12 t Stallmist pro Hektar gedüngt wurde, erfuhr das Kontrollfeld keinerlei Düngungsmaßnahmen. Mangels Feldreplikate wurden die Versuchsareale von jeweils 25m x 11,75m in drei Teilbereiche (I, II, III) unterteilt, aus denen Proben aus einer Tiefe von 0-25 cm entnommen wurden. Die Bodentriplikate der beiden Versuchsfelder wurden durch ein 2-mm-Sieb gegeben und bis zu Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert. Eine vollständige Dokumentation des Versuchablaufes ist bei (Stumpe *et al.*, 1995; Stumpe und Schliephake, 1995; Merbach und Körschens, 1999) im Detail beschrieben.

## **B.V FRAKTIONIERUNG VON BODENAGGREGATEN**

Die Fraktionierung der Bodenaggregate wurde nach der zuvor von (Jocteur Monrozier *et al.*, 1991) beschriebenen und von (Stemmer *et al.*, 1998) abgewandelten Methode durchgeführt. Das Prinzip hierbei ist die Auftrennung von Mikroaggregaten bezüglich der Partikelgröße ihrer Bestandteile durch die Kombination von Nasssieben und Zentrifugieren.

Hierfür werden die zuvor gesiebten und gefrorenen Bodenproben (s.o.) zwei Tage lang bei 4°C aufgetaut, anschließend mit destilliertem Wasser vermischt und niederenergetisch (ca. 50J s<sup>-1</sup>; 120s) sonifiziert. Zuerst wird die Grob- und Mittel- (2000-200µm) von der Feinsandfraktion (200-63µm) durch manuelles Sieben abgetrennt. Durch die folgenden Zentrifugationsschritte wird zunächst die Schluff- (63-2µm) (150 x g; 2 Min.; 15°C) gefolgt von der Tonfraktion (2-0,1µm) (3900 x g; 30 Min.; 15°C) sedimentiert. Die einzelnen Fraktionen werden im Ofen getrocknet und schließlich bei -20°C gelagert. Eine detaillierte Beschreibung diese Methode findet sich bei (Stemmer *et al.*, 1998).

## **B.VI RADIOAKTIVE MARKIERUNG VON NUKLEINSÄUREN *IN SITU***

### **B.VI.1 Radioaktive Markierung der Reinkultur von *N. eutropha* (Nm57)**

250 ml einer spät-logarithmischen Flüssigkultur von *N. eutropha* wurden geerntet (10 000 x g, 20 min; Centrikon, T-42K, Kontron Instruments, Mailand, I) und in 15 ml eines frischen LM-Mediums ohne die Bestandteile NaHCO<sub>3</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sowie Phenolrot resuspendiert. Die konzentrierte Reinkultur wurde mit <sup>14</sup>C-markierten Bikarbonat (58 mCi mmol<sup>-1</sup> C, Amersham Biosciences, Uppsala, S) [H<sup>14</sup>CO<sub>3</sub><sup>-</sup>] auf 60 µM, 3,6 µCi ml<sup>-1</sup> eingestellt. Ferner wurde dem Medium (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bis zu einer Endkonzentration von 2,5 mM zugesetzt. Die Reinkultur wurde bei 30°C, unter Schütteln (150 UpM) und Lichtausschluss für 48 h inkubiert. Nach 48 Stunden wurde der Einbau des radioaktiven Substrats in die Biomasse mit der unten beschriebenen Filter-Count-Methode analysiert. Die markierten Zellen wurden geerntet (10,000 x g, 10 min), in 90% (v/v) RNAlater<sup>TM</sup> (Ambion, Austin, Texas, USA) und 10% (v/v) LM-Medium ohne NaHCO<sub>3</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sowie Phenolrot aufgenommen. Die Zellen wurden zunächst für zwei Stunden auf Eis, dann für 24 Stunden bei 4°C inkubiert und anschließend bis zur RNS-Extraktion bei -20°C gelagert.

### **B.VI.2 Radioaktive Markierung von Belebtschlamm**

Belebtschlammproben wurden aus den Nitrifikationsbecken einer industriellen (Tierkörperverwertungsanlage, TVA Oberding, D) sowie einer kommunalen (Aalborg West,

DK) Kläranlage entnommen und für maximal drei Tage vor der radioaktiven Markierung bei 5°C gelagert. Vor Zugabe des  $^{14}\text{C}$ -markierten Bikarbonats wurde der natürliche  $^{12}\text{C}$ -Bikarbonatgehalt der Schlämme minimiert. Zu diesem Zweck wurden die Proben zentrifugiert (10 000 x g, 15 min), der Überstand verworfen und die pelletierte Biomasse in HEPES-gepuffertem LM-Medium, das frei von  $\text{NaHCO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  und Phenolrot war, resuspendiert. Zur vollständigen Entfernung von  $^{12}\text{C}$ -Bikarbonat wurden die Schlammsuspensionen für eine Stunde mit  $\text{CO}_2$ -freier Luft begast (Whitby *et al.*, 2001a). Die Bikarbonat-Konzentration in den Schlämmen wurde sowohl vor als auch nach der  $\text{CO}_2$ -Eliminierung gaschromatographisch bestimmt (Chai *et al.*, 2001). Die  $^{12}\text{C}$ -Bikarbonat-freien Schlämme wurden jeweils mit  $^{14}\text{C}$ -markierten Bikarbonat auf eine Endkonzentration von 1,85 mM  $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$  (107  $\mu\text{Ci ml}^{-1}$ ) sowie mit  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  auf 2,5 mM eingestellt. Die so modifizierten Schlämme wurden bei 30°C unter Schütteln (150 UpM) und Lichtausschluss für maximal 26 Stunden inkubiert. Parallel dazu wurden die in gleicher Weise modifizierten Schlämme zusätzlich mit 5 mg  $\text{l}^{-1}$  Allylthioharnstoff, einem spezifischen Inhibitor des Enzyms Ammoniakmonooxygenase inkubiert. Allylthioharnstoff ist ein reversibler Chelat-Bildner mit Cu-Ionen und verhindert somit die Oxidation von Ammoniak (Bedard und Knowles, 1989).

Der Einbau des radioaktiven Substrats in die Biomasse wurde kontinuierlich mit Hilfe der unten beschriebenen Filter-Count-Methode überwacht.

Weitere Parallelproben wurden mit nicht radioaktivem  $\text{HCO}_3^-$  inkubiert, um die  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ - and  $\text{NH}_4^+$ -Konzentrationen in den Schlämmen zu unterschiedlichen Zeitpunkten zu verfolgen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels Farbstreifens (MERCK, Darmstadt, Germany).  $\text{NH}_4^+$  wurde kontinuierlich zu radioaktiven sowie nicht radioaktiven Proben zugegeben, sobald die Konzentration im Schlamm unter den Wert von 1 mM gesunken war. Nach Beenden der radioaktiven Markierungen wurden alle Proben, wie bereits oben beschrieben, in RNAlater<sup>TM</sup> (Ambion) aufgenommen und bis zur RNS-Extraktion bei -20°C gelagert.

## **B.VII QUANTIFIZIERUNG VON RADIOAKTIVITÄT IN BIOMASSE MITTELS DER FILTER-COUNT-METHODE**

Aus den radioaktiven Inkubationsansätzen wurden jeweils 10  $\mu\text{l}$  mittels Kanüle und Spritze entnommen. Die Proben wurden zu 10 ml LM-Medium gegeben und durch einen Cellulosefilter (Advantec MFS Inc, Pleasanton, CA, USA) mit einer Porengröße von 0,2  $\mu\text{m}$  filtriert. Reste von anorganischen Karbonaten wurden durch Zugabe von 5 ml 0,1 N HCl

gelöst. Nach 3-minütiger Ansäuerung wurde das HCl durch Filtrieren entfernt. Anschließend wurde der Cellulosefilter in ein Szintillationsgläschen mit 10 ml Szintillationscocktail (Filter-Count™, Packard, Groningen, NL) überführt und darin gelöst. Die Filter wurden für 3 min in einem Szintillationszähler (Packard 1600 TR, Packard, Groningen, NL) gemessen. Eventuelle Werteverzerrungen durch Quenching-Effekte wurden mit externen Standards (gelöster Cellulosefilter ohne Biomasse) korrigiert.

## **B.VIII EXTRAKTION VON NUKLEINSÄUREN**

### **B.VIII.1 Extraktion genomischer DNS**

Für die Extraktion genomischer DNS wurden 2 ml pelletierter Biomasse aus Belebtschlamm bzw. 150 ml Flüssigkultur von *Nitrosomonas eutropha* bzw. 1 g Bodenprobe eingesetzt. Die DNS wurde mit dem Fast DNA Kit for Soil (BIO101, Vista, CA, USA) unter Verwendung eines Bead-Beaters (FastPrep120; BIO101) nach Angaben des Herstellers extrahiert.

### **B.VIII.2 RNS-Extraktion nach dem modifizierten RNAwiz™ (Ambion)-Protokoll (Adamczyk *et al.*, 2003)**

Sowohl frische als auch in RNAlater™ (Ambion) gelagerte Biomasse wurde durch Zentrifugation (23645 x g; 15 min, 4°C; Rotina 35R, Hettich, Tuttlingen, D) in 2-ml-Schraubdeckel-Reagenzgefäßen (SRG) (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) sedimentiert, der Überstand verworfen und bei Bedarf mit 1xPBS gewaschen. Die Pellets wurden in 1 ml RNAwiz™ resuspendiert, mit dem Inhalt eines Lysing-Matrix-E-Gefäßes (Fast DNA Kit for Soil, BIO101) versetzt und mit dem Bead-Beater (FastPrep120; BIO101) für 40 s bei einer Geschwindigkeit von 4,5 homogenisiert. Für Reinkulturen wurde der Aufschluss einmal, für Belebtschlammproben viermal wiederholt. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben mit 200 µl Chloroform intensiv geschüttelt und für weitere 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Phasentrennung mittels Zentrifugation (15 min, 23645 x g, 4°C) wurde die wässrige Phase in ein neues SRG überführt und auf Eis gelagert. Um die RNS-Extraktionseffizienz für die Belebtschlammproben zu erhöhen, wurde die Lysing-Matrix-E-haltige organische Phase erneut mit 400 µl RNAwiz™ versetzt, eine Minute lang gevortext, für 10 min bei 65°C erhitzt, wiederholt für 30 s gevortext und schließlich für 5 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine weitere Zugabe von 200 µl Chloroform, ein intensives Ausschütteln der Proben und eine 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Nach der anschließenden Zentrifugation (15 min, 23645 x g, 4°C) wurden die wässrigen

Phasen aus der ersten und zweiten Extraktion vereinigt. Um eine Phasentrennung zu vermeiden, wurde 500 µl ddH<sub>2</sub>O und 1 ml Isopropanol (JT Baker, Deventer, NL) zu der RNS zugegeben, die RNS im Trockeneis-Ethanol-Gemisch für 5 min präzipitiert und mittels Zentrifugation (20 min, 23645 x g, 4°C) sedimentiert. Das Pellet wurde mit 75%-igem Ethanol gewaschen, für 3 min bei 90°C luftgetrocknet und in TE-Puffer (Tris 10 mM, EDTA 1 mM; pH 8,0) resuspendiert. Ein vollständiges Lösen der RNS wurde durch Erhitzen auf 90°C für 3 min erreicht. Nachfolgend wurde die aus Belebtschlamm extrahierte RNS mit dem RNA Purification Kit (QiAgen, Hilden, D) nach Herstellerangaben gereinigt.

Die Menge sowie die Reinheit der extrahierten RNS wurden einerseits spektralphotometrisch (Biorad, SmartSpec™ 3000, Hercules, CA, USA) bei den Wellenlängen von 260 nm bzw. 280 nm, andererseits mittels Agarosegelelektrophorese (0,9% w/v SeaPlaque® GTG® Agarose; BioWhittaker Molecular Applications, Rockland, ME) in 1xTAE-Puffer (40 mM Tris, 10 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA; pH 8,0) bestimmt. Die RNS im Agarosegel wurde mit SYBR Gold (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA) visualisiert.

## **B.IX QUANTIFIZIERUNG DER IN DIE RRNS INKORPORIERTEN RADIOAKTIVITÄT**

Die 16S- und 23S-Banden der elektrophoretisch (siehe oben) aufgetrennten RNS wurden mit einer Kapillare aus dem Agarosegel ausgestochen und die rRNS-haltigen Gelfragmente in 1 ml ddH<sub>2</sub>O bei 95°C verflüssigt. Nach Zugabe von 9 ml des Szintillationscocktails (InstaGel-Plus™, Packard, Groningen, NL) wurde die Radioaktivität für 11 min in einem Szintillationszähler (Beckman Instruments, Inc., LS-1800, Pasadena, CA, USA) gemessen.

## **B.X PCR-AMPLIFIKATION**

### **PCR-Amplifikation der 16S-rRNS-Gene**

Die Amplifikation der 16S-rRNS-Gene wurde in einem Primus PCR-Gerät (MWG Biotech, Ebersberg, D) durchgeführt. Hierfür wurden die Primerkombinationen 616V/630R (Juretschko *et al.*, 1998) (616V: 5'-AGA GTT TGA TYM TGG CTC AG-3'; 630R: 5'-CAK AAA GGA GGT GAT CC-3') sowie 616V/1492R (Kane *et al.*, 1993; Juretschko *et al.*, 1998) (1492R: 5'-GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3') verwendet. Der Standardreaktionsansatz enthielt 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 µM des V- bzw. R-Primers, sowie 1,5 U der *Taq*-Polymerase (Promega, Madison, Wis., USA) und belief sich auf ein Gesamtvolumen von 50 µl. Die Reaktion fand unter folgenden Bedingungen statt: einleitende Denaturierung bei 94°C für 2 min, gefolgt von 30 Zyklen mit Denaturierung bei 94°C für 30 s, Annealing bei 52°C für 30 s und Elongation bei 72°C für 40 s, sowie eine abschließende Elongation bei 72°C für 5 min.

Die Länge der Amplifikate wurde mit Agarosegelelektrophorese in 1xTAE-Puffer (Sambrook und Russell, 2001) bestimmt.

### **PCR-Amplifikation der *amoA*-Gene**

Die Amplifikation der *amoA*-Fragmente wurde in einem Primus PCR-Gerät (MWG Biotech) mit dem Primerpaar amoA1F/amoA2R (amoA1F: 5'-GGG GHT TYT ACT GGT GGT-3'; amoA2R: 5'-CCC CTC KGS AAA GCC TTC TTC-3', (Rotthauwe *et al.*, 1997; Stephen *et al.*, 1999) durchgeführt. Der Standardreaktionsansatz von insgesamt 50 µl enthielt 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTP-Mix, 1 µM des V- bzw. R-Primers sowie 1,5U der *Taq*-Polymerase (Promega). Die Reaktionsbedingungen wurden, wie folgt, eingestellt: einleitende Denaturierung bei 94°C für 2 min., gefolgt von 30 Zyklen mit Denaturierung bei 94°C für 20 s, Annealing bei 52°C für 30 s und Elongation bei 72°C für 30 s, und eine abschließende Elongation bei 72°C für 5 min.

### **B.XI AUFTRENNUNG VON *AMO*A-AMPLIFIKATEN MITTELS GELRETARDATION**

Die aus Umweltproben amplifizierte *amoA*-Fragmente wurden vor dem Klonieren in einem retardierenden Agarosegel aufgetrennt (Wawer *et al.*, 1995; Schmid *et al.*, 2000). Hierfür wurde das Gel mit einem hochmolekularen DNS-Liganden (HA Yellow, Hanse Analytik, D) versetzt, der sich vorzugsweise an AT-reiche Regionen der Amplifikate anlagert. Man erzielt somit eine Auftrennung heterogener Amplifikate gleicher Länge hinsichtlich ihres GC-Gehalts, der sich wiederum in unterschiedlichen Migrationsgeschwindigkeiten innerhalb des Gels widerspiegelt. Die Amplifikate wurden im Gel mit SYBR Gold (Molecular Probes) visualisiert. Die einzelnen Banden wurden mit einer Kapillare aus dem Gel ausgestochen und in unabhängigen Ansätzen kloniert (siehe unten)

### **B.XII KLONIERUNG**

Nach Größenbestimmung der 16S-rRNS- bzw. *amoA*-Amplikons mittels Agarosegelelektrophorese (2% w/v low melting SeaPlaque® GTG® Agarose; BioWhittaker Molecular Applications, Rockland, USA) wurden die Banden der erwarteten Größe mit Kapillaren ausgestochen, in ein ERG mit 50 µl sterilem ddH<sub>2</sub>O überführt und im Heizblock für 10 min bei 80°C aufgeschmolzen. Für die darauf folgende Ligation in den Vektor pCR<sup>TM</sup>2.1 wurden 10 µl der Nukleinsäure-Lösung eingesetzt. Die weiteren Klonierungsschritte erfolgten nach Herstellerangaben (TOPO TA, Invitrogen), mit der Ausnahme, dass für die Transformation 5 µl Ligationsansatz (statt 3 µl) verwendet wurden.

Die Insertgröße im Vektor wurde durch PCR-Amplifikation des Inserts (zuzüglich flankierender Vektorregionen) mit den Primern M13V/M13R (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3 bzw. 5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3') direkt aus den transformierten *E.coli* TOP10-Zellen überprüft. Eine zu untersuchende Transformandenkolonie wurde steril von der Agarplatte abgenommen und ein Teil zu Vermehrung in Ampicillin haltiges LB-Flüssigmedium (100 µg/ml) angeimpft, während ein Teil für die nachfolgende PCR-Reaktion in 20 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gelöst und auf eine Endkonzentration von 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTP-Mix, 1 µM des V- bzw. R-Primers sowie 1,5 U der *Taq*-Polymerase (Promega) mit 30 µl PCR-Reaktionsmix eingestellt wurde. Die PCR-Reaktion wurde bei einleitender Denaturierung 94°C für 5 min, gefolgt von 30 Zyklen mit Denaturierung bei 94°C für 30s, Annealing bei 60°C für 30 s und Elongation bei 72°C für 40 s, sowie einer abschließende Elongation bei 72°C für 10 min durchgeführt und mit anschließender Agarosegelelektrophorese kontrolliert.

Die Plasmide wurden nach Herstellerangaben mit dem Spin Plasmid Kit (QiAgen) isoliert und die Insertgröße bei Bedarf zusätzlich durch anschließenden Verdau mit der Restriktionsendonuklease *EcoRI* (Mbi Fermentas, St. Leon-Rot, D) mit anschließender Agarosegelelektrophorese kontrolliert.

### **B.XIII SEQUENZIERUNG**

Die Sequenzierung der klonierten PCR-Produkte erfolgte an einem automatisierten DNS Sequenziergerät (LI-COR, Lincoln, USA) nach dem „cycle-sequencing“-Prinzip, einer Kombination aus der enzymatischen Didesoxy-Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977) und der Polymerase-Kettenreaktion (Saiki *et al.*, 1988) unter Verwendung des Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit (Amersham Biosciences). Das Bandenmuster wurde über die Infrarot-markierten (IRD-800, IRD-700) Primer M13V bzw. M13R detektiert, die komplementär zu den Zielsequenzen auf dem zur Klonierung verwendeten Vektor pCR<sup>TM</sup> 2.1 (Invitrogen) sind. Zur besseren Auflösung schwer sequenzierbarer Sekundärstrukturen enthielt der Standardreaktionsansatz 6% (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma, München, D).

### **B.XIV PHYLOGENETISCHE ANALYSE VON SEQUENZEN**

Zur phylogenetischen Analyse von *amoA*- bzw. 16S-rRNS-Sequenzen wurde das ARB-Softwarepaket (<http://www.arb-home.de/>) mit den darin enthaltenen Alignment- sowie Baumberechnungsprogrammen verwendet.

### **B.XIV.1 *amoA*-basierende Phylogenie**

Neue, entweder in dieser Arbeit aus Umweltproben generierte oder in GenBank publizierte *amoA*-Sequenzen wurden in die bereits existierende Datenbank (Purkhold *et al.*, 2000; Purkhold *et al.*, 2003) importiert und deren Basenpositionen an das vorhandene Alignment angepasst. Nukleotidsequenzen des *amoA*-Genfragments wurden manuell mit dem ARB\_EDIT-Sequenzeditor aligned. Die aus Nukleotidsequenzen des *amoA*-Genfragments abgeleiteten Aminosäuresequenzen wurden mit dem GDE 2.2-Editor (S.W. Smith, C. Wang, P.M. Gillevet and W. Gilbert (1992) Genetic Data Environment and the Harvard Genome Database. Genome mapping and Sequencing, Cold Spring Harbor Laboratory) bearbeitet. Für die Sequenzanalyse des AmoA-Protein- bzw. *amoA*-Genfragments wurden maximal 151 Aminosäuren bzw. 453 Basen herangezogen, die dem PCR-Amplifikat mit den amoA1F/amoA2R-Primern (Rotthauwe *et al.*, 1997) modifiziert nach (Stephen *et al.*, 1999) entsprachen. Die flankierenden Primersequenzen wurden bei der Sequenzanalyse nicht berücksichtigt und deshalb entfernt. Sequenzen unter einer Länge von 300 Basen wurden von der phylogenetischen Analyse ausgeschlossen.

Phylogenetische Bäume wurden mit den im ARB-Programmpaket verfügbaren Verfahren berechnet. Die auf Nukleinsäureebene basierende *amoA*-Phylogenie wurde einerseits mit dem Distanz-Matrix-Verfahren FITCH mit dem Korrekturfaktor Jukes-Cantor (Jukes und Cantor, 1969) ermittelt. Andererseits wurden Merkmal-bedingte Algorithmen, wie Maximum-Likelihood, (fastDNAmI; (Olsen *et al.*, 1994)) bzw. Maximum-Parsimony mit 100 Wiederholungen zur Berechnung von sog. Bootstrap-Werten (PHYLIP, version 3.57c, J. Felsenstein, Department of Genetics, University of Washington, Seattle, USA) verwendet. Um die hochvariablen, sog. Wobble-Basen an Position drei im Codon nicht in die Baumberechnung eingehen zu lassen, wurden diese Positionen durch die Verwendung eines Konservierungsfilters ausgelassen. Zur Berechnung phylogenetischer Verhältnisse von AmoA-Sequenzen auf Aminosäureebene wurden Distanz-Matrix- (FITCH) und Maximum-Parsimony-Verfahren mit 100 Wiederholungen zur Ermittlung von Bootstrap-Werten (PHYLIP), sowie das Maximum-Likelihood-basierende MOLPHY-Programm (Version 2.3, Computer science monographs, no. 28.: J. Adachi and M. Hasegawa, Institute of Statistics and Mathematics, Tokyo, J) eingesetzt. Aufgrund sehr hoher Sequenzähnlichkeiten auf AmoA-Aminosäureebene wurde auf die Verwendung von Konservierungsfiltren bei Berechnungen von phylogenetischen Bäumen verzichtet. Anhand der Gemeinsamkeiten in den mit allen Berechnungsverfahren ermittelten Baumtopologien wurden Konsensusbäume (Ludwig *et al.*, 1998) für Nukleinsäure- sowie Aminosäuresequenzen erstellt.

## **B.XIV.2 16S-rRNS-basierende Phylogenie**

Neue, aus GenBank in die bereits vorhandene 16S-rRNS-Datenbank importierte Sequenzen wurden mit Hilfe des ARB\_EDIT-Programms automatisch aligned und bei Bedarf die dabei entstandenen Fehler unter Berücksichtigung von Sekundärstrukturmerkmalen der 16S rRNS manuell korrigiert. Für die Berechnung phylogenetischer Bäume wurden Distanz-Matrix-, Maximum-Parsimony- sowie Maximum-Likelihood-Verfahren für Nukleinsäuren aus dem ARB-Softwarepaket verwendet. Zur phylogenetischen Sequenzanalyse wurden lediglich die Sequenzen herangezogen, die eine Länge von mehr als 1000 Basen aufwiesen. Aufgrund hoher Sequenzähnlichkeiten auf 16S-rRNS-Ebene innerhalb der AOB wurde auf die Verwendung von Konservierungsfildern bei Berechnungen von phylogenetischen Bäumen verzichtet. Anhand daraus resultierender, reproduzierbarer Baumtopologien wurden Konsensusbäume (Ludwig *et al.*, 1998) erstellt.

## **B.XV IN-VITRO-TRANSKRIPTION**

Um eine ausreichende Menge an rRNS aus AOB zu erhalten, wurden ihre klonierten 16S-rRNS-Gene (Purkhold *et al.*, 2000) aus Plasmiden (pCR®2.1-TOPO; Invitrogen) *in vitro* transkribiert. Zu diesem Zweck wurden die entsprechenden Plasmide mit der Restriktionsendonuklease *Bam*HI (MBI Fermentas) linearisiert und die RNS unter Verwendung des T7 Transcription Kit (MBI Fermentas) nach Herstellerangaben synthetisiert. Die Aufreinigung der RNS wurde mit der bei (Sambrook und Russell, 2001) beschriebenen Phenol-Chloroform-Extraktionsmethode vorgenommen. Die korrekte Größe der synthetisierten RNS wurde mittels Agarosegelelektrophorese bestätigt und die RNS-Konzentration mittels Spektralphotometrie (Biorad, SmartSpec™ 3000) bestimmt.

## **B.XVI MARKIERUNG VON NUKLEINSÄUREN MIT FLUORESZENZFARBSTOFFEN**

### **B.XVI.1 Fluoreszenzmarkierung von PCR-Amplifikaten mittels Random Priming (Loy *et al.*, 2002)**

Die Amplifikate der 16S-rRNS-Gene wurden mit dem QiAquick PCR Purification Kit (QiAgen) aufgereinigt und ihre Konzentration spektralphotometrisch (Biorad, SmartSpec™ 3000) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Für die DNS-Markierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 (Amersham Biosciences) wurde das DecaLabel DNA Labeling Kit (MBI Fermentas) verwendet. Der Reaktionsansatz enthielt maximal 200 ng zu markierende DNS. Das PCR-Produkt mit 10 µl Dekanukleotide-haltigem Reaktionspuffer wurde für

10 min bei 95°C denaturiert und sofort auf Eis platziert. Anschließend wurden 3 µl Desoxynukleotidmix-C, der kein dCTP enthielt, 1 µl Cy5-dCTP (Amersham Biosciences) und 1 µl Klenow-Fragment (Exo<sup>-</sup>; 5 U µl<sup>-1</sup>) zugesetzt, so dass das Reaktionsvolumen 50 µl betrug. Der Markierungsansatz wurde für 45 min bei 37°C inkubiert. Für eine erhöhte Markierungseffizienz wurden erneut Mix-C, Cy5-dCTP sowie das Klenow-Fragment zugegeben und der Reaktionsansatz für weitere 45 min bei 37°C inkubiert. Die Markierung wurde beendet nach Zugabe von 4 µl des dNTP-Mix und einer abschließenden Inkubation bei 37°C für 1 h. Das markierte PCR-Produkt wurde vom überschüssigen Farbstoff sowie sonstigen Reaktionsbestandteilen mit dem QiAquick Nucleotide Removal Kit (Qiagen) gereinigt und mit ddH<sub>2</sub>O aus der Säulchenmatrix eluiert. Schließlich wurden jeweils zwei 200-ng-Markierungsansätze der gleichen Probe vereinigt, mit 0,5 pmol des Cy5-markierten Kontrolloligonukleotids CONT-COMP (Loy *et al.*, 2002) versetzt, im Vakuum getrocknet und im Dunkeln bei -20°C gelagert.

### **B.XVI.2 Fluoreszenzmarkierung von RNS (Adameczyk *et al.*, 2003)**

Die native bzw. *in-vitro*-transkribierte RNS wurde mit dem CyScribe Direct mRNA Labeling Kit (Amersham Biosciences) fluoreszenzmarkiert. Hierbei handelt es sich um eine direkte, nicht enzymatische RNS-Markierungsmethode, bei der Guanidinreste an Position N<sub>7</sub> kovalent mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Cy3 oder Cy5) verknüpft werden, ohne einen negativen Einfluss auf nachfolgende Basenpaarung auszuüben. Die Markierung wurde nach Herstellerangaben vorgenommen.

*In-vitro*-transkribierte RNS aus Reinkulturen sowie nicht radioaktive RNS aus Umweltproben wurden in 1-µg-Maßstab markiert und anschließend über MobiSpin G50-Säulchen (MoBiTec, Göttingen, D) gereinigt. Das Eluat wurde mit 0,5 pmol des Cy5-markierten Kontrolloligonukleotids CONT-COMP (Loy *et al.*, 2002) versetzt, im Vakuum eingeeengt und im Dunkeln bei -20°C gelagert.

Radioaktive RNS aus Umweltproben wurde in 0,5-µg-Ansatz markiert. Zu diesem Zweck wurden 0,5 µg gereinigter RNS präzipitiert, durch Zentrifugation (Rotina 35R, Hettich) (15 min, 23,645 x g, 4°C) sedimentiert, mit 70%-igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in ddH<sub>2</sub>O resuspendiert. Die Markierung wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Der überschüssige Farbstoff aus dem Markierungsansatz wurde durch eine erneute Fällung der RNS mit 0,1 Vol. 5M NaCl und 3 Vol. 96% Ethanol in einem Trockeneis-Ethanol-Gemisch

vorgenommen. Die RNS wurde zentrifugiert (Rotina 35R, Hettich) (30 min, 23,645xg, 4°C), mit 70%-igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und im Dunkeln bei -20°C gelagert.

### **B.XVII RNS-FRAGMENTIERUNG**

Sowohl *in-vitro*-transkribierte als auch native RNS (außer radioaktivmarkierter RNS) wurde nach der Fluoreszenzmarkierung nach (Bodrossy *et al.*, 2003) fragmentiert. Die markierte RNS wurde mit 10 mM ZnCl<sub>2</sub> und 20 mM Tris/HCl (pH 7,4) für 15 min bei 70°C (anstatt für 30 min bei 60°C, wie bei (Bodrossy *et al.*, 2003) beschrieben) inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 10 mM EDTA pH 8,0 und sofortiges Platzieren des Reaktionsgefäßes auf Eis gestoppt.

### **B.XVIII HERSTELLUNG VON MIKROARRAYS**

Alle für die Mikroarrays verwendeten Sonden wurden bei MWG Biotech erworben. Diese Sonden sind in Tab. 4 bzw. Tab. 6, sowie Tab. 7 bzw. Tab. 8 aufgelistet. Um eine erhöhte Zugänglichkeit der Sonden auf der Chipoberfläche für die respektiven Zielnukleinsäuren zu gewährleisten, wurden die Oligonukleotide am 5'-Terminus mit einer (dTTP)<sub>15</sub>-Sequenz verlängert. (Shevchenko *et al.*, 1979; Southern *et al.*, 1999). Ferner wurden die Sonden 5'-terminal mit einem Aminonlinker ausgestattet, um die Ausbildung von kovalenten Bindungen mit nukleophilen Gruppen auf der Objektträgeroberfläche zu ermöglichen.

#### **B.XVIII.1 Der Prototyp des Isotope Arrays (Adamczyk *et al.*, 2003)**

Für den Prototyp des Isotope Arrays wurden zehn, darunter sechs AOB spezifische, bereits publizierte Sonden (Tab. 4) verwendet. Die Sonden wurden im Spotting-Puffer (Exiqon AS, Vedbaek, DK) auf eine Endkonzentration von 50 pmol µl<sup>-1</sup> eingestellt und anschließend auf die Immobilizer<sup>TM</sup> MicroArray Objektträger (Exiqon AS) aufgebracht. Mit dem GMS 417 Kontakt-Arrayspotter (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) wurden Objektträger mit zwei unterschiedlichen Durchmessergrößen der Spots (125 µm and 500 µm) hergestellt. Daneben wurden manuell pipettierte Arrays von circa 1 µm Spotdurchmesser erzeugt, indem Sondentropfen (ca. 0,1 µl) mit einer 1,0-µl-Pipettenspitze auf die Objektträgeroberfläche aufgebracht wurden. Die so beschickten Objektträger wurden laut Herstellerangaben in gesättigter NaCl-Atmosphäre für 24 h inkubiert, anschließend mit SSCT pH 7,0 (150 mM NaCl; 30 mM NaCitrat; 0,05% (v/v) Tween<sup>®</sup> 20) für 15 min bei Raumtemperatur gewaschen, bei 37°C getrocknet, und bis zur Weiterverwendung im Dunkeln verwahrt.

## **B.XVIII.2 Der AOB-Mikroarray**

Die für den AOB-Array verwendeten Oligonukleotidsonden (Tab. 6) wurden aus den gelieferten Mikrotiterplatten mit dem RoboAmp-Pipettierroboter (B&L Systems, Maarssen, NL für MWG Biotech) zu den gewünschten Positionen in neue Mikrotiterplatten transferiert. Zudem wurden sie auf eine Endkonzentration von  $50 \text{ pmol } \mu\text{l}^{-1}$  und 50% (v/v) Dimethylsulfoxid eingestellt (Loy *et al.*, 2002), um den Verdunstungseffekt während des Spottens zu minimieren. Die AOB-Chips wurden mit dem Kontakt-Arrayspotter (Affymetrix 417) auf CSS-GlasObjektträgern mit Aldehydoberfläche (CEL Associates, Houston, Tex., USA) (Loy *et al.*, 2002) erzeugt. Dabei wurden Chips mit zwei unterschiedlichen Spotgrößen (125  $\mu\text{m}$  und 300  $\mu\text{m}$ ) hergestellt. Für die Ausbildung von kovalenten Bindungen (Schiff'sche Base) zwischen den reaktiven Gruppen auf der Objektträgeroberfläche und den Sonden wurden die Objektträger für mindestens 18 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die ungebundenen Sonden durch jeweils zweimaliges Waschen in 0,2% w/v SDS (Natriumdodecylsulfat) bzw. ddH<sub>2</sub>O bei Raumtemperatur entfernt. Um die freien Aldehydgruppen auf der Objektträgeroberfläche zu reduzieren, wurden die getrockneten Objektträger in eine Natriumborhydrid-haltige Lösung (1,0 g NaBH<sub>4</sub> in 300 ml 1xPBS (Sambrook und Russell, 2001) und 100 ml Ethanol<sub>abs.</sub>) für 5 min bei Raumtemperatur überführt. Zum Abstoppen der Reaktion wurden die reduzierten Objektträger in eiskalten Ethanol<sub>abs</sub> getaucht. Die Objektträger wurden dreimal in einer 0,2% (w/v) SDS-Lösung und schließlich, bis zur vollständigen Entfernung von SDS, dreimal in ddH<sub>2</sub>O bei Raumtemperatur gewaschen. Abschließend wurden die Objektträger für 3 s in 95°C-heisses ddH<sub>2</sub>O getaucht, um den Trocknungsprozess zu beschleunigen. Die luftgetrockneten Objektträger wurden im Dunkeln bei Raumtemperatur gelagert.

## **B.XIX REVERSE HYBRIDISIERUNG AUF MIKROARRAYS**

### **B.XIX.1 Hybridisierung auf Mikroarrays mit PCR-Amplifikaten nach (Loy *et al.*, 2002)**

400 ng fluoreszenzmarkierter und im Vakuum getrockneter 16S-rRNS-Genamplifikate wurden in 30  $\mu\text{l}$  eines frischen Hybridisierungspuffers [5x SSC (1x SSC entspricht 150 mM Natriumchlorid; 15 mM Natriumcitrat), 1,0% (w/v) Blocking Reagent (Roche, Mannheim, D), 0,1% (w/v) N-Lauroylsarcosin, 0,02% (w/v) SDS, 5% (v/v) Formamid] aufgenommen, für 5 min bei 95°C denaturiert und sofort auf Eis überführt. In eine Hybridisierungskammer (<http://cmgm.stanford.edu/pbrown/mguide/HybChamber.pdf>) (Loy *et al.*, 2002) wurde ein Mikroarray-Objektträger eingelegt und die Mikroarrayfläche mit einem Deckglas bedeckt.

Anschließend wurde die Hybridisierungslösung mit darin gelösten 16S-rRNS-Genamplifikaten an den Rand des Deckglases pipettiert, die sogleich über die gesamte Mikroarrayfläche diffundierte. Zusätzlich wurden insgesamt 120 µl Hybridisierungspuffer in die dafür vorgesehenen Aussparungen der Hybridisierungskammer pipettiert, um stabile Hybridisierungsbedingungen in feuchter Kammer zu schaffen. Anschließend wurde die Kammer dicht verschlossen und für 18 h bei 42°C im Wasserbad inkubiert. Die Hybridisierung wurde beendet durch einen 5-minütigen Waschschrift des Objektträgers in 50 ml Waschpuffer [3M TMAC; 50 mM Tris/HCl, pH 8,0; 2 mM EDTA; 0,1% (w/v) SDS] bei 57°C. Es folgten weitere Waschschriffe für 10 s in ddH<sub>2</sub>O bei Raumtemperatur, für 1 min in eiskaltem ddH<sub>2</sub>O, für 10 s in eiskaltem Ethanol<sub>abs.</sub> und für weitere 10 s in eiskaltem ddH<sub>2</sub>O. Der Objektträger wurde unter Druckluft getrocknet und bis zur Auswertung im Dunkeln bei Raumtemperatur gelagert.

### **B.XIX.2 Reverse Hybridisierung auf Mikroarrays mit RNS (Adamczyk *et al.*, 2003)**

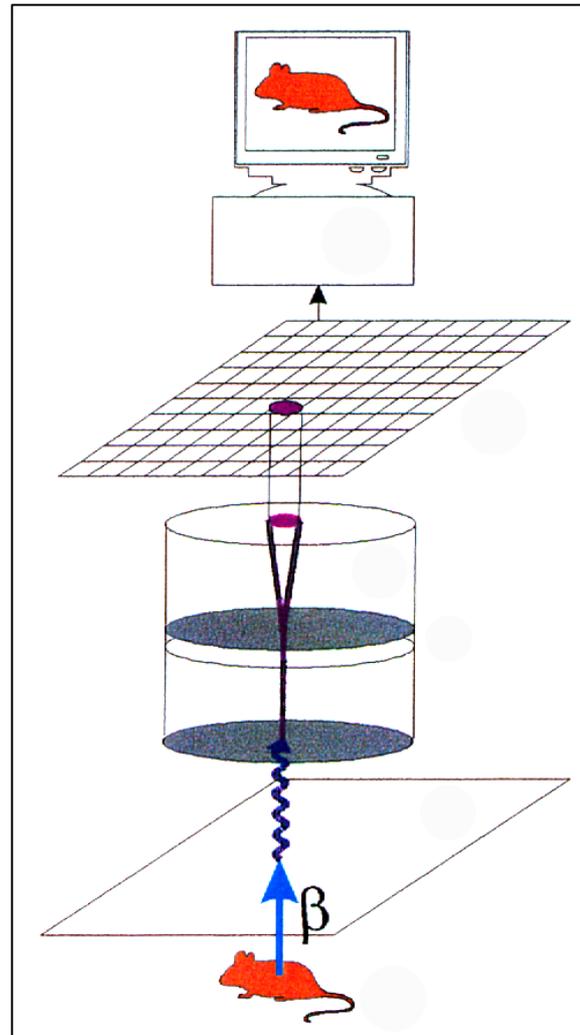
Die RNS mit 0,5 pmol des Cy5-markierten Kontrolloligonukleotids CONT-COMP (Loy *et al.*, 2002) wurde in 30 µl frischem Hybridisierungspuffer (6×SSC; 5×Denhardts; 5-30% (v/v) Formamid; 0,5% w/v SDS; 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 8,0) aufgenommen, für 5 min bei 90°C denaturiert und anschließend auf Eis überführt.

Der Mikroarray-Objektträger wurde in eine Hybridisierungskammer eingelegt und die Mikroarrayfläche mit einem Deckglas bedeckt. Anschließend wurde die Hybridisierungslösung mit der darin gelösten RNS an den Rand des Deckglases pipettiert, die sogleich über die gesamte Mikroarrayfläche diffundierte. Nach Zugabe von weiteren 120 µl Hybridisierungspuffer in die dafür vorgesehenen Aussparungen der Hybridisierungskammer wurde diese dicht verschlossen und für 18 h bei 42°C im Wasserbad inkubiert. Die Hybridisierung wurde beendet durch einen 5-minütigen Waschschrift des Objektträgers in 50 ml 2xSSC bei Raumtemperatur. Es folgten weitere Waschschriffe für 10 s in ddH<sub>2</sub>O bei Raumtemperatur, für 1 min in eiskaltem ddH<sub>2</sub>O, für 10s in eiskaltem Ethanol<sub>abs.</sub> und für weitere 10 s in eiskaltem ddH<sub>2</sub>O. Der Objektträger wurde unter Druckluft getrocknet und bis zur Auswertung im Dunkeln bei Raumtemperatur gelagert.

## B.XX DETEKTION RADIOAKTIVER SIGNALE AUF MIKROARRAYS

Die radioaktiven Signale auf Mikroarrays wurden mit Hilfe von  $\mu$  IMAGER<sup>TM</sup> (Biospace Mesure, Paris, F; (<http://www.biospace.fr/>)) unter Verwendung der zugehörigen BV Acquisition<sup>TM</sup> Software detektiert. Im Unterschied zu Flüssigszintillation, bei der sowohl die radioaktive Probe als auch der Szintillator flüssig sind, werden in dem  $\mu$  IMAGER<sup>TM</sup> radioaktive Feststoffe exponiert, deren emittierten Elektronen einen aus festem Polymergemisch bestehenden Szintillatorfilm anregen (Abb. 2). Durch die Anregung der Szintillatorfolie werden Lichtblitze erzeugt, die im Photomultiplier verstärkt und anschließend am CCD-Detektorraster gezählt werden. Dabei wird die Ursprungsposition eines jeden emittierten  $\beta$ -Teilchens zurückberechnet und die Signale über die Zeit akkumuliert (Abb. 2). Die Quantifizierung der Radioaktivität erfolgte mit Hilfe der  $\beta$ VISION+ Software (BioSpace Mesure), wobei das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis für die Signalebewertung maßgebend war. Erst bei einem Wert von 2,0 oder größer wurde das Signal als positiv bewertet.

Abb. 2 Schematische Darstellung der Funktionsweise des  $\mu$  IMAGERs<sup>TM</sup> (Biospace Mesure, Paris, F) Darstellung modifiziert nach Zinsser Analytics.



## **B.XXI DETEKTION VON FLUORESZENZSIGNALEN AUF MIKROARRAYS**

Zur qualitativen sowie quantitativen Evaluierung von Mikroarrays wurden die Fluoreszenzsignale mit dem GMS 418 Array Scanner (Affymetrix) aufgenommen. Die Bildanalyse aller, automatisch gespotteter Arrays wurde mit der ImaGene 4.0 Software (BioDiscovery, Inc., Los Angeles, CA, USA) durchgeführt. Spots auf manuell angefertigten Arrays (für den Prototyp des Isotope Arrays) wurden mit dem unentgeltlich erhältlichen Softwarepaket Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) ausgewertet. Für die Bewertung von Fluoreszenz- bzw. Radioaktivitätssignalen einzelner Sonden fand folgende Formel

Formel 1 
$$T = [I_P - (I_{NS} - I_{NSLB})] \times I_{PLB}^{-1}$$

Anwendung, mit deren Hilfe der sog. T-Wert (Loy *et al.*, 2002) ermittelt wurde. Dabei stehen  $I_P$  bzw.  $I_{NS}$  für die mittlere Signalintensität der untersuchten, bzw. der NONSENSE-Kontrollsonde.  $I_{PLB}$  bzw.  $I_{NSLB}$  stehen hingegen für die mittlere Hintergrundintensität der untersuchten bzw. NONSENSE-Kontrollsonde. Ein Sondersignal wurde erst dann als positiv bewertet, wenn sein T-Wert größer oder gleich 2,0 war (Loy *et al.*, 2002).

## **B.XXII FLÄCHENQUANTIFIZIERUNG MITTELS FLUORESZENZ *IN SITU***

### **HYBRIDISIERUNG (FISH) UND KONFOKALER LASERSCANNING MIKROSKOPIE (CLSM)**

Die Abundanz von AOB in Belebtschlammproben wurde mittels der kultivierungsunabhängigen, quantitativen Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) und konfokaler Laserscanning Mikroskopie (CLSM510, Zeiss, Jena, D) bestimmt. Für die Populationsanalyse der AOB wurden Belebtschlammproben, die zuvor in einer 4%-igen (w/v) Paraformaldehyd (PFA)-Lösung fixiert wurden, mit fluoreszenzmarkierten, gegen die 16S rRNS gerichteten Oligonukleotidsonden (Tab. 4) hybridisiert. Die verwendeten Sonden wurden hierfür als Cy3- und Cy5-Derivate (Thermo Hybaid, Ulm, Germany) bei optimalen Hybridisierungsbedingungen laut Originalpublikationen eingesetzt. Simultane Hybridisierungen mit Sonden, für die unterschiedliche Stringenzbedingungen erforderlich waren, wurden nacheinander, in abnehmender Stringenz durchgeführt (Wagner *et al.*, 1994a). Zur Erhöhung der Spezifität der Sonden NEU bzw. 6a192 wurden die zugehörigen Kompetitorsonden CTE bzw. c6a192 eingesetzt. (Wagner *et al.*, 1995; Purkhold, 2003). Die hier angewandte, semiautomatische Flächen-Quantifizierungsmethode wurde, wie bereits bei (Schmid *et al.*, 2000; Daims *et al.*, 2001b) beschrieben, durchgeführt.

**B.XXIII MIKROAUTORADIOGRAPHIE (MAR)**

Die Aufnahme und der Einbau radioaktiver Substrate in die Biomasse von Mikroorganismen im Belebtschlamm wurde neben dem Isotope Array auch mit der kombinierten FISH-MAR-Methode (Lee *et al.*, 1999) detektiert. Zu diesem Zweck wurden Belebtschlammproben einer industriellen (TVA Oberding, D) sowie einer kommunalen (Aalborg West, DK) Kläranlage mit  $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$  ( $10 \mu\text{Ci ml}^{-1}$ ) inkubiert. Um vergleichbare Versuchsbedingungen mit den des Isotope Arrays bezüglich der Bikarbonat-Konzentration zu schaffen, wurde nicht radioaktiver Bikarbonat bis zu einer Endkonzentration von 1,85 mM zugesetzt. Die FISH-MAR-Experimente wurden von Frau Marianne Stevenson und Herrn Dr. Martin Hesselsoe an der Universität Aalborg, DK nach dem von (Lee *et al.*, 1999) beschriebenen Protokoll durchgeführt.

**B.XXIV GENBANK-ZUGANGSDATEN (ACCESSION NUMBERS)**

Für die beiden untersuchten Kläranlagen Aalborg West bzw. Oberding wurden repräsentative *amoA*-Sequenzen, in der GenBank wie folgt AY367275 und AY367276 (Aalborg West, DK) sowie AY367277 (Oberding, D) abgelegt.

## **C. ERGEBNISSE**



## C.I DER PROTOTYP DES AOB-MIKROARRAYS

Anfänglich wurde ein DNS-Mikroarray-Prototyp mit sechs AOB-spezifischen, gegen die 16S rRNS gerichteten und bereits publizierten Oligonukleotidsonden (Tab. 4) zum Nachweis beta-proteobakterieller AOB in der Umwelt konstruiert. Zusätzlich wurden für den Array drei Kontrollsonden sowie die meisten Eubakterien erfassende Sonde EUB338 verwendet.

Tab. 4 Für FISH<sup>a</sup>- sowie AOB-Mikroarray-Prototyp<sup>b</sup>-Experimente verwendete Oligonukleotidsonden. Mehr Informationen zu den einzelnen Oligonukleotiden können bei probeBase (Loy *et al.*, 2003) eingesehen werden.

Sondenname	Sondensequenz (5'- 3')	Bindepotion	Zielorganismen	Referenz
EUB338 <sup>a, b</sup>	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	338-355	die meisten <i>Bacteria</i>	Amann <i>et al.</i> , 1990; Daims <i>et al.</i> , 1999
EUB338-II <sup>a</sup>	GCAGCCACCCGTAGGTGT	338-355	<i>Planctomycetales</i>	Daims <i>et al.</i> , 1999
EUB338-III <sup>a</sup>	GCTGCCACCCGTAGGTGT	338-355	<i>Verrucomicrobiales</i>	Daims <i>et al.</i> , 1999
Nso1225 <sup>a, b</sup>	CGCCATTGTATTACGTGTGA	1224-1243	die meisten betaproteo- bakteriellen AOB; (Koops <i>et al.</i> , 2003)	Mobarry <i>et al.</i> , 1996
Nso190 <sup>a, b</sup>	CGATCCCCTGCTTTCTCC	189-207	viele betaproteobakterielle AOB; (Koops <i>et al.</i> , 2003)	Mobarry <i>et al.</i> , 1996
Nsv 443 <sup>a, b</sup>	CCGTGACCGTTTCGTTCCG	443-461	<i>Nitrosospira</i> "Cluster" 1-3; (Koops <i>et al.</i> , 2003)	Mobarry <i>et al.</i> , 1996
Ncmob <sup>a, b</sup>	TCCTCAGAGACTACGCGG	174-191	<i>Nitrosococcus mobilis</i> ; (Koops <i>et al.</i> , 2003)	Juretschko <i>et al.</i> , 1998
NEU <sup>a, b</sup>	CCCCTCTGCTGCACTCTA	651-668	die meisten halophilen und - toleranten Nitrosomonaden; (Koops <i>et al.</i> , 2003)	Wagner <i>et al.</i> , 1995
CTE <sup>a</sup>	TTCCATCCCCCTCTGCCG	659-676	Kompetitorsonde für NEU; <i>Comamonas</i> spp., <i>Acidovorax</i> spp., <i>Hydrogenophaga</i> spp., <i>Aquaspirillum</i> spp.; (Koops <i>et al.</i> , 2003)	Wagner <i>et al.</i> , 1995
6a192 <sup>a, b</sup>	CTTTCGATCCCCTACTTTCC	192-212	<i>Nitrosomonas-oligotropha</i> - Linie	Purkhold, 2003
c6a192 <sup>a, b</sup>	CTTTCGATCCCCGACTTTCC	192-212	Kompetitorsonde für 6a192; <i>Nitrosomonas eutropha</i>	Purkhold, 2003
NONEUB <sup>a, b</sup>	ACTCCTACGGGAGGCAGC	-	-	Wallner <i>et al.</i> , 1993
NONSENSE <sup>a, b</sup>	AGAGAGAGAGAGAGAGAG	-	-	Loy <i>et al.</i> , 2002
CONT <sup>b</sup>	AGGAAGGAAGGAAGGAAG	-	Kontrolloligonukleotid	Loy <i>et al.</i> , 2002
CONT-COMP <sup>b</sup>	CTTCTTCCTTCCTTCCT	-	Komplementär zu CONT	Loy <i>et al.</i> , 2002

Die Evaluierung des Mikroarrays wurde mit *in-vitro*-transkribierter 16S rRNS aus insgesamt neun verschiedenen – acht beta- und einer gammaproteobakteriellen – AOB-Reinkulturen vorgenommen. Das Dissoziationsverhalten zwischen den 16S-rRNS-Zielmolekülen und den Sonden wurde bei steigender Stringenz, die durch die Formamid-Konzentration im

Hybridisierungspuffer kontrolliert wurde, verfolgt (Abb. 3). Bei 10% (v/v) Formamid fand eine Duplexbildung zwischen allen Sonden und deren 16S-rRNS-Zielmolekülen, die keine Basenfehlpaarung aufwiesen, statt. Daneben konnte für einige Sonden Duplexbildung trotz einer bzw. zwei Basenfehlpaarungen mit den entsprechenden 16S-rRNS-Molekülen beobachtet werden. Das Erhöhen der Formamid-Konzentration auf bis zu 20% (v/v) steigerte einerseits die Bindungsspezifität der Sonden, führte andererseits gleichzeitig zu Signalverlust und somit zu falsch-negativen Ergebnissen der Sonden Nso1225, Nsv443, Nso190 sowie 6a192 (Abb. 3). Bei einer Formamid-Konzentration von 30% (v/v) blieben bis auf die Sonde EUB338 alle Sondensignale aus (Daten nicht gezeigt). Ausgehend von diesen Ergebnissen wurden alle weiteren Experimente mit einer Formamid-Konzentration von 10% (v/v) im Hybridisierungspuffer durchgeführt.

<b>A</b> 10% FA	Referenzorganismus								
	Nsp40	Nm45	Nm51	Nm50	Nm57	Nm107	Nm41	Nm55	Nc4
Sonde									
EUB338									
Nso1225						19 A:G			
Nso190		5G:U 10U:G			5 G:U	5 U:U	5 G:U		
Nsv 443									
Ncmob									
NEU	8 U:G	18 A:C	8U:G 10A:C			8 U:G		8 U:G	
6a192					7 A:A		7 A:A		
NONEUB									
NONSENSE									

<b>B</b> 20% FA	Referenzorganismus								
	Nsp40	Nm45	Nm51	Nm50	Nm57	Nm107	Nm41	Nm55	Nc4
Sonde									
EUB338									
Nso1225	falsch negativ	falsch negativ			falsch negativ	19 A:G	falsch negativ	falsch negativ	
Nso190	falsch negativ					5 U:U	5 G:U		
Nsv 443	falsch negativ								
Ncmob									
NEU		18 A:C				8 U:G			
6a192		falsch negativ							
NONEUB									
NONSENSE									

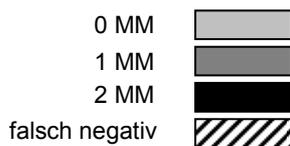


Abb. 3 Evaluierung des AOB-Mikroarray-Prototyps. Die Hybridisierungen wurden bei einer Stringenz von 10% (A) bzw. 20% (v/v) (B) Formamid im Hybridisierungspuffer durchgeführt. Dargestellt wurden einzelne Hybridisierungsergebnisse von Sonden mit getesteten Referenzorganismen (*Nitrosospira* sp. Nsp40 (aus dem *Nitrosospira*-"Cluster 3"), *Nitrosomonas oligotropha* Nm45 (*N.-oligotropha*-Linie), *Nitrosomonas* sp. Nm51 (*N.-marina*-Linie), *Nitrosomonas europaea* Nm50, *Nitrosomonas eutropha* Nm57, *Nitrosococcus mobilis* Nm107 (alle drei aus der *N.-europaea*/*Nc.-mobilis*-Linie); *Nitrosomonas* sp. Nm41 (*N.-communis*-Linie), *Nitrosomonas cryotolerans* Nm55, und *Nitrosococcus halophilus* Nc4 (ein gammaproteobaterielles AOB), deren Phylogenie von (Koops et al., 2003; Purkhold et al., 2003) im Detail beschrieben wurde. Hybridisierungssignale, deren Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis „T“ (Formel 1, S.37) bei größer oder gleich 2,0 lagen, wurden durch Grauschattierungen, wie in der Legende erklärt, gekennzeichnet. „0MM“ (=“Mismatch“) steht für ein Sonden-rRNS-Hybrid ohne, „1MM“ mit einer bzw. „2MM“ mit zwei Basenfehlpaarungen. Das Ausbleiben von Sondersignalen trotz Anwesenheit einer rRNS-Zielsequenz mit 0MM wurde als „falsch negativ“ bezeichnet und durch Streifen visualisiert. Für alle fehlgepaarten Hybride wurde(n) die Position(en) des/der MM sowie die an der MM-Bindung beteiligten Base(n) angegeben.

Zusätzlich wurde der Effekt der Fragmentierung von rRNS durch alkalische Hydrolyse nach (de Saizieu *et al.*, 1998) auf den Hybridisierungserfolg untersucht. Da mit dieser Maßnahme keine Signalsteigerung bei dem verwendeten Hybridisierungssystem erzielt wurde, wurde beim Prototyp des AOB-Mikroarrays auf die rRNS-Fragmentierung verzichtet (Daten nicht gezeigt).

## C.II HYBRIDISIERUNGEN MIT rRNS VON *N. EUTROPHA* NM57 AUF DEM PROTOTYP DES ISOTOPE ARRAYS

Eine *N.-eutropha*-Reinkultur wurde mit radioaktiv markiertem Bikarbonat inkubiert. Nach 48 Stunden konnten 39% des zugesetzten <sup>14</sup>C in der Biomasse detektiert bzw. 19000 CPM pro 1 µg rRNS (entspricht 9 nCi pro 1 µg RNS) gemessen werden. Auf einem DNS-Mikroarray mit einem Spotdurchmesser von 125 µm wurden 0,5 µg extrahierter und fluoreszenzmarkierter rRNS hybridisiert und anschließend ein Fluoreszenz- bzw. Radioaktivitätsscan vorgenommen. Während die erwarteten Signale mit dem Fluoreszenzscanner detektiert wurden, blieben die Radioaktivitätssignale mit dem µ IMAGER™ für die einzelnen Spots aus (Abb. 4). Das Verdoppeln der rRNS-Menge auf 1 µg pro Hybridisierung lieferte das gleiche Ergebnis (Daten nicht gezeigt). Ein weiteres Erhöhen der rRNS-Menge führte zu einem wesentlich stärkeren Fluoreszenzhintergrund, ohne die gewünschte Detektion von Radioaktivität zu bewirken (Daten nicht gezeigt).

Da die 125-µm-Spots nach mehrtägiger Exposition noch jenseits der räumlichen Auflösungsgrenze des µ IMAGERS™ lagen, wurden Objektträger mit größeren Spots getestet, um die Nachweisbarkeit des <sup>14</sup>C-Einbaus in die rRNS von *N. eutropha* zu verbessern. Zu diesem Zweck wurden automatisch hergestellte Mikroarrays mit einem 500-µm-Spotdurchmesser verwendet. Zusätzlich wurden Mikroarrays mit einem Spotdurchmesser von

ca. 1 mm manuell erzeugt, indem ca. 0,1 µl Sondenlösung auf die Objektträgeroberfläche mittels einer 1-µl-Pipette überführt wurde.

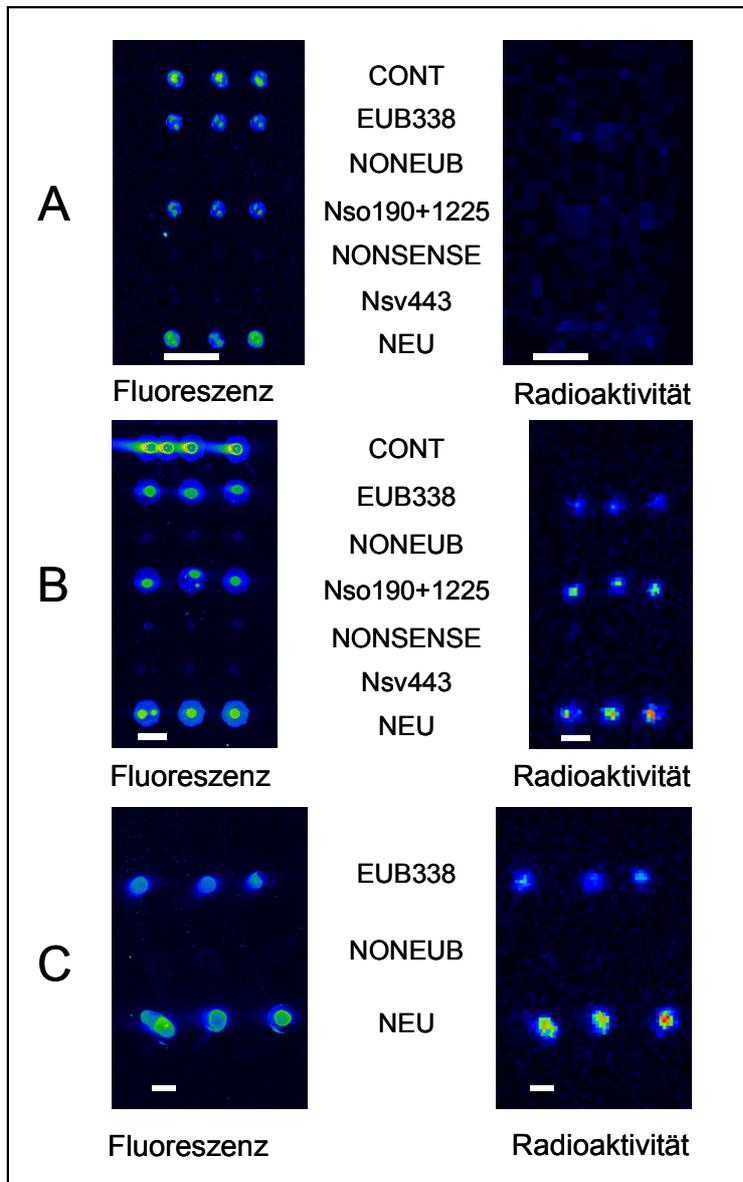


Abb. 4 Hybridisierungen mit rRNS von *N. eutropha* Nm57 auf dem Prototyp des Isotope Arrays. Nach Inkubation von *N. eutropha*-Reinkultur mit <sup>14</sup>C-markiertem Bikarbonat wurde die rRNS extrahiert, fluoreszenzmarkiert (Cy5), und auf einem Objektträger mit dem AOB-Mikroarray-Prototyp hybridisiert. Dabei wurden unterschiedliche Durchmesser (A: 125 µm; B: 500 µm; C: ca. 1 mm) von Spots getestet. Auf den gewaschenen Objektträgern wurde im Anschluss die Fluoreszenz bzw. Radioaktivität gemessen.

Nach Hybridisierungen mit jeweils 0,5 µg rRNS von *N. eutropha* konnten auf den 500-µm- bzw. 1-mm-Spot-Arrays sowohl Fluoreszenz- als auch Radioaktivitätssignale detektiert werden (Abb. 4). Nach dem anfänglich erfolgreichen, automatischen Spotten der 500-µm-Arrays wurden die dazu verwendeten Nadeln aufgrund eines Gerätedefekts beschädigt und konnten nicht weiterverwendet werden. Da zu gegebenem Zeitpunkt kein weiterer, vergleichbarer Arrayspotter verfügbar war, wurden für die folgenden Experimente manuell erzeugte Mikroarrays mit einem Spotdurchmesser von ca. 1 mm verwendet, obwohl damit eine stärkere Abweichung der applizierten Sondenmenge pro Spot gegenüber dem automatischen Verfahren hingenommen werden musste.

### C.III VERSUCHE MIT RADIOAKTIV MARKIERTEN, NITRIFIZIERENDEN BELEBTSCHLÄMMEN

Die Eignung des Isotope Arrays als Analysewerkzeug von komplexen mikrobiellen Lebensgemeinschaften wurde anhand von zwei verschiedenen nitrifizierenden Belebtschlämmen aus den Kläranlagen Aalborg West, DK bzw. Oberding, D überprüft. Zu diesem Zweck wurden beide Schlämme vorerst hinsichtlich ihrer AOB-Zusammensetzung bzw. Aktivität mittels vergleichender Sequenzanalyse des *amoA*-Gens sowie quantitativer FISH bzw. untersucht.

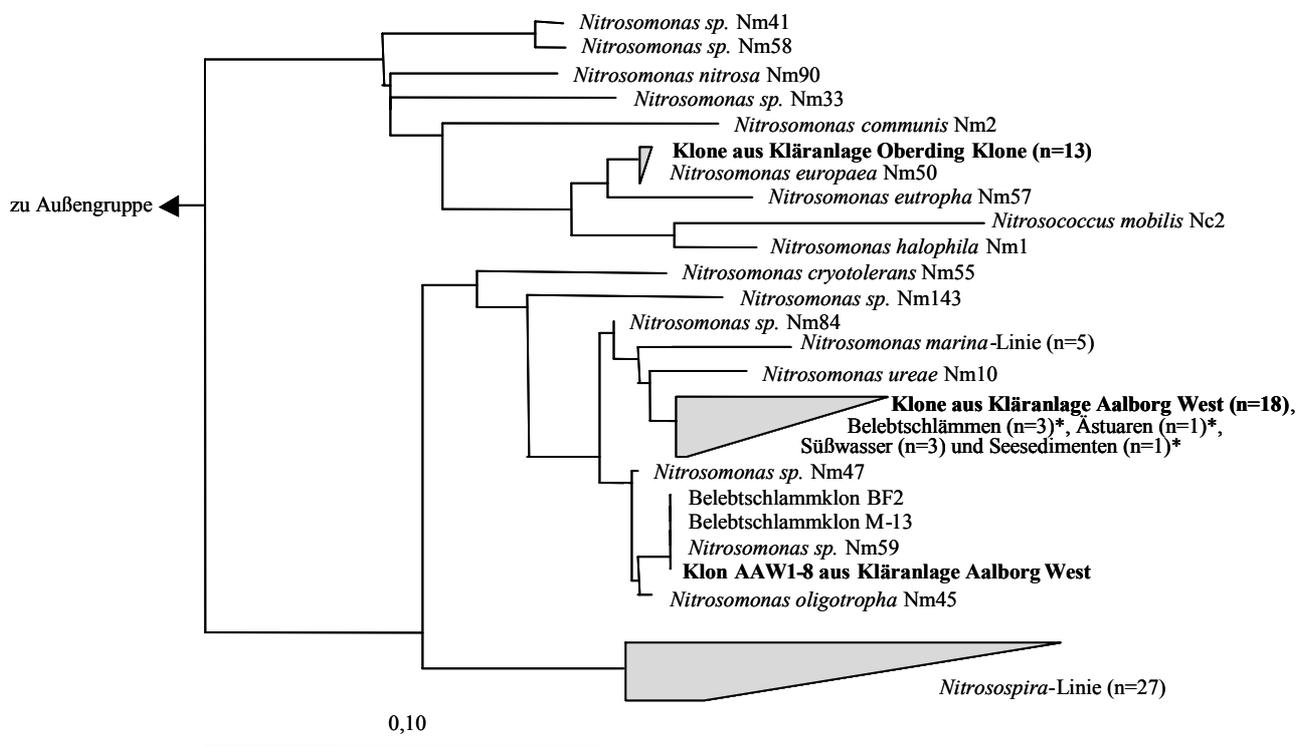


Abb. 5 Auf vergleichender *AmoA*-Aminosäuresequenzanalyse basierender, phylogenetischer Baum, der die Zuordnung der aus den Kläranlagen Aalborg West bzw. Oberding gewonnenen Klone (**fett** markiert) zeigt. Die Berechnung des Baums wurde mit dem FITCH Algorithmus mit „global rearrangements“ und „randomised input order“ vorgenommen. Der Balken zeigt einen geschätzten Sequenzunterschied von 10% an. *AmoA*-Sequenzen von gammaproteobakteriellen AOB wurden als Außengruppe (outgroup) verwendet (nicht gezeigt). {\* Die Genbank-Zugangsdaten (accession number) dieser Klone lauten: AF367463 (Duc-27) (Ästuar-Klon); AJ388566 (pGtA.2), AJ388570 (pG5B.1), AJ388571 (pG5B.2) (Süßwasser-Klone); AF420298 (M-13), AF272442 (IA-32), AF272482 (BF1-1), AF489661 (S\_3), AF489660 (S\_2) (Kläranlagen-Klone); und AF489645 (T\_2) (Seesediment-Klon). *amoA* Referenzsequenzen wurden anderweitig (Speksnijder *et al.*, 1998; Purkhold *et al.*, 2000; Nicolaisen und Ramsing, 2002; Cebron *et al.*, 2003; Koops *et al.*, 2003; Purkhold *et al.*, 2003) publiziert.}

### C.III.1 Vergleichende Sequenzanalyse des *amoA*-Gens

Zunächst wurden beide Schlämme hinsichtlich ihres AOB-Speziesreichtums (=species richness) mit der vergleichenden Sequenzanalyse des *amoA*-Gens untersucht. Dazu wurden aus der Anlage Aalborg West 19 zufällig gewählte *amoA*-Klone sequenziert und phylogenetisch analysiert. 18 dieser Klone zeigten dabei sehr hohe Sequenzähnlichkeit zueinander (98,9%) und erwiesen sich als am nächsten verwandt mit anderen, zuvor publizierten *amoA*-Umweltklonen, die u.a. aus anderen Kläranlagen erhalten wurden. Diese Klone bildeten eine monophyletische Gruppe innerhalb der *Nitrosomonas-oligotropha*-/*N.-marina*-Linien, die auf der *amoA*-Ebene nicht klar von einander getrennt werden können (Koops *et al.*, 2003; Purkhold *et al.*, 2003). Einer der 19 *amoA*-Klone aus Aalborg West erwies sich auf Aminosäureebene als sequenzidentisch mit *amoA* von *Nitrosomonas* sp. Nm59, der ein naher Verwandter von *N. oligotropha* ist (Abb. 5).

Die vergleichende Sequenzanalyse von 13 Klonen aus Oberding zeigte, dass alle Klone miteinander identisch und zudem sehr nahe verwandt zur *amoA*-Sequenz von *N. europaea* waren (Abb. 5).

### C.III.2 Quantitative FISH

Im Belebtschlamm aus Aalborg West hybridisierten 4,7% +/- 0,5% des mit dem EUB338-Sondenmix (Amann *et al.*, 1990; Daims *et al.*, 1999) detektierten Biovolumens mit der Sonde Nso1225. Gleichzeitig zeigten diese Zellen auch positive Signale mit der Sonde 6a192. Die Sonde Nso190 lieferte nur sehr wenige positive Signale (<1%), während keine Fluoreszenzsignale mit den Sonden NEU, Nsv443, oder Ncmob beobachtet werden konnten. Dieses Hybridisierungsergebnis grenzte die AOB-Population des Belebtschlammes aus Aalborg West nahezu ausschließlich auf Mitglieder der *Nitrosomonas-oligotropha*-Linie ein. Im Belebtschlamm der Anlage Oberding wurden für 9,3% +/- 1,1% des mit dem EUB338-Sondenmix detektierten Biovolumens positive Signale mit den Sonden Nso1225, Nso190 sowie NEU gemessen. Keine Fluoreszenzsignale wurden nach Hybridisierungen mit den Sonden Ncmob, Nsv443 oder 6a192 beobachtet. Laut diesem Hybridisierungsergebnis wurde die AOB-Gemeinschaft des Oberdinger Belebtschlammes durch Vertreter der *Nitrosomonas-eutropha*-/*N.-europaea*-Linie dominiert. Nach Zugabe von Allylthioharnstoff zu den Belebtschlämmen aus Aalborg West bzw. Oberding blieben die AOB mit FISH nachweisbar. Da für keine der untersuchten Proben Signale der Sonde NONEUB (komplementär zu EUB338) verzeichnet wurden, konnte unspezifische Sondenbindung ausgeschlossen werden. (Daten nicht gezeigt).

### C.III.3 FISH-MAR

Der Einbau von  $^{14}\text{C}$ -Bikarbonat in die AOB-rRNS beider untersuchten Belebtschlämme wurde zusätzlich durch eine weitere, unabhängige Kombinationsmethode aus FISH und Mikroautoradiographie kontrolliert. Erwartungsgemäß bauten AOB der beiden aktiven Belebtschlammproben signifikante Mengen an radioaktivem Bikarbonat ein, während bei den mit Allylthioharnstoff inhibierten Proben der Einbau ausblieb (Abb. 6).

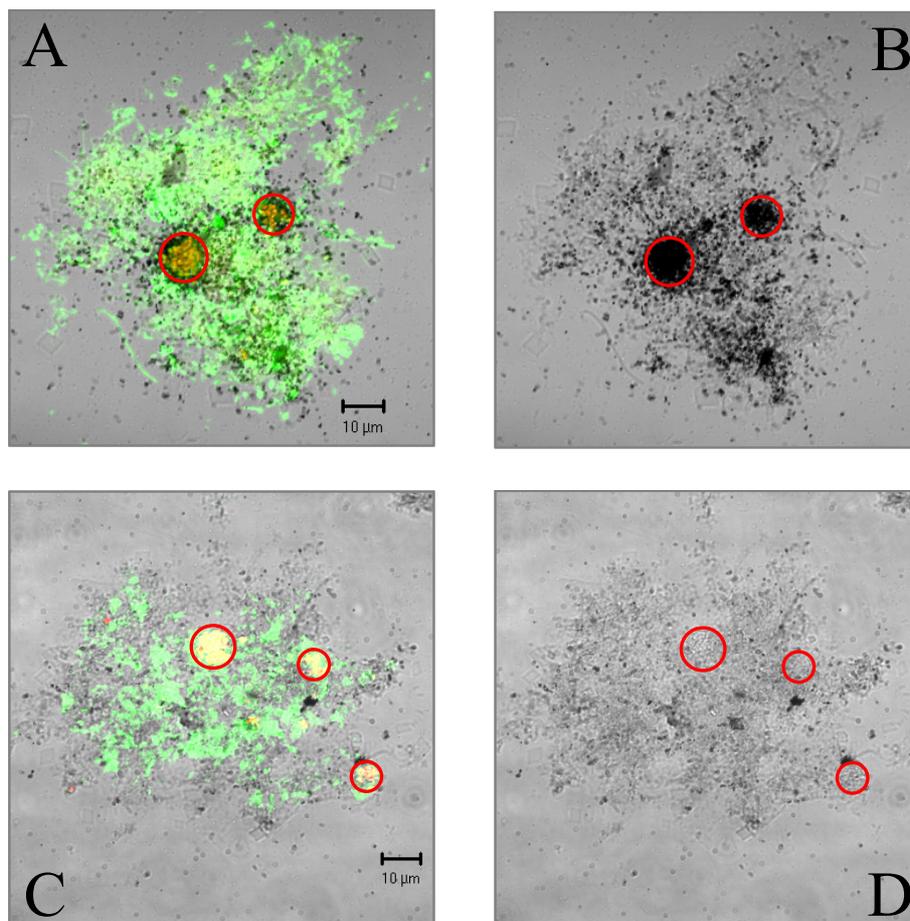


Abb. 6 FISH-Mikroautoradiographie von aktivem (A und B), sowie mit Allylthioharnstoff inhibiertem (C und D) Belebtschlamm aus Oberding nach 11-stündiger Inkubation mit  $^{14}\text{C}$ -Bikarbonat. Für FISH wurde die Sonde Nso1225 (Mobarry *et al.*, 1996), (Cy3; rote Signale) sowie der EUB338-Sondenmix (Amann *et al.*, 1990; Daims *et al.*, 1999), (FLUOS, grüne Signale) eingesetzt. Aufgrund der Signalüberlappung erscheinen AOB in gelb. In A und C sind sowohl Fluoreszenz als auch Silberpartikel (schwarz) aus Mikroautoradiographie, in B und D (der Übersichtlichkeit halber) nur Silberpartikel (schwarz) mit Lokalisierung der AOB-Kolonien (rote Kreise) abgebildet.

### C.III.4 Einbaudynamik von <sup>14</sup>C-Bikarbonat in Biomasse von Belebtschlamm

Nach Minimierung des natürlichen (<sup>12</sup>C) Bikarbonat-Gehalts beider Schlämme (durch Waschen und Entgasen) wurden diese jeweils mit einer in Belebtschlamm üblichen Konzentration an <sup>14</sup>C-markiertem Bikarbonat versetzt und inkubiert (Tab. 5).

Tab. 5 Einbaudynamik von <sup>14</sup>C in die Biomasse bzw. rRNS von *N. eutropha*, sowie von Belebtschlamm der Kläranlagen Aalborg West bzw. Oberding nach Inkubation mit radioaktivem Bikarbonat.

Probe	Inkubationszeit	Zugabe von		Einbau von <sup>14</sup> C in		
		ATH	<sup>14</sup> C	ges. Biomasse	gereinigte rRNS	
	Stunden	mg l <sup>-1</sup>	μCi ml <sup>-1</sup>	%	%	CPM μg <sup>-1</sup> RNS
<i>N. eutropha</i> Nm57	48	0	3,6	38,8	0,19	19000
Aalborg West	3	0	107	4,4	0,05	9000
	13	0	107	10,2	0,06	16000
	26	0	107	12,4	0,13	37000
	3	5	107	0,7	0,02	3000
	13	5	107	2,6	0,03	6000
	26	5	107	2,7	0,04	10000
Oberding	2,5	0	107	7,5	0,10	10000
	11	0	107	20,7	0,33	31000
	25	0	107	22,8	0,29	29000
	2,5	5	107	0,6	0,01	2000
	11	5	107	2,1	0,03	2000
	25	5	107	3,2	0,02	4000

Der Einbau des radioaktiven Substrats in den Belebtschlamm wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten durch Szintillationsmessung filtrierter Biomasse überwacht. Als Kontrolle dienten Parallelproben beider Schlämme, welche zusätzlich, neben <sup>14</sup>C-Bikarbonat, mit Allylthioharnstoff – einem spezifischen Hemmstoff der autotrophen Ammoniakoxidation – versetzt wurden. Innerhalb der ersten 10 Stunden konnte bei beiden, nicht gehemmten Schlämmen ein rapider Anstieg des <sup>14</sup>C-Einbaus in die Biomasse beobachtet werden. Eine Inkubationszeit über 10 Stunden führte zu keiner wesentlichen Steigerung der bereits aufgenommenen Radioaktivitätsmenge (Abb. 7 und Tab. 5). In Gegenwart von Allylthioharnstoff konnte, wie erwartet, nur eine deutlich geringere Menge an eingebautem <sup>14</sup>C-Bikarbonat in die Biomasse beider Belebtschlämme gemessen werden. Der trotz Hemmung stattgefunden Resteinbau an Radioaktivität in die Biomasse wurde vermutlich durch heterotrophe CO<sub>2</sub>-Fixierung verursacht.

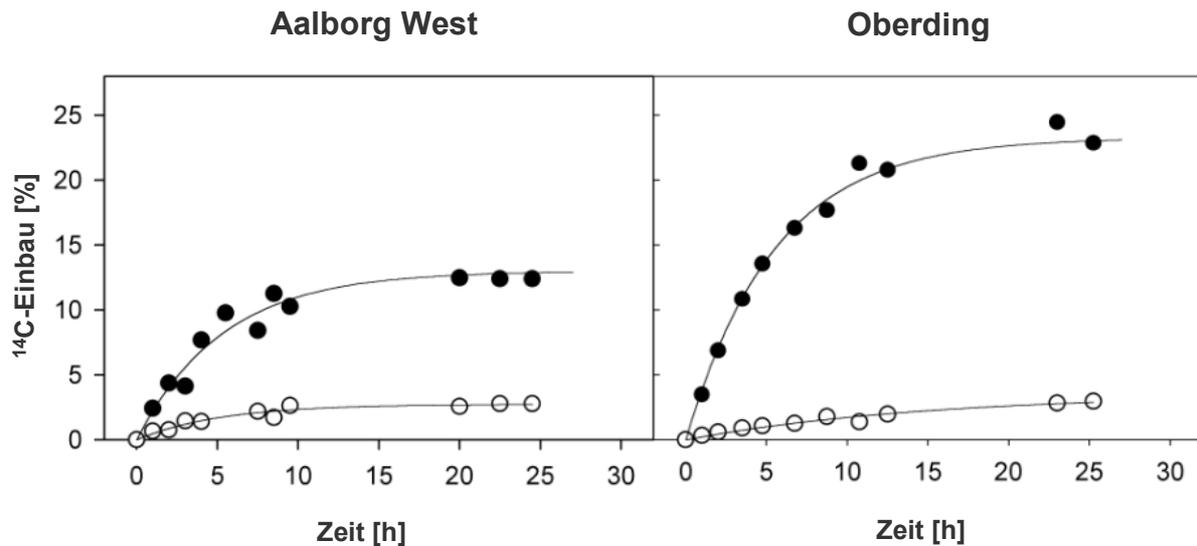


Abb. 7 Einbau von <sup>14</sup>C in die Biomasse von nitrifizierenden Belebtschlämmen nach Inkubation mit <sup>14</sup>C-markiertem Bikarbonat. Der Einbau von <sup>14</sup>C in aktiven Belebtschlamm wird durch schwarze Punkte symbolisiert. Schwarze Ringe zeigen die Einbaudynamik in Gegenwart von Allylthioharnstoff, einem AOB-Hemmstoff.

Nach Extraktion intakter rRNS aus beiden Belebtschlämmen wurde diese chromatographisch gereinigt, wobei die 5S-rRNS-Moleküle selektiv entfernt wurden. Die Qualität der extrahierten und gereinigten rRNS wurde aufgrund der Präsenz von jeweils einer distinkten Bande der 23S- bzw. 16S-rRNS-Moleküle anhand der im Anschluss durchgeführten Agarosegelelektrophorese als zufrieden stellend befunden. (Abb. 8). Die Menge an eingebauter Radioaktivität in den 16S- bzw. 23S-rRNS-Molekülen wurde durch Flüssigszintillation gemessen (Tab. 5). Die Gesamtmenge des inkorporierten <sup>14</sup>C in die 16S- sowie 23S-rRNS-Moleküle, die aus den nicht inhibierten Belebtschlammproben stammten, lag bei 0,05-0,33% der zu den Inkubationsansätzen zugesetzten <sup>14</sup>C-Menge und entsprach 1-2% der in die Biomasse assimilierten Isotopmenge. Entsprechend geringere Werte wurden für den Radioaktivitätseinbau in die rRNS-Moleküle der inhibierten Ansätze gemessen, die sich auf 0,01-0,04% der ursprünglich eingesetzten <sup>14</sup>C-Menge zu Belebtschlamm beliefen (Tab. 5).

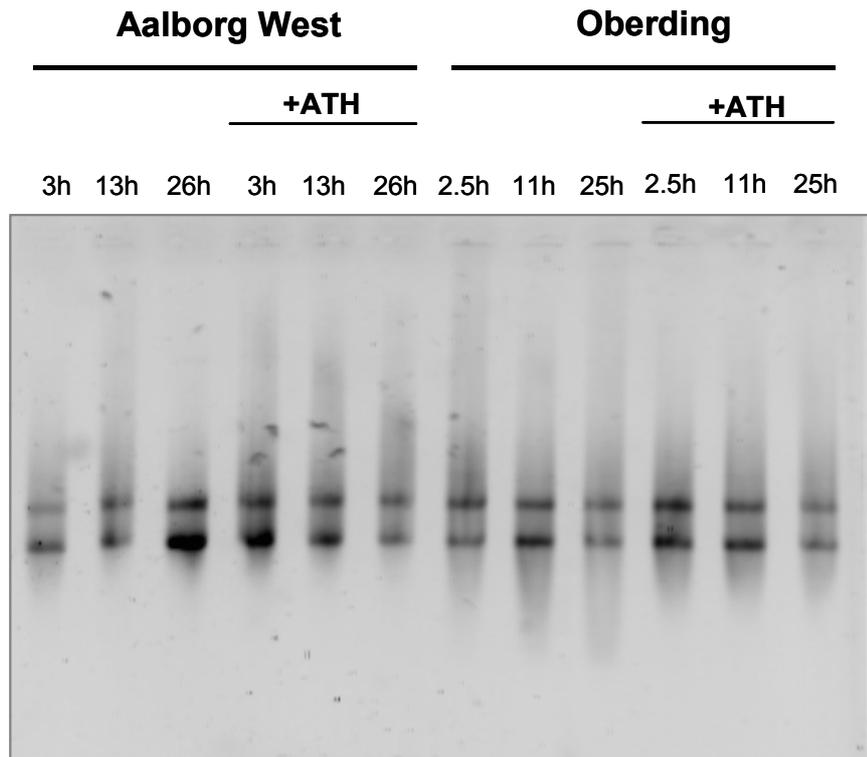


Abb. 8 Agarosegelelektrophorese von rRNS extrahiert aus Belebtschlammern der Kläranlagen Aalborg West bzw. Oberding nach unterschiedlich langer Inkubation mit radioaktivem Bikarbonat in Ab- bzw. Anwesenheit des AOB-Inhibitors Allylthioharnstoff (ATH). Die einzelnen Gelspuren wurden mit ca. 300 ng gereinigter Gesamt-RNS beladen. Die distinkten 16S- und 23S-rRNS-Banden zeigen die Integrität der extrahierten RNS.

#### C.IV HYBRIDISIERUNGEN MIT rRNS AUS BELEBTSCHLÄMMEN AUF DEM PROTOTYP DES ISOTOPE ARRAYS

Die aus der Biomasse der Belebtschlammern extrahierte und fluoreszenzmarkierte rRNS wurde auf manuell hergestellten Mikroarrays hybridisiert, die anschließend hinsichtlich Fluoreszenz sowie Radioaktivität analysiert wurden (Abb. 9). Insgesamt wurden für jede Schlammprobe (sowohl mit als auch ohne Allylthioharnstoff) jeweils drei Zeitpunkte der Inkubation mit  $^{14}\text{C}$ -Bikarbonat untersucht. Generell stimmten die Fluoreszenzsignale des Mikroarrays mit den Ergebnissen der AOB-Diversitätsanalysen, die durch quantitative FISH- bzw. vergleichende *amoA*-Sequenzanalyse erhalten wurden, überein. So wurden mit der rRNS aus Aalborg West positive Sondensignale für Nso1225, Nso190, 6a192, sowie NEU gemessen. Übereinstimmend mit der FISH-Analyse lieferte auch der Mikroarray keine positiven Signale mit den Sonden Nsv443 bzw. Ncmob.

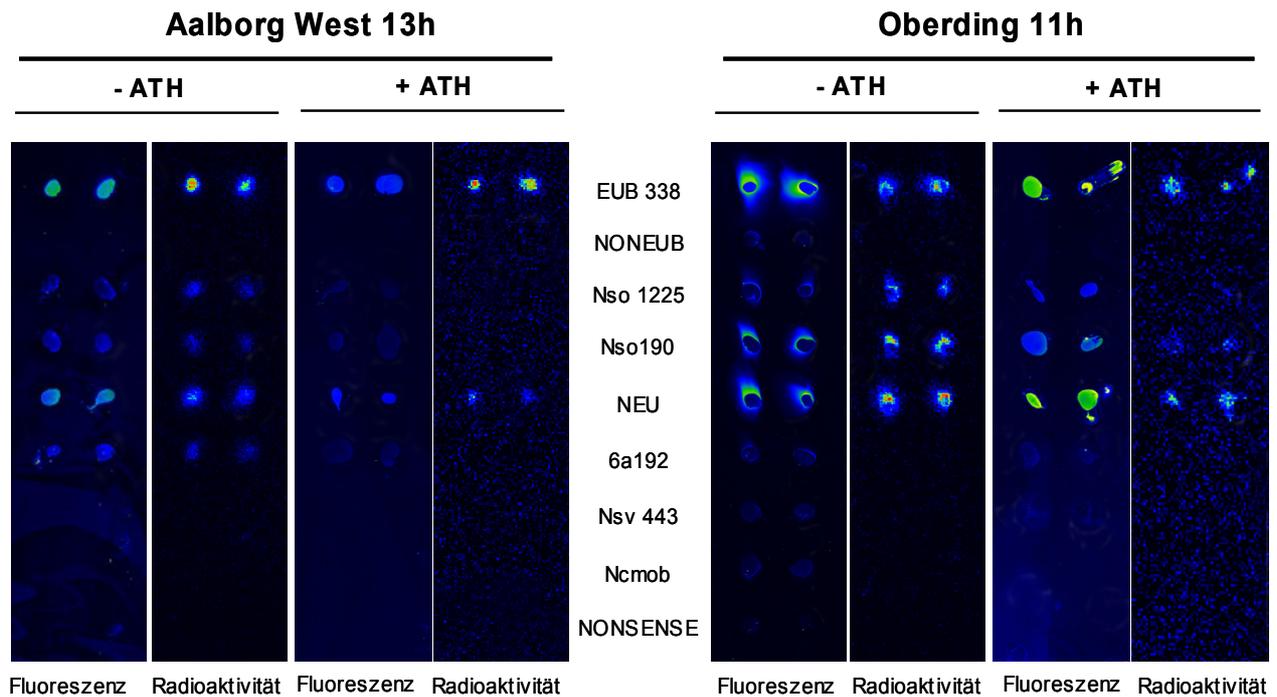


Abb. 9 Hybridisierungen mit rRNS aus Belebtschlammern auf dem Prototyp des Isotope Arrays. Aus aktiven (-ATH) sowie inhierten (+ATH), und jeweils für 13 h bzw. 11,5 h mit  $^{14}\text{C}$ -Bikarbonat inkubierten Belebtschlammern der Kläranlagen Aalborg West bzw. Oberding wurde rRNS extrahiert, Cy3-fluoreszenzmarkiert und auf manuell hergestellten Mikroarrays hybridisiert. Der Übersichtlichkeit halber wurde die Position der gemessenen Fluoreszenz- sowie Radioaktivitätsspot auf dem Array mit Hilfe von Adobe Photoshop korrigiert. Steigende Signalintensität innerhalb der einzelnen Objektträger ist durch die Farbgebung von blau über grün, gelb bis hin zu rot gekennzeichnet. Da für jede Messung automatisch eine separate Farbskala anhand der minimalen und maximalen Signalintensität auf dem Objektträger erstellt wurde, ist die Farbkodierung zwischen den Objektträgern nicht übertragbar.

Nach Hybridisierungen mit rRNS aus Oberding wurden für die Sonden Nso1225, Nso190 sowie NEU positive T-Werte gemessen, wohingegen die Fluoreszenzsignale der Sonden 6a192, Nsv443 und Ncmob unter dem Schwellenwert von zwei lagen. Ferner wiesen die fluoreszenten Mikroarray-Hybridisierungsmuster aktiver im Vergleich zu den mit Allylthioharnstoff inhierten Belebtschlammproben aus Oberding kaum Unterschiede auf. Im Gegensatz dazu konnten bei den gehemmten Proben aus Aalborg West positive, AOB-spezifische Signale nur mit der Sonde NEU gemessen werden.

Der Radioaktivitätsscan zeigte, dass in die mit bakterieller sowie den AOB-spezifischen Sonden immobilisierte rRNS eine ausreichend hohe Menge an Radioaktivität eingebaut wurde, um sie auf dem Mikroarray nachweisen zu können (Abb. 9). Wie erwartet, erwies sich der Einbau von  $^{14}\text{C}$  in die AOB-rRNS von den durch Allylthioharnstoff inhierten Proben als äußerst gering, so dass kaum radioaktive Signale für die AOB-spezifischen Sonden gemessen wurden. Gleichzeitig wurden für die mit Allylthioharnstoff inkubierten Proben

Radioaktivitätssignale mit der Sonde EUB338 detektiert, die vermutlich mit rRNS heterotroph CO<sub>2</sub>-fixierender Bakterien hybridisierte .

Zur quantitativen Auswertung der <sup>14</sup>C-Aufnahme in die rRNS wurden die radioaktiven sowie fluoreszenten Signale einer digitalen Bildanalyse unterzogen. Zu diesem Zweck wurde das Verhältnis „A“ des radioaktiven zu fluoreszentelem Signal einer Sonde nach folgender Formel ermittelt (Adamczyk *et al.*, 2003):

Formel 2 
$$A = [X_P - X_{PLB}] \times [I_P - I_{PLB}]^{-1}$$

X<sub>P</sub> und I<sub>P</sub> stehen für kumulierte Werte der Radioaktivitäts- bzw. Fluoreszenzintensität der manuellen Sondenspots. X<sub>PLB</sub> und I<sub>PLB</sub> stehen für kumulierte Radioaktivitäts- bzw. Fluoreszenzintensität des lokalen Sondenhintergrunds, dessen Größe so gewählt wurde, dass sie mit der des zugehörigen Sondenspots identisch war.

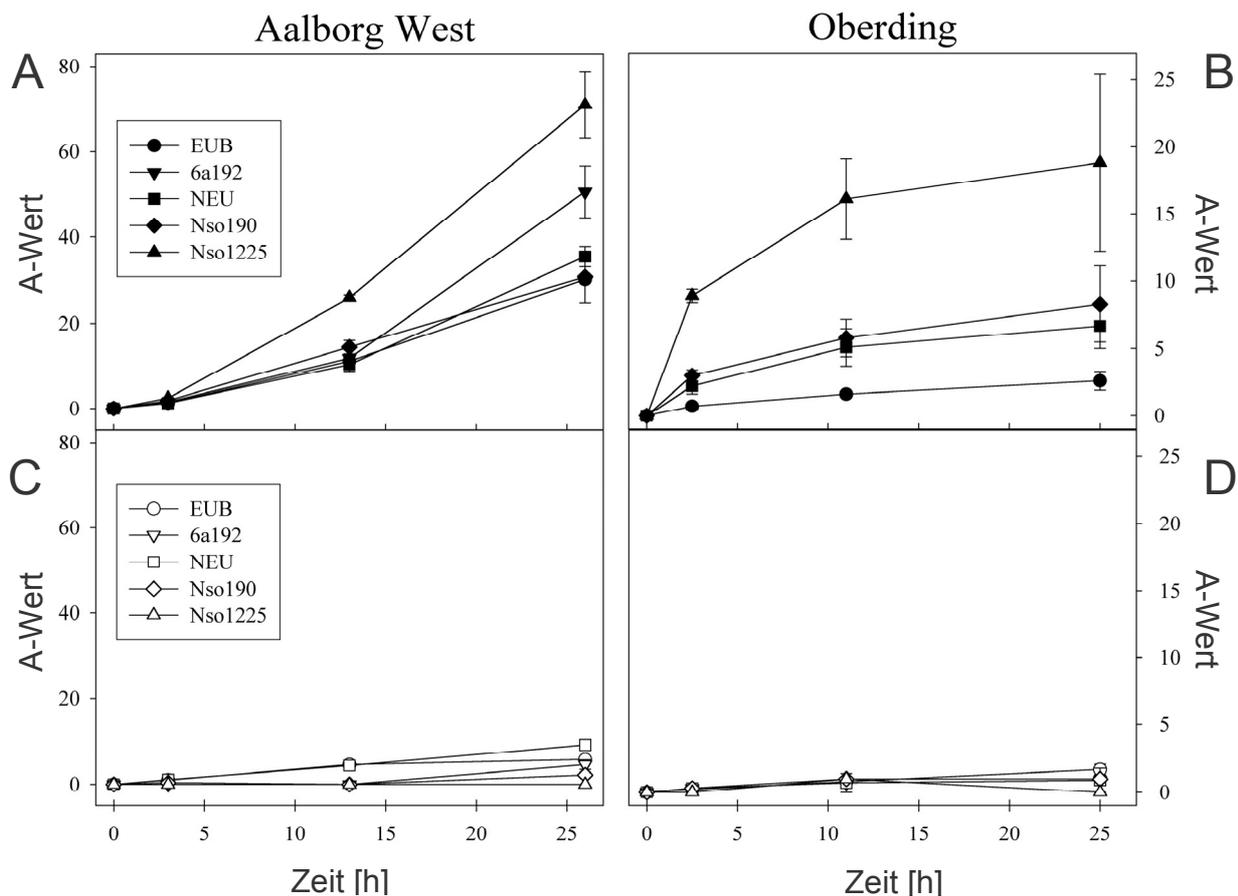


Abb. 10 Einbaudynamik von Radioaktivität in rRNS der phylogenetischen AOB-Untergruppen gemessen an A-Werten (Formel 2, S.37) für die einzelnen Sonden (detaillierte Beschreibung im Text). Die Isotope-Array-Experimente (s. auch Abb. 9) wurden mit aktiven (schwarze Symbole) bzw. mit Allylthioharnstoff inhibierten (weiße Symbole) Belebtschlämmen, die unterschiedlich lange mit <sup>14</sup>C-Bikarbonat inkubiert wurden, durchgeführt. A-Werte wurden für jede Sonde und Experiment separat bestimmt. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen an. A und C: Aalborg West; B und D: Oberding. In A und B wurden nur diejenigen Sonden (A-Werte) abgebildet, deren fluoreszentes Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis bei oder über dem Schwellenwert von 2,0 lag.

Abb. 10 (A und B) zeigt einen stetigen Anstieg des  $^{14}\text{C}$ -Einbaus in die AOB-rRNS über die Zeit. Interessanterweise werden Unterschiede zwischen einzelnen AOB-spezifischen Sonden hinsichtlich des Anstiegs ihrer A-Werte zu gegebenen Inkubationszeitpunkten deutlich. Dabei kann festgestellt werden, dass der A-Wert der Sonde Nso1225 stets über den der Sonden Nso190, NEU, 6a192 bzw. EUB338 lag. Für die mit Allylthioharnstoff inhibierten Schlämme fielen die A-Werte sowohl für alle Sonden als auch Inkubationszeitpunkte sehr gering aus (Abb. 10, C und D).

## C.V DER AOB-MIKROARRAY

### C.V.1 Sondendesign und *in-silico*-Evaluierung

Nach ersten erfolgreichen Hybridisierungen mit einer begrenzten Anzahl an Sonden sollte ein Mikroarray mit einem umfassenden SONDENSATZ zu Identifizierung aller bisher bekannten AOB-Organismen entworfen werden. Als Grundlage dafür diente die von (Koops *et al.*, 2003; Purkhold *et al.*, 2003) vorgeschlagene AOB-Phylogenie. Dem Sondendesign wurde das sog. Mehrfachsondenprinzip (Behr *et al.*, 2000; Amann und Schleifer, 2001) zugrunde gelegt, gemäß dessen ein Organismus durch einen hierarchisch aufgebauten SONDENSATZ eindeutig nachgewiesen wird. Um für alle Sonden ein möglichst vergleichbares Dissoziationsverhalten *a priori* zu erzielen, wurden alle Oligonukleotidsonden in gleicher Länge (von 18 Basen) sowie einem möglichst ähnlichen GC-Gehalt von ca. 50% entworfen. Zudem wurden stets diejenigen Sonden bevorzugt, die möglichst viele zentrale Basenfehlpaarungen (=Mismatches, MM) zu 16S rRNS von Nichtzielorganismen aufwiesen.

Zuerst wurde die Spezifität aller bereits für AOB publizierten, gegen die 16S rRNS gerichteten Oligonukleotide unter Verwendung von PROBE\_MATCH aus dem Softwarepaket ARB (Strunk und Ludwig, 2001) anhand des aktuellen (Stand Juli 2003) AOB-Datensatzes evaluiert. Die Sondenanalyse ergab, dass 23 (Tab. 6) der publizierten AOB-Sonden – zumeist nach geringfügiger Abwandlung – sich als geeignet für den AOB-SONDENSATZ erwiesen. Eine Sonde entsprach unmodifiziert dem Konzept des neuen AOB-SONDENSATZES, während die 22 verbleibenden, bereits publizierten Sonden hinsichtlich ihrer Bindungsposition sowie Lage der Basenfehlpaarung(en) gegenüber Nichtzielorganismen optimiert und auf eine Länge von 18 Basen angepasst wurden (Tab. 6).

Darüber hinaus wurden 100 neue Oligonukleotidsonden (Tab. 6) zur Erfassung aller bisher kultivierten, aber auch zahlreicher, nicht kultivierter AOB mit Hilfe von ARB PROBE\_DESIGN entworfen und hinsichtlich ihrer Spezifität mit ARB PROBE\_MATCH evaluiert.

Insgesamt wurden 105 AOB-spezifische Sonden mit einem GC-Gehalt von 50-56%, sieben mit einem GC-Gehalt von 39-44%, sowie 11 mit einem GC-Gehalt zwischen 61 und 83% in den AOB-Sondensatz aufgenommen.

Schließlich wurde der Sondensatz durch drei universelle (UnivA, UnivB und UnivC) und drei bakterielle (EUB338, EUB338II und EUB338III) Sonden, sowie drei Nonsens-Kontrolloligonukleotide zu Überwachung unspezifischer Bindung (NONSENSE und NONEUB) bzw. Lokalisierung des Hybridisierungsrasters (CONT) auf dem AOB-Mikroarray ergänzt.

Abb. 11 bis Abb. 22 Visualisierung der AOB-Erfassung mit dem neuen AOB-Sondensatz auf unterschiedlichen Hierarchieebenen. Als Grundlage dienten nach (Koops *et al.*, 2003; Purkhold *et al.*, 2003) abgewandelte, phylogenetische 16S-rRNS-Konsensusbäume von AOB-Isolaten sowie Umweltsequenzen mit einer Mindestlänge von 1000 Nukleotiden. Für die Konstruktion von Konsensusbäumen wurden mit Maximum-Likelihood-, Maximum-Parsimony- sowie Neighbour-Joining-Verfahren berechnete Bäume zugrunde gelegt. Mehrfachverzweigungen verbinden Äste, deren relative Anordnung bei Verwendung verschiedener Baumverfahren nicht zweifelsfrei bestimmt werden konnte. Volle bzw. leere Kreise zeigen Bootstrap-Unterstützung (bei 100 Wiederholungen mit dem Maximum-Likelihood-Verfahren) für Verzweigungen von >90% bzw. >70% an. Der Balken repräsentiert einen Sequenzunterschied von 10%.

Tab. 6 Übersicht über die Spezifität von Oligonukleotidsonden für den AOB-Mikroarray. Die Zielorganismen sind in sog. phylogenetische Cluster gemäß ihrer 16S-rRNS-Phylogenie (Koops *et al.*, 2003; Purkhold *et al.*, 2003) unterteilt. **Fett** gedruckte Namen bezeichnen beschriebene Spezies, Typstämme und Isolate; nicht fett gedruckte Namen bezeichnen AOB-Klone. In grün wurden nur diejenigen theoretischen Hybride zwischen Sonde und Zielsequenz(en) dargestellt, welche laut PROBE\_MATCH (aus dem Softwarepaket ARB; Strunk und Ludwig, 2001) keine Basenfehlpaarung aufweisen.

Referenz (und ggf. Synonyme in Originalpublikation)	Sequenz (6-7)	Blindsequenz	MSG	Position auf dem AOB-Army	Position auf dem Isotope Army	Sequenz	Nitrospira-Cluster 1										Nitrospira-Cluster 2										Nitrospira-Cluster 3										Nitrospira-Cluster 4										Nitrospira-Cluster 5										Nitrosomonas-Cluster 6a (N-oligotropha-/N-ureae-Linie)										Nitrosomonas-Cluster 6b (N-marina-/N-aestuarii-Linie)										Nitrosomonas-Cluster 7 (N-europaea-/N-mobilitas-Linie)										Nitrosomonas-Cluster 8										Nitrosomonas-Cluster 9										N. cyathiformis										Diverse AOB																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
							1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525	526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540	541	542	543	544	545	546	547	548	549	550	551	552	553	554	555	556	557	558	559	560	561	562	563	564	565	566	567	568	569	570	571	572	573	574	575	576	577	578	579	580	581	582	583	584	585	586	587	588	589	590	591	592	593	594	595	596	597	598	599	600	601	602	603	604	605	606	607	608	609	610	611	612	613	614	615	616	617	618	619	620	621	622	623	624	625	626	627	628	629	630	631	632	633	634	635	636	637	638	639	640	641	642	643	644	645	646	647	648	649	650	651	652	653	654	655	656	657	658	659	660	661	662	663	664	665	666	667	668	669	670	671	672	673	674	675	676	677	678	679	680	681	682	683	684	685	686	687	688	689	690	691	692	693	694	695	696	697	698	699	700	701	702	703	704	705	706	707	708	709	710	711	712	713	714	715	716	717	718	719	720	721	722	723	724	725	726	727	728	729	730	731	732	733	734	735	736	737	738	739	740	741	742	743	744	745	746	747	748	749	750	751	752	753	754	755	756	757	758	759	760	761	762	763	764	765	766	767	768	769	770	771	772	773	774	775	776	777	778	779	780	781	782	783	784	785	786	787	788	789	790	791	792	793	794	795	796	797	798	799	800	801	802	803	804	805	806	807	808	809	810	811	812	813	814	815	816	817	818	819	820	821	822	823	824	825	826	827	828	829	830	831	832	833	834	835	836	837	838	839	840	841	842	843	844	845	846	847	848	849	850	851	852	853	854	855	856	857	858	859	860	861	862	863	864	865	866	867	868	869	870	871	872	873	874	875	876	877	878	879	880	881	882	883	884	885	886	887	888	889	890	891	892	893	894	895	896	897	898	899	900	901	902	903	904	905	906	907	908	909	910	911	912	913	914	915	916	917	918	919	920	921	922	923	924	925	926	927	928	929	930	931	932	933	934	935	936	937	938	939	940	941	942	943	944	945	946	947	948	949	950	951	952	953	954	955	956	957	958	959	960	961	962	963	964	965	966	967	968	969	970	971	972	973	974	975	976	977	978	979	980	981	982	983	984	985	986	987	988	989	990	991	992	993	994	995	996	997	998	999	1000	1001	1002	1003	1004	1005	1006	1007	1008	1009	1010	1011	1012	1013	1014	1015	1016	1017	1018	1019	1020	1021	1022	1023	1024	1025	1026	1027	1028	1029	1030	1031	1032	1033	1034	1035	1036	1037	1038	1039	1040	1041	1042	1043	1044	1045	1046	1047	1048	1049	1050	1051	1052	1053	1054	1055	1056	1057	1058	1059	1060	1061	1062	1063	1064	1065	1066	1067	1068	1069	1070	1071	1072	1073	1074	1075	1076	1077	1078	1079	1080	1081	1082	1083	1084	1085	1086	1087	1088	1089	1090	1091	1092	1093	1094	1095	1096	1097	1098	1099	1100	1101	1102	1103	1104	1105	1106	1107	1108	1109	1110	1111	1112	1113	1114	1115	1116	1117	1118	1119	1120	1121	1122	1123	1124	1125	1126	1127	1128	1129	1130	1131	1132	1133	1134	1135	1136	1137	1138	1139	1140	1141	1142	1143	1144	1145	1146	1147	1148	1149	1150	1151	1152	1153	1154	1155	1156	1157	1158	1159	1160	1161	1162	1163	1164	1165	1166	1167	1168	1169	1170	1171	1172	1173	1174	1175	1176	1177	1178	1179	1180	1181	1182	1183	1184	1185	1186	1187	1188	1189	1190	1191	1192	1193	1194	1195	1196	1197	1198	1199	1200	1201	1202	1203	1204	1205	1206	1207	1208	1209	1210	1211	1212	1213	1214	1215	1216	1217	1218	1219	1220	1221	1222	1223	1224	1225	1226	1227	1228	1229	1230	1231	1232	1233	1234	1235	1236	1237	1238	1239	1240	1241	1242	1243	1244	1245	1246	1247	1248	1249	1250	1251	1252	1253	1254	1255	1256	1257	1258	1259	1260	1261	1262	1263	1264	1265	1266	1267	1268	1269	1270	1271	1272	1273	1274	1275	1276	1277	1278	1279	1280	1281	1282	1283	1284	1285	1286	1287	1288	1289	1290	1291	1292	1293	1294	1295	1296	1297	1298	1299	1300	1301	1302	1303	1304	1305	1306	1307	1308	1309	1310	1311	1312	1313	1314	1315	1316	1317	1318	1319	1320	1321	1322	1323	1324	1325	1326	1327	1328	1329	1330	1331	1332	1333	1334	1335	1336	1337	1338	1339	1340	1341	1342	1343	1344	1345	1346	1347	1348	1349	1350	1351	1352	1353	1354	1355	1356	1357	1358	1359	1360	1361	1362	1363	1364	1365	1366	1367	1368	1369	1370	1371	1372	1373	1374	1375	1376	1377	1378	1379	1380	1381	1382	1383	1384	1385	1386	1387	1388	1389	1390	1391	1392	1393	1394	1395	1396	1397	1398	1399	1400	1401	1402	1403	1404	1405	1406	1407	1408	1409	1410	1411	1412	1413	1414	1415	1416	1417	1418	1419	1420	1421	1422	1423	1424	1425	1426	1427	1428	1429	1430	1431	1432	1433	1434	1435	1436	1437	1438	1439	1440	1441	1442	1443	1444	1445	1446	1447

Referenz (und ggf. Sondenname in Originalpublikation)	Sondenname (5'-3')	Bindungsposition	5'GC	Position auf dem AOB-Army	Position auf dem Nitrospira-Army	Sondenname	Nitrospira-Cluster 0										Nitrospira-Cluster 4										Nitrospira-Cluster 2										Nitrospira-Cluster 3										Nitrospira-Cluster 1 (bislang nicht kultiviert)										Nitrosomonas-Cluster 5 (bislang nicht kultiviert)										Nitrosomonas-Cluster 6a (N.-oligotropha-/N.-ureae-Linie)										Nitrosomonas-Cluster 6b (N.-marina-/N.-aestuvarii-Linie)										Nitrosomonas-Cluster 7 (N.-europaea-/N.-mobilia-Linie)										Nitrosomonas-Cluster 8										Nitrosomonas-Cluster 9										Gamma-AOB																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
							80A10	80A11	80A12	80A13	80A14	80A15	80A16	80A17	80A18	80A19	80A20	80A21	80A22	80A23	80A24	80A25	80A26	80A27	80A28	80A29	80A30	80A31	80A32	80A33	80A34	80A35	80A36	80A37	80A38	80A39	80A40	80A41	80A42	80A43	80A44	80A45	80A46	80A47	80A48	80A49	80A50	80A51	80A52	80A53	80A54	80A55	80A56	80A57	80A58	80A59	80A60	80A61	80A62	80A63	80A64	80A65	80A66	80A67	80A68	80A69	80A70	80A71	80A72	80A73	80A74	80A75	80A76	80A77	80A78	80A79	80A80	80A81	80A82	80A83	80A84	80A85	80A86	80A87	80A88	80A89	80A90	80A91	80A92	80A93	80A94	80A95	80A96	80A97	80A98	80A99	80A100	80A101	80A102	80A103	80A104	80A105	80A106	80A107	80A108	80A109	80A110	80A111	80A112	80A113	80A114	80A115	80A116	80A117	80A118	80A119	80A120	80A121	80A122	80A123	80A124	80A125	80A126	80A127	80A128	80A129	80A130	80A131	80A132	80A133	80A134	80A135	80A136	80A137	80A138	80A139	80A140	80A141	80A142	80A143	80A144	80A145	80A146	80A147	80A148	80A149	80A150	80A151	80A152	80A153	80A154	80A155	80A156	80A157	80A158	80A159	80A160	80A161	80A162	80A163	80A164	80A165	80A166	80A167	80A168	80A169	80A170	80A171	80A172	80A173	80A174	80A175	80A176	80A177	80A178	80A179	80A180	80A181	80A182	80A183	80A184	80A185	80A186	80A187	80A188	80A189	80A190	80A191	80A192	80A193	80A194	80A195	80A196	80A197	80A198	80A199	80A200	80A201	80A202	80A203	80A204	80A205	80A206	80A207	80A208	80A209	80A210	80A211	80A212	80A213	80A214	80A215	80A216	80A217	80A218	80A219	80A220	80A221	80A222	80A223	80A224	80A225	80A226	80A227	80A228	80A229	80A230	80A231	80A232	80A233	80A234	80A235	80A236	80A237	80A238	80A239	80A240	80A241	80A242	80A243	80A244	80A245	80A246	80A247	80A248	80A249	80A250	80A251	80A252	80A253	80A254	80A255	80A256	80A257	80A258	80A259	80A260	80A261	80A262	80A263	80A264	80A265	80A266	80A267	80A268	80A269	80A270	80A271	80A272	80A273	80A274	80A275	80A276	80A277	80A278	80A279	80A280	80A281	80A282	80A283	80A284	80A285	80A286	80A287	80A288	80A289	80A290	80A291	80A292	80A293	80A294	80A295	80A296	80A297	80A298	80A299	80A300	80A301	80A302	80A303	80A304	80A305	80A306	80A307	80A308	80A309	80A310	80A311	80A312	80A313	80A314	80A315	80A316	80A317	80A318	80A319	80A320	80A321	80A322	80A323	80A324	80A325	80A326	80A327	80A328	80A329	80A330	80A331	80A332	80A333	80A334	80A335	80A336	80A337	80A338	80A339	80A340	80A341	80A342	80A343	80A344	80A345	80A346	80A347	80A348	80A349	80A350	80A351	80A352	80A353	80A354	80A355	80A356	80A357	80A358	80A359	80A360	80A361	80A362	80A363	80A364	80A365	80A366	80A367	80A368	80A369	80A370	80A371	80A372	80A373	80A374	80A375	80A376	80A377	80A378	80A379	80A380	80A381	80A382	80A383	80A384	80A385	80A386	80A387	80A388	80A389	80A390	80A391	80A392	80A393	80A394	80A395	80A396	80A397	80A398	80A399	80A400	80A401	80A402	80A403	80A404	80A405	80A406	80A407	80A408	80A409	80A410	80A411	80A412	80A413	80A414	80A415	80A416	80A417	80A418	80A419	80A420	80A421	80A422	80A423	80A424	80A425	80A426	80A427	80A428	80A429	80A430	80A431	80A432	80A433	80A434	80A435	80A436	80A437	80A438	80A439	80A440	80A441	80A442	80A443	80A444	80A445	80A446	80A447	80A448	80A449	80A450	80A451	80A452	80A453	80A454	80A455	80A456	80A457	80A458	80A459	80A460	80A461	80A462	80A463	80A464	80A465	80A466	80A467	80A468	80A469	80A470	80A471	80A472	80A473	80A474	80A475	80A476	80A477	80A478	80A479	80A480	80A481	80A482	80A483	80A484	80A485	80A486	80A487	80A488	80A489	80A490	80A491	80A492	80A493	80A494	80A495	80A496	80A497	80A498	80A499	80A500	80A501	80A502	80A503	80A504	80A505	80A506	80A507	80A508	80A509	80A510	80A511	80A512	80A513	80A514	80A515	80A516	80A517	80A518	80A519	80A520	80A521	80A522	80A523	80A524	80A525	80A526	80A527	80A528	80A529	80A530	80A531	80A532	80A533	80A534	80A535	80A536	80A537	80A538	80A539	80A540	80A541	80A542	80A543	80A544	80A545	80A546	80A547	80A548	80A549	80A550	80A551	80A552	80A553	80A554	80A555	80A556	80A557	80A558	80A559	80A560	80A561	80A562	80A563	80A564	80A565	80A566	80A567	80A568	80A569	80A570	80A571	80A572	80A573	80A574	80A575	80A576	80A577	80A578	80A579	80A580	80A581	80A582	80A583	80A584	80A585	80A586	80A587	80A588	80A589	80A590	80A591	80A592	80A593	80A594	80A595	80A596	80A597	80A598	80A599	80A600	80A601	80A602	80A603	80A604	80A605	80A606	80A607	80A608	80A609	80A610	80A611	80A612	80A613	80A614	80A615	80A616	80A617	80A618	80A619	80A620	80A621	80A622	80A623	80A624	80A625	80A626	80A627	80A628	80A629	80A630	80A631	80A632	80A633	80A634	80A635	80A636	80A637	80A638	80A639	80A640	80A641	80A642	80A643	80A644	80A645	80A646	80A647	80A648	80A649	80A650	80A651	80A652	80A653	80A654	80A655	80A656	80A657	80A658	80A659	80A660	80A661	80A662	80A663	80A664	80A665	80A666	80A667	80A668	80A669	80A670	80A671	80A672	80A673	80A674	80A675	80A676	80A677	80A678	80A679	80A680	80A681	80A682	80A683	80A684	80A685	80A686	80A687	80A688	80A689	80A690	80A691	80A692	80A693	80A694	80A695	80A696	80A697	80A698	80A699	80A700	80A701	80A702	80A703	80A704	80A705	80A706	80A707	80A708	80A709	80A710	80A711	80A712	80A713	80A714	80A715	80A716	80A717	80A718	80A719	80A720	80A721	80A722	80A723	80A724	80A725	80A726	80A727	80A728	80A729	80A730	80A731	80A732	80A733	80A734	80A735	80A736	80A737	80A738	80A739	80A740	80A741	80A742	80A743	80A744	80A745	80A746	80A747	80A748	80A749	80A750	80A751	80A752	80A753	80A754	80A755	80A756	80A757	80A758	80A759	80A760	80A761	80A762	80A763	80A764	80A765	80A766	80A767	80A768	80A769	80A770	80A771	80A772	80A773	80A774	80A775	80A776	80A777	80A778	80A779	80A780	80A781	80A782	80A783	80A784	80A785	80A786	80A787	80A788	80A789	80A790	80A791	80A792	80A793	80A794	80A795	80A796	80A797	80A798	80A799	80A800	80A801	80A802	80A803	80A804	80A805	80A806	80A807	80A808	80A809	80A810	80A811	80A812	80A813	80A814	80A815	80A816	80A817	80A818	80A819	80A820	80A821	80A822	80A823	80A824	80A825	80A826	80A827	80A828	80A829	80A830	80A831	80A832	80A833	80A834	80A835	80A836	80A837	80A838	80A839	80A840	80A841	80A842	80A843	80A844	80A845	80A846	80A847	80A848	80A849	80A850	80A851	80A852	80A853	80A854	80A855	80A856	80A857	80A858	80A859	80A860	80A861	80A862	80A863	80A864	80A865	80A866	80A867	80A868	80A869	80A870	80A871	80A872	80A873	80A874	80A875	80A876	80A877	80A878	80A879	80A880	80A881	80A882	80A883	80A884	80A885	80A886	80A887	80A888	80A889	80A890	80A891	80A892	80A893	80A894	80A895	80A896	80A897	80A898	80A899	80A900	80A901	80A902	80A903	80A904	80A905	80A906	80A907	80A908	80A909	80A910	80A911	80A912	80A913	80A914	80A915	80A916	80A917	80A918	80A919	80A920	80A921	80A922	80A923	80A924	80A925	80A926	80A927	80A928	80A929	80A930	80A931	80A932	80A933	80A934	80A935	80A936	80A937	80A938	80A939	80A940	80A941	80A942	80A943	80A944	80A945	80A946	80A947	80A948	80A949	80A950	80A951	80A952	80A953	80A954	80A955	80A956	80A957	80A958	80A959	80A960	80A961	80A962	80A963	80A964	80A965	80A966	80A967	80A968	80A969	80A970	80A971	80A972	80A973	80A974	80A975	80A976	80A977	80A978	80A979	80A980	80A981	80A982	80A983	80A984	80A985	80A986	80A987	80A988	80A989	80A990	80A991	80A992	80A993	80A994	80A995	80A996	80A997	80A998	80A999	80A1000	80A1001	80A1002	80A1003	80A1004	80A1005	80A1006	80A1007	80A1008	80A1009	80A1010	80A1011	80A1012	80A1013	80A1014	80A1015	80A1016	80A1017	80A1018	80A1019	80A1020	80A1021	80A1022	80A1023	80A1024	80A1025	80A1026	80A1027	80A1028	80A1029	80A1030	80A1031	80A1032	80A1033	80A1034	80A1035	80A1036	80A1037	80A1038	80A1039	80A1040	80A1041	80A1042	80A1043	80A1044	80A1045	80A1046	80A1047	80A1048	80A1049	80A1050	80A1051	80A1052	80A1053	80A1054	80A1055	80A1056	80A1057	80A1058	80A1059	80A1060	80A1061	80A1062	80A1063	80A1064	80A1065	80A1066	80A1067	80A1068	80A1069	80A1070	80A1071	80A1072	80A1073	80A1074	80A1075	80A1076	80A1077	80A1078	80A1079	80A1080	80A1081	80A1082	80A1083	80A1084	80A1085	80A1086	80A1087	80A1088	80A1089

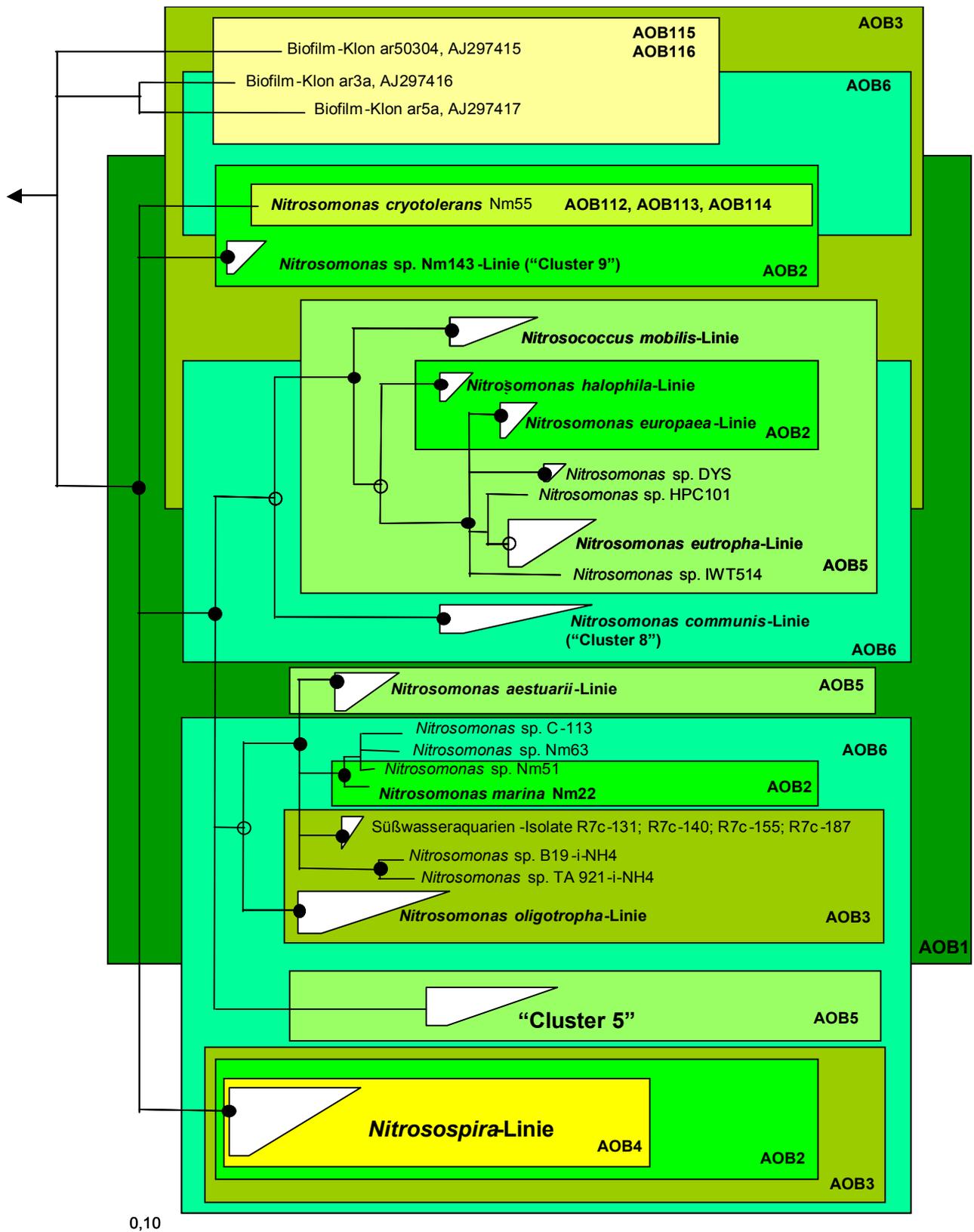


Abb. 11 Auf 16S-rRNS-Sequenzen basierender, phylogenetischer Konsensusbaum. Dargestellt ist die Erfassung einzelner Entwicklungslinien innerhalb der Nitrosomonaden sowie der *Nitrospira*-Linie mit den übergeordneten AOB-Sonden AOB1 bis AOB6. Zudem wird die Erfassung der *N. cryotolerans*-Linie, die bisher nur aus einem Organismus besteht, mit spezifischen Sonden dargestellt. Ferner wurden spezifische Sonden für die tiefzweigenden Biofilmklone ar5a, AJ297417; ar50304, AJ297415 sowie ar3a, AJ297416, die bisher keinem kultivierten AOB zugeordnet werden konnten, eingetragen.

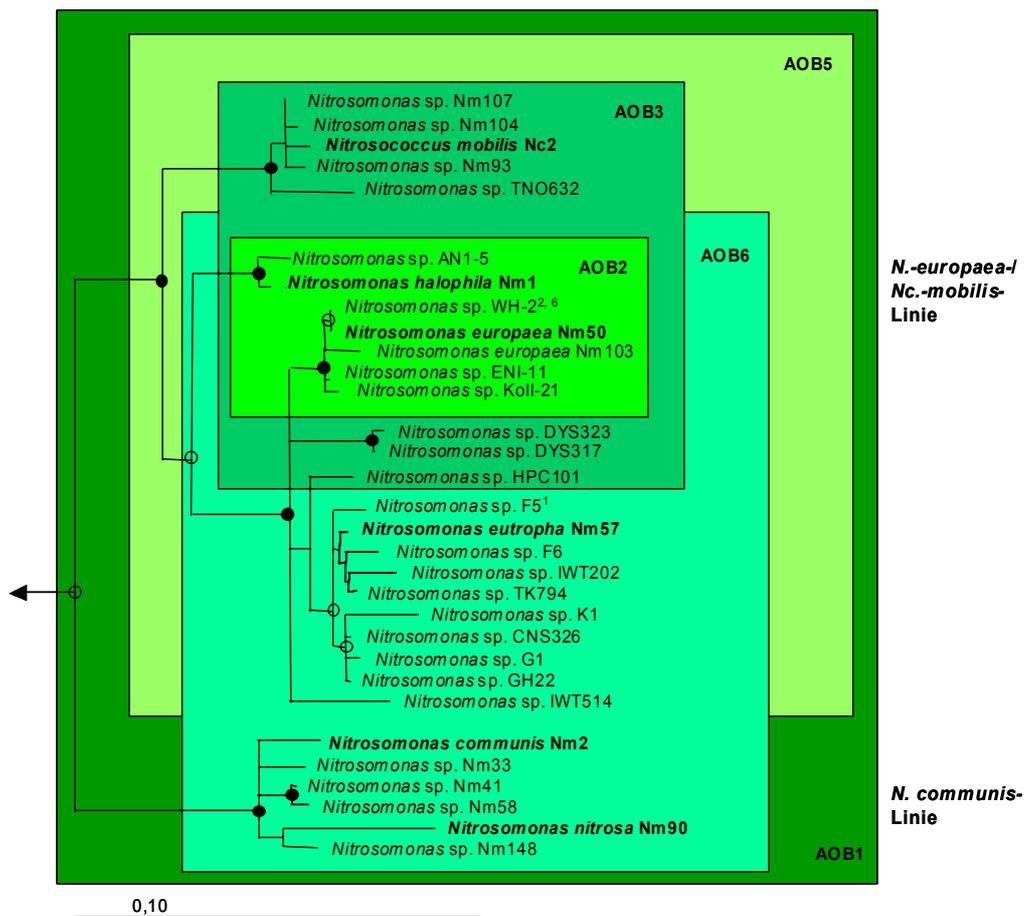


Abb. 12 Auf 16S-rRNS-Sequenzen basierender, phylogenetischer Konsensusbaum der „Cluster 7“ sowie „Cluster 8“ innerhalb der AOB (Koops *et al.*, 2003; Purkhold *et al.*, 2003). Detaillierte Darstellung der Erfassung einzelner AOB-Reinkulturen innerhalb der *N.-europaea-/Nc.-mobilis-Linie* (sog. „Cluster 7“) bzw. *N.-communis-Linie* (sog. „Cluster 8“) mit den übergeordneten Sonden AOB1 bis AOB6. Die hinter Organismen-namen hochgestellten Zahlen <sup>1, 2</sup> bzw. <sup>6</sup> beziehen sich auf AOB-Sonden mit entsprechenden Nummern (AOB1, AOB2, bzw. AOB6) und weisen darauf hin, dass jene Organismen von diesen Sonden nicht erfasst werden. Beschriebene Spezies sind **fett** hervorgehoben.

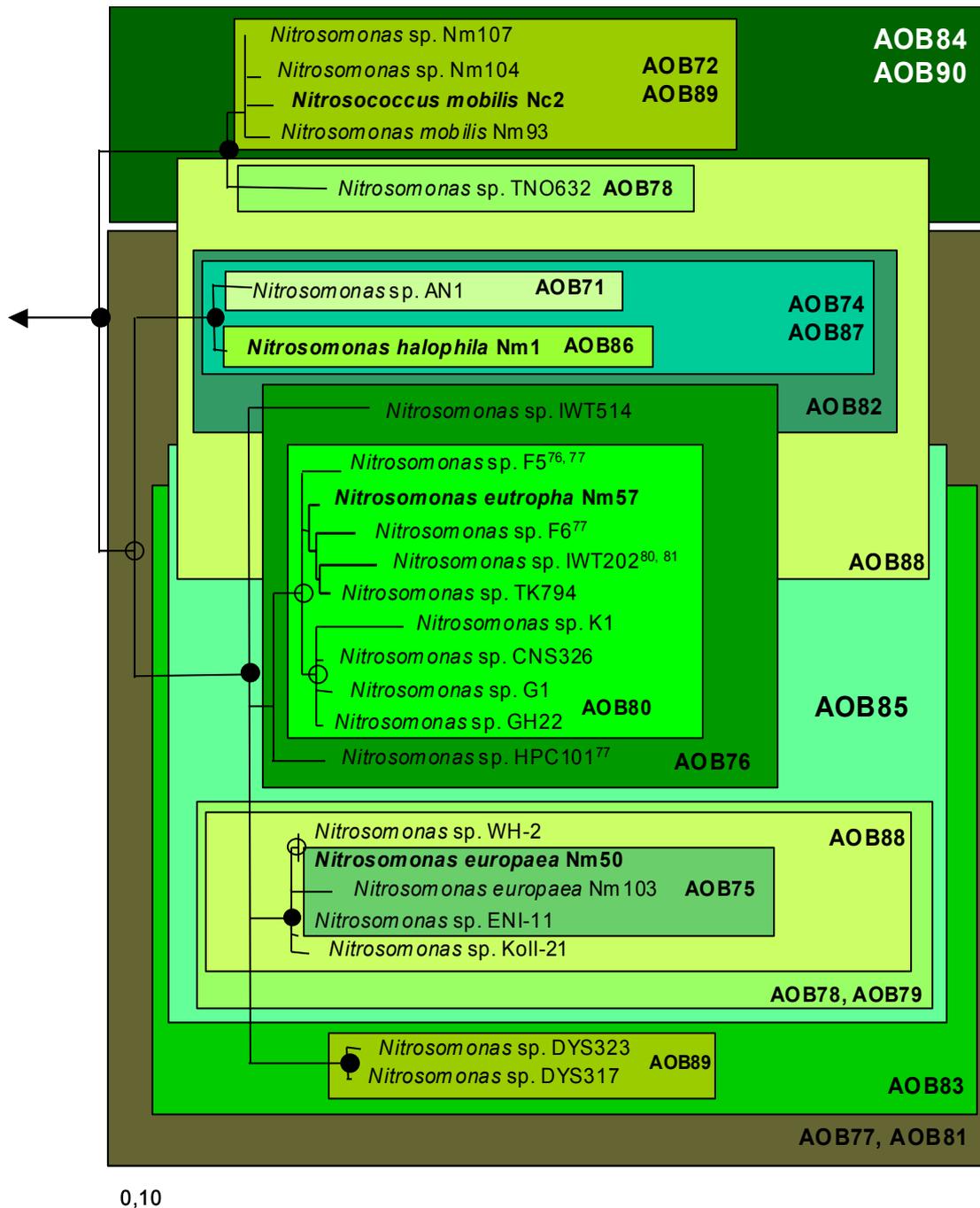


Abb. 13 Auf 16S-rRNS-Sequenzen basierender, phylogenetischer Konsensusbaum des AOB-„Clusters 7<sup>c</sup>“ (Koops *et al.*, 2003; Purkhold *et al.*, 2003). Detaillierte Darstellung der Erfassung einzelner AOB-Reinkulturen innerhalb der *N.-europaea*-, *N.-eutropha*-, *N.-halophila*- sowie *Nc.-mobilis*-Linie mit spezifischen AOB-Sonden. Die hinter Organismennamen hochgestellten Zahlen <sup>76, 77, 80 bzw. 81</sup> beziehen sich auf entsprechend nummerierte AOB-Sonden (AOB76, AOB77, AOB80 bzw. AOB81) und weisen darauf hin, dass jene Organismen von diesen Sonden nicht erfasst werden. Beschriebene Spezies sind **fett** hervorgehoben.

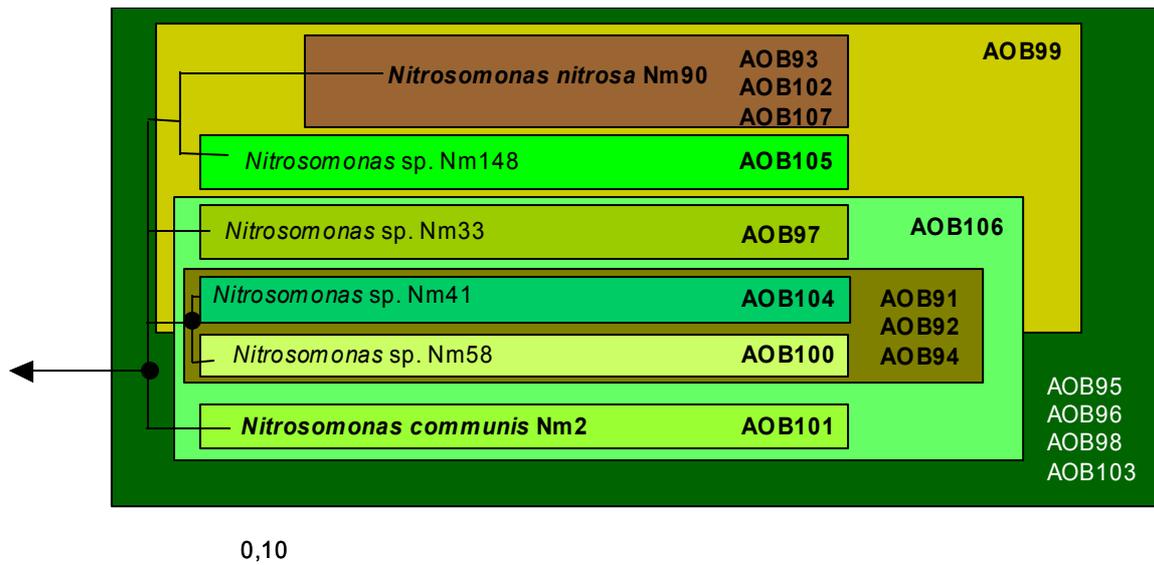


Abb. 14 Auf 16S-rRNS-Sequenzen basierender, phylogenetischer Konsensusbaum des AOB-, Clusters 8<sup>cc</sup> (Koops *et al.*, 2003; Purkhold *et al.*, 2003). Detaillierte Darstellung der Erfassung einzelner AOB-Reinkulturen innerhalb der *N.-nitrosa*-Linie mit spezifischen AOB-Sonden. Beschriebene Spezies sind **fett** hervorgehoben.

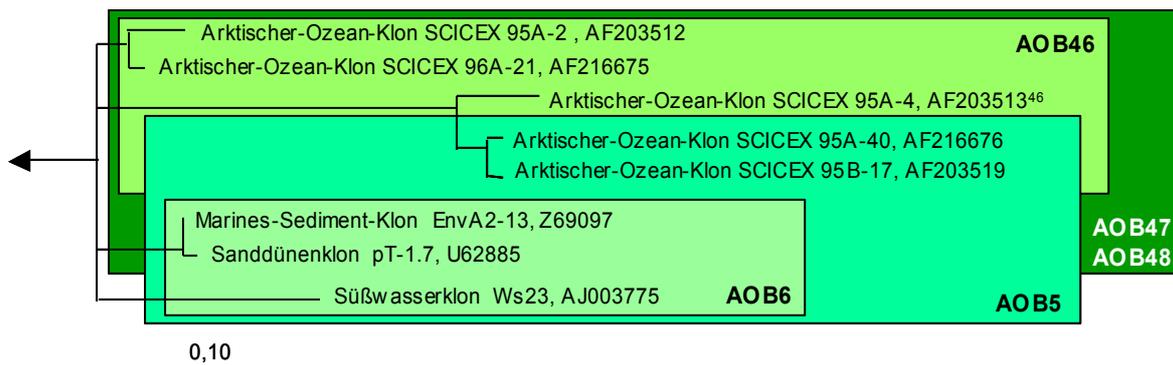


Abb. 15 Auf 16S-rRNS-Sequenzen basierender, phylogenetischer Konsensusbaum des AOB-, Clusters 5<sup>cc</sup> (Koops *et al.*, 2003; Purkhold *et al.*, 2003), der gänzlich aus Sequenzen bisher nicht kultivierter (AOB-) Organismen besteht. Dabei wird die Erfassung einzelner Umweltklone sowohl mit übergeordneten (AOB5 und AOB6) als auch spezifischen AOB-Sonden visualisiert. Die hinter den Organismenamen hochgestellte Zahl <sup>46</sup> bezieht sich auf entsprechend nummerierte AOB-Sonde (AOB46) und weist darauf hin, dass jener Organismus von dieser Sonde nicht erfasst wird.

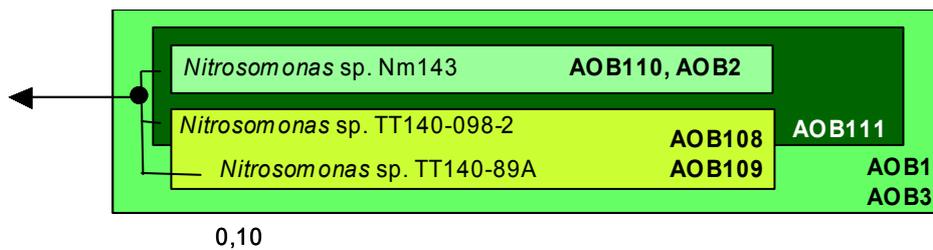


Abb. 16 Auf 16S-rRNS-Sequenzen basierender, phylogenetischer Konsensusbaum des AOB-, Clusters 9<sup>cc</sup> (Koops *et al.*, 2003; Purkhold *et al.*, 2003), in dem die Erfassung einzelner AOB-Reinkulturen mit übergeordneten (AOB1, AOB2, AOB3) sowie spezifischen AOB-Sonden detailliert dargestellt wird.

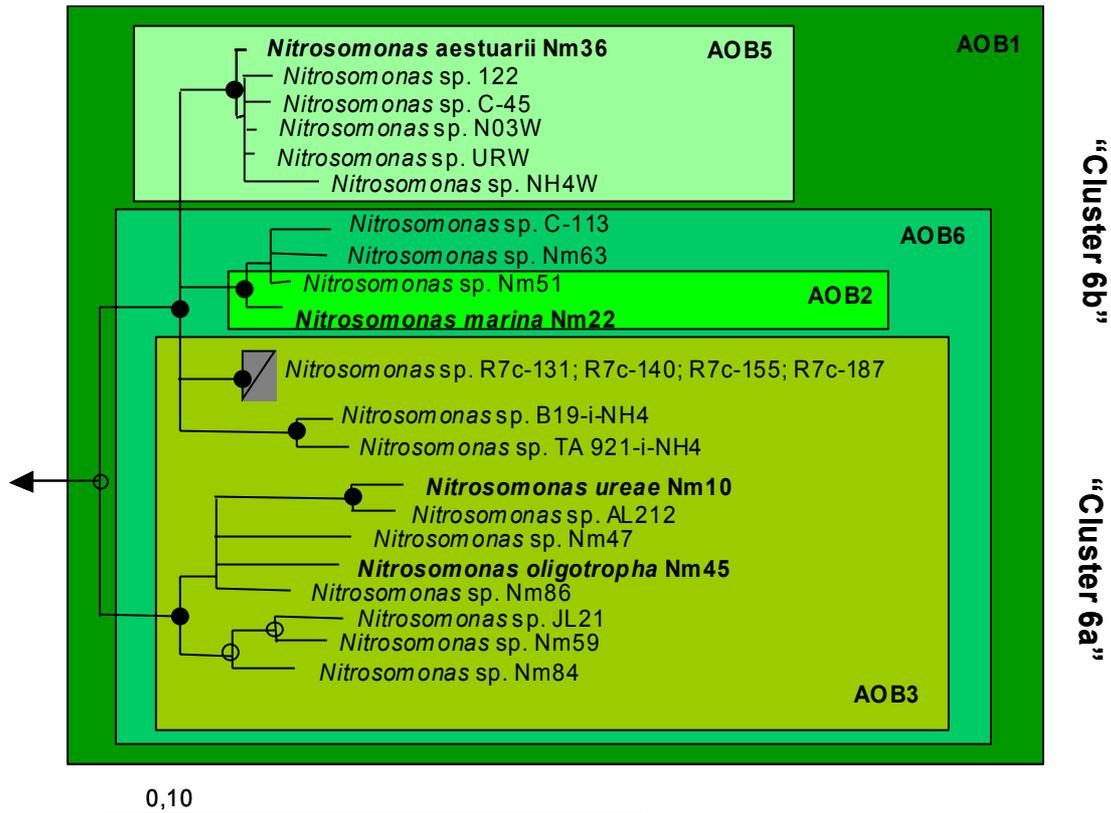


Abb. 17 Auf 16S-rRNS-Sequenzen basierender, phylogenetischer Konsensusbaum der AOB-„Cluster 6a“ sowie AOB-„Cluster 6b“ (Koops *et al.*, 2003; Purkhold *et al.*, 2003). Detaillierte Darstellung der Erfassung einzelner AOB-Reinkulturen innerhalb der *N.-oligotropha*- sowie *N.-ureae*- („Cluster 6a“) bzw. *N.-aestuarii*- und *N.-marina*-Linie („Cluster 6b“) mit übergeordneten AOB-Sonden. Beschriebene Spezies sind **fett** hervorgehoben.

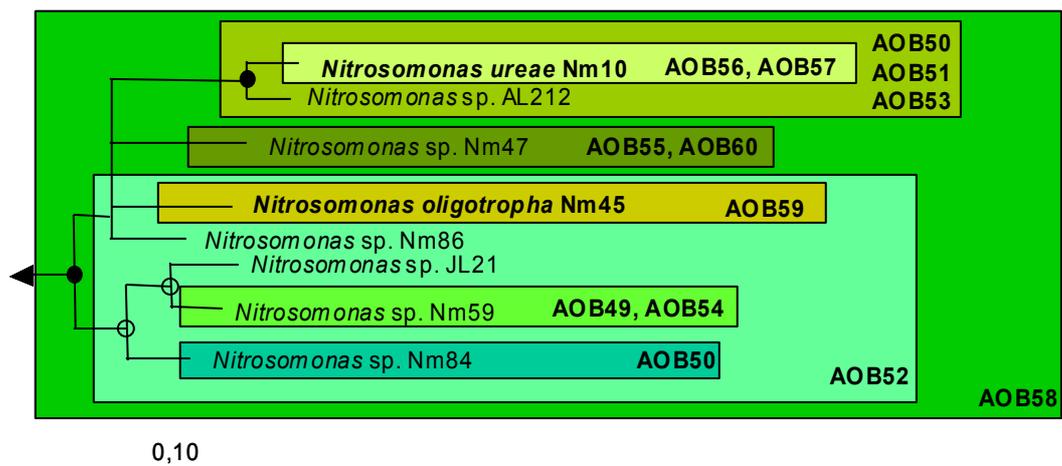


Abb. 18 Auf 16S-rRNS-Sequenzen basierender, phylogenetischer Konsensusbaum des AOB-„Clusters 6a“ (Koops *et al.*, 2003; Purkhold *et al.*, 2003). Detaillierte Darstellung der Erfassung einzelner AOB-Reinkulturen innerhalb der *N.-oligotropha*- sowie *N.-ureae*-Linie mit spezifischen AOB-Sonden. Beschriebene Spezies sind **fett** hervorgehoben.

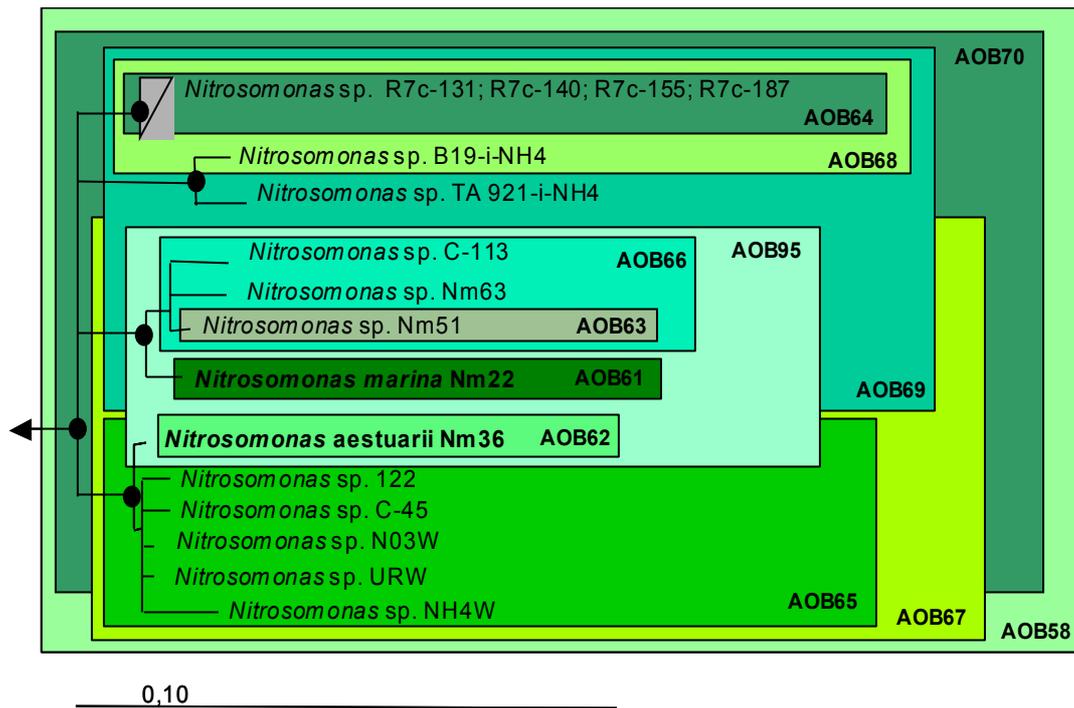


Abb. 19 Auf 16S-rRNS-Sequenzen basierender, phylogenetischer Konsensusbaum des AOB-, „Clusters 6b“ (Koops *et al.*, 2003; Purkhold *et al.*, 2003). Detaillierte Darstellung der Erfassung einzelner AOB-Reinkulturen innerhalb der *N.-marina*- sowie *N.-aestuarii*-Linie mit spezifischen AOB-Sonden. Beschriebene Spezies sind **fett** hervorgehoben.

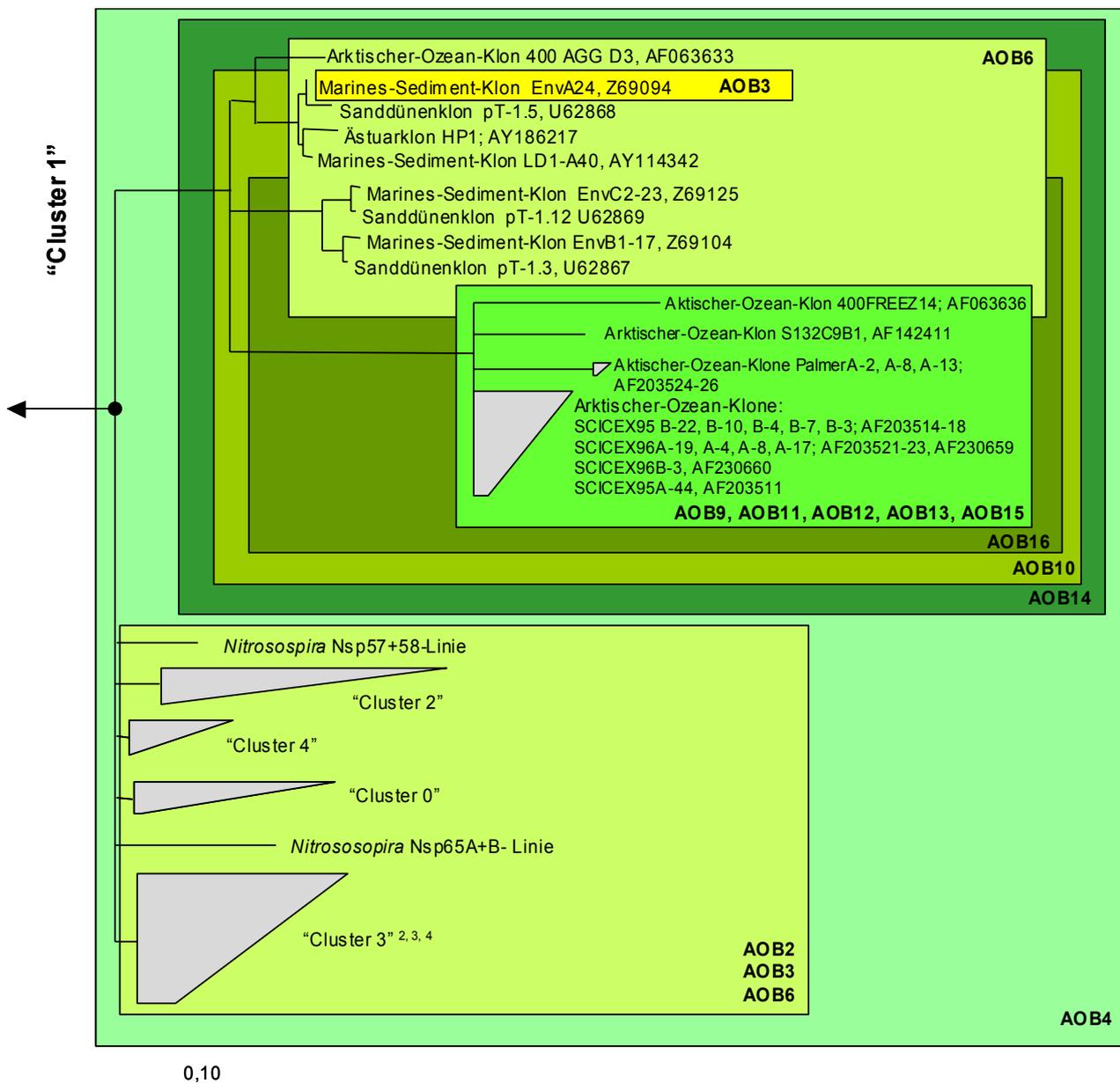


Abb. 20 16S-rRNS-basierender, phylogenetischer Konsensusbaum für *Nitrosospira*-Entwicklungslinien innerhalb der AOB (Koops *et al.*, 2003; Purkhold *et al.*, 2003). In der Darstellung wurde zum einen die Erfassung sog. „Cluster“ 0 bis 4 mit übergeordneten (AOB1 bis AOB6) Sonden abgebildet. Zum anderen wurden spezifische Sonden zu Detektion von Organismen des „Clusters 1“, welches vollständig aus Sequenzen bislang nicht kultivierter AOB besteht, eingetragen. Für alle Klonsequenzen wurden die zugehörigen GenBank-Zugangsdaten (accession numbers) angegeben. Die hinter dem „Cluster“-Namen hochgestellten Zahlen <sup>2,3</sup> bzw. <sup>4</sup> beziehen sich auf entsprechend nummerierte AOB-Sonden (AOB2, AOB3 und AOB4) und weisen darauf hin, dass jene Organismengruppe nicht vollständig von diesen Sonden erfasst wird.

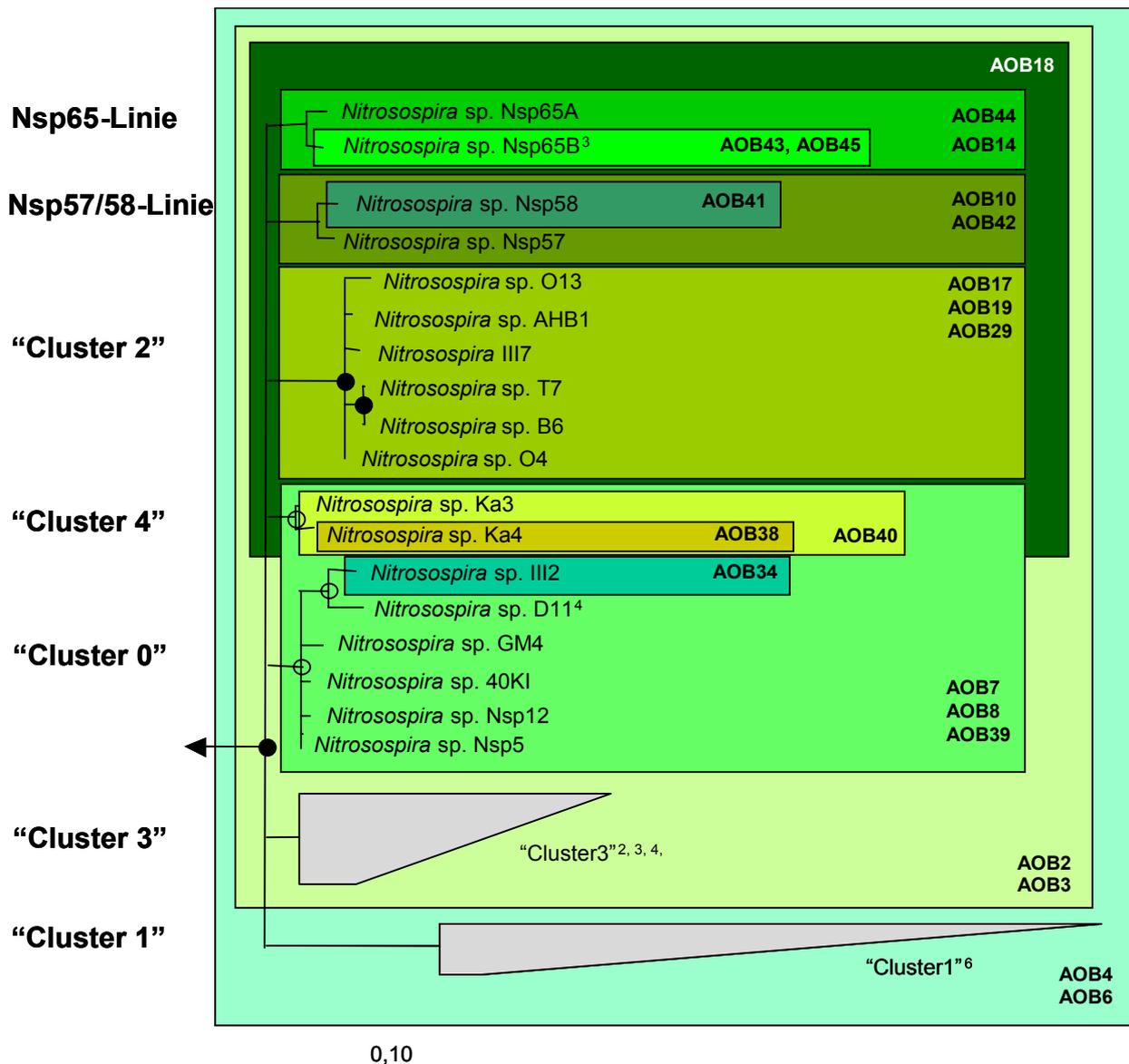


Abb. 21 Auf 16S-rRNS-Sequenzen basierender, phylogenetischer Konsensusbaum für *Nitrospira*-Entwicklungslinien innerhalb der AOB (Koops *et al.*, 2003; Purkhold *et al.*, 2003). Detaillierte Darstellung der Erfassung von AOB-Reinkulturen innerhalb sog. „Cluster“ 0, 2 bzw. 4“ sowie der Nsp65AB- bzw. Nsp57/58-Entwicklungslinien mit spezifischen sowie übergeordneten AOB-Sonden. Die hinter Organismen- bzw. „Cluster“-Namen hochgestellten Zahlen <sup>2, 3, 4</sup> bzw. <sup>6</sup> beziehen sich auf entsprechend nummerierte AOB-Sonden (AOB2, AOB3, AOB4 bzw. AOB6) und weisen darauf hin, dass jene Organismen(gruppen) von diesen Sonden nicht (vollständig) erfasst werden.

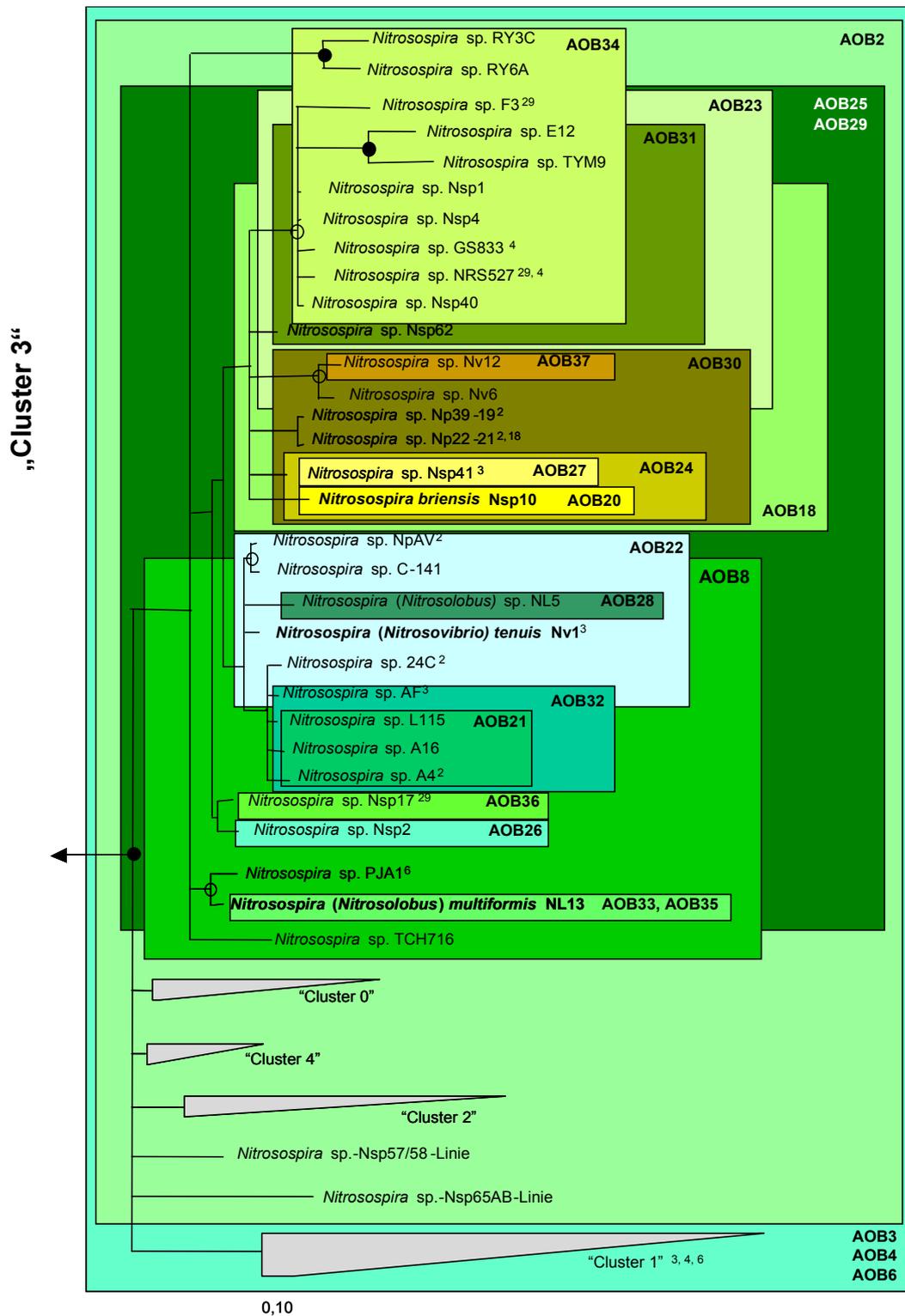


Abb. 22 Auf 16S-rRNS-Sequenzen basierender, phylogenetischer Konsensusbaum für *Nitrospira*-Entwicklungslinien innerhalb der AOB (Koops *et al.*, 2003; Purkhold *et al.*, 2003). Detaillierte Darstellung der Erfassung von AOB-Reinkulturen innerhalb des sog. „Clusters 3“ mit spezifischen sowie übergeordneten AOB-Sonden. Die hinter Organismen- bzw. „Cluster“-Namen hochgestellten Zahlen <sup>2, 3, 4, 6, 18 bzw. 29</sup> beziehen sich auf entsprechend nummerierte AOB-Sonden (AOB2, AOB3, AOB4, AOB6, AOB18 bzw. AOB29) und weisen darauf hin, dass jene Organismen(gruppen) von diesen Sonden nicht (vollständig) erfasst werden. Die aus historischen Gründen noch geläufigen Gattungsnamen der *Nitrospira*-Organismen *Nitrosolobus* und *Nitrosovibrio* sind in Klammern angegeben. Beschriebene Spezies sind **fett** hervorgehoben.



An dieser Stelle sollte erwähnt werden, dass alle nachfolgenden Versuche (mangels einer Klimaanlage) in nicht klimatisierten Räumen zum Zeitpunkt (Juli und August 2003) ungewöhnlich hoher Außentemperaturen (30-40°C) durchgeführt wurden. Diese Tatsache wirkte sich nachteilig sowohl auf alle temperaturempfindlichen Experimente, insbesondere Hybridisierungen, aber auch Fluoreszenzmarkierung von Nukleinsäuren, als auch die dafür verwendeten Geräte aus. So traten in diesem Zeitraum ungünstigerweise immer wiederkehrende technische Mängel am verfügbaren Arrayspotter auf, die vom technischen Service nicht einwandfrei behoben werden konnten.

### ***C.V.2.a Evaluierung des AOB-Mikroarrays mit PCR-amplifizierten 16S-rRNS-Genen aus AOB-Reinkulturen***

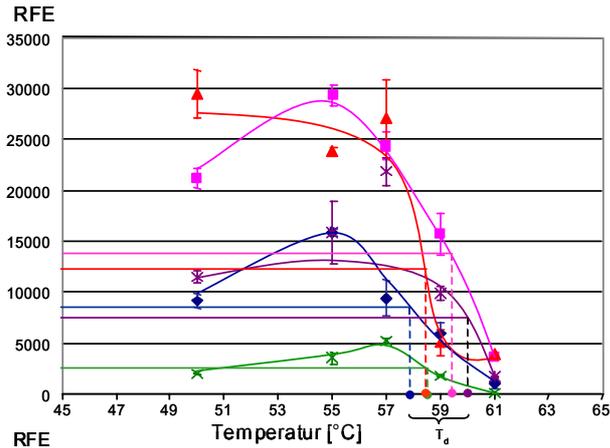
#### Dissoziationsreihen mit PCR-amplifizierten 16S-rRNS-Genen aus AOB-Reinkulturen

Zunächst wurde das Temperatur-abhängige Dissoziationsverhalten von fluoreszenzmarkierten 16S-rRNS-Genamplifikaten von *N. europaea*, *N. eutropha*, *N. oligotropha*, Nm41 (*N.-communis*-Stamm) sowie Nsp40 (*Nitrosospira*-, „Cluster 3“) und ihren Sondenpendants auf dem AOB-Mikroarray analysiert, um Hinweise auf optimale Hybridisierungs- und Waschbedingungen zu erhalten. Dafür wurde für jeden Referenzorganismus und für jede Temperaturstufe innerhalb des Temperaturintervalls von 50 bis 61°C ein separater Mikroarray verwendet. Zu Ermittlung optimaler Stringenzbedingungen wurden zum einen die Fluoreszenzintensitäten ausgewählter Sonden von jedem der fünf Referenzorganismen gegen die (Wasch-) Temperatur in jeweils ein Diagramm aufgetragen (Abb. 24). Zum anderen wurden, für jeden Referenzorganismus separat, Fluoreszenzwerte aller PM-, 1MM- und 2MM-Sonden, mit denen positive Signale innerhalb des untersuchten Waschtemperaturintervalls detektiert wurden, gegen die Waschtemperatur in jeweils ein Diagramm eingezeichnet (Abb. 25).

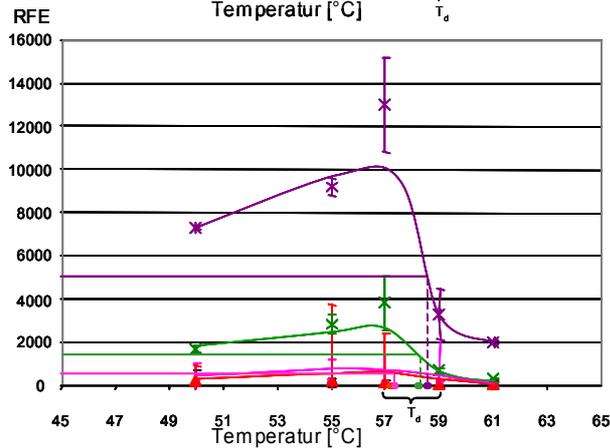
Erwartungsgemäß konnte zunächst beobachtet werden, dass perfekt bindende (Perfect Match=PM) Sonden für die meisten AOB, wie EUB338, UnivA, sowie AOB6, positive Hybridisierungssignale im Bereich von 50-59°C lieferten (Abb. 24 und Abb. 25), während SONDENSIGNALE für die meisten Nichtzielorganismen ausblieben. Gleichzeitig wurde dabei festgestellt, dass für die einzelnen PM-Sonden beträchtliche Signalintensitätsunterschiede bei Verwendung verschiedener Referenzstämmen auftraten. Für die Sonde AOB6 konnte der maximale Unterschied zwischen den Referenzstämmen Nm50 und Nm45 festgestellt werden, der bei Faktor 15 lag (Abb. 24). Zudem fiel auf, dass erwartete SONDENSIGNALE in Gegenwart

ihrer Zielsequenzen gelegentlich ausblieben (Tab. 7). Diese Probleme konnten trotz Wiederholung einzelner Experimente nicht gelöst werden und wurden zumindest zum Teil auf die erhöhte Temperatur im Laboratorium sowie die gerätetechnischen Mängel zurückgeführt. Darüber hinaus zeigte sich dass, wie erwartet, die Fluoreszenzwerte von PM-Sonden zumeist höher als die der fehlgepaarten Hybride lagen, so dass die meisten, wenn auch nicht alle fehlgepaarten Duplices diskriminiert werden konnten (Abb. 25).

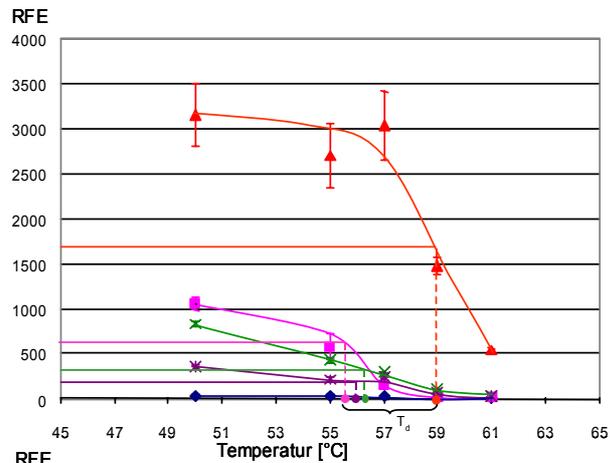
Abb. 24 Graphische Darstellung von Dissoziationsreihen durchgeführt mit PCR-amplifizierten 16S-rRNS-Genen von fünf Referenzorganismen innerhalb des Waschtemperaturintervalls von 50 bis 61°C. Zu diesem Zweck wurden Schmelzkurven für vier ausgewählte Sonden angefertigt, indem jeweils die mittleren, relativen Fluoreszenzeinheiten (RFE) der fünf untersuchten Referenzorganismen gegen die jeweilige Waschtemperatur aufgetragen wurden. Zu Ermittlung optimaler Stringenzbedingungen wurden Dissoziationstemperaturen anhand der einzelnen Schmelzkurven graphisch bestimmt. Der Fehlerbalken steht für Standardabweichung, die aus Sondentriplikaten ermittelt wurde. Neben den Diagrammen wurde das Alignment der jeweiligen Sequenzen für die einzelnen Sondenpositionen aufgetragen und gegebenenfalls die Basenfehlpaarungen eingetragen. „X“: Deletion.



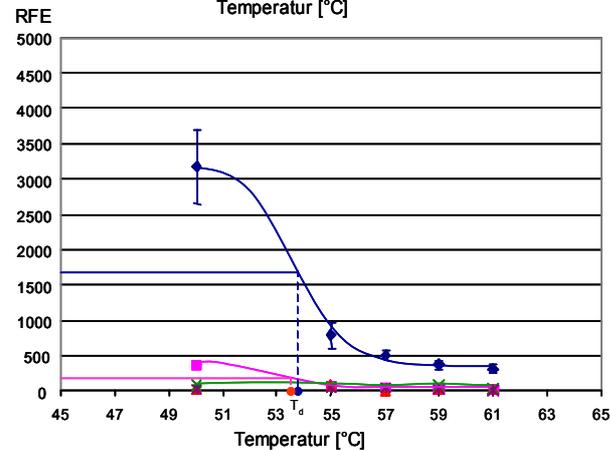
**Sonde AOB6**  
 3'-5' TGT GCA TTA TGT TAC CGC  
 ◆ *Nitrosospira sp. Nsp40* "=== === === === === ==="  
 ▲ *N. oligotropha* "=== === === === === ==="  
 × *N. europaea* "=== === === === === ==="  
 × *N. eutropha* "=== === === === === ==="  
 ■ *Nitrosomonas sp. Nm41* "=== === === === === ==="



**Sonde AOB83**  
 3'-5' AGG GAC CCA ACT GTG ACT  
 × *N. europaea* "=== === === === === ==="  
 × *N. eutropha* "=== === === === === ==="  
 ◆ *Nitrosospira sp. Nsp40* "C== === === =A= === ==="  
 ■ *Nitrosomonas sp. Nm41* "=== === === =A= === ==="  
 ▲ *N. oligotropha* "=== X== ==C =AG === ==="



**Sonde AOB58**  
 3'-5' ACC TTC TTG TAG CTA CCG  
 ▲ *N. oligotropha* "=== === === === === ==="  
 × *N. europaea* "=== === === =C= === ==="  
 × *N. eutropha* "=== === === =C= === ==="  
 ■ *Nitrosomonas sp. Nm41* "=== === === =C= === ==="  
 ◆ *Nitrosospira sp. Nsp40* "=== =G= === =C= === ==="



**Sonde AOB23**  
 3'-5' TGC ATA GAA GTT CAC CCC  
 ◆ *Nitrosospira sp. Nsp40* "=== === === === === ==="  
 ■ *Nitrosomonas sp. Nm41* "=== === === G== === ==="  
 ▲ *N. oligotropha* "=== =G= =C= G== === ==="  
 × *N. europaea* "=== =G= =C= U== === ==="  
 × *N. eutropha* "=== =G= =C= U== === ==="

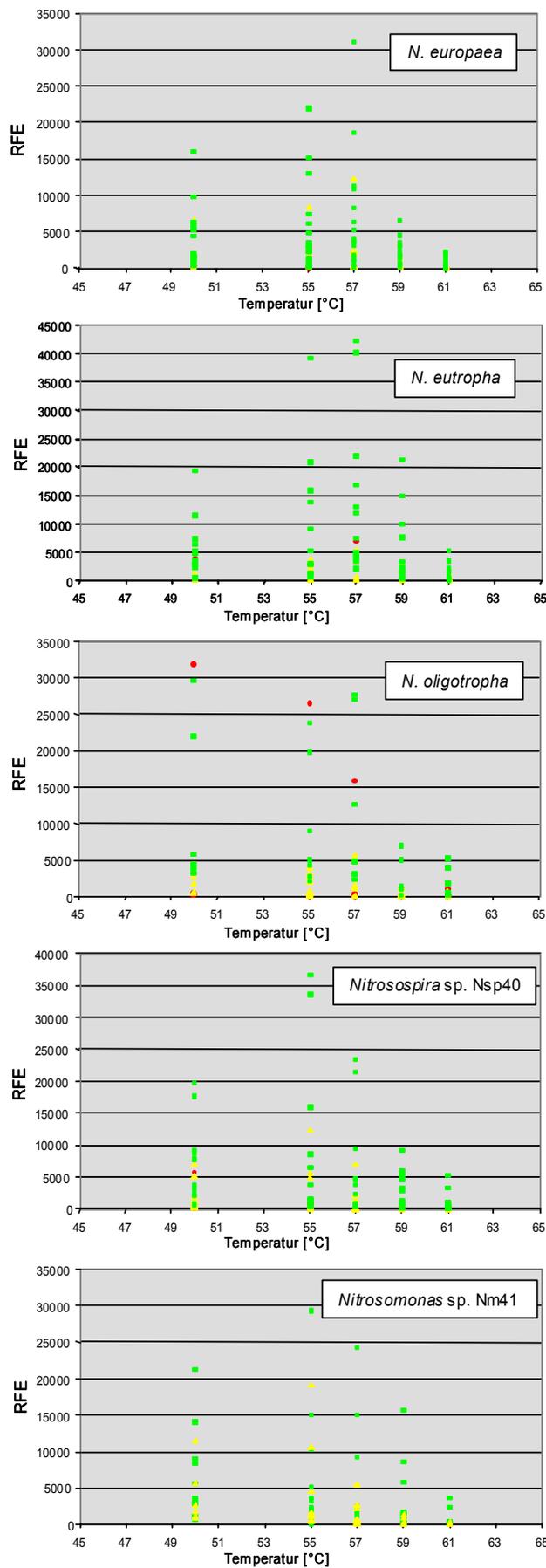


Abb. 25 Graphische Darstellung mittlerer, relativer Fluoreszenzeinheiten für alle PM- 1MM, sowie 2MM-Sonden, mit denen positive Fluoreszenzsignale (zumindest bei geringer Stringenz) nach Hybridisierung und Waschung innerhalb des Temperaturintervalls von 50 bis 61°C mit PCR-amplifizierten 16S-rRNS-Genen von fünf Referenzorganismen erzielt wurden. Grüne Symbole indizieren PM, gelbe Symbole 1MM und rote Symbole 2MM zwischen Sonde und dem Referenzorganismus.

Die (graphisch) ermittelten Schmelztemperaturen ( $T_d$ ) für die verschiedenen Hybridtypen bewegten sich im Bereich von 55 bis 59°C, demzufolge für weitere Hybridisierungen eine Waschtemperatur von 57°C als Kompromisslösung zwischen Spezifität und Sensitivität gewählt wurde.

#### Hybridisierungen mit PCR-amplifizierten 16S-rRNS-Genen aus AOB-Reinkulturen

Für die Bestimmung der Spezifität und Sensitivität des AOB-Mikroarrays wurden Hybridisierungen mit fluoreszenzmarkierten 16S-rRNS-Genamplifikaten von 34 AOB-Referenzorganismen, gefolgt von einer stringenten Waschung bei 57°C durchgeführt. Nach einem Fluoreszenzscan und digitaler Bildanalyse wurden die Sondensignale unter Anwendung der Formel für den sog. T-Wert (Loy *et al.*, 2002) interpretiert. Lag das Signalintensitätsverhältnis „T“ (Formel 1, S.37) von Sonde (abzüglich des NONSENSE-Sondensignals) zu ihrem lokalen Hintergrund bei größer oder gleich 2,0, so wurde das Sondensignal als positiv gewertet.

Bei Betrachtung der erzielten Ergebnisse auf dem AOB-Mikroarray mit PCR-amplifizierten 16S-rRNS-Genen aus AOB-Reinkulturen konnte generell (Tab. 7) festgestellt werden, dass zwischen der überwiegenden Mehrheit an PM-Sonden und ihren Zielsequenzen erfolgreiche Hybridisierungen stattfanden, wohingegen für die Mehrzahl von MM-Sonden und Nichtzielsequenzen keine Hybridisierungssignale detektierbar waren. So erwiesen sich 32 von insgesamt 123 AOB-spezifischen Sonden als absolut spezifisch, da sie ausschließlich mit ihren Zielsequenzen hybridisierten und/oder keine Hybride mit Nichtzielsequenzen bildeten (Tab. 7). Ferner fiel auf, dass bei acht Sonden zwar keine falsch positiven Signale mit Nichtzielsequenzen detektierbar waren, es aber vereinzelt zu unerwarteten falsch negativen Signalen in Gegenwart von Zielsequenzen kam, was vermutlich auf das Versagen vom Arrayspotter und/oder der erhöhten Raumtemperatur zurückzuführen war. Bei 17 anderen Sonden blieben die erwarteten Signale in Anwesenheit ihrer PCR-amplifizierten 16S-rRNS-Zielsequenzen gänzlich aus, wobei neun von diesen 17 Sonden ebenso wenig mit Nichtzielsequenzen hybridisierten (Tab. 7). Zehn dieser 17 Sonden bildeten jedoch Duplices mit ihren Zielsequenzen auf *in-vitro*-transkribierter rRNS (C.V.2.b und Tab. 8), wohingegen bei sieben Sonden (AOB41, AOB50, AOB59, AOB89, AOB97, AOB102, AOB110) niemals korrekte Duplexbildung beobachtet wurde (Tab. 7 und Tab. 8), so dass davon ausgegangen werden kann, dass sie als Mikroarray-Sonden nicht geeignet sind. Mangels verfügbarer Referenzorganismen konnten für 25 Sonden keine näheren Angaben über ihre Spezifität getroffen werden, während bei Hybridisierungen mit Nichtziel-AOB-Sequenzen für 16 dieser

Sonden keine unspezifischen Signale gemessen wurden. Zudem traten bei 41 Sonden falsch positive Hybridisierungssignale auf. In diesen Fällen gelang es unter den gewählten Bedingungen nicht, Hybridbildung mit Nichtzielsequenzen, die eine bis fünf Basenfehlpaarungen zu den jeweiligen Sonden aufweisen, zu verhindern. Besonders auffallend waren dabei die Sonden AOB81, AOB78 sowie AOB42, die in bis zu 41% aller Hybridisierungen falsch positive Ergebnisse lieferten (Tab. 7) und daher für zukünftige Untersuchungen vom AOB-Mikroarray entfernt werden sollten.

Tab. 7 Übersicht über die Hybridisierungsergebnisse erzielt auf dem AOB-Mikroarray mit PCR-amplifizierten 16S-rRNS-Genen von 34 Referenzorganismen bei einer Waschttemperatur von 57°C. Die Art des detektierten Signals (0MM bis mehr als 5MM) auf dem Array wurde farblich gekennzeichnet. Bei Signalen trotz Basenfehlpaarung(en) wurden zusätzlich die Positionen der fehlpaarenden Sondenbasen (in 5'-3'-Richtung auf der Sonde) mit der 16S rRNS angegeben. Die unten abgesetzten Sonden (AOB42, AOB78, AOB81) sollten aufgrund ihrer hohen Unspezifitäten aus dem AOB-Sondensatz entfernt werden.



### ***C.V.2.b Evaluierung des AOB-Mikroarrays mit in-vitro-transkribierter 16S rRNS aus AOB-Reinkulturen***

#### Dissoziationsreihen mit in-vitro-transkribierter 16S rRNS aus AOB-Reinkulturen

Neben 16S-rRNS-Genamplifikaten sollte künftig ebenfalls rRNS auf dem AOB-Mikroarray hybridisiert werden. Zu Bestimmung optimaler Stringenzbedingungen wurden zunächst Testreihen mit fluoreszenzmarkierter, *in-vitro*-transkribierter und – im Unterschied zu den Experimenten mit dem AOB-Mikroarray-Prototyp – nach (Bodrossy *et al.*, 2003) fragmentierter 16S rRNS aus zwei Referenzorganismen *Nitrosomonas europaea* und *Nitrosococcus mobilis* durchgeführt. Aufgrund unterschiedlicher Hybridisierungssysteme für rRNS (B.XIX.2) bzw. PCR-Genamplifikate (B.XIX.1) wurde die Stringenz in diesen Dissoziationsversuchen mittels steigender Formamid-Konzentration im Hybridisierungspuffer reguliert. Die Hybridisierungen fanden im Bereich von 10 bis 25% (v/v) Formamid bei 42°C statt, denen ein Waschschriff bei Raumtemperatur folgte. Dabei wurde für jeden Referenzorganismus und Stringenzstufe ein separater Array verwendet.

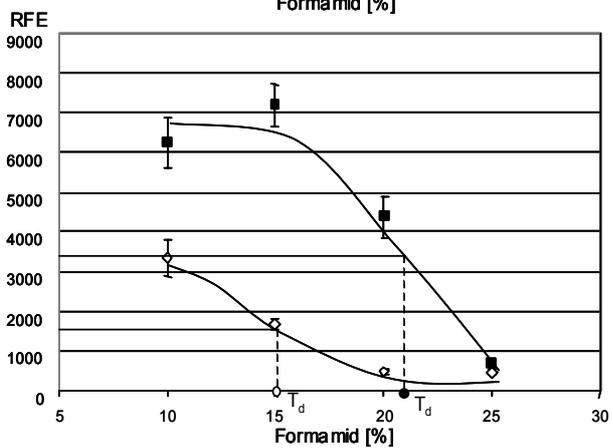
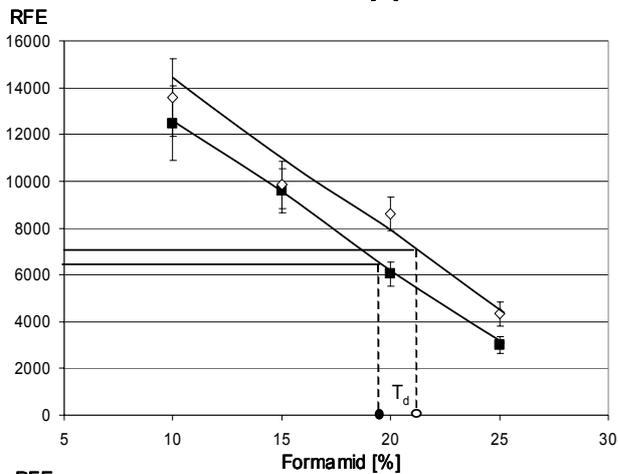
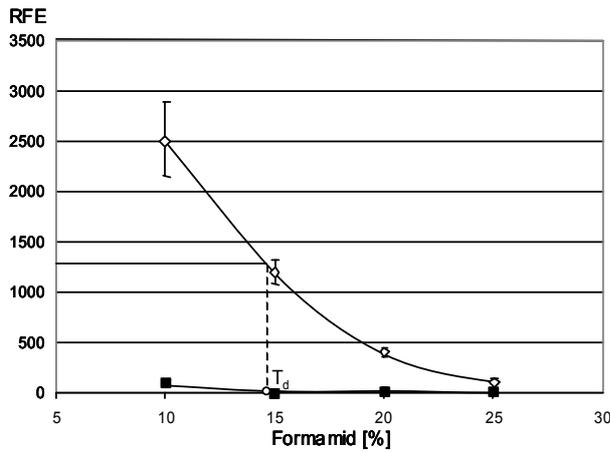
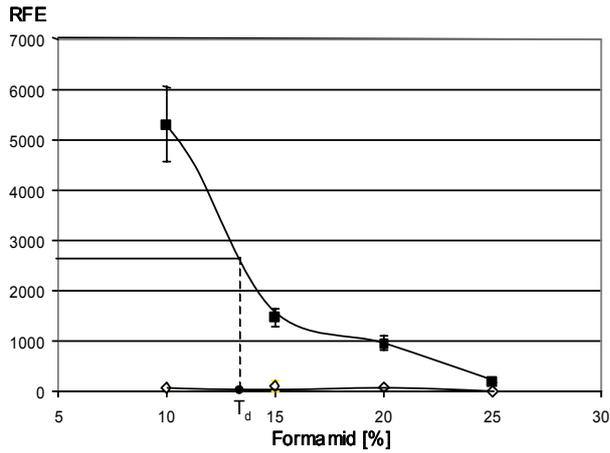
Analog zu Evaluierung PCR-amplifizierter 16S-rRNS-Gene von AOB wurde auch das Schmelzverhalten *in-vitro*-transkribierter 16S rRNS beider Referenzorganismen ausgewertet. Zu diesem Zweck wurden nach dem Fluoreszenzscan und digitaler Bildanalyse zum einen die Fluoreszenzintensitäten ausgewählter Sonden für beide Referenzorganismen gegen die Formamid-Konzentration aufgetragen (Abb. 26). Zum anderen wurden jeweils für *N.-europaea*- bzw. *Nc.-mobilis*-rRNS Fluoreszenzwerte aller PM-, 1MM- und 2MM-Sonden, mit denen positive Signale innerhalb des untersuchten Stringenzbereichs ermittelt wurden, gegen die Formamid-Konzentration im Hybridisierungspuffer graphisch dargestellt (Abb. 27).

Einerseits konnte festgestellt werden, dass für übergeordnete, wie EUB338 und UnivA, sowie AOB-spezifische, wie AOB3 oder AOB5, PM-Sonden positive Signale in Hybridisierungen mit beiden Referenzstämmen und bei allen getesteten Stringenzbedingungen detektiert werden konnten, während unspezifische Signale größtenteils ausblieben. Wie bereits für die PCR-amplifizierten 16S-rRNS-Gene beobachtet, wurden auch hier Abweichungen in Fluoreszenzintensitätswerten zwischen den beiden Referenz-rRNS für einzelne PM-Sonden (EUB338, UnivA, AOB3, AOB5) bis zu einem Faktor von 3,5 deutlich. Andererseits blieben wider Erwarten Hybridisierungssignale einiger PM-Sonden bereits bei geringen Stringenzen (AOB1, AOB89, AOB83, AOB79) unter dem Schwellenwert von  $T=2,0$ . Sowohl Schwankungen von Signalintensitäten als auch Ausfall von PM-Sondensignalen sind vermutlich auf gerätetechnische Mängel bei Herstellung der Mikroarrays und/oder

unterschiedliche Fluoreszenzmarkierungseffizienz Abb. 26 eventuell als Folge erhöhter Raumtemperatur zurückzuführen.

Darüber hinaus gelang es aufgrund wesentlich deutlicher Unterschiede in der Signalintensität mit Hilfe von T-Werten zwischen den meisten, wenn auch nicht allen, fehlgepaarten von korrekt gepaarten Hybriden zu differenzieren (Abb. 26). Folglich wurden anhand der Graphen (Abb. 26 und Abb. 27) Schmelzpunkte für die verschiedenen Hybride ermittelt, welche zumeist im Bereich von 15 bis 20% (v/v) Formamid lagen. Mit den zugrunde liegenden Ergebnissen wurde 15% (v/v) Formamid im Hybridisierungspuffer als geeignete Kompromisslösung zwischen Spezifität und Sensitivität erachtet (Abb. 26) und für künftige Hybridisierungen mit rRNS auf dem AOB-Mikroarray eingesetzt.

Abb. 26 Graphische Darstellung von Dissoziationsreihen durchgeführt mit *in-vitro*-transkribierten 16S-rRNS-Genen von zwei Referenzorganismen innerhalb der getesteten Formamid-Konzentrationen im Hybridisierungspuffer zwischen 10 und 25% (v/v). Für vier ausgewählte Sonden wurden Schmelzkurven angefertigt, indem jeweils die mittleren, relativen Fluoreszenzeinheiten (RFE) der beiden untersuchten Referenzorganismen gegen die jeweiligen Formamid-Konzentrationen im Hybridisierungspuffer aufgetragen wurden. Zu Ermittlung optimaler Stringenzbedingungen wurden Dissoziationspunkte anhand der einzelnen Schmelzkurven graphisch bestimmt. Der Fehlerbalken steht für Standardabweichung, die aus Sondentriplikaten ermittelt wurde. Neben den Diagrammen wurde das Alignment der jeweiligen Sequenzen für die einzelnen Sondenpositionen aufgetragen und gegebenenfalls die Basenfehlpaarungen eingetragen.



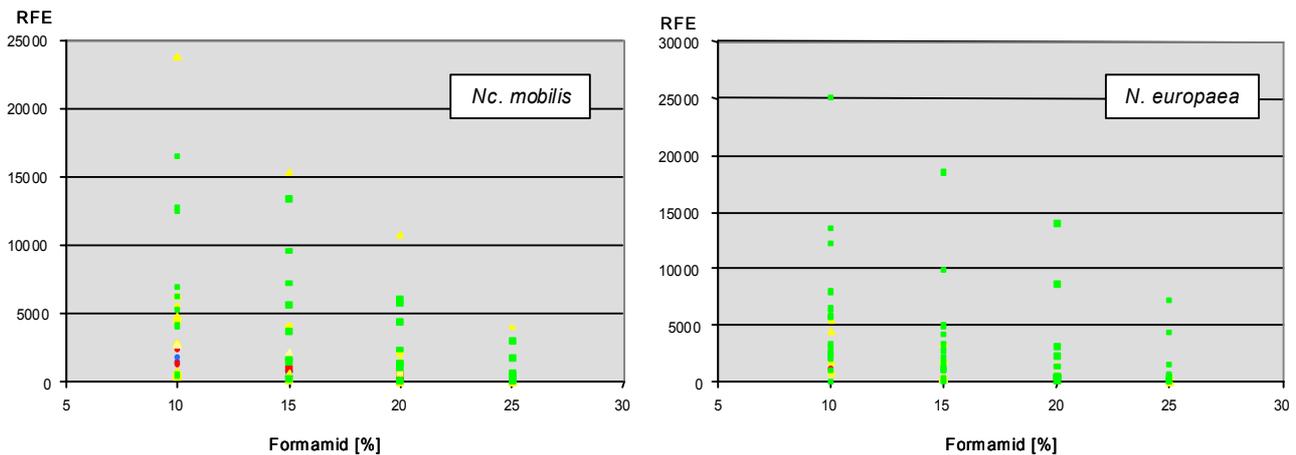


Abb. 27 Graphische Darstellung mittlerer, relativer Fluoreszenzeinheiten für alle PM- 1MM-, 2MM- sowie 3MM-Sonden, mit denen positive Fluoreszenzsignale (zumindest bei geringer Stringenz) bei Hybridisierungen mit einem Formamid-Gehalt im Hybridisierungspuffer zwischen 10 und 25% (v/v) mit *in-vitro*-transkribierten 16S-rRNS-Genen von zwei Referenzorganismen erzielt wurden. Grüne Symbole indizieren PM, gelbe Symbole 1MM, rote Symbole 2MM und blaue Symbole 3MM zwischen Sonde und dem Referenzorganismus.

#### Hybridisierungen mit *in-vitro*-transkribierter 16S rRNS aus AOB-Reinkulturen

In folgendem Schritt wurde der AOB-Mikroarray bei 15% (v/v) Formamid im Hybridisierungspuffer mit *in-vitro*-transkribierter 16S rRNS aus 29 AOB-Referenzstämmen getestet. Ausgehend von insgesamt 123 AOB-spezifischen Sonden konnten 29 als absolut spezifisch klassifiziert werden, da sie mit allen Zielsequenzen hybridisierten und/oder keine Hybride mit Nichtzielsequenzen bildeten (Tab. 8). Für drei weitere Sonden wurden ebenso keine falsch positiven Signale detektiert, allerdings wurden für einige ihrer Zielsequenzen falsch negative Signale beobachtet. Bei 16 anderen Sonden blieben die spezifischen Signale in Anwesenheit ihrer *in-vitro*-transkribierten 16S-rRNS-Zielsequenzen aus, während 14 davon auch keine unspezifischen Signale lieferten. Für neun der 16 Sonden wurde jedoch eine Duplexbildung mit PCR-amplifizierten 16S-rRNS-Zielsequenzen beobachtet (C.V.2.a und Tab. 7). Aufgrund nicht erhältlicher Referenzorganismen konnte die Sensitivität von 36 Sonden nicht ermittelt werden (Tab. 8). In Anwesenheit von Nichtziel-AOB-Sequenzen wurde jedoch festgestellt, dass 23 dieser 36 Sonden keine unspezifische Bindung eingingen. Für die verbleibenden 39 Sonden wurde zwar korrekte Hybridbildung mit Zielsequenzen beobachtet, jedoch gleichzeitig falsch positive Signale mit Nichtzielsequenzen, die eine bis mehr als fünf Basenfehlpaarungen aufwiesen, gemessen. Dabei fielen insbesondere die Sonden AOB99, AOB51, AOB66, und AOB81 durch hohe Unspezifität auf, da sie in 55 bis 93% aller Hybridisierungen zu falsch positiven Ergebnissen führten (Tab. 8) und künftig aus dem AOB-Sondensatz entfernt werden sollten.

Tab. 8 Übersicht über die Hybridisierungsergebnisse erzielt auf dem AOB-Mikroarray mit *in-vitro*-transkribierter rRNS von 29 Referenzorganismen bei einer Stringenz von 15% Formamid (v/v) im Hybridisierungspuffer. Die Art des detektierten Signals (0MM bis mehr als 5MM) auf dem Array wurde farblich gekennzeichnet. Bei Signalen trotz Basenfehlpaarung(en) wurden zusätzlich die Positionen der fehlpaarenden Sondenbasen (in 5'-3'-Richtung auf der Sonde) mit der 16S rRNS angegeben. Die unten abgesetzten Sonden (AOB51, AOB66, AOB81, AOB99, AOB101) sollten aufgrund ihrer hohen Unspezifitäten aus dem SONDENSATZ entfernt werden.



## C.VI DER ISOTOPE ARRAY

Die Hybridisierungen mit Reinkulturen zeigten, dass für die überwiegende Mehrzahl der Sonden auf dem AOB-Mikroarray korrekte Hybridisierungssignale erzielt wurden. Wie im vorigen Kapitel beschrieben, traten jedoch vereinzelt unerwartete Signalausfälle in Gegenwart von Zielsequenzen auf. Dies wurde einerseits auf die zum Versuchszeitpunkt herrschende, erhöhte Raumtemperatur, andererseits auf die (evtl. dadurch verursachte) Fehlfunktion des Arrayspotters zurückgeführt. Zum Zeitpunkt der Austestung des AOB-Mikroarrays mit Reinkulturen konnte dieses Problem nicht hinreichend behoben werden und schränkte folglich die Qualität seiner Evaluierung ein. Da im Rahmen dieser Arbeit die Eignung des AOB-Mikroarrays für Diversitätsanalysen von AOB in Umweltproben ebenfalls untersucht werden sollte, musste diese Einschränkung in Kauf genommen werden.

Die Tauglichkeit des AOB-Mikroarrays zu Analyse von Umweltproben wurde anhand radioaktiv markierter Belebtschlammproben zweier Kläranlagen (Aalborg West und Oberding), deren AOB-Populationen mit vergleichender *amoA*-Gensequenz- sowie quantitativer FISH-Analyse bereits für den Prototyp des Isotope Arrays charakterisiert wurden (Abb. 5 und Abb. 6), beurteilt. Zudem bestand die Gelegenheit, den neu entworfenen AOB-Mikroarray als Isotope Array einzusetzen, und die Resultate mit denen seines Prototyps (Abb. 9) zu vergleichen bzw. sie mit bereits durchgeführten FISH-MAR-Analysen zu validieren (Abb. 6). Mit Hilfe eines automatischen Arrayspotters, der Spots mit einem Durchmesser von 300 µm erzeugte, wurden AOB-Mikroarrays in einem abgewandelten Raster zu dem bestehenden Array hergestellt (Abb. 28). Da mit dem verwendeten Arrayspotter keine Sondentriplikate für das gewünschte Raster auf der verfügbaren Hybridisierungsfläche des Objektträgers erzeugt werden konnten, wurde ein Array mit Spotduplikaten hergestellt.

Die Hybridisierungen wurden auf dem AOB-Mikroarray bei 15% (v/v) Formamid mit jeweils 500 ng fluoreszenzmarkierter und fragmentierter (Bodrossy *et al.*, 2003) rRNS, die zuvor aus aktiven bzw. mit Allylthioharnstoff inhibierten Belebtschlammproben der Kläranlagen Aalborg West sowie Oberding extrahiert wurde, durchgeführt. Nach Fluoreszenz- bzw. Radioaktivitätsscans und anschließender digitaler Bildanalyse wurden diejenigen Sondensignale als positiv gewertet, deren T-Werte (Formel 1, S.37) größer oder gleich 2,0 waren. Darüber hinaus wurden für die einzelnen Sonden A-Werte (C.IV und Formel 2, S.52 (Adamczyk *et al.*, 2003) berechnet, indem die Radioaktivitätswerte (abzüglich des Hintergrundsignals) zu Fluoreszenzwerten (abzüglich des Hintergrundsignals) ins Verhältnis gesetzt wurden.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24		
A	CONT	AOB4	AOB11	AOB12	AOB13	AOB15	CONT	AOB25	AOB34	AOB23	AOB31	AOB30	AOB80	AOB55	AOB59	AOB56	AOB51	AOB53	AOB46	AOB47	AOB48	EUB338	NonEUB	NS		
	Kontrolle	BAOB	Cluster 1	Cluster 1	Cluster 1	Cluster 1	Kontrolle	Cluster 3	Cluster 6a	Cluster 5	Cluster 5	Cluster 5	Bacteria	Kontrolle	Kontrolle											
B	AOB9	AOB16	AOB14	AOB10	EUB338	NonEUB	AOB24	AOB27	AOB20	AOB37	AOB32	AOB21	AOB57	AOB62	AOB49	AOB54	AOB50	AOB52	AOB95	AOB96	AOB98	AOB103	AOB106	AOB99		
	Cluster 1	Cluster 1	Cluster 1	Cluster 1	Bacteria	Kontrolle	Cluster 3	Cluster 6a	Cluster 6b	Cluster 6a	Cluster 6a	Cluster 6a	Cluster 6a	Cluster 8												
C	NS	AOB42	AOB41	AOB7	AOB39	AOB8	AOB22	AOB28	AOB26	AOB36	AOB33	AOB35	AOB58	AOB70	AOB69	AOB68	AOB64	AOB65	AOB93	AOB102	AOB107	AOB105	AOB101	AOB97		
	Kontrolle	Nsp57/58	Nsp57/58	Cluster 0	Cluster 4	Cluster 0	Cluster 3	Cluster 6ab	Cluster 6b	Cluster 8																
D	AOB17	AOB19	AOB29	AOB18	AOB40	AOB38	AOB43	AOB44	AOB45				AOB67	AOB66	AOB63	AOB61		CONT	AOB91	AOB92	AOB94	AOB104	AOB100	CONT		
	Cluster 2	Cluster 2	Cluster 3	Cluster 2	Cluster 4	Cluster 4	Nsp65AB	Nsp65AB	Nsp65AB				Cluster 6b	Cluster 6b	Cluster 6b	Cluster 6b		Kontrolle	Cluster 8	Kontrolle						
E	CONT	AOB77	AOB81	AOB88	AOB83	AOB85	CONT	AOB108	AOB109	AOB111	AOB110			EUBII	EUBIII	UNIVa	UNIVb	UNIVc			EUB338	NonEUB	NS	AOB122	AOB121	AOB123
	Kontrolle	Cluster 7	Kontrolle	Cluster 9	Cluster 9	Cluster 9	Cluster 9			Bacteria	Bacteria	Life	Life	Life			Bacteria	Kontrolle	Kontrolle	GAOB	GAOB	GAOB				
F	AOB75	AOB78	AOB79	AOB80	AOB76	AOB86	AOB112	AOB113	AOB114		AOB115	AOB116	AOB5	AOB3	AOB2	AOB6	AOB1		AOB119	AOB120	AOB117	AOB118				
	Cluster 7	Nm55	Nm55	Nm55		ar	ar	BAOB	BAOB	BAOB	BAOB	BAOB		GAOB	GAOB	GAOB	GAOB									
G	AOB71	AOB74	AOB82	AOB87	EUB338	NonEUB																				
	Cluster 7	Cluster 7	Cluster 7	Cluster 7	Bacteria	Kontrolle																				
H	NS	AOB73	AOB84	AOB72	AOB89	AOB90													CONT					CONT		
	Kontrolle	Cluster 7													Kontrolle					Kontrolle						

Abb. 28 Schematische Darstellung des Isotope Arrays. In den jeweils oberen Hälften der Felder A bis H befindet sich die Sondenbezeichnung, während direkt darunter die Spezifität der jeweiligen Sonden –teilweise abgekürzt– angegeben ist. Die Sondenspezifitäten wurden, wie folgt, abgekürzt: „BAOB“ bezieht sich auf die übergeordneten, Beta-AOB-spezifischen Sonden, während durch „GAOB“ alle Gamma-AOB-spezifischen Sonden bezeichnet wurden. Ferner steht „Nm55“ für *N.-cryotolerans*-spezifische Sonden; „ar“ bezeichnet die gegen die tiefzweigenden ar-Klonesequenzen (ar5a, AJ297417; ar50304, AJ297415 sowie ar3a, AJ297416) gerichteten Sonden. Als „Bacteria“ bzw. „Life“ wurden diejenigen Sonden bezeichnet, welche die Mehrzahl aller bekannten Bakterien (Sequenzen) bzw. lebender Organismen (Sequenzen) erfassen. „NS“ NONSENSE. Alle Sonden wurden in Duplikaten gespottet, indem die Sondenblöcke A bis D bzw. E bis H jeweils zweimal untereinander angeordnet wurden.

### C.VI.1 Isotope-Array-Experimente mit rRNS aus der Kläranlage Aalborg West

Wie aus quantitativer FISH- (C.III.2) bzw. vergleichender *amoA*-Gensequenzanalyse (C.III.1), die parallel zu Experimenten mit dem Prototyp des Isotope Arrays durchgeführt wurden, hervorgeht, dominierten *N.-oligotropha*-/*N.-ureae*-verwandte Organismen die AOB-Gemeinschaft des Belebtschlamm aus Aalborg West. Mit Hilfe der FISH-MAR-Analyse (C.III.3) sowie des Isotope-Array-Prototyps (C.IV) konnte zudem die CO<sub>2</sub>-Assimilationsaktivität dieser Organismengruppe aufgezeigt werden. In folgenden Versuchen wurden die Isotope-Array-Hybridisierungen mit rRNS aus Belebtschlamm aus Aalborg West auf dem neu entworfenen AOB-Mikroarray wiederholt.

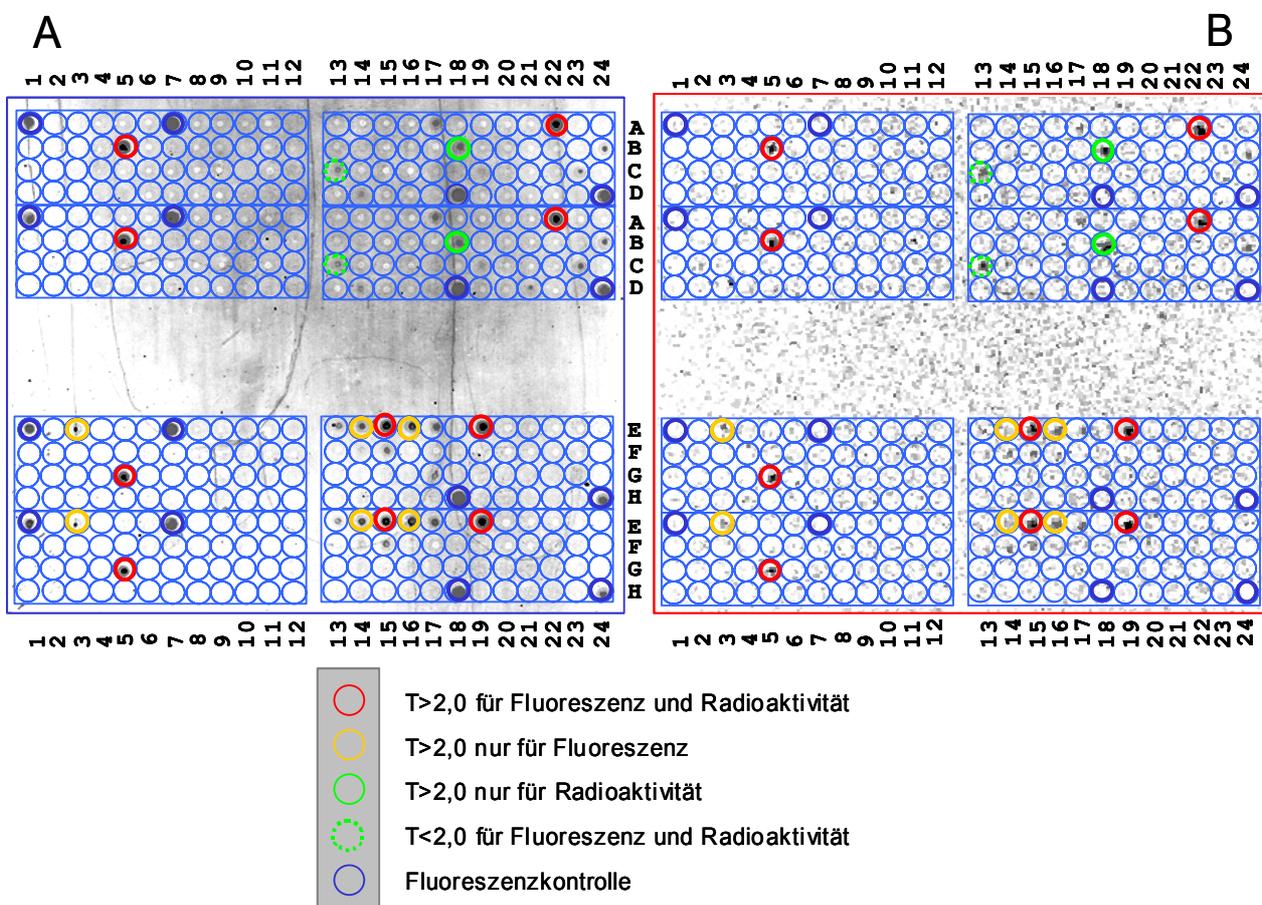


Abb. 29 Hybridisierung auf dem Isotope Array bei 15% (v/v) Formamid im Hybridisierungspuffer mit rRNS aus aktivem Belebtschlamm aus Aalborg West, der für 13 Stunden mit <sup>14</sup>C-Bikarbonat inkubiert wurde. A: Fluoreszenzscan (Cy5), B: Radioaktivitätsscan nach 4-wöchiger Exposition des Objektträgers im  $\mu$  IMAGER™. „T“: T-Wert nach (Loy et al., 2002).

Gemäß dem Fluoreszenzscan (Abb. 29) der Hybridisierung mit rRNS aus dem nicht inhibierten Belebtschlamm aus Aalborg West (13 h mit <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> inkubiert) lagen nur die übergeordneten Sonden EUB338, EUB338III, UnivA und UnivB deutlich über dem

Hintergrund. Zudem wurde ein positives Signal mit der Sonde AOB81 detektiert, jedoch mangels ihrer Spezifität in Tests mit Reinkulturen in der Auswertung nicht berücksichtigt.

Die Messung der Radioaktivität wurde zuerst nach einer 7-, und dann nach einer 30-tägigen Exposition des AOB-Mikroarrays im  $\mu$  IMAGER™ vorgenommen. Nach sieben Tagen konnte noch kein Sondensignal als positiv gewertet werden, da die maximalen T-Werte für die visuell detektierbaren Sonden EUB338, UnivA und AOB52 knapp (1,8 bis 1,9) unter dem Schwellenwert von  $T=2,0$  lagen. Nach einer 4-wöchigen Exposition stiegen die Werte für die übergeordneten Sonden, wie EUB338 und UnivA, sowie für die Sonde AOB52, die *Nitrosomonas-oligotropha*-Verwandte detektiert, in den positiven Bereich (Abb. 29). Für die Sonde AOB58, die Organismen der *N.-oligotropha*-/*N.-ureae*- sowie *N.-marina*-Linien detektiert, lagen zwar die T-Werte für Fluoreszenz bzw. Radioaktivität unterhalb des Schwellenwerts von 2,0, auf dem Radioaktivitätsscan war ihr Signal jedoch visuell detektierbar.

Im Folgenden wurden A-Werte (Formel 2, S.52) für die einzelnen Sonden mit positiven Radioaktivitäts- und/oder Fluoreszenzsignalen berechnet (Tab. 9). Demzufolge erreichte die Sonde AOB52 den höchsten A-Wert (Abb. 30), obwohl ihr Fluoreszenzsignal ( $T=1,4$ ) unter dem Schwellenwert von 2,0 blieb. Dieser Befund deckte sich mit Resultaten der zuvor durchgeführten *amoA*-Gensequenz- (C.III.1), quantitativen FISH- (C.III.2) sowie FISH-MAR-Analysen (C.III.3), die zum einen Präsenz zum anderen hohe  $^{14}\text{CO}_2$ -Assimilationsaktivität von *N.-oligotropha*-verwandten Organismen im Belebtschlamm der Kläranlage Aalborg West bestätigten.

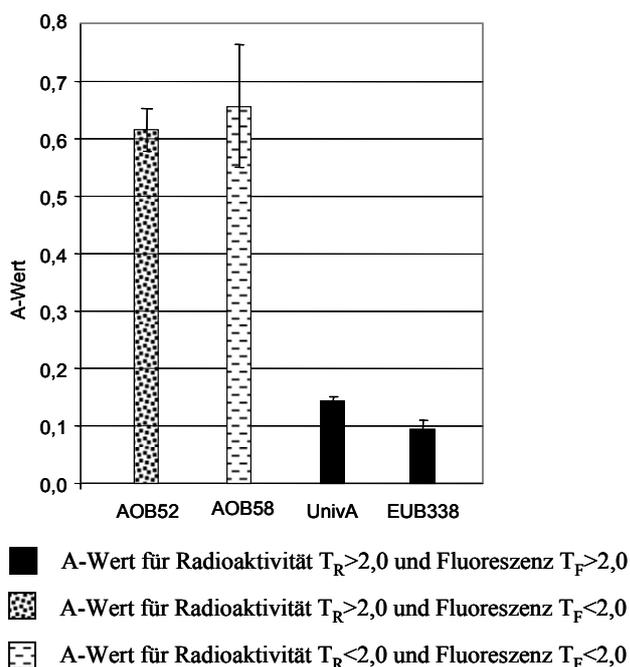


Abb. 30 Graphische Darstellung von A-Werten (Adamczyk *et al.*, 2003) für Sonden, die bei der Hybridisierung mit rRNS aus dem aktiven Belebtschlamm aus Aalborg West bei 15% (v/v) Formamid im Hybridisierungspuffer erzielt wurden. „ $T$ “: T-Wert nach (Loy *et al.*, 2002); „ $T_F$ “: T-Wert für Fluoreszenz; „ $T_R$ “: T-Wert für Radioaktivität.

Nach Fluoreszenzevaluierung der Hybridisierung mit rRNS aus inhibiertem Belebtschlamm wurden ebenso wie für die aktive Probe positive Signale für die übergeordneten Sonden EUB338, UnivA und UnivB gemessen (Tab. 9). Anders als für die aktive wurden für die mit Allylthioharnstoff inhibierte Probe keine positiven Radioaktivitätssignale weder nach sieben noch nach 30 Tagen Exposition des AOB-Mikroarrays im  $\mu$  IMAGER™ gemessen.

Obwohl die Präsenz (C.III.1 und C.III.2) und Aktivität (C.III.3 und C.IV) von *N.-oligotropha*/*N.-ureae*-verwandten Organismen im Belebtschlamm aus Aalborg West bereits zuvor demonstriert wurde, konnte der Nachweis dieser Organismengruppe bei den gewählten Bedingungen auf dem Isotope Array nicht eindeutig erbracht werden, da spezifische Sondensignale wider Erwarten ausblieben. Aus diesem Grund wurde der Versuch bei einer niedrigeren Stringenz, bei 10% (v/v) Formamid im Hybridisierungspuffer erneut durchgeführt (Abb. 31).

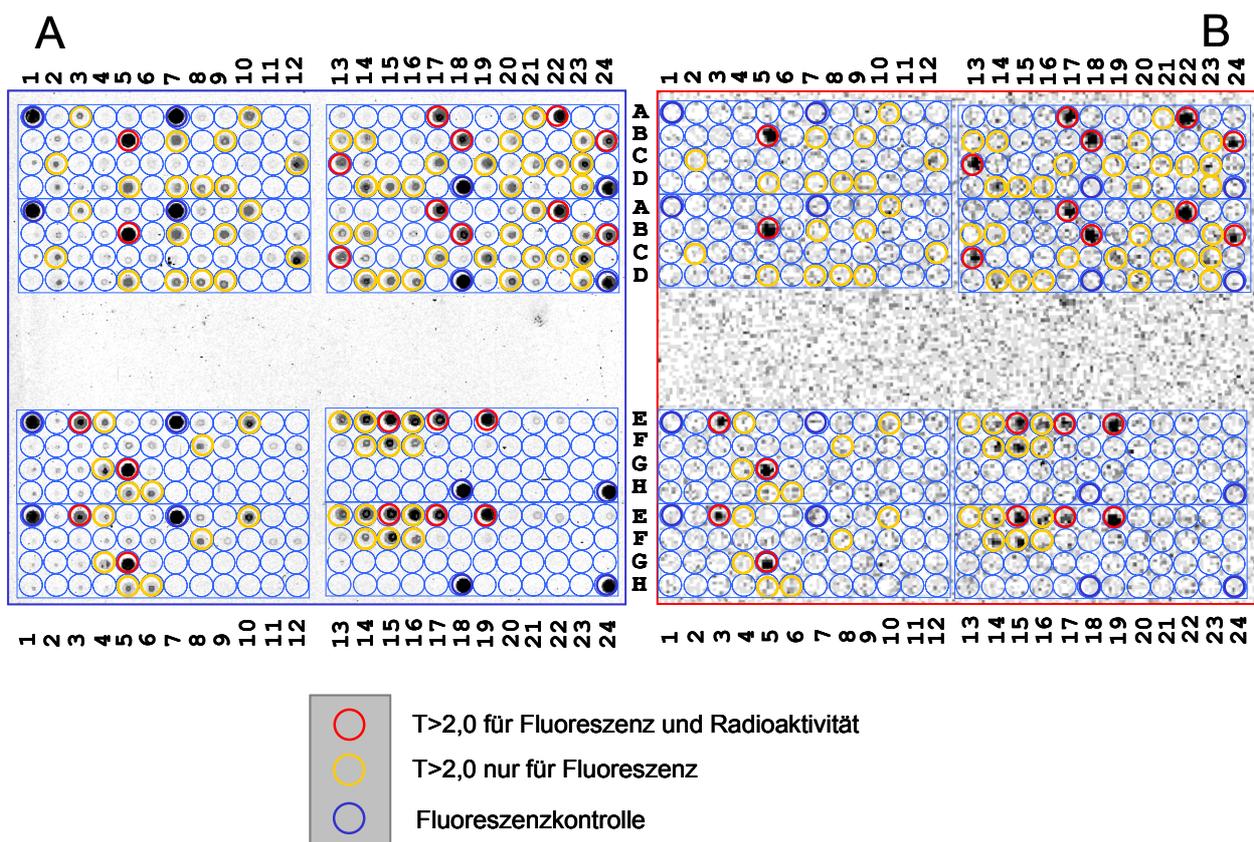


Abb. 31 Hybridisierung auf dem Isotope Array bei 10% (v/v) Formamid im Hybridisierungspuffer mit rRNS aus aktivem Belebtschlamm aus Aalborg West, der für 13 h mit  $^{14}\text{C}$ -Bikarbonat inkubiert wurde. **A:** Fluoreszenzscan (Cy5), **B:** Radioaktivitätsscan nach 7-tägiger Exposition des Objektträgers im  $\mu$  IMAGER™. „T“: T-Wert nach (Loy *et al.*, 2002).

Erwartungsgemäß wurde sowohl im Fluoreszenz- als auch Radioaktivitätsscan der aktiven Belebtschlammprobe eine viel höhere Anzahl an positiven Sondensignalen als in vorangehendem Versuch bei einer höheren Stringenz detektiert (Tab. 9 und Abb. 31), die auf Präsenz von Organismen der *N.-oligotropha*-Linie hindeuteten (Abb. 32). Auch für die inhibierte Belebtschlammprobe zeigte der Fluoreszenzscan ein mit der aktiven Probe vergleichbares Hybridisierungsmuster, wohingegen im Radioaktivitätsscan positive Signale ausblieben (Daten nicht gezeigt).

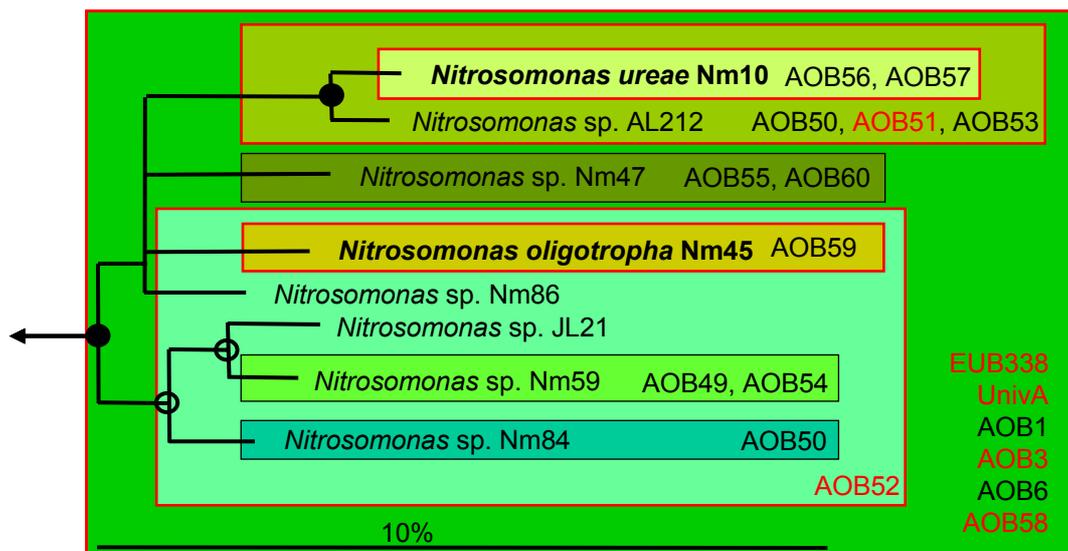


Abb. 32 Phylogenetischer 16S-rRNS-Konsensusbaum für die *N.-oligotropha*-/*N.-ureae*-Linie (Cluster 6a) mit den darin eingetragenen AOB-Sonden, die *N.-oligotropha*-verwandte Organismen erfassen, bzw. bei der Hybridisierung mit rRNS aus dem Belebtschlamm aus Aalborg West bei 10% (v/v) Formamid im Hybridisierungspuffer positive Fluoreszenz- und/oder Radioaktivitätssignale lieferten (rot markiert). Der Balken symbolisiert einen Sequenzunterschied von 10 %.

Die Ermittlung von A-Werten für Sonden mit positiven Radioaktivitäts- und Fluoreszenzsignalen der aktiven Belebtschlammprobe zeigte (Abb. 33), dass die *N.-oligotropha*-/*N.-marina*-spezifische Sonde AOB58 den höchsten, und die *N.-oligotropha*-spezifische Sonde AOB52 den zweithöchsten A-Wert erreichte. Zusätzlich konnte für die Sonde AOB3, deren Radioaktivitätsintensität noch knapp unter dem Schwellenwert von 2,0 lag, ebenfalls ein positives Fluoreszenzsignal gemessen werden (Tab. 9, Abb. 31 und Abb. 33). Der ermittelte A-Wert zeigte, dass die mehrere AOB-Entwicklungslinien, darunter auch die *N.-oligotropha*-Linie, erfassende Sonde AOB3 einen ebenso hohen A-Wert, wie die Sonde AOB58 erreichte. Die niedrigsten A-Werte erreichten die übergeordneten Sonden EUB338 und UnivA, die, wie erwartet, mit rRNS autotroph und heterotroph CO<sub>2</sub>-fixierender aber auch nicht radioaktiv markierter Bakterien hybridisierten.

Zudem wurden für Sonden AOB51, AOB99, AOB81, AOB66 und AOB101 ebenfalls positive Fluoreszenz- sowie Radioaktivitätssignale detektiert. Diese wurden jedoch aufgrund der bekannten Unspezifität dieser Sonden (C.V.2.b und Tab. 8) in der Auswertung nicht berücksichtigt.

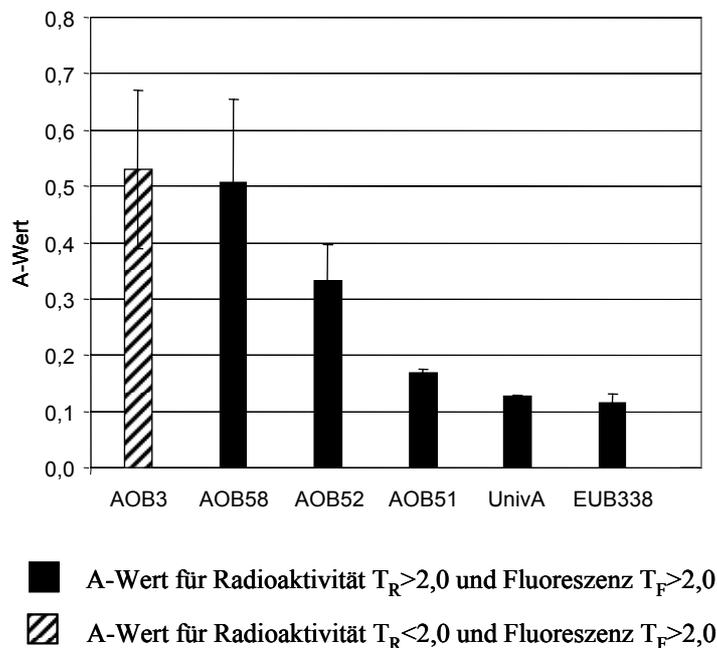


Abb. 33 Graphische Darstellung von A-Werten (Adamczyk *et al.*, 2003) für Sonden, die bei der Hybridisierung mit rRNS aus dem aktiven Belebtschlamm aus Aalborg West bei 10% (v/v) Formamid im Hybridisierungspuffer erzielt wurden. „ $T^c$ “: T-Wert nach (Loy *et al.*, 2002); „ $T_F$ “: T-Wert für Fluoreszenz; „ $T_R$ “: T-Wert für Radioaktivität.

### C.VI.2 Isotope-Array-Experimente mit rRNS aus der Kläranlage Oberding

Anhand quantitativer FISH- (C.III.2) bzw. vergleichender *amoA*-Gensequenzanalysen (C.III.1), die zu Validierung von Experimenten auf dem Isotope-Array-Prototyp durchgeführt wurden, konnten ausschließlich *N.-europaea*-verwandte Organismen als AOB-Vertreter innerhalb des Belebtschlammes aus Oberding identifiziert werden. Zudem gelang es sowohl mit FISH-MAR (C.III.3) als auch auf dem Isotope-Array-Prototyp (C.IV) die  $CO_2$ -Assimilationsaktivität für diese Organismengruppe aufzuzeigen.

In folgenden Versuchen wurden die Isotope-Array-Hybridisierungen mit rRNS aus Belebtschlamm aus Oberding auf dem neu entworfenen AOB-Mikroarray wiederholt. Für die Hybridisierung mit rRNS aus der aktiven Belebtschlammprobe (11,5 h Inkubation mit  $^{14}CO_2$ ) konnten positive Fluoreszenzsignale für die AOB-spezifische Sonde AOB2 sowie für die übergeordneten Sonden wie EUB338, EUB338III, UnivA, UnivB und UnivC detektiert werden. Nach einer 7-tägigen Exposition des AOB-Mikroarrays im  $\mu$ IMAGER™ lagen

ausschließlich die beiden AOB-spezifischen Sonden AOB2 und AOB5 über dem Schwellenwert von 2,0. Erneut erreichte auch die unspezifische Sonde AOB81 sowohl im Fluoreszenz- als auch Radioaktivitätsscan positive Signale, wurde jedoch für die Auswertung nicht berücksichtigt.

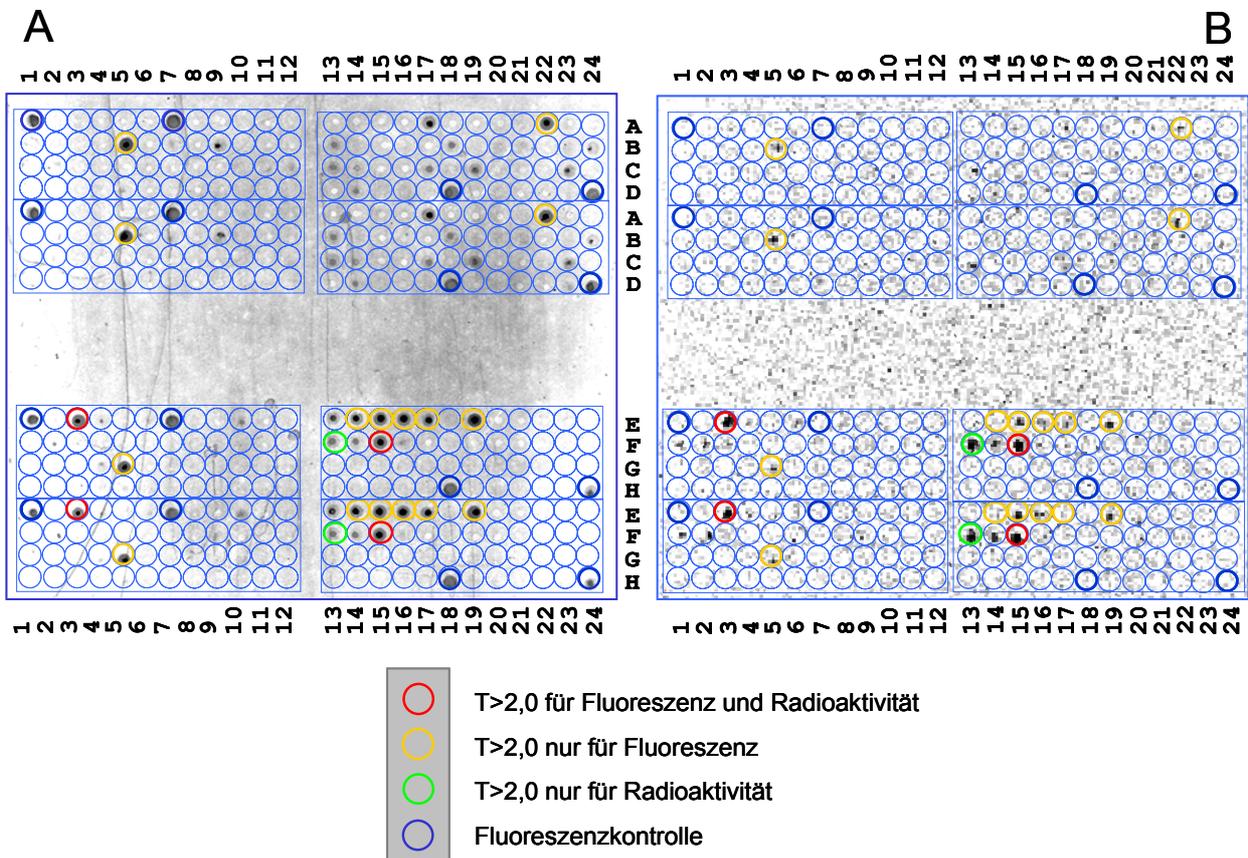


Abb. 34 Hybridisierung auf dem Isotope Array bei 15% (v/v) Formamid im Hybridisierungspuffer mit rRNS aus aktivem Belebtschlamm aus Oberding, der für 11,5 Stunden mit <sup>14</sup>C-Bikarbonat inkubiert wurde. **A:** Fluoreszenzscan (Cy5), **B:** Radioaktivitätsscan nach 7-tägiger Exposition des Objektträgers im  $\mu$  IMAGER<sup>TM</sup>. „T“: T-Wert nach (Loy *et al.*, 2002).

Nach Berechnung von A-Werten (Tab. 9 und Abb. 35) für die einzelnen Sonden mit positiven Radioaktivitäts- und/oder Fluoreszenzsignalen erreichte die Sonde AOB5, die sowohl Organismen der *N.-europaea*- bzw. *N.-marina*-Linie („Cluster 7“ bzw. „Cluster 6b“), detektiert, den höchsten Wert, obwohl ihr Fluoreszenzsignal (T=1,5) unter dem Schwellenwert von T=2,0 blieb (Abb. 35). Die Sonde AOB2, die Organismen mehrerer AOB-Entwicklungslinien erfasst, wies geringere A-Werte als die Sonde AOB5 auf, was entweder auf Co-Hybridisierung mit rRNS vergleichsweise inaktiver AOB oder unspezifische Hybridisierung mit rRNS von heterotrophen Organismen hindeutete. Für die hierarchisch übergeordneten Sonden UnivA sowie EUB338 konnten erwartungsgemäß nur sehr geringe A-Werte ermittelt werden, da sie sowohl mit radioaktiver als auch nicht radioaktiver rRNS von autotrophen oder heterotrophen Organismen hybridisierten.

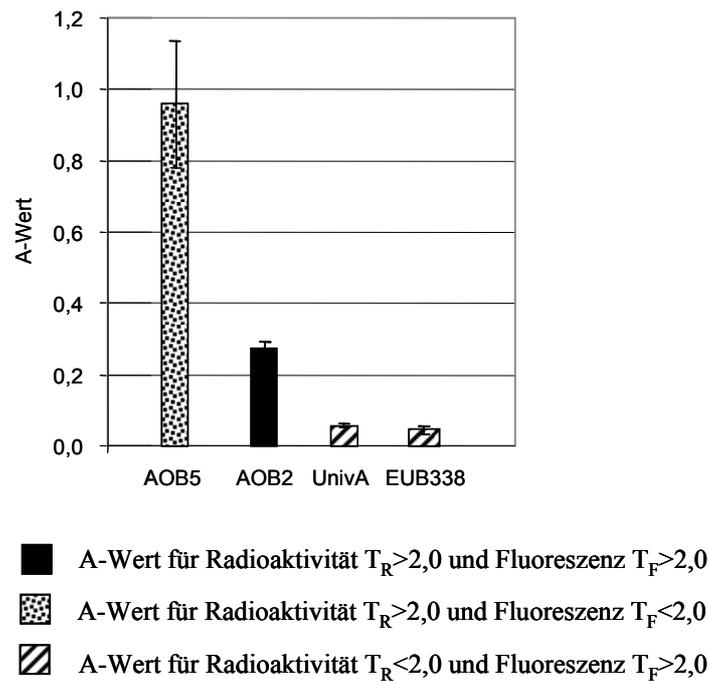


Abb. 35 Graphische Darstellung von A-Werten (Adamczyk *et al.*, 2003) für Sonden, die bei der Hybridisierung mit rRNS aus dem aktiven Belebtschlamm aus Oberding bei 15% (v/v) Formamid im Hybridisierungspuffer erzielt wurden. „ $T^c$ “: T-Wert nach (Loy *et al.*, 2002); „ $T_F$ “: T-Wert für Fluoreszenz; „ $T_R$ “: T-Wert für Radioaktivität.

Während das Fluoreszenzsignalmuster der Hybridisierung mit rRNS aus mit Allylthioharnstoff inhibierter Belebtschlammprobe dem der aktiven Probe entsprach, konnten nach einer 7-tägigen Exposition des AOB-Mikroarrays im  $\mu$  IMAGER™ keine über dem Schwellenwert von 2,0 liegenden radioaktiven Signale detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Da, anders als erwartet, bei den geschilderten Experimenten spezifische Sondensignale für die *N.-europaea*-Linie ausblieben, wurden, wie für die Belebtschlammprobe aus Aalborg West, die Hybridisierungen mit rRNS aus Oberding bei einer geringeren Stringenz, bei 10% (v/v) Formamid im Hybridisierungspuffer, erneut durchgeführt.

Erwartungsgemäß wurde sowohl im Fluoreszenz- als auch Radioaktivitätsscan der aktiven Belebtschlammprobe eine viel höhere Anzahl an Sondensignalen als im vorangehenden Versuch bei einer höheren Stringenz als positiv gewertet (Tab. 9 und Abb. 36), die auf Anwesenheit und Aktivität von *N.-europaea*-verwandten Organismen hindeuteten. Auch für die inhibierte Belebtschlammprobe zeigte der Fluoreszenzscan ein mit der aktiven Probe vergleichbares Hybridisierungsmuster, wohingegen im Radioaktivitätsscan positive Signale nicht detektiert wurden (Daten nicht gezeigt).



Für die einzelnen Sonden mit positiven Radioaktivitäts- und/oder Fluoreszenzsignalen der aktiven Belebtschlammprobe wurden erneut die A-Werte (Tab. 9 und Abb. 38) berechnet. Dabei erreichte die *N.-europaea*-spezifische Sonde AOB79 den höchsten A-Wert, obwohl ihr Fluoreszenzsignal unter dem Detektionslimit ( $T=1,4$ ) lag. Ebenfalls deutlich hohe A-Werte erreichten weitere AOB- (AOB5, AOB3, AOB2), „Cluster 7“- (AOB85, AOB88) sowie *N.-europaea*-spezifische (AOB78) Sonden (Abb. 38). Sie zeigten in Übereinstimmung mit unabhängigen, zuvor durchgeführten Analysen sowohl die Präsenz als auch die Aktivität von *N.-europaea*-verwandten Organismen im Belebtschlamm der Probe aus Oberding an.

Darüber hinaus wurden für die hierarchisch höher gestellten Sonden EUB338 sowie UnivA, die mit rRNS autotropher aber auch heterotropher Organismen hybridisierten, erwartungsgemäß sehr geringe A-Werte bestimmt. Zudem wurden Fluoreszenz- und/oder Radioaktivitätssignale für eine Reihe an Sonden detektiert (Tab. 9), die nicht in der Graphik (Abb. 38) abgebildet wurden, da sie aufgrund ihrer Unspezifität künftig aus dem AOB-Sondensatz entfernt werden.

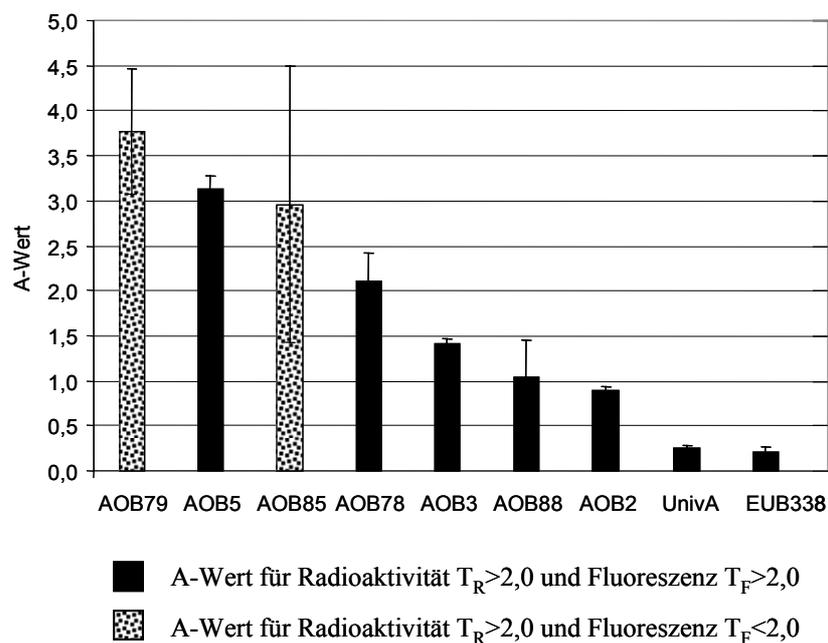


Abb. 38 Graphische Darstellung von A-Werten (Adamczyk *et al.*, 2003) für Sonden, die bei der Hybridisierung mit rRNS aus dem aktiven Belebtschlamm aus Oberding bei 10% (v/v) Formamid im Hybridisierungspuffer erzielt wurden. „ $T^c$ “: T-Wert nach (Loy *et al.*, 2002); „ $T_F$ “: T-Wert für Fluoreszenz; „ $T_R$ “: T-Wert für Radioaktivität.

Tab. 9 Auflistung positiver Sondensignale sowie der zugehörigen A-Werte (Formel 2, S.52), (Adamczyk *et al.*, 2003), die in Hybridisierungen mit rRNS aus dem Belebtschlamm der Kläranlagen Aalborg West bzw. Oberding erzielt wurden. Bei eindeutig über dem Schwellenwert von  $T=2,0$  liegenden Werten Formel 1, S.37), (Loy *et al.*, 2002) wurde „+“, bei eindeutig negativen Signalen „-“ angegeben. Bei visuell detektierbaren, jedoch (noch) unter dem Schwellenwert von  $T=2,0$  liegenden Signalen wurden die absoluten T-Werte angegeben. „ $T_F$ “ bzw. „ $T_R$ “: T-Wert für das Fluoreszenz- bzw. Radioaktivitätssignal. „A“: A-Wert.

Spezifität	Sonde	Aalborg West 15% (v/v) Formamid			Aalborg West 10% (v/v) Formamid			Oberding 15% (v/v) Formamid			Oberding 10% (v/v) Formamid			Position auf Isotope Array
		$T_F$	$T_R$	A	$T_F$	$T_R$	A	$T_F$	$T_R$	A	$T_F$	$T_R$	A	
<b>Bacteria</b>	EUB338	+	+	0,1	+	+	0,1	+	1,7	0,0	+	+	0,2	A22, B05, E19, G05
<b>Life</b>	UNIVa	+	+	0,1	+	+	0,1	+	1,8	0,1	+	+	0,2	E15
<b>BAOB</b>	AOB2	1,4	1,5	0,4	+	+	0,2	+	+	0,3	1,4	1,5	0,9	F15
<b>BAOB</b>	AOB3	1,2	1,5	1,1	+	1,7	0,5	1,3	1,8	0,7	1,2	1,5	1,4	F14
<b>BAOB</b>	AOB6	1,0	1,5	9,0	+	-	-	-	-	-	1,0	1,5	0,5	F16
<b>BAOB</b>	AOB5	-	-	-	-	-	-	1,5	+	0,9	-	-	3,2	F13
<b>Cluster 6a</b>	AOB51	1,4	1,6	0,3	+	+	0,2	-	-	-	1,4	1,6	-	A17
<b>Cluster 6a</b>	AOB52	1,4	+	0,6	+	+	0,3	-	-	-	1,4	+	-	B18
<b>Cluster 6a</b>	AOB57	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	B13
<b>Cluster 6ab</b>	AOB58	1,2	1,5	0,6	+	+	0,5	1,3	1,5	0,4	1,2	1,5	0,5	C13
<b>Cluster 7</b>	AOB81	+	1,4	0,2	+	+	0,2	+	+	0,4	+	1,4	1,3	E03
<b>Cluster 7</b>	AOB88	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1,1	E04
<b>Cluster 7</b>	AOB85	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,9	E06
<b>Cluster 7</b>	AOB75	-	-	-	-	-	-	1,2	1,3	0,7	-	-	-	F01
<b>Cluster 7</b>	AOB78	-	-	-	-	-	-	1,2	1,6	1,3	-	-	2,1	F02
<b>Cluster 7</b>	AOB79	-	-	-	-	-	-	1,0	1,5	2,2	-	-	3,8	F03
<b>Cluster 7</b>	AOB87	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	G04
<b>Cluster 7</b>	AOB89	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	H05
<b>Cluster 7</b>	AOB90	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	H06
<b>Cluster 6b</b>	AOB66	-	-	-	+	1,8	0,2	-	-	-	-	-	0,5	D14
<b>Cluster 6b</b>	AOB63	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	D15
<b>Cluster 6b</b>	AOB64	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	C17
<b>Cluster 6b</b>	AOB61	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	D16
<b>Cluster 6b</b>	AOB62	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	B14
<b>Cluster 8</b>	AOB101	-	-	-	+	1,6	0,1	-	-	-	-	-	0,2	C23
<b>Cluster 8</b>	AOB99	-	-	-	+	+	0,2	-	-	-	-	-	0,3	B24
<b>Cluster 8</b>	AOB92	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	D20
<b>Cluster 8</b>	AOB100	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	D23
<b>Cluster 8</b>	AOB106	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	B23
<b>Cluster 8</b>	AOB105	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	C22
<b>Cluster 8</b>	AOB96	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	B20
<b>Cluster 8</b>	AOB107	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	C21
<b>Cluster 5</b>	AOB48	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	A21
<b>Cluster 9</b>	AOB111	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	E10
<b>Nm55</b>	AOB113	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	F08
<b>Nsp 65AB</b>	AOB45	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	D09
<b>Nsp 65AB</b>	AOB43	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	D07
<b>Nsp 65AB</b>	AOB44	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	D08
<b>Nsp57/58</b>	AOB42	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	C02
<b>Cluster 3</b>	AOB35	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	C12
<b>Cluster 3</b>	AOB24	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	B07
<b>Cluster 3</b>	AOB23	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	A10
<b>Cluster 3</b>	AOB20	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	B09
<b>Cluster 4</b>	AOB40	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	D05
<b>Life</b>	UNIVb	+	1,7	0,1	+	1,5	0,1	+	1,7	0,1	-	1,7	-	E16
<b>Life</b>	UNIVc	1,8	1,6	0,2	+	+	0,1	+	1,2	0,0	-	1,6	-	E17
<b>Bacteria</b>	EUB338II	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	E13
<b>Bacteria</b>	EUB338III	+	1,2	0,2	+	1,3	-	-	-	-	-	1,2	-	E14

## C.VII UNTERSUCHUNGEN ZU AUSWIRKUNGEN VON DAUERDÜNGUNG MIT STALLMIST AUF AOB-DIVERSITÄT IN BÖDEN BZW. SEINEN KORNGRÖßENFRAKTIONEN

Für die Diversitätsanalysen wurden Proben aus Böden mit unterschiedlicher Düngungspraxis, aus dem Versuchsgelände der Universität Halle (Julius-Kühn-Feld), entnommen. Während das eine Areal jährlich mit 12 t Stallmist pro Hektar gedüngt wurde, erfuhr das Kontrollfeld seit 1878 keinerlei Düngungsmaßnahmen. Aus beiden Versuchsarealen wurden Proben in Triplikaten aus einer Tiefe von 0-25 cm entnommen und im Anschluss hinsichtlich ihrer Korngrößen in jeweils zwei Sand-, eine Schluff-, sowie eine Tonfraktion aufgetrennt.

Für die nachfolgenden Molekularanalysen wurde aus allen Fraktionen und auch den nicht fraktionierten Bodeproben DNS extrahiert. Die Populationsanalyse sollte zum einen mittels Hybridisierung PCR-amplifizierter 16S-rRNS-Gene auf dem AOB-Mikroarray durchgeführt werden. Zum anderen sollten die Resultate mit einer etablierten, unabhängigen Methode wie der vergleichenden Sequenzanalyse des *amoA*-Gens verglichen werden.

Im ersten Schritt wurden 16S-rRNS-Gene aus der DNS aller Bodenfraktionen unter Verwendung universell bindender PCR-Primer (616V-630R + 616V-1492R) amplifiziert, anschließend auf dem AOB-Mikroarray hybridisiert und schließlich bei einer Temperatur von 57°C gewaschen. Für keine Fraktion der beiden Böden konnten außer für die Sonden EUB338 sowie UnivA positive Signale detektiert werden. In Anschluss wurde die AOB-Populationsstruktur in beiden Bodentypen mit dem *amoA*-Ansatz detailliert untersucht.

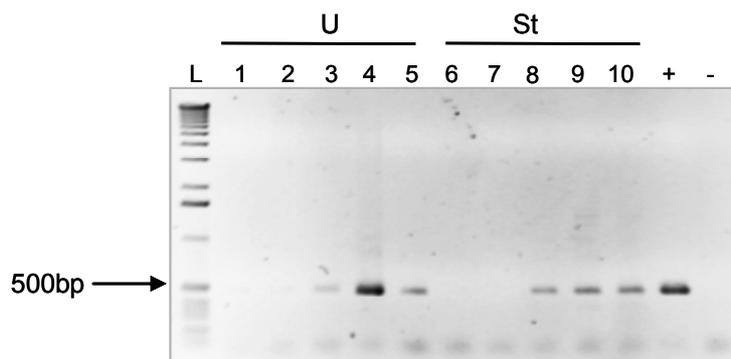


Abb. 39 Agarosegelelektrophorese von PCR-amplifizierten *amoA*-Genfragmenten mit dem von Rothauwe *et al.*, 1997 publizierten Primerpaar aus nicht fraktioniertem Boden (Positionen 5 und 10) bzw. seinen Fraktionen: 1, 6: Grobsand-; 2, 7: Feinsand-; 3, 8: Schluff-; 4, 9: Tonfraktion. „U“ bzw. „St“ stehen für Proben aus dem ungedüngten (U) bzw. mit Stallmist (St) gedüngten Boden. „+“ bzw. „-“, bezeichnen die Positiv- (*amoA*-Genfragment von *N. eutropha*) bzw. Negativkontrolle. „L“: Längenstandard. Die erwartete Fragmentlänge von 491 Basenpaaren der *amoA*-Genamplifikate liegt knapp unterhalb der durch den Pfeil angezeigten Markerbande von 500 Basenpaaren. Die *amoA*-Genamplifikate aus Grob- und Feinsandfraktionen (Positionen 1 und 2 bzw. 6 und 7) der beiden Böden sind in dieser Abbildung nicht deutlich erkennbar, werden aber in Abb. 40 aufgrund erhöhter Menge der aufgetragenen Amplifikate sichtbar.

Zu diesem Zweck wurde aus den DNS-Extrakten ein 491-bp-langes (453bp abzüglich Primer) *amoA*-Genfragment, das für die katalytisch aktive Untereinheit der Ammoniakmonooxygenase kodiert, mittels PCR amplifiziert. Die *amoA*-Genamplifikate unterschiedlichen GC-Gehalts wurden in einem retardierenden Agarosegel aufgetrennt, extrahiert und einzeln in Vektoren kloniert (Abb. 39 und Abb. 40). Mit vergleichender Sequenzanalyse wurden insgesamt 225 Klone untersucht, wobei 115 von denen aus dem ungedüngten, und 110 aus dem mit Stallmist gedüngten Boden stammten.

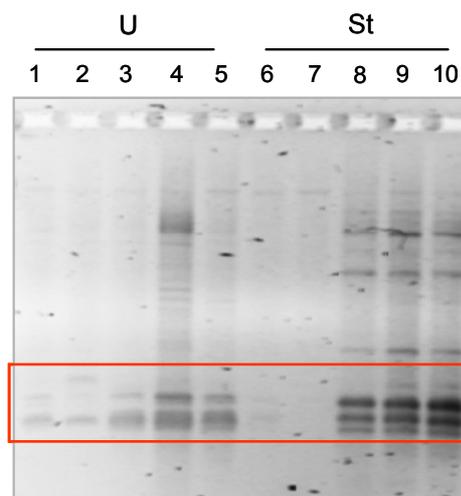


Abb. 40 Retardierende Agarosegelelektrophorese der in Abb. 39 dargestellten *amoA*-Genamplifikate aus nicht fraktioniertem Boden (Positionen 5 und 10) bzw. seinen Fraktionen (Positionen 1-4 und 6-9). 1, 6: Grobsand-; 2, 7: Feinsand-; 3, 8: Schluff-; 4, 9: Tonfraktion. „U“ bzw. „St“ stehen für Proben aus dem ungedüngten (U) bzw. mit Stallmist (St) gedüngten Boden. Umrahmt wurden diejenigen Banden, die nach Klonierung und vergleichender Sequenzanalyse als *amoA*-Genfragmente identifiziert wurden. Banden oberhalb der Umrahmung wurden ebenfalls kloniert und sequenziert, zeigten jedoch keine Sequenzähnlichkeit zu bekannten *amoA*-Genen.

### C.VII.1 AOB-Populationsunterschiede zwischen ungedüngtem und mit Stallmist gedüngtem Boden

Um einen Vergleich zwischen der AOB-Besiedlung von ungedüngtem bzw. mit Stallmist gedüngtem Boden anzustellen, wurde zunächst die Diversität dieser Organismengruppe auf verschiedenen phylogenetischen Hierarchieebenen innerhalb beider Böden ermittelt. Zu diesem Zweck wurden die aus beiden Bodentypen gewonnenen Klone unter Verwendung von Ähnlichkeitsmatrices sowie dem von Dr. H. Daims entwickelten Makro „Matrix“ (Daims, unveröffentlicht) zu sog. OTUs (=operational taxonomic units) zusammengefasst, wenn ihre Sequenzähnlichkeit auf Nukleinsäureebene über oder bei einem gegebenen OTU-Grenzwert zwischen 80 und 97% lag.

Da jenseits von 97% Sequenzähnlichkeit nicht sicher unterschieden werden kann, ob die Mikrodiversität auf Unterschieden zwischen zwei Organismen auf Operonunterschieden innerhalb eines Organismus und/oder auf durch *Taq*-Polymerase oder Sequenzierung bedingten Fehlern basiert, wurde die Untersuchung nur bis 97% Sequenzähnlichkeit vorgenommen (Abb. 41).

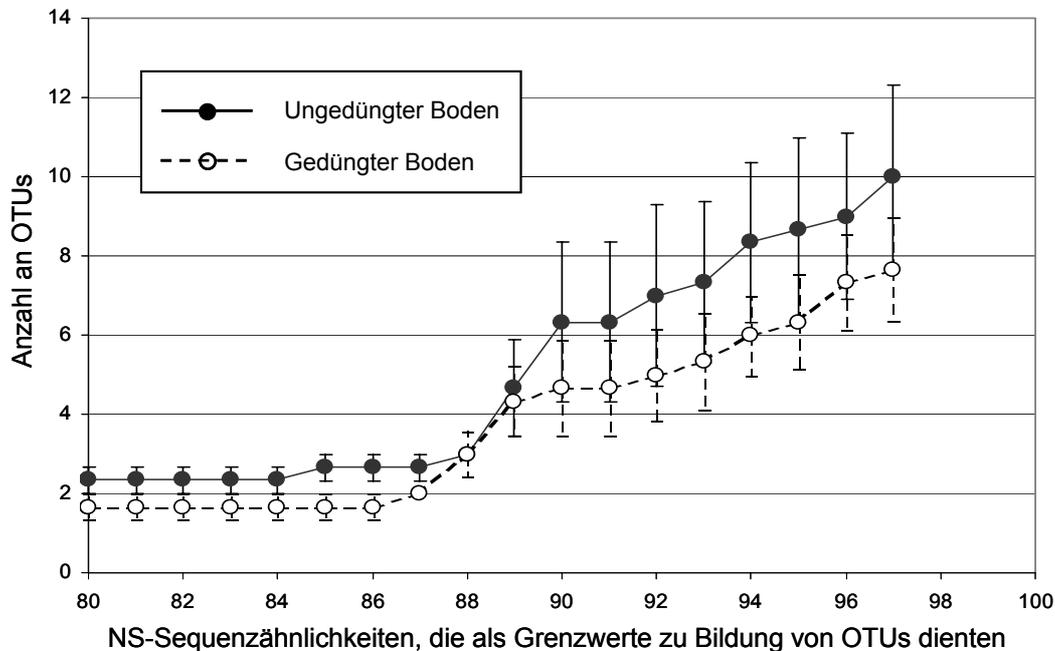


Abb. 41 Graphische Darstellung der mittleren Anzahl an OTUs, die aus Probenreplikaten des ungedüngten (schwarze Symbole) bzw. gedüngten Bodens (weiße Symbole) bei unterschiedlichen OTU-Grenzwerten zwischen 80 und 97% Nukleinsäuresequenzähnlichkeit ermittelt wurden. Fehlerbalken zeigt den Standardfehler an. „NS“: Nukleinsäure.

Mit steigenden OTU-Grenzwerten im Bereich zwischen 80 und 97% Nukleinsäuresequenzähnlichkeit stieg auch die Anzahl an OTUs für beide Bodentypen kontinuierlich an (Abb. 41). Zudem wurde dabei deutlich, dass die mittlere Anzahl an OTUs aus ungedüngtem Boden bis auf eine Ausnahme (Gleichstand bei 88% Nukleinsäuresequenzähnlichkeit) stets die des gedüngten Bodens übertraf (Abb. 41). Als Kontrolle, ob eine hinreichende Anzahl an Klonen pro Bodenprobe untersucht wurde, fand die Formel für das sog. homologe Coverage  $C_x$  (Good, 1953) Anwendung

Formel 3 
$$\% C_x = [1 - (N_x/n)] * 100.$$

Diese Formel gibt einen prozentualen Schätzwert an, wie viele der vermutlich in der untersuchten Probe vorhandenen OTUs in der Datenbank wiedergefunden werden können.

Während Cx für das homologe Coverage steht, gibt Nx die OTU-Anzahl, die aus einer einzigen Sequenz bestehen, und n die Gesamtanzahl der in der untersuchten Probe enthaltenen Sequenzen an (Good, 1953). Mit Hilfe dieser Formel erhält man somit einen Hinweis, ob die kreierte Datenbank für die untersuchte Probe hinsichtlich der Anzahl an OTUs bei einem gegebenen Ähnlichkeitsgrenzwert repräsentativ ist.

Aus Abb. 42 wird ersichtlich, dass bei OTU-Grenzwerten <86% Nukleinsäuresequenz-ähnlichkeit die homologen Coverage-Werte für *amoA*-Genbanken beider Bodenproben bei 100% lagen, und somit die AOB-Diversität innerhalb beider Böden auf höherer phylogenetischer Hierarchieebene mit den jeweiligen Genbanken vollständig erfasst wurde. Mit steigenden OTU-Ähnlichkeitsgrenzwerten, also mit abnehmender phylogenetischer Hierarchie nahmen für beide Bodentypen die homologen Coverage-Werte geringfügig ab. Beim OTU-Grenzwert von 97% Sequenzähnlichkeit erreichten die homologen Coverage-Werte 95% bzw. 93% für den gedüngten bzw. ungedüngten Boden. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die untersuchte Anzahl an Klonen aus beiden Bodenproben ausreichte, um die darin vorkommenden OTUs auch auf niedriger phylogenetischer Hierarchieebene (vermutlich „Stammesebene“) nahezu vollständig in den jeweiligen *amoA*-Genbanken zu erfassen.

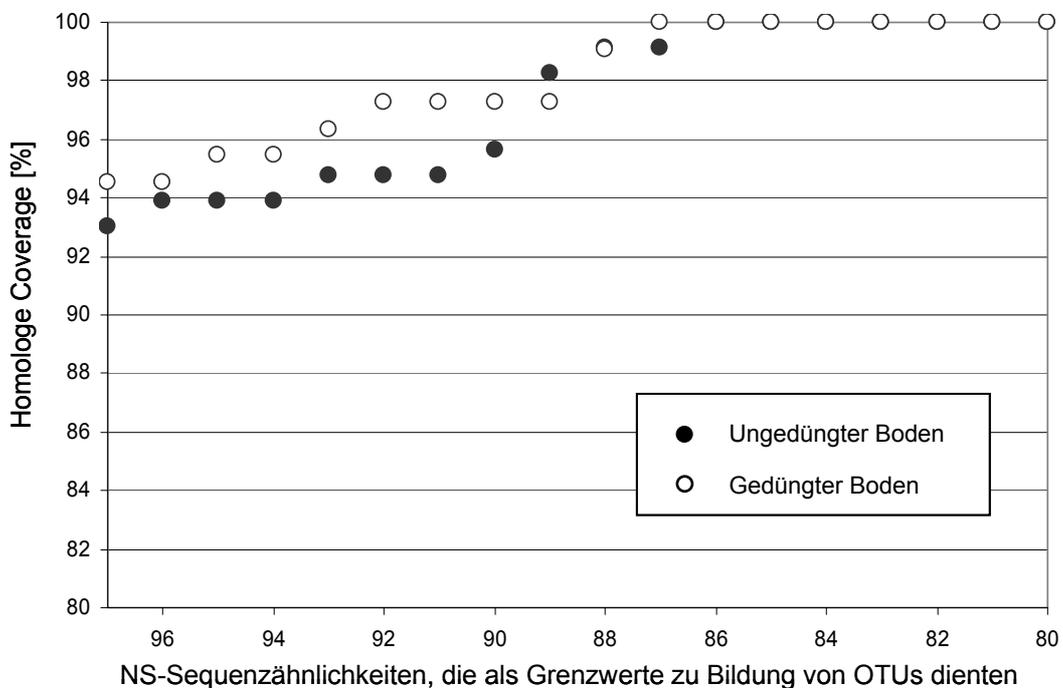


Abb. 42 Homologe Coverage-Kurven für die untersuchten Klone aus dem gedüngten bzw. ungedüngten Boden. Schwarze Symbole stehen für ungedüngten, weiße Symbole für gedüngten Boden.

Der Vergleich von AOB-Diversität innerhalb der beiden Bodenproben anhand der Anzahl ihrer OTUs bei dem jeweiligen OTU-Grenzwert zwischen 80 und 97% Nukleinsäuresequenzähnlichkeit zeigte, dass bis ca. 89% nur wenige Unterschiede zwischen gedüngtem und ungedüngtem Boden herrschten. Erst ab einem OTU-Grenzwert von 90% bis 97% Nukleinsäuresequenzähnlichkeit kamen kontinuierlich deutliche Unterschiede zwischen den beiden Bodentypen zum Vorschein. Schließlich, bei einer Nukleinsäuresequenzähnlichkeit von 97% wurden für den gedüngten Boden 16 und für den ungedüngten 20 unterschiedliche OTUs gezählt, wobei sieben OTUs in beiden Bodentypen vorkamen. Damit wurde deutlich, dass auf höherer phylogenetischer Hierarchieebene nur wenige Unterschiede in der AOB-Diversität zwischen dem gedüngten und ungedüngten Boden herrschten, und erst durch die Betrachtung der Mikrodiversität auf niedriger, phylogenetischer Hierarchieebene Unterschiede zwischen beiden Bodentypen erkennbar wurden.

Anhand von statistischen Vergleichen (ANOVA) der AOB-Diversität zwischen den beiden Bodentypen konnte zwar der bereits graphisch ermittelte Trend zu höherer OTU-Vielfalt im ungedüngten gegenüber der im gedüngten Boden (Abb. 41) bestätigt werden. Die erhöhte OTU-Vielfalt im ungedüngten Boden erwies sich jedoch bei keinem OTU-Grenzwert zwischen 80 und 97% Nukleinsäuresequenzähnlichkeit als statistisch signifikant ( $p > 0,05$ ).

Für einen besseren Überblick über die OTU-Unterschiede zwischen den beiden Bodentypen bei 97% Nukleinsäuresequenzähnlichkeit wurden die identifizierten OTUs in einem Schnittmengendiagramm dargestellt (Abb. 43).

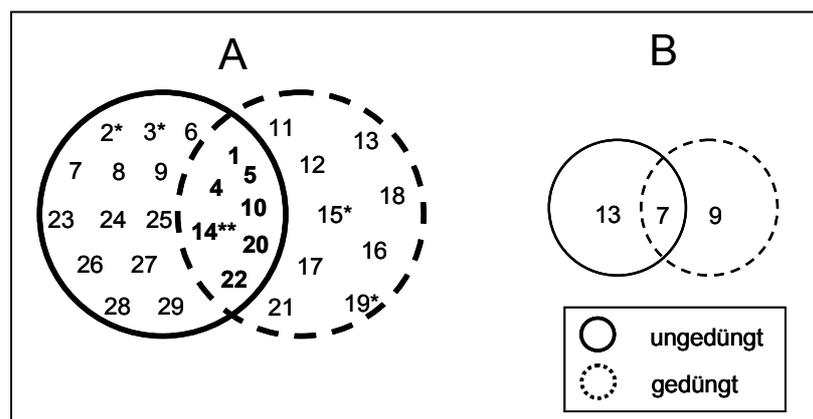


Abb. 43 Schnittmengen-Darstellung von OTUs, die bei dem OTU-Grenzwert von 97% Nukleinsäuresequenzähnlichkeit in ungedüngtem (durchgezogene Linie) bzw. gedüngtem (unterbrochene Linie) Boden, ermittelt wurden. **A:** Die im Schnittmengendiagramm eingetragenen Zahlen (1-29) bezeichnen die verschiedenen OTUs. „\*“ bezeichnet diejenigen OTUs, die niemals in den Fraktionen, dafür ausschließlich in nicht fraktioniertem Boden vorgefunden wurden. „\*\*“ bezeichnet OTU14, die zwar in beiden unfraktionierten Böden vorkam, jedoch in den Fraktionen des gedüngten Boden nicht vorgefunden wurde. **B:** Die im Schnittmengendiagramm eingetragenen Zahlen indizieren die Anzahl verschiedener OTUs, die entweder in ungedüngtem oder gedüngtem Boden, oder in beiden Bodentypen vorkamen.

### C.VII.2 Unterschiede in der Besiedelung verschiedener Bodenfraktionen durch AOB

Um Populationsunterschiede auf Korngrößenebene aufzuzeigen, wurden erneut Berechnungen mit Hilfe von Ähnlichkeitsmatrices mit Klonen, die aus den einzelnen Korngrößenfraktionen, sowohl gedüngter als auch ungedüngter Bodenproben, gewonnen wurden, durchgeführt. Dabei wurden erneut Klone einer Korngrößenfraktion zu einer OTU zusammengefasst, sobald ihre Sequenzähnlichkeit auf Nukleinsäureebene bei oder über einem gegebenen Grenzwert zwischen 80 und 97% lag.

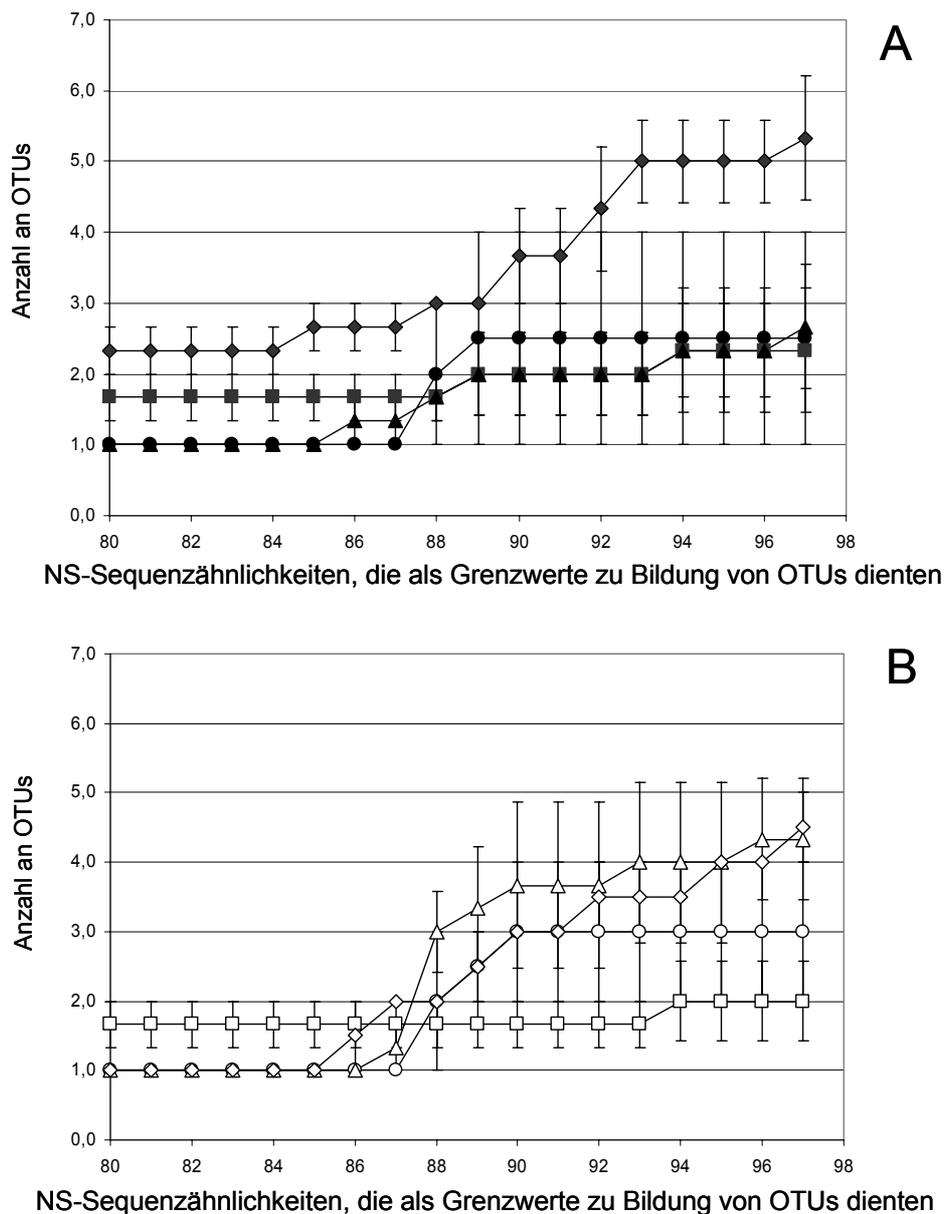


Abb. 44 Graphische Darstellung der mittleren Anzahl an OTUs, die aus Probenreplikaten von Fraktionen des ungedüngten (A; schwarze Symbole) bzw. gedüngten Bodens (B; weiße Symbole) bei unterschiedlichen OTU-Grenzwerten zwischen 80 und 97% Nukleinsäuresequenzähnlichkeit ermittelt wurden. Symbolerklärung: Kreis: Grobsandfraktion; Quadrat: Feinsandfraktion; Dreieck: Schlufffraktion; Raute: Tonfraktion. Fehlerbalken zeigt den Standardfehler an. „NS“: Nukleinsäure.

Für die ungedüngten Bodenfraktionen wurden bis zu einem Ähnlichkeitswert von ca. 89% nur unwesentliche Unterschiede in der Anzahl an OTUs pro Fraktion verzeichnet. Erst ab einem Grenzwert von 90% Nukleinsäuresequenzähnlichkeit begann die Anzahl an OTUs in der Tonfraktion zu steigen und sich von den verbleibenden Fraktionen abzuheben (Abb. 44). Bei 97% Sequenzähnlichkeit erreichte die Tonfraktion mit insgesamt neun (Abb. 45A), durchschnittlich 5,3 OTUs ein Maximum (Abb. 44A). Dabei kamen fünf OTUs (Abb. 45AB) ausschließlich im Ton vor, drei OTUs wurden in zwei weiteren und eine in allen vier Fraktionen des ungedüngten Bodens wiedergefunden. Die bei verschiedenen Nukleinsäuresequenzähnlichkeiten untersuchte OTU-Vielfalt zeigte somit, dass auf höherer phylogenetischer Hierarchieebene sich kaum wesentliche AOB-Diversitätsunterschiede zwischen den Fraktionen des ungedüngten Bodens manifestierten. Erst mit abnehmender, phylogenetischer Hierarchieebene nahm die AOB-Diversität, insbesondere in der Tonfraktion, deutlich zu (Abb. 44 und Abb. 45AB). Schließlich wurde auch die statistische Signifikanz der AOB-Diversitätsunterschiede zwischen den einzelnen Fraktionen des ungedüngten Bodens ermittelt. Dabei konnte bestätigt werden, dass innerhalb der Tonfraktion eine signifikant höhere OTU-Vielfalt (ANOVA;  $p < 0,05$ ) als in den restlichen Fraktionen des ungedüngten Bodens herrschte.

Aufgrund der homologen Coverage-Werte (Formel 3, S.93) bei 97% Nukleinsäuresequenzähnlichkeit, die für Ton bei 93%, für Schluff bei 97%, und für die beiden Sandfraktionen bei 83% (Grobsand) bzw. 86% (Feinsand) lagen, konnte zudem festgestellt werden, dass die Anzahl untersuchter Klone für die jeweilige Bodenfraktion ausreichte, um ihre AOB-Diversität auch auf niedriger, phylogenetischer Hierarchieebene nahezu vollständig in den *amoA*-Genbanken zu erfassen.

Anders gestaltete sich die Lage für die Fraktionen des mit Stallmist gedüngten Bodens. Während die Anzahl an OTUs für die Feinsandfraktion bei allen OTU-Grenzwerten zwischen 80 und 97% Nukleinsäuresequenzähnlichkeit nahezu unverändert blieb, konnte ab einer Nukleinsäuresequenzähnlichkeit von ca. 85% zuerst für Ton, dann für Schluff und schließlich für Grobsand eine OTU-Zunahme beobachtet werden (Abb. 44). Obwohl die Anzahl an OTUs über die Ähnlichkeitsskala in der Schlufffraktion am stärksten gestiegen ist, wurde ein ähnlicher Trend in der Tonfraktion beobachtet. Bei einer Nukleinsäuresequenzähnlichkeit von 97% wurden in der Schlufffraktion insgesamt neun verschiedene OTUs gezählt, von denen vier in mindestens einer weiteren Fraktion des gedüngten Bodens vorkamen (Abb. 45CD).

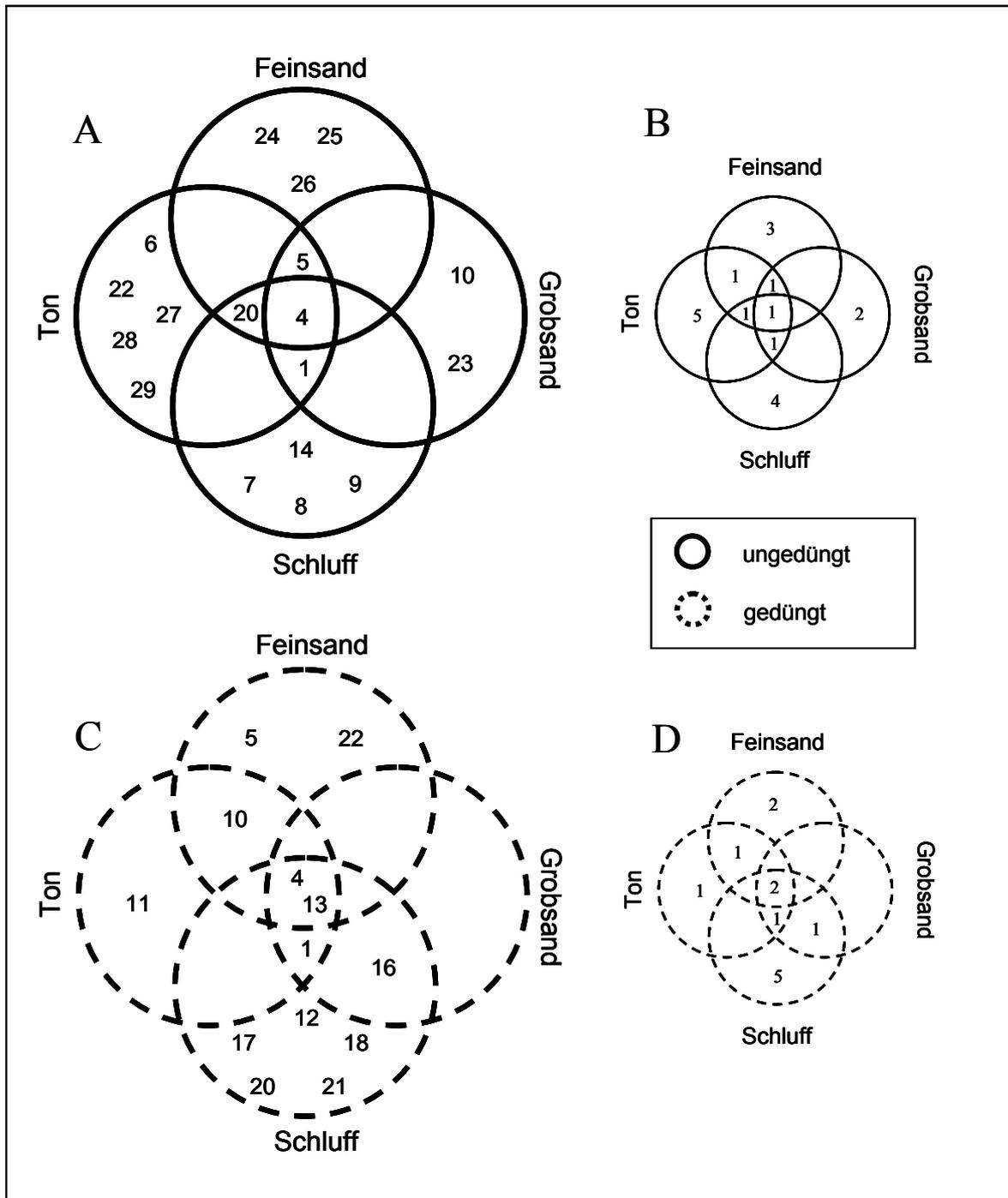


Abb. 45 Schnittmengen-Darstellung von OTUs aus Fraktionen des ungedüngten (A bzw. B; durchgezogene Linie) bzw. gedüngten (C bzw. D; unterbrochene Linie) Bodens, die bei einem OTU-Grenzwert von 97% Nukleinsäuresequenzähnlichkeit ermittelt wurden. A, C: Die in den Schnittmengendiagrammen eingetragenen Zahlen (1-29) bezeichnen die verschiedenen OTUs, die bei dem Grenzwert von 97% Nukleinsäuresequenzähnlichkeit ermittelt wurden. B bzw. D: Die in den Schnittmengendiagrammen eingetragenen Zahlen indizieren die Anzahl an verschiedenen OTUs, die in den Fraktionen des ungedüngten (B) bzw. gedüngten (D) Bodens bei 97% Nukleinsäuresequenzähnlichkeit identifiziert wurden.

Wie bereits für die AOB-Diversität im ungedüngten Boden und deren Fraktionen beobachtet, zeigte sich auch für die Fraktionen des gedüngten Bodens ein ähnlicher Trend zu höherer OTU-Vielfalt bei abnehmender phylogenetischer Hierarchieebene.

Bei dem OTU-Grenzwert von 97% Nukleinsäuresequenzähnlichkeit lagen die homologen Coverage-Werte (Formel 3, S.93) für die Grob- bzw. Feinsandfraktion bei 93% bzw. 91% und für Ton bei 96%, die Schlufffraktion erreichte dagegen nur 74%. Dies bedeutet, dass aus der Grob- und Feinsand- sowie Tonfraktion eine ausreichend hohe Anzahl an Klonen untersucht wurde, um die AOB-Diversität auf niedriger phylogenetischer Hierarchieebene in den entsprechenden *amoA*-Genbanken nahezu vollständigen darzustellen. Für die Schlufffraktion wären noch weitere Klone nötig, um alle in der Probe vorkommenden AOB-OTUs mit der *amoA*-Genbank zu erfassen.

Die im Anschluss durchgeführte, statistische Überprüfung (ANOVA) von AOB-Diversitätsunterschieden zwischen den einzelnen Fraktionen des gedüngten Bodens verdeutlichte, dass, wie bereits in der Abb. 44 erkennbar, sie lediglich zwischen der Schluff- und Feinsandfraktion bzw. Ton- und Feinsandfraktion signifikant waren ( $p < 0,05$ ).

### **C.VII.3 Vergleich einzelner Fraktionen des gedüngten mit denen des ungedüngten Bodens hinsichtlich ihrer AOB-Besiedlung**

Nach Gegenüberstellung einzelner Fraktionen des gedüngten mit denen des ungedüngten Bodens bei 97% Nukleinsäuresequenzähnlichkeit hinsichtlich ihrer AOB-Populationen konnten einige Gemeinsamkeiten sowie Unterschiede festgestellt werden. Zum einen wurde deutlich, dass OTU4 in allen vier und OTU3 in jeweils drei Fraktionen beider Böden vorkamen, während OTU13 auf die vier Fraktionen des gedüngten Bodens beschränkt blieb (Abb. 45). Darüber hinaus wurden fünf weitere gemeinsame OTUs (OTU1, OTU5, OTU10, OTU20, OTU22) in unterschiedlicher Verteilung auf die einzelnen Korngrößenfraktionen beider Böden gefunden (Abb. 45).

Zum anderen wurde beobachtet, dass beachtliche Unterschiede bezüglich OTU-Anzahl und -Verteilung zwischen den Ton- bzw. Schlufffraktionen der beiden Böden bestanden. Während im Ton des ungedüngten Bodens insgesamt neun OTUs identifiziert wurden, von denen fünf ausschließlich in dieser Fraktion vorkamen, waren im gedüngten Boden im Ton insgesamt nur fünf OTUs nachweisbar, von denen vier auch in anderen Fraktionen wiedergefunden wurden (Abb. 45A). Anders als für Ton war der OTU-Unterschied für Schluff weniger deutlich, da im ungedüngten Boden sieben OTUs, von denen vier nur in dieser Fraktion vorkamen, gefunden wurden, wohingegen im gedüngten Boden es neun waren, von denen ebenfalls vier mit

anderen Fraktionen geteilt wurden (Abb. 45C). Weit bemerkenswerter gestaltete sich somit der Unterschied von Schluff zu Ton in beiden Bodentypen. Während die Tonfraktion des ungedüngten Bodens neun AOB-OTUs beherbergte, blieb sie im gedüngten Boden mit fünf OTUs hinter der Schlufffraktion, in der neun OTUs gezählt wurden, zurück.

#### **C.VII.4 Phylogenetische Analyse von AOB-Populationen im ungedüngten bzw. gedüngten Boden**

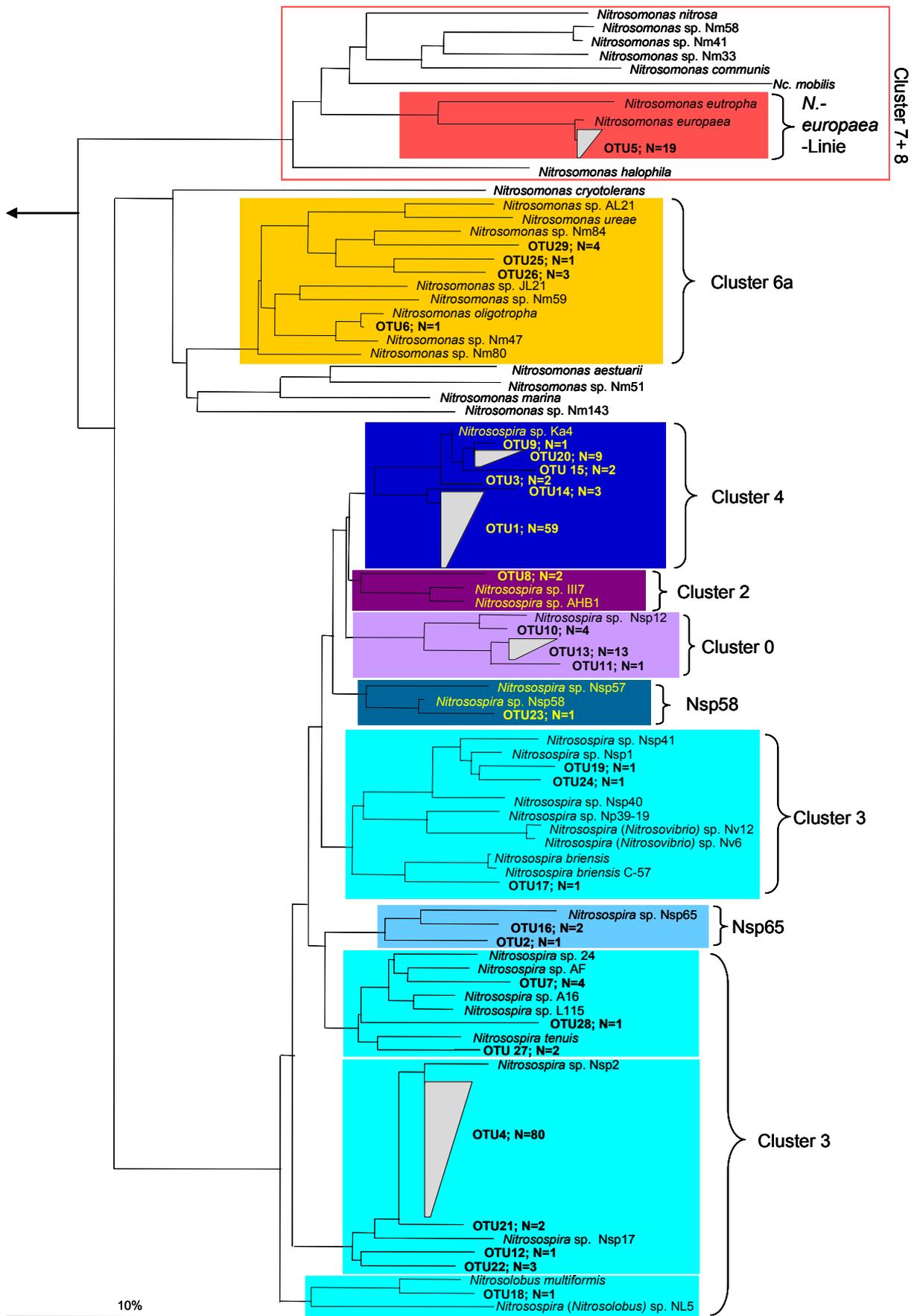
Für die Zuordnung sowie Identifizierung von OTUs wurden alle Klone in die *amoA*-Genbank eingegeben und anschließend einer phylogenetischen Sequenzanalyse unterzogen. Zu diesem Zweck wurden mit repräsentativen Klonen phylogenetische Dendrogramme mit verschiedenen Baumberechnungsverfahren erstellt, von denen der Neighbour-Joining-Baum zu Darstellung ausgewählt wurde (Abb. 46). Die OTU-Identität wurde anhand der Baumtopologie definiert. (Abb. 46).

Bei 197 der 225 untersuchten Klone handelte es sich um Vertreter der Gattung *Nitrospira*, wohingegen 28 Klone als *Nitrosomonas*-Verwandte eingeordnet wurden. Nähere phylogenetische Untersuchungen der *Nitrospira*-ähnlichen OTUs zeigten, dass sowohl in gedüngtem als auch ungedüngtem Boden Verwandte nahezu aller bekannten Nitrospiren mit Ausnahme des sog. „Clusters 1“, das bisher ausschließlich aus Sequenzen nicht kultivierter AOB besteht, vorkamen (Abb. 47). Da für die Konstruktion des phylogenetischen Baums (Abb. 46) nur kultivierte Referenz-AOB herangezogen wurden, kommen Vertreter des sog. *Nitrospira*-„Cluster 1“ darin nicht vor.

Die am häufigsten in beiden Böden gefundenen Klone gehörten u.a. OTU4 bzw. OTU1 an, die wiederum die höchsten Ähnlichkeiten zu den Bodenisolaten Nsp2 und Nsp17 (aus dem sog. „Cluster 3“) bzw. Ka3 und Ka4 (aus dem sog. „Cluster 4“) aufwiesen (Abb. 46).

Zudem zeigten Angehörige von OTU4 bzw. OTU1 eine 95-100%-ige Übereinstimmung mit Klonen unterschiedlicher Böden aus anderen Studien [(Rotthauwe *et al.*, 1997; Horz *et al.*, 2000; Avrahami *et al.*, 2002; Avrahami und Conrad, 2003; Avrahami *et al.*, 2003; Purkhold *et al.*, 2003) und Grimm (nur in Genbank; unveröffentlicht)].

Abb. 46 Phylogenetisches Dendrogramm basierend auf *amoA*-Nukleinsäuresequenz, das mit Hilfe des Neighbour-Joining-Verfahrens konstruiert wurde. Für die Erstellung dieses Baums wurden *amoA*-Gensequenzen kultivierter AOB sowie die innerhalb dieser Studie ermittelten Klone verwendet. Da die *amoA*-basierende Phylogenie keine zuverlässige Cluster-Unterteilung zulässt, stützt sich die farblich unterlegte Cluster-Aufteilung auf die 16S-rRNS-Phylogenie. Im Unterschied zur 16S-rRNS-basierenden Phylogenie ist das Cluster 3 laut *amoA*-Phylogenie nicht monophyletisch. Der Balken zeigt einen Sequenzunterschied von 10% an. OTU: operational taxonomic unit.





Während Mitglieder der sog. „Cluster 3“ und „Cluster 4“ ungeachtet der Düngungspraxis in beiden Böden gleich oft zu finden waren, traten *Nitrosospira* sp.-Nsp12-ähnliche Sequenzen (aus dem sog. „Cluster 0“) bis auf eine Ausnahme ausschließlich (OTU10) in Fraktionen des gedüngten Bodens auf (Abb. 47).

Eine genauere Analyse der Nitrosomonaden-Gruppe zeigte, dass 19 der 28 *amoA*-Klone eine hohe Sequenzähnlichkeit zueinander (OTU5) sowie zu *Nitrosomonas europaea*, aber auch zu anderen Umweltklonen aus Böden [(Briones *et al.*, 2002) und Grimm (unveröffentlicht)] bzw. Belebtschlamm (Rotthauwe *et al.*, 1997) aufwiesen. Während 17 der OTU5-Klone aus drei Fraktionen des ungedüngten Bodens stammten, wurden auch 2 Klone in der Feinsandfraktion des gedüngten Bodens vorgefunden (Abb. 47). Bei den verbleibenden neun Nitrosomonaden-Klonen bzw. vier OTUs (OTU6, OTU25, OTU26, OTU29), die ausschließlich in zwei Fraktionen des ungedüngten Bodens vorkamen (Abb. 47), handelte es sich um Angehörige der *Nitrosomonas-oligotropha*-/*N.-ureae*-Linie. Drei OTUs (OTU25, OTU26, OTU29) konnten als Verwandte von *Nitrosomonas* sp. Nm84 – einem Fluss-Isolat – eingeordnet werden, während OTU6 eine hohe Sequenzähnlichkeit zu *Nitrosomonas oligotropha* zeigte, der ursprünglich aus Boden isoliert wurde. Darüber hinaus wiesen Klone dieser OTUs eine hohe Sequenzähnlichkeit (99-95%) zu einer Reihe an Umweltsequenzen, die aus Belebtschlämmen [(Zheng, unveröffentlicht); (Rotthauwe *et al.*, 1997; Purkhold *et al.*, 2000; Oved *et al.*, 2001; Nicolaisen und Ramsing, 2002)], Ästuaren (Nicolaisen und Ramsing, 2002) und Süßwasser(sedimenten) (Speksnijder *et al.*, 1998; Baribeau *et al.*, 2000; Cebren *et al.*, 2003), aber auch Böden (Vasara; unveröffentlicht); (Dong *et al.*, 2004) stammten.



## **D. DISKUSSION**



Das Aufklären von Strukturen komplexer mikrobieller Lebensgemeinschaften sowie deren Funktionsweisen sind die herausragenden Ziele in der mikrobiellen Ökologie. Inzwischen existiert zwar eine Vielzahl kultivierungsunabhängiger Methoden, mit deren Hilfe die Zusammensetzung von Lebensgemeinschaften erforscht werden kann, doch nur wenige gewähren einen Einblick in die Aktivitäten oder gar spezifischen Funktionen einzelner Organismen innerhalb ihrer Umwelt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein neuartiger Ansatz entwickelt, in dem die Analyse von Gemeinschaftsstrukturen an den Nachweis spezifischer Substratverwertung mit Hilfe direkter Detektion von Umwelt-(16S-)rRNS auf einem Mikroarray gekoppelt ist (Abb. 48).

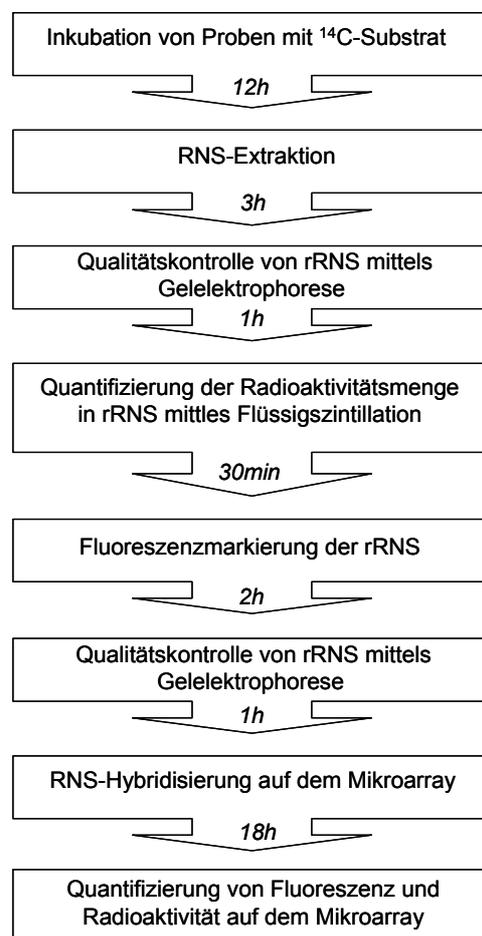


Abb. 48 Flussdiagramm des Isotope Arrays

## **D.I DER PROTOTYP DES AOB-MIKROARRAYS**

### **D.I.1 Isotope-Array-Experimente mit dem Prototyp des AOB-Mikroarrays mit AOB-Reinkulturen**

Zu Beginn wurde ein miniaturisierter AOB-Mikroarray mit publizierten Sonden konstruiert, die bereits bei FISH oder Dot-Blot-Hybridisierungen Anwendung fanden (Wagner *et al.*, 1995; Mobarry *et al.*, 1996; Juretschko *et al.*, 1998; Purkhold, 2003). Die Evaluierung des AOB-Mikroarray-Prototyps mit neun verschiedenen AOB-Referenzorganismen bei optimierten Hybridisierungsbedingungen zeigte einerseits, dass alle Sonden ihre korrespondierenden 16S-rRNS-Moleküle detektiert haben. Andererseits wurde deutlich, dass Hybride zwischen Sonde und rRNS trotz einer bzw. in zwei Fällen zwei Basenfehlpaarungen gebildet wurden (Abb. 3). Mit mehr als zwei Basenfehlpaarungen zwischen Sonde und rRNS-Molekül wurde keine Duplexbildung beobachtet. Der Mangel an Spezifität bei den Sonden NEU und 6a192 könnte durch das Fehlen der zugehörigen Kompletionssonden in der Hybridisierungslösung erklärt werden. Ferner wurde die Spezifität auf dem Mikroarray sowohl durch die Länge als auch den GC-Gehalt der Sonden beeinflusst. Mit dem erreichten – wenn auch nicht perfekten – Maß an Spezifität des AOB-Mikroarray-Prototyps konnten trotzdem einige wesentliche Informationen über die AOB-Populationsstruktur aus Umweltproben gewonnen werden. Unter den verwendeten Bedingungen war es mit dem Prototypen des AOB-Arrays möglich, alle bekannten betaproteobakteriellen AOB (mit Hilfe der Sonden Nso190 und Nso1225) zu detektieren, sowie spezifisch die Präsenz der Gattung *Nitrosospira* (Sonde Nsv443) bzw. der Art *Nitrosococcus mobilis* (Sonde Ncmob) nachzuweisen. Zeigen alle Sondensignale bis auf die Sonde Nsv443 ein positives Signal, so ist dies ein klarer Hinweis auf das Vorhandensein von Nitrosomonaden in der Probe.

Im Rahmen dieser Studie wurde das Spezifitätsniveau des AOB-Prototyp-Arrays als akzeptabel erachtet, da dieser primär dazu benutzt wurde, um die prinzipielle Durchführbarkeit des Isotop-Array Ansatzes zu demonstrieren. Darüber hinaus wurden die Ergebnisse zur AOB-Populationsstruktur in den untersuchten Belebtschlammproben mit Hilfe quantitativer FISH sowie vergleichender *amoA*-Sequenzanalyse verifiziert.

### **D.I.2 Isotope-Array-Experimente mit dem Prototyp des AOB-Mikroarrays mit nitrifizierenden Belebtschlämmen**

Um die Durchführbarkeit des Isotope-Array-Ansatzes zu demonstrieren, wurde diese Methode zur Untersuchung der AOB-Populationsstruktur sowie deren CO<sub>2</sub>-Fixierungsaktivität in zwei verschiedenen, nitrifizierenden Belebtschlämmen eingesetzt. Aus parallel

durchgeführten Studien mit quantitativer FISH bzw. vergleichender *amoA*-Sequenzanalyse ging hervor, dass beide Schlämme sich in ihren AOB-Populationen voneinander unterschieden. Während der Belebtschlamm aus Aalborg West von Vertretern der *N.-oligotropha*-Linie (Koops *et al.*, 2003; Purkhold *et al.*, 2003) dominiert wurde, erwies sich *N. europaea* als einziger AOB-Organismus im Belebtschlamm aus Oberding. Bei beiden Organismen handelt es sich um AOB, die typischerweise in nitrifizierenden Belebtschlämmen gefunden werden (Purkhold *et al.*, 2000; Wagner und Loy, 2002; Wagner *et al.*, 2002).

Die gleichen Sonden, die für FISH-Analysen verwendet wurden, wurden auch für den Isotope Array eingesetzt (Tab. 4). Bei den Versuchen mit beiden Belebtschlämmen zeigten alle Sonden, die in den FISH-Analysen positive Signale lieferten, auch positive Resultate auf dem Isotope Array (Abb. 9). Zudem wurden mit dem Isotope Array auch positive Signale mit der Sonde NEU im Belebtschlamm aus Aalborg West gemessen. Hingegen in den FISH-Analysen blieben diese Signale aus. Die Diskrepanz der Ergebnisse kann durch das Fehlen der Kompetitorsonde CTE, die zu Hybridisierungen auf dem Mikroarray nicht verwendet wurde, in den FISH-Analysen jedoch spezifische Signale der Sonde NEU gewährleistete (Wagner *et al.*, 1995), erklärt werden. Da die Sonde NEU eine einzige Basenfehlpaarung zu 16S rRNS einiger heterotropher Bakterien aufweist, wurden diese in Abwesenheit des zugehörigen Kompetitors mitdetektiert.

Nach Inhibierung der AOB im Belebtschlamm aus Aalborg West mit Allylthioharnstoff konnten auf dem Isotope Array keine Fluoreszenzsignale mit AOB-spezifischen Sonden (mit Ausnahme der Sonde NEU) detektiert werden. Im Gegensatz dazu konnten im Belebtschlamm aus Oberding keine signifikanten Veränderungen in fluoreszenten Hybridisierungsmustern zwischen der inhibierten und nicht inhibierten Probe festgestellt werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass Vertreter der *N.-oligotropha*-Linie aus dem Belebtschlamm Aalborg West ihre Ribosomenzahl nach Hemmung reduziert hatten, so dass sie zwar mit FISH detektierbar blieben, für ihren Nachweis auf dem Mikroarray die rRNS-Menge jedoch nicht ausreichte. Eine vergleichbare Abnahme des zellulären Ribosomengehaltes wurde bei *N. europaea* aus dem Belebtschlamm Oberding nach Hemmung mit Allylthioharnstoff weder in den FISH- noch Array-Experimenten beobachtet. Untersuchungen in der Vergangenheit belegten, dass zumindest einige AOB in der Lage sind, über lange Perioden hinweg hohe rRNS-Konzentrationen trotz Inhibition mit Allylthioharnstoff (Wagner *et al.*, 1995), oder während Hungerphasen (Morgenroth *et al.*, 2000) aufrechtzuerhalten. Es wäre daher vom Interesse, künftig zu untersuchen, ob

speziesspezifische Unterschiede in der Regulation des zellulären Ribosomengehaltes von AOB bestehen.

Wie aus der Abb. 9 ersichtlich, konnte der Einbau von  $^{14}\text{CO}_2$  in die rRNS von AOB mit Hilfe des Isotope Arrays erfolgreich detektiert werden. Erwartungsgemäß wurden hingegen nur sehr geringe Radioaktivitätsmengen in AOB-rRNS aus Kontrollversuchen mit Allylthioharnstoff inkubiertem Belebtschlamm beobachtet. Radioaktive Markierung der rRNS in Gegenwart von Allylthioharnstoff (Sonde EUB338 und NEU) kann wahrscheinlich auf heterotrophe  $\text{CO}_2$ -Assimilation, wie bereits bei Romanenko, 1964; Dijkhuizen und Harder, 2000 beschrieben, zurückgeführt werden.

Für jede Sonde und jeden Inkubationszeitpunkt wurde das Verhältnis aus radioaktiver zu fluoreszenter Signalintensität, der sog. A-Wert (Formel 2, S.52), ermittelt (Abb. 10). Anhand des A-Werts kann die Substratinkorporation einerseits zwischen verschiedenen Zeitpunkten eines Inkubationsexperiments, andererseits zwischen Populationen, die durch verschiedene Sonden detektiert werden, verglichen werden (Adamczyk *et al.*, 2003). Wie erwartet, stiegen die A-Werte der AOB-spezifischen sowie der bakteriellen Sonden im Laufe der Inkubation mit radioaktivem Bikarbonat für beide Belebtschlämme stetig an. Sehr niedrig dagegen blieben die A-Werte für die beiden mit Allylthioharnstoff inhibierten Belebtschlämme. Die vergleichsweise geringeren A-Werte der eubakteriellen Sonde EUB338 geben darüber Aufschluss, dass an die hierarchisch übergeordnete Sonde weit mehr nicht radioaktive rRNS aus heterotrophen Mikroorganismen gebunden hatte.

Interessanterweise wurden nach Hybridisierung mit rRNS aus demselben Belebtschlamm und zu demselben Inkubationszeitpunkt unterschiedliche A-Werte für die unterschiedlichen AOB-spezifischen Sonden ermittelt. Diese Unterschiede könnten die verschiedenen  $\text{CO}_2$ -Fixierungsaktivitäten der verschiedenen AOB-Populationen widerspiegeln. Die Tatsache, dass (zumindest im Belebtschlamm Oberding) es sich lediglich um eine AOB-Population handelte, steht jedoch im Widerspruch zu dieser Hypothese. Vorausgesetzt alle Sonden würden spezifisch an ihre 16S-rRNS-Zielregionen binden, würde man für diesen Belebtschlamm zu gegebenem Inkubationszeitpunkt identische A-Werte für jede AOB-Sonde erwarten. Die plausibelste Erklärung für die unterschiedlich hohen A-Werte für die verschiedenen AOB-spezifischen Sonden ist ihr unterschiedlicher Grad an Bindungsspezifität. Sonden mit einem geringeren A-Wert banden vermutlich an (unterschiedliche Mengen) nicht radioaktive rRNS von heterotrophen Mikroorganismen. So zeigte die Sonde Nso1225 in allen Experimenten die höchsten A-Werte, was zu dem Schluss führte, dass diese Sonde auf dem Mikroarray die höchste Spezifität gegenüber AOB aufwies, und kaum oder gar nicht mit rRNS heterotropher

Mikroorganismen hybridisierte. Diese Schlussfolgerung steht im Einklang mit der jüngst durchgeführten Reevaluierung aller AOB-spezifischer Sonden (Koops *et al.*, 2003), die zeigte, dass gegenwärtig in der 16S-rRNS-Datenbank lediglich vier Nicht-AOB-Sequenzen mit null oder einem Mismatch zur Sonde Nso1225 existieren. Bezüglich der Sonde Nso190, deren A-Werte weit niedriger als die der Nso1225 lagen, konnte anhand der Überprüfung mit der 16S-rRNS-Datenbank eine ähnliche Mismatch-Situation gegenüber Nichtzielorganismen festgestellt werden. Andererseits liegt der Schmelzpunkt der Sonde Nso190 weit höher als der von Nso1225 (Mobarry *et al.*, 1996), so dass die angewendeten Hybridisierungsbedingungen für die Sonde Nso190 unstringenter ausfielen, mit der Konsequenz, dass weit mehr Nichtzielorganismen an diese Sonden binden konnten. Die vergleichsweise niedrigen A-Werte der Sonden NEU sowie 6a192 deuteten ebenfalls auf ihre nicht optimale Bindungsspezifität hin, insbesondere da ihre Spezifität steigenden Kompetitorsonden zu dem Mikroarrayansatz nicht zugegeben werden konnten.

## **D.II DER AOB-MIKROARRAY**

### **D.II.1 Sonden-Design für den AOB-Mikroarray**

Die sowohl funktionell als auch phylogenetisch kohärente (Koops *et al.*, 2003) Gruppe der Ammoniak oxidierenden Bakterien, insbesondere innerhalb der Beta-Proteobakterien, spielt im globalen Stickstoffkreislauf eine zentrale Rolle und konnte bisher in verschiedensten Umwelthabitaten nachgewiesen werden (z.B. Belser, 1979; Prosser, 1989; Wagner *et al.*, 1995; Juretschko *et al.*, 1998; Bothe *et al.*, 2000; Daims *et al.*, 2001b; Koops und Pommerening-Röser, 2001; Kowalchuk und Stephen, 2001; Prosser und Martin Embley, 2002; Zehr und Ward, 2002; Koops *et al.*, 2003). Bis dato wurden bereits zahlreiche, gegen die 16S rRNS von AOB gerichtete Oligonukleotide als Sonden oder als PCR-Primer publiziert (McCaig *et al.*, 1994; Hiorns *et al.*, 1995; Voytek und Ward, 1995; Wagner *et al.*, 1995; Hovanec und DeLong, 1996; Mobarry *et al.*, 1996; Pommerening-Röser *et al.*, 1996; Rath, 1996; Chandler *et al.*, 1997; Hastings *et al.*, 1997; Kowalchuk *et al.*, 1997; Suwa *et al.*, 1997; Ward *et al.*, 1997; Juretschko *et al.*, 1998; Stephen *et al.*, 1998; Utaaker und Nes, 1998; Burrell *et al.*, 2001; Gieseke *et al.*, 2001; Hermansson und Lindgren, 2001; Silyn-Roberts und Lewis, 2001; Hollibaugh *et al.*, 2002; Purkhold, 2003). Ihre Evaluierung mit dem aktuellen AOB-16S-rRNS-Sequenzdatensatz zeigte jedoch, dass nur wenige die gewünschte Spezifität bzw. Sensitivität besitzen, da die Mehrheit dieser Oligonukleotide viele Nicht-AOB-Organismen erfasst bzw. ganze AOB-Gruppen nicht detektiert (Koops *et al.*, 2003).

Für Populationsanalysen komplexer AOB-Lebensgemeinschaften in der Umwelt bieten sich moderne Hybridisierungsmethoden, wie z. B. DNS-Mikroarrays, an. Sie erfordern jedoch einen möglichst umfangreichen und alle bekannten AOB erfassenden SONDENSATZ. Angesichts der unzureichenden Spezifität wie Sensitivität der publizierten, gegen die AOB gerichteten Sonden war es erforderlich, einen hierarchisch aufgebauten SONDENSATZ zu konstruieren, der eine eindeutige Identifizierung aller bekannten AOB ermöglichen würde. Zu diesem Zweck wurde für das SONDENSATZDESIGN das von Behr *et al.*, 2000; bzw. Amann und Schleifer, 2001 vorgeschlagene Mehrfachsondenkonzept eingesetzt.

Mit 123 größtenteils neu entworfenen, drei bakteriellen, drei universalen sowie drei Kontrollsonden wurde ein SONDENSATZ geschaffen, der eine eindeutige Identifizierung aller bisher durch Kultivierung oder molekulare Methoden bekannten AOB-Gruppen ermöglicht.

Um ähnliche Dissoziationseigenschaften der Sonden von ihren Zielsequenzen zu erzielen, wurde für die Mehrzahl der Sonden (105) ein möglichst enger GC-Gehaltsbereich zwischen 50 und 56% gewählt. Aufgrund hoher Sequenzähnlichkeiten (min. 89%) auf 16S-rRNS-Ebene zwischen den einzelnen AOB-Gruppen wurde die Wahl einiger, außerhalb dieses GC-Bereichs liegender Sonden für eine eindeutige Unterscheidung der Organismen erforderlich. So wurden sieben Sonden mit einem GC-Gehalt zwischen 39-44%, aber auch elf mit einem GC-Gehalt zwischen 61-83% in den SONDENSATZ aufgenommen.

Für die AOB-Gruppe der *Nitrosospira* (Koops *et al.*, 2003) erwies sich das SONDENSATZDESIGN als eine besondere Herausforderung. Diese Organismengruppe weist sehr hohe Sequenzähnlichkeitswerte von min. 96% auf 16S-rRNS-Ebene auf (Koops *et al.*, 2003; Purkhold *et al.*, 2003), so dass ihre phylogenetisch eher instabile Untergliederung in „Pseudocluster“ sich nur bedingt in der Sondenabdeckung widerspiegelt (Abb. 20 bis Abb. 22). Für alle anderen AOB-Entwicklungslinien schlug sich die von Koops *et al.*, und 2003; Purkhold *et al.*, 2003 vorgeschlagene AOB-Phylogenie im SONDENSATZDESIGN größtenteils nieder (Abb. 11 bis Abb. 19).

## **D.II.2 Evaluierung des AOB-Mikroarrays mit Reinkulturen**

Für eine künftige Verwendung des AOB-Mikroarrays als Inventarisierungswerkzeug für komplexe AOB-Lebensgemeinschaften in der Umwelt wurden zwei Detektionsansätze – mit PCR-amplifizierten 16S-rRNS-Genen bzw. direkt extrahierter rRNS – erprobt. Zu Vermeidung eines enormen Kultivierungsaufwands zur direkten Gewinnung ribosomaler RNS aus allen verfügbaren AOB, deren Generationszeiten sich auf mehrere Stunden bis Tage belaufen (Koops *et al.*, 2003), wurden für diese rRNS-Hybridisierungen *in-vitro*-transkribierte 16S-rRNS-Gene eingesetzt.

Die Verwendung des PCR-Ansatzes zur Amplifikation von 16S-rRNS-Genen für nachfolgende Hybridisierungen auf dem Mikroarray bietet die Möglichkeit, ausreichende Kopienzahlen von 16S-rRNS-Genen, z. B. durch die Wahl geeigneter PCR-Primer, selbst von selten vorkommenden Mikroorganismen zu erzeugen, um sie anschließend auf dem Mikroarray zu detektieren. Durch PCR-Amplifikation von 16S-rRNS-Genen aus der Umwelt wird jedoch gleichzeitig die tatsächliche Populationsstruktur aufgrund PCR-bedingter Verzerrungseffekte (Suzuki und Giovannoni, 1996; von Wintzingerode *et al.*, 1997; Polz und Cavanaugh, 1998; Becker *et al.*, 2000; Crosby und Criddle, 2003; Lueders und Friedrich, 2003) nicht korrekt wiedergegeben. Eine Möglichkeit, dieses Problem zu umgehen, ist die Verwendung direkt aus der Umweltprobe extrahierter rRNS. Wegen ihrer größeren Instabilität im Vergleich zur DNS stellt dieser Ansatz einerseits relativ hohe technische Anforderungen, um intakte rRNS effizient aus der Umweltprobe zu extrahieren. Andererseits beinhaltet dieser Detektionsansatz keinen Amplifikationsschritt und erlaubt somit eine weniger verfälschte Erfassung der mikrobiellen Populationsstruktur. Allerdings ist dabei zu beachten, dass einige Organismen, wie AOB, auch über lange Perioden physiologischer Inaktivität hinweg in der Lage sind, einen hohen Ribosomengehalt aufrechtzuerhalten (Wagner *et al.*, 1995; Morgenroth *et al.*, 2000).

Um den AOB-Mikroarray fortan für beide Ansätze nutzen zu können, wurden zunächst optimale Hybridisierungsbedingungen sowohl für PCR-amplifizierte 16S-rRNS-Gene, als auch für *in-vitro*-transkribierte 16S rRNS von AOB-Referenzstämmen getestet.

Anhand von Dissoziationsreihen mit Sonden und ihren Zielsequenzen auf PCR-amplifizierten bzw. *in-vitro*-transkribierten 16S-rRNS-Genen konnte zunächst festgestellt werden, dass die Mehrzahl der Hybride in jeweils beiden Ansätzen einen ähnlichen und relativ engen, Schmelzbereich hinsichtlich Temperatur bzw. Formamid-Konzentration besaß (Abb. 24 bzw. Abb. 26). Dies ist vermutlich auf die gleiche Länge und – zumindest für die Mehrzahl der Sonden – den ähnlichen GC-Gehalt der Sonden zurückzuführen. Um den Einfluss von GC-Gehaltsunterschieden auf die Hybridstabilität zwischen den einzelnen Sonden und ihren PCR-amplifizierten 16S-rRNS-Genen zu verringern, wurde zudem Tetramethylammoniumchlorid, ein sog. GC-Equalizer (Maskos und Southern, 1992), zum Waschpuffer zugesetzt.

Anders als in Experimenten mit PCR-amplifizierten 16S-rRNS-Genen wurde zu Hybridisierungen mit *in-vitro*-transkribierter 16S rRNS kein Tetramethylammoniumchlorid zugesetzt. Dies lag daran, dass unterschiedliche Hybridisierungssysteme für PCR-amplifizierte bzw. *in-vitro*-transkribierte 16S-rRNS-Gene verwendet wurden. Es wurde festgestellt, dass das ursprünglich für PCR-Amplifikate entwickelte Hybridisierungssystem, in

dem die Stringenz durch Temperierung des Waschpuffers reguliert wurde, für Hybridisierungen mit rRNS nicht geeignet war (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde für Hybridisierungen mit rRNS ein Protokoll verwendet, indem die Stringenz im Hybridisierungspuffer mit Formamid, jedoch ohne Zugabe von Tetramethylammoniumchlorid eingestellt wurde. Künftig böte sich die Möglichkeit, das bestehende Hybridisierungsprotokoll für rRNS durch Zugabe von Tetramethylammoniumchlorid zum Hybridisierungspuffer zu modifizieren, um durch seine Eigenschaft als GC-Equalizer (Maskos und Southern, 1992) die Hybridisierungen mit rRNS zu optimieren.

Generell konnte, wie erwartet, beobachtet werden, dass für die überwiegende Mehrzahl von Sonden positive Hybridisierungssignale mit ihren Zielsequenzen sowohl auf PCR-amplifizierten 16S-rRNS-Genen als auch *in-vitro*-transkribierter 16S rRNS innerhalb eines engen Stringenzbereiches gemessen wurden, wohingegen Signale mit Nichtzielsequenzen zumeist negativ waren.

Darüber hinaus wurde für beide Ansätze deutlich, dass Signalintensitäten für Zielsequenzen verschiedener Referenzstämme, die mit der gleichen PM-Sonde hybridisierten, in ihrer Höhe variierten (Abb. 24 und Abb. 25 bzw. Abb. 26 und Abb. 27). Zudem fiel auf, dass positive Signale für einzelne Sonden in Gegenwart ihrer Zielsequenzen sowohl auf PCR-amplifizierten als auch *in-vitro*-transkribierten 16S-rRNS-Genen wider Erwarten ausblieben (Tab. 7 bzw. Tab. 8). Dieses Problem konnte trotz Wiederholung von Experimente nicht behoben werden.

Die Erklärung für dieses Phänomen liefern vermutlich zumindest zum Teil die ungünstigen Umstände, die zum Zeitpunkt der Hybridisierungen und den damit verbundenen Arbeiten geherrscht hatten. Die Herstellung von Mikroarrays mit dem Arrayspotter, Fluoreszenzmarkierung von Nukleinsäuren, sowie Hybridisierungen und Waschungen mussten zu einem Zeitpunkt (Juli und August 2003) ungewöhnlich hoher Außentemperaturen (30 bis 40°C), mangels einer Klimaanlage in nicht klimatisierten Laborräumen durchgeführt werden. Bei diesen Arbeiten handelt es sich jedoch um temperaturempfindliche Vorgänge, welche folglich von Temperaturschwankungen nachteilig beeinflusst werden können. Ein entscheidendes Problem waren die wiederholt auftretenden Fehlfunktionen des Arrayspotters, die vom Fachpersonal nichtzufrieden stellend behoben werden konnten. Denkbare Folgen waren variierende Sondenmengen pro Spot bis hin zum Ausfall einzelner Sondenspots.

Außerdem traten vereinzelt falsch positive Signale für fehlgepaarte Hybride auf, die nur durch eine Stringenzerhöhung zu diskriminieren wären, was jedoch zu Signalverlust zahlreicher, korrekt gepaarter Hybride führen würde. Um für beide Detektionsansätze optimale

Stringenzbedingungen zu finden, musste jeweils ein Kompromiss zwischen Sensitivität und Spezifität getroffen werden. Anhand graphisch ermittelter Schmelzpunkte (Abb. 24 bzw. Abb. 26) wurde für weitere Hybridisierungen mit PCR-amplifizierten bzw. *in-vitro*-transkribierten 16S-rRNS-Genen eine Waschttemperatur von 57°C bzw. ein Formamid-Gehalt im Hybridisierungspuffer von 15% (v/v) als optimal erachtet, und für Testreihen mit Reinkulturen eingesetzt.

Im nächsten Schritt sollte die Sensitivität sowie Spezifität des AOB-Sondensatzes in Hybridisierungen mit PCR-amplifizierten bzw. *in-vitro*-transkribierten 16S-rRNS-Genen bei den zuvor ermittelten und als optimal erachteten Stringenzbedingungen auf dem AOB-Mikroarray evaluiert werden. Zu diesem Zweck wurden zum einen PCR-amplifizierte 16S-rRNS-Gene von 34 AOB-Referenzorganismen mit 123 AOB-spezifischen Sonden auf dem AOB-Mikroarray getestet, was 4182 Einzelhybridisierungen entsprach. In 3899 (93%) Fällen konnte ein korrektes Ergebnis erzielt werden, weil die Sonden ausschließlich mit ihren Zielsequenzen hybridisierten bzw. ihre Hybridisierungssignale mit Nichtzielsequenzen unter dem Schwellenwert von 2,0 geblieben sind (Tab. 7). Parallel dazu wurde der AOB-Mikroarray mit 29 verschiedenen *in-vitro*-transkribierten 16S-rRNS-Sequenzen getestet, was bei 123 Sonden 3567 Einzelhybridisierungen entsprach. 3252 dieser Hybridisierungen erwiesen sich dabei als korrekt, d.h. in 91% der Einzelhybridisierungen konnte das erwartete Ergebnis beobachtet werden (Tab. 8).

Wie bereits bei den Dissoziationsreihen wurden auch bei diesen Experimenten unerwartete Signalausfälle von Sonden in Gegenwart ihrer Zielsequenzen beobachtet. Einige Sonden hybridisierten zwar erfolgreich mit ihren rRNS-Zielsequenzen, versagten jedoch in Anwesenheit von PCR-Amplifikaten. Das gleiche wurde ebenso für den umgekehrten Fall beobachtet. Einige wenige Sonden zeigten niemals positive Hybridisierungssignale, weder in Anwesenheit ihrer PCR-amplifizierten noch *in-vitro*-transkribierten Zielsequenzen, weshalb sie künftig vom Sondensatz entfernt werden sollten.

Die Ursachen für das Ausbleiben erwarteter Sondersignale könnten vielfältiger Natur sein. Der Signalausfall von Sonden sowohl in Anwesenheit PCR-amplifizierter als auch *in-vitro*-transkribierter Zielsequenzen könnte durch Sequenzierfehler, die zu inkorrektem Sondendesign geführt haben, oder mangelhafte Sondensynthese verursacht werden. Partieller Sondenausfall, d.h. teilweise positive aber auch unerwartete, falsch negative Signale mit Zielsequenzen unterschiedlicher Zielorganismen, ebenso wie vereinzelt falsch negative Signale mit Ziel- und zugleich falsch positive Signale mit Nichtzielsequenzen können lediglich durch die bereits beschriebenen, ungünstigen Bedingungen erklärt werden. Die

erhöhte Raumtemperatur wirkte sich offensichtlich nachteilig auf die Effizienz der Fluoreszenzmarkierung der Nukleinsäuren, ebenso wie auf die Funktionstüchtigkeit des Arrayspotters aus, was hohe Signalschwankungen bis hin zum Signalausfall zu Folge hatte. Die Effizienz der Fluoreszenzmarkierung von Reinkulturen ließe sich künftig anhand von sog. L-Werten (Schulz, 2003) bestimmen, indem jeweils Quotienten aus T-Werten einzelner, zu untersuchender Sonden und dem einer Sonde mit konstantem Fluoreszenzsignal ermittelt würden. Dafür erwies sich die CONT-Sonde als geeignet, weil sie in jeder Hybridisierung mit gleicher Menge ihres komplementären Oligonukleotids CONT-COMP detektiert wird, das eine bekannte Menge an Fluoreszenzfarbstoff trägt. Die L-Werte könnten jedoch nur dann sinnvoll ausgewertet werden und Vergleiche von Hybridisierungen auf verschiedenen Objektträgern ermöglichen, wenn sichergestellt würde, dass von jeder Sonde gleichviel gespottet wurde.

Neben technisch-methodischen Ursachen für Unterschiede in der Signalintensität zwischen einzelnen Sonden können molekulare Wechselwirkungen, wie z.B. Sekundärstrukturen innerhalb einer Sonde, oder physikalisch-chemische Gegebenheiten, wie z.B. die Höhe der durch Hybridbildung bedingten Freien Enthalpie  $-\Delta G^\circ$ , eine Rolle spielen. Um diese Signalintensitätsunterschiede von Sonde zu Sonde in Gegenwart ihrer Reinkultur-Zielsequenzen zu erfassen und zu vergleichen, könnten aus dem Verhältnis des T-Werts der zu untersuchenden Sonde und dem der EUB338-Sonde sog. R-Werte (Loy *et al.*, 2002) innerhalb einer Hybridisierung ermittelt werden.

Sowohl für die L- als auch R-Werte spielt die Sondenmenge pro Spot eine essentielle Rolle, da sie die Signalintensität von Sonden direkt beeinflusst. Um die Signalintensitäten von Sonden innerhalb einer Hybridisierung korrekt evaluieren zu können, müsste die auf dem Objektträger immobilisierte Sondenmenge pro Spot quantifiziert werden. Als Möglichkeit hierfür böte sich die Anfärbung der immobilisierten Sonden mit einem spezifisch an einzelsträngige DNS bindenden Fluoreszenzfarbstoff, wie z.B. SYBR<sup>®</sup> Green II. Mittels digitaler Bildanalyse könnte die Sondenmenge pro Spot in Abhängigkeit von seiner Fluoreszenzintensität bestimmt werden (Battaglia *et al.*, 2000). Um eine Verfälschung von Messergebnissen zu vermeiden, müssten nach Hybridisierung und Fluoreszenzevaluierung eines Objektträgers die an Sonden hybridisierten Nukleinsäuren (z.B. durch denaturierende Waschlösung) restlos entfernt werden, bevor die Sonden mit SYBR<sup>®</sup> Green II angefärbt würden. Mit den ermittelten Sondenmengen-Koeffizienten könnten anschließend die einzelnen L- sowie R-Werte korrigiert werden, welche nun echte Vergleiche von

Sondenintensitäten sowohl innerhalb einer als auch zwischen verschiedenen Hybridisierungen zuließen.

Für den unerwarteten Ausfall von Sondersignalen kommen auch andere Ursachen als Erklärungen in Frage. Dabei sollte zunächst die Unzugänglichkeit von bestimmten Sondenbinderegionen auf den Nukleinsäuren wegen starker, nicht dissoziierter Sekundärstrukturen erwähnt werden. Dieses Phänomen wurde intensiv in Zusammenhang mit dem Design von Sonden für FISH beobachtet und vor allem auf interhelikale rRNS-rRNS-Interaktionen zurückgeführt (Fuchs *et al.*, 1998; Behrens *et al.*, 2003a; Behrens *et al.*, 2003b). Da für die Hybridisierungen auf Mikroarrays extrahierte und von Proteinen weitestgehend gereinigte PCR-Amplifikate und *in-vitro*-transkribierte rRNS eingesetzt wurden, kommen vermutlich starke Sekundärstrukturen, die trotz „random prime labeling“ bzw. alkalischer Hydrolyse nicht aufgehoben werden konnten, als Erklärung in Frage. Gleichzeitig könnte sich das Fragmentieren von rRNS bzw. deren PCR-amplifizierter Gene durch das Zerstören „bevorzugter“ Sondenbinderegionen nachteilig auswirken und das unterschiedliche Ausbleiben von erwarteten Sondersignalen erklären. Auffallend oft wurde bei Hybridisierungen mit 16S rRNS ein Signalausfall von Sonden mit Bindeposition um die Base 830 beobachtet (Tab. 8). Diese Region wurde bereits von (Fuchs *et al.*, 1998) für FISH-Sonden als schwer zugänglich postuliert und ist offensichtlich auch für Mikroarray-Sonden blockiert. Zudem wurde bei Hybridisierungen mit PCR-Amplifikaten beobachtet, dass Signale von Sonden, deren Bindepositionen nahe des 5'- bzw. 3'-Endes von 16S-rRNS-Genen lagen, häufiger ausfielen, als solche, deren Zielregionen sich zentraler im Gen befanden. Offenbar wurden die randständigen Amplifikatregionen durch das „random prime labeling“ vergleichsweise schwächer mit Fluoreszenz markiert als die zentral gelegenen, wodurch der Signalausfall von jenen Sonden erklärt werden könnte.

Neben unerwartetem Signalausfall wurde auch für einige Sonden unspezifische Bindung an Nichtzielsequenzen festgestellt. Dies war insbesondere dann der Fall, wenn sich in gegebenen Duplices schwache, und darum nicht diskriminierbare Basenfehlpaarungen befanden. Für einige wenige Sonden wurde eine überdurchschnittlich hohe Unspezifität mit Nichtzielsequenzen beobachtet (DNS: AOB42, AOB78, AOB81; RNS: AOB99, AOB51, AOB66, AOB101 und AOB81), weshalb diese künftig aus dem Sondersatz entfernt werden sollten (Tab. 7 und Tab. 8). Insbesondere bei Hybridisierungen mit rRNS wiesen Sonden mit Binderegionen um die Basen 190 (AOB2, AOB51) bzw. 650 (AOB66, AOB81, AOB99, AOB101) häufig falsch positive Signale auf. Bemerkenswert waren dabei die Sonden AOB66, AOB99 und AOB101, für die in Hybridisierungen mit rRNS eine 31- bis 83%-ige

Fehlerquote ermittelt wurde, während sie mit PCR-amplifizierten 16S-rRNS-Genen maximal 6% falsch positive Signale lieferten. Als Erklärung für dieses Phänomen könnte die Ausbildung unterschiedlich starker Hybride zwischen Sonde und Zielsequenz, je nach dem ob es sich um DNS-DNS- oder DNS-RNS-Moleküle handelt, in Frage kommen. Zusätzlich könnte die Hybridstabilität durch intramolekulare Sekundärstrukturen, vor allem um die Sondenbinderegionen, die innerhalb von rRNS-Molekülen stärker als bei DNS-Molekülen ausgeprägt sind, beeinflusst werden.

Die Testhybridisierungen mit PCR-amplifizierten sowie *in-vitro*-transkribierten 16S-rRNS-Genen bei den jeweilig gewählten Stringenzbedingungen zeigten, dass eine eindeutige Identifizierung aller getesteten AOB-Organismen mit dem neuen AOB-Sondensatz prinzipiell möglich war. So könnten dank dem Mehrfachsondenkonzept die vereinzelt unspezifischen Signale mancher Sonden toleriert werden, da sie für die Populationsanalyse nicht berücksichtigt werden. Die bereits erwähnten, ungünstigen Umstände, bei denen die Testreihen durchgeführt wurden, wirkten sich jedoch gleichzeitig auf den Hybridisierungserfolg mancher Sonden aus, so dass einige Hybridisierungen mit Reinkulturen zu wiederholen sind.

Mangels verfügbarer Referenzorganismen für die gänzlich aus unkultivierten AOB-Organismen bestehenden „Cluster 1“ und „Cluster 5“ konnten im Rahmen dieser Arbeit keine Testhybridisierungen durchgeführt werden. Diese sollten der Vollständigkeit halber mit Klonen der 16S-rRNS-Gensequenzen, die von diesen Organismen aus der Umwelt gewonnen wurden, noch nachgeholt werden.

Der gegenwärtige Sondensatz ist trotz des hohen AOB-Verwandtschaftsgrades und somit erschwerter Diskriminierung einzelner Organismen(Gruppen) voneinander hinsichtlich Sondenzahl, Speziesabdeckung und nicht zuletzt Spezifität mit den bis dato publizierten Sondensätzen für Sulfat reduzierende Prokaryonten (Loy *et al.*, 2002) und Bakterien der *Rhodocyclales*-Gruppe (Loy *et al.*, 2004) vergleichbar.

### **D.III DER ISOTOPE ARRAY: EVALUIERUNG DES AOB-MIKROARRAYS MIT KOMPLEXEN UMWELTPROBEN**

Nach Testreihen mit Reinkulturen sollte der neu entworfene AOB-Mikroarray hinsichtlich Spezifität und Sensitivität mit komplexen, jedoch zuvor mit etablierten Methoden charakterisierten Umweltproben überprüft werden. Die zum Zeitpunkt der Evaluierung des AOB-Mikroarrays herrschenden, ungünstigen Versuchsbedingungen, wie erhöhte Raumtemperatur sowie die unter Umständen dadurch bedingte, eingeschränkte Funktionstüchtigkeit des Arraysporters, hatten eine Minderung der Ergebnisqualität zu Folge, so dass sie zunächst gegen eine Fortsetzung von Experimenten mit komplexen Umweltproben auf dem AOB-Mikroarray sprachen. Diese Experimente wurden jedoch trotzdem durchgeführt, da radioaktiv- und fluoreszenzmarkierte rRNS aus zwei Belebtschlämmen der Kläranlagen Aalborg West bzw. Oberding, die für den Prototyp des Isotope Arrays verwendet wurde, bereits vorhanden jedoch nicht unbegrenzt lagerfähig war. So konnte die Eignung des neuen AOB-Mikroarrays als sog. Isotope Array, ein Werkzeug zu Struktur-Funktions-Analyse von komplexen Lebensgemeinschaften, mit bereits für den Prototyp des Isotope Arrays untersuchtem und daher bekanntem Probematerial überprüft werden. Als Kontrolle für die neue Methode wurden Resultate aus vorangegangenen *amoA*-Gensequenz- (C.III.1 und Abb. 5), quantitativen FISH- (C.III.2) sowie FISH-MAR-Analysen (C.III.3 und Abb. 6) der beiden verwendeten Belebtschlämme herangezogen.

#### **D.III.1 Isotope Array mit rRNS aus der Kläranlage Aalborg West**

Die anhand von Hybridisierungen mit Reinkulturen ermittelte, optimale Stringenz von 15% (v/v) Formamid im Hybridisierungspuffer wurde auch für die Isotope-Array-Experimente mit rRNS aus dem Belebtschlamm der Kläranlage Aalborg West, der für 13 Stunden mit  $^{14}\text{CO}_2$  inkubiert wurde (Adamczyk *et al.*, 2003), eingesetzt. Die dabei ermittelten Fluoreszenzsignale der aktiven sowie der mit Allylthioharnstoff inhibierten Probe zeigten, dass lediglich die beiden übergeordneten Sonden EUB338 sowie UnivA, jedoch keine der AOB-spezifischen Sonden über dem Schwellenwert von 2,0 lagen (Abb. 29). Die Detektion radioaktiver Signale wurde zunächst nach einer 7-tägigen Exposition des AOB-Mikroarrays im  $\mu$  IMAGER™ ausgewertet, wurde jedoch verlängert, da die Intensitätswerte für alle visuell detektierbaren Sonden wie EUB338, UnivA sowie AOB52 knapp unterhalb des T-Grenzwertes von 2,0 (1,8 bis 1,9) lagen. Erst nach einer 4-wöchigen Exposition konnten die radioaktiven Signale der übergeordneten Sonden EUB338 und UnivA, aber ebenso der *Nitrosomonas-oligotropha*-Linie detektierenden Sonde AOB52 als positiv gewertet werden (Abb. 29). Weitere, visuell

detektierbaren Sondensignale (AOB58, AOB3, AOB2, AOB51, AOB97, UnivB, UnivC) wurden für negativ befunden, da sie nach wie vor unter dem Schwellenwert von 2,0 lagen.

Ein Vergleich radioaktiver mit fluoreszenten Signalen zeigte, dass für die Sonde AOB52 das radioaktive Signal über dem Schwellenwert von 2,0 lag, während das zugehörige Fluoreszenzsignal lediglich den Wert 1,4 erreichte (Tab. 9). Dieses Phänomen wies vermutlich auf eine unzureichende Fluoreszenzmarkierung der rRNS hin. Der FISH-Flächenquantifizierung zufolge (C.III.2), die auf der Annahme basiert, dass die Fläche einer Zelle direkt proportional zu ihrer Ribosomenzahl ist, belief sich die AOB-(rRNS-) Population auf max. 5% des bakteriellen Biovolumens bzw. dessen rRNS (Adamczyk *et al.*, 2003). Die zahlenmäßige Unterlegenheit von AOB bzw. ihrer rRNS gegenüber Nicht-AOB (rRNS) im Belebtschlamm könnte somit eine weitere Erklärung für das niedrige Fluoreszenzsignal der Sonde AOB52 liefern. So lag offenbar die AOB-Konzentration für den Fluoreszenznachweis nahe am Detektionslimit des Mikroarrays. Aufgrund u.a. verlängerter Expositionszeit im  $\mu$  IMAGER™, sowie selektiver Markierung der CO<sub>2</sub>-assimilierenden AOB mit <sup>14</sup>C-Bikarbonat lag dagegen die Nachweisgrenze für Radioaktivität auf dem Mikroarray tiefer als für Fluoreszenz.

Das Ausbleiben radioaktiver Signale mit Allylthioharnstoff inhibierter Kontrollprobe zeigte, dass die <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-Assimilation im Belebtschlamm vorrangig von autotrophen AOB betrieben wurde, und dass es sich bei den radioaktiven Signalen der aktiven Belebtschlammprobe nicht um Artefakte handelte.

Setzt man die Intensitätswerte der radioaktiven und fluoreszierenden Signale der einzelnen Sonden ins Verhältnis, so lässt sich der sog. A-Wert (Formel 2, S.52), (Adamczyk *et al.*, 2003) ermitteln, der Aufschluss über die Assimilationsaktivität der detektierten Organismen gibt. Demzufolge erreichte die *N.-oligotropha*-Linie detektierende Sonde AOB52 (Abb. 30) den höchsten A-Wert, während die beiden übergeordneten Sonden EUB338 sowie UnivA erwartungsgemäß nur sehr geringe A-Werte erzielten, da sie mit rRNS autotropher und heterotropher, also nicht radioaktiv markierter Organismen hybridisierten.

Dieses Ergebnis zeigte, dass sich aktive, *N.-oligotropha*-verwandte Organismen im Belebtschlamm der Kläranlage Aalborg West befanden und stimmte somit mit Befunden zuvor durchgeführter *amoA*-Gensequenz- (Abb. 5 und C.III.1), quantitativer FISH- (C.III.2) sowie FISH-MAR-Analysen (C.III.3) überein. Allerdings darf nicht unerwähnt bleiben, dass erwartete Signale hierarchischer Sonden für diese Organismengruppe, welche die Präsenz *N.-oligotropha*-verwandter Organismen untermauern würden, ausblieben (Abb. 29 und Abb. 30). Möglicherweise war die eingesetzte Stringenz von 15% (v/v) Formamid im

Hybridisierungspuffer für die Analysen von Umweltproben zu hoch. Darum wurden zusätzlich Experimente mit niedrigerer Stringenz bei 10% (v/v) Formamid im Hybridisierungspuffer durchgeführt. Es wurde erwartungsgemäß, sowohl mit rRNS aus aktivem als auch mit Allylthioharnstoff inhibiertem Belebtschlamm eine größere Anzahl an positiven Fluoreszenzsignalen gegenüber dem Versuch bei höherer Stringenz gemessen (Abb. 31). Nach einer siebentägigen Exposition des Isotope Arrays im  $\mu$  IMAGER™ erbrachte die Auswertung radioaktiver Signale der aktiven Belebtschlammprobe eine ebenfalls höhere Anzahl an positiven SONDensignalen (Tab. 9) verglichen mit dem Experiment bei erhöhter Stringenz. Für die inhibierte Belebtschlammprobe blieben positive, radioaktive Signale aus. Die quantitative Bestimmung der Assimilationsaktivität der detektierten Organismen (Tab. 9 und Abb. 33) ergab, dass der höchste A-Wert von der *N.-oligotropha*-/*N.-marina*- (AOB58) gefolgt von der *N.-oligotropha*-spezifischen Sonde (AOB52) erreicht wurde. Ferner erzielte die Sonde AOB3, die mehrere AOB-Entwicklungslinien, darunter auch Organismen aus der *N.-oligotropha*-Linie („Cluster 6a“) erfasst, einen ebenso hohen A-Wert wie die Sonde AOB58, wobei ihr Radioaktivitätssignal noch unterhalb des Schwellenwertes bei 1,7 lag. Wie erwartet, fielen die A-Werte der beiden übergeordneten Sonden EUB338 und UnivA am niedrigsten aus, da die Sonden auch mit rRNS heterotropher Organismen hybridisierten. Die übergeordneten, AOB- sowie „Cluster 6a“-spezifischen SONDensignale deckten sich mit den Befunden unabhängiger Analysen (Abb. 5) (Adamczyk *et al.*, 2003) und bestätigten die Präsenz sowie Aktivität *N.-oligotropha*-verwandter Organismen im Belebtschlamm von Aalborg West. Die für diese Organismengruppe erzielten A-Werte (Tab. 9 und Abb. 33) übertrafen jene aller anderen Sonden und weisen somit auf Dominanz *N.-oligotropha*-verwandter Organismen innerhalb der AOB-Gemeinschaft im Belebtschlamm der Kläranlage Aalborg West hin (Adamczyk *et al.*, 2003).

### D.III.2 Isotope Array mit rRNS aus der Kläranlage Oberding

Analog zu Belebtschlamm der Kläranlage aus Aalborg West wurde nun die AOB-Gemeinschaft des Belebtschlammes der Oberdinger Kläranlage mit dem Isotope Array untersucht. Zu diesem Zweck wurde rRNS aus aktivem bzw. mit Allylthioharnstoff inhibiertem, und jeweils für 11,5 Stunden mit  $^{14}\text{C}$ -Bikarbonat inkubiertem Belebtschlamm analysiert. Ebenso wie mit rRNS aus Aalborg West wurden die Hybridisierungen zunächst bei 15% (v/v) Formamid im Hybridisierungspuffer durchgeführt (Abb. 34). Dabei zeigte sich jedoch, dass lediglich die übergeordneten Sonden EUB338, EUB338III, UnivA, UnivB und UnivC, sowie die mehrere AOB-Entwicklungslinien erfassende Sonde AOB2 positive

Fluoreszenzsignale aufwiesen (Tab. 9). Eine 7-tägige Exposition des AOB-Mikroarrays mit rRNS aus inhibierter Belebtschlammprobe im  $\mu$  IMAGER™ erbrachte erwartungsgemäß keine positiven radioaktiven Signale. Eine ebenso lange Radioaktivitätsmessung auf dem AOB-Mikroarray mit rRNS aus aktivem Belebtschlamm zeigte hingegen positive Signale für zwei AOB-spezifische Gruppensonden, AOB2 und AOB5. Beide Sonden erfassen mehrere AOB-Entwicklungslinien, darunter auch *Nitrosomonas-europaea*-verwandte Organismen, die gemäß den zuvor durchgeführten Analysen (Abb. 5, C.III.1, C.III.2, C.III.3 und Abb. 6) in diesem Belebtschlamm präsent und aktiv waren. Anders als erwartet blieben weitere, AOB- sowie *N.-europaea*-spezifische Signale von Sonden unterschiedlicher Hierarchieebenen aus, so dass die Präsenz sowie Aktivität dieser Organismen im Oberdinger Belebtschlamm nicht schlüssig gezeigt werden konnte.

Da der  $\mu$  IMAGER™ nur begrenzt und für dieses Experiment nicht längerfristig verfügbar war, liegen Messwerte nach verlängerter Exposition – vergleichbar mit den Proben aus Aalborg West – leider nicht vor.

Eine quantitative Bestimmung der Assimilationsaktivität mit Hilfe von A-Werten (Abb. 35) zeigte zunächst, dass die beiden, hierarchisch am höchsten stehenden Sonden EUB338 sowie UnivA erwartungsgemäß die geringsten Werte erzielten, da sie neben rRNS autotropher AOB auch mit rRNS heterotropher Organismen hybridisierten. Der höchste A-Wert wurde für die Sonde AOB5 ermittelt, obwohl ihr Fluoreszenzsignal ( $T_F=1,5$ ) unterhalb des Schwellenwerts von 2,0 lag (Tab. 9). Für die übergeordnete, AOB-spezifische Sonde AOB2 wurde ein geringerer A-Wert berechnet und zeugte entweder von Präsenz nicht aktiver AOB oder von unspezifischer Bindung mit rRNS heterotropher Organismen.

Wie bereits erwähnt, lag in diesem Versuch das Fluoreszenzsignal der AOB-spezifischen Sonde AOB5 unterhalb des Schwellenwerts von 2,0, während gleichzeitig ein positives Radioaktivitätssignal für diese Sonden gemessen wurde. Vermutlich handelte es sich um eine unzureichende Fluoreszenzmarkierung der rRNS, in welche jedoch selektiv radioaktives Bikarbonat aufgrund der CO<sub>2</sub>-Fixierungsaktivität von AOB eingebaut wurde. Gemäß der FISH-Flächenquantifizierung, bei der angenommen wird, dass die Fläche einer Zelle proportional zu ihrer Ribosomenzahl ist, belief sich die AOB-Population auf max. 10% des gesamten bakteriellen Biovolumens (Adamczyk *et al.*, 2003). Darum reichte die AOB-Konzentration offensichtlich nicht aus, um die niedrige Effizienz der Fluoreszenzmarkierung durch z.B. hohe Zell- bzw. Ribosomenzahl in Bezug auf die Gesamtpopulation zu kompensieren.

Den Resultaten aus vergleichender *amoA*-Gensequenz- (C.III.1), quantitativer FISH- (C.III.2) sowie FISH-MAR-Analyse (C.III.3) zufolge, bildeten ausschließlich *N.-europaea*-verwandte Organismen die AOB-Population im Belebtschlamm aus Oberding (Adamczyk *et al.*, 2003). Dagegen deuteten – wenn auch nicht vollständig konsistent – die Isotope-Array-Experimente auf Präsenz und Aktivität von Organismen aus dem sog. „Cluster 7“ (*N.-europaea*-Linie) bzw. „Cluster 6b“ (*N.-marina*-Linie) im Belebtschlamm aus Oberding hin. Da jedoch viele Signale knapp unter dem Schwellenwert von  $T=2,0$  lagen, und daher kein vollständiges Signalmuster für keine der beiden Organismengruppen vorlag, wurden die Isotope-Array-Versuche bei einer niedrigeren Stringenz, bei 10% (v/v) Formamid im Hybridisierungspuffer wiederholt (Abb. 36).

Die Fluoreszenz- sowie Radioaktivitätsevaluierung des Isotope Arrays mit rRNS aus der aktiven Belebtschlammprobe zeigte weit mehr positive SONDENSIGNALE, als zuvor im Versuch bei höherer Stringenz erzielt wurden. Dabei stimmte das fluoreszente Signalmuster der Kontrollhybridisierung mit rRNS aus inhibiertem Belebtschlamm weitestgehend mit dem des aktiven Belebtschlamm überein. Radioaktive Signale, die vorrangig auf aktive, autotrophe AOB zurückzuführen wären, blieben dagegen in der mit Allylthioharnstoff inkubierten Belebtschlammprobe erwartungsgemäß aus (Tab. 9).

Zu Ermittlung der Assimilationsaktivitäten für die detektierte AOB-Gemeinschaft wurden erneut aus den Radioaktivitäts- und Fluoreszenzintensitäten einzelner Sonden A-Werte berechnet (Abb. 38). Dabei wurde deutlich, dass die Sonden AOB79 (*N.-europaea*-Linie), AOB5 („Cluster 6b“ und „Cluster 7“), AOB85 (*N.-europaea*-/*N.-eutropha*-Linie), sowie AOB78 (*N.-europaea*-Linie) die höchsten A-Werte erzielten und sowohl Präsenz als auch Aktivität von *N.-europaea*-verwandten Organismen im Belebtschlamm aus Oberding bestätigten. Für weitere AOB-spezifische Sonden, wie AOB88, AOB3, AOB2 konnten wesentlich geringere A-Werte ermittelt werden, die entweder auf Anwesenheit inaktiver AOB oder unspezifische Hybridisierung mit rRNS heterotropher Organismen zurückzuführen waren. Die mit Abstand geringsten A-Werte zeigten erwartungsgemäß die beiden hierarchisch übergeordneten Sonden UnivA und EUB338, da sie sowohl mit radioaktiv markierter als auf unmarkierter rRNS heterotropher Organismen hybridisierten.

Anhand des Isotope Arrays (Adamczyk *et al.*, 2003) gelang somit der eindeutige Nachweis von Präsenz und Assimilationsaktivität *N.-europaea*-verwandter Organismen im Oberdinger Belebtschlamm. Zu diesem Zweck fand das Mehrfachsondenprinzip (Behr *et al.*, 2000; Amann und Schleifer, 2001) Anwendung, dem gemäß der Nachweis eines Organismus, wie z.B. von *N. europaea*, durch positive Signale eines hierarchischen SONDENSATZES (UnivA,

EUB338, AOB2, AOB3, AOB5, AOB88, AOB85, AOB78, AOB79) gesichert wurde (Abb. 37). Demzufolge konnte die Aktivität weiterer AOB in Belebtschlamm aus Oberding weitestgehend ausgeschlossen werden, da kein entsprechendes, vollständiges Signalmuster für andere bekannte AOB detektiert wurde.

Aus Hybridisierungsergebnissen mit rRNS aus beiden Kläranlagen können folgende Schlüsse gezogen werden: Die in Reinkultorexperimenten ermittelte Stringenz von 15% Formamid im Hybridisierungspuffer ließ auf Fluoreszenzebene keine klaren Aussagen über die AOB-Zusammensetzung zu, da die Bedingungen entweder zu stringent waren, oder die Detektionsgrenze für Fluoreszenzsignale zahlenmäßig unterrepräsentierter rRNS-Moleküle zu hoch lag. Obwohl das Detektionslimit für Radioaktivität offensichtlich viel niedriger lag als für Fluoreszenz, konnten radioaktive Signale auf dem Isotope Array nur nach ausgedehnten, und somit nicht für Routineexperimente praktikablen Expositionszeiten im  $\mu$  IMAGER™ ermittelt werden. Vergleicht man die relativ langen Expositionszeiten des Isotope Arrays, die zwischen einer und vier Wochen lagen, mit denen seines Prototyps, der für lediglich 10 Stunden am  $\mu$  IMAGER™ exponiert wurde, obwohl die hybridisierte rRNS aus dem gleichem Markierungsexperiment stammte, so sind für künftige Experimente einige Parameter neu zu überdenken.

Als erstes wäre erneut ein Arrayformat mit größeren Sondenspots in Erwägung zu ziehen, wenn der  $\mu$  IMAGER™ auch weiterhin für Radioaktivitätsmessungen des Isotope Arrays verwendet werden sollte. Der Grund dafür ist die durch die Software bedingte Dynamik der räumlichen Auflösung, die theoretisch maximal 15  $\mu$ m erreichen kann, jedoch von der Menge der zumessenden Radioaktivität pro Fläche und/oder von der Expositionszeit abhängt. Um diese maximale Auflösungsgrenze auch bei kleinen Sondenspots (z.B. 300  $\mu$ m im Durchmesser) zu erreichen, sind jedoch hohe Radioaktivitätsmengen pro Fläche erforderlich. Allerdings können auch geringe Radioaktivitätsmengen bis zu 0,04 CPM/mm<sup>2</sup> hochauflösend detektiert werden, wenn die Signale ausreichend lange am  $\mu$  IMAGER™ exponiert werden, was wiederum die Durchführung von Routineexperimenten wesentlich erschwert. Durch Erhöhung des Spotdurchmessers auf z.B. 1 mm, wie bereits beim Isotope-Array-Prototyp gezeigt, könnten geringe Radioaktivitätsdichten, die in den Experimenten mit 300- $\mu$ m-Spots bei max. 0,58-0,08 CPM/mm<sup>2</sup> lagen, schneller (z.B. statt einer Woche in 12 Stunden) und ohne Einbußen an räumlicher Auflösung detektiert werden.

Ein weiterer, ebenso wesentlicher Parameter ist die Sondenmenge pro Flächeneinheit eines Spots. Je mehr Sonde pro Fläche fixiert wird, umso mehr markierte rRNS-Moleküle können

gebunden, und umso schneller detektiert werden. Es wäre daher zu erwägen, ob die Konzentration der gespotteten Sonden künftig erhöht werden sollte.

Die bei 10% Formamid durchgeführten Hybridisierungen zeigten zwar, dass sowohl für Fluoreszenz als auch Radioaktivität (nach 7-tägiger Exposition) erwartete Signale detektiert werden konnten, die sowohl die Präsenz als auch Assimilationsaktivität von AOB bezeugten. Die erhöhte Zahl an falsch positiven Signalen (Tab. 9) zeigte jedoch gleichzeitig, dass die Stringenz von 10% Formamid unter den optimalen Hybridisierungsbedingungen lag, und diese in Zukunft zwischen 10 und 15% Formamid neu zu ermitteln sei.

#### **D.IV STÄRKEN UND GRENZEN DES ISOTOPE ARRAYS**

Der Isotope Array verwendet direkt aus der Umwelt gewonnene rRNS als Markermolekül für phylogenetische Analysen sowie Untersuchungen von Substrataufnahme in Zielorganismen. Aus diesem Grund unterliegt dieser Ansatz nicht den typischen Verzerrungseffekten (Suzuki und Giovannoni, 1996; von Wintzingerode *et al.*, 1997; Polz und Cavanaugh, 1998; Becker *et al.*, 2000; Crosby und Criddle, 2003; Lueders und Friedrich, 2003) PCR-abhängiger Methoden, erfordert aber dafür eine effiziente rRNS-Extraktion aus der zu untersuchenden Umweltprobe.

Im Unterschied zu anderen Studien (Guschin *et al.*, 1997; Bavykin *et al.*, 2001; Small *et al.*, 2001; Koizumi *et al.*, 2002; El Fantroussi *et al.*, 2003) führte eine den Hybridisierungen auf dem AOB-Mikroarray-Prototyp vorgeschaltete rRNS-Fragmentierung (de Saizieu *et al.*, 1998) nicht zu einer gesteigerten Hybridisierungseffizienz, bewirkte jedoch eine erhöhte Hintergrundfluoreszenz. Dieser Effekt könnte durch mangelnde Kompatibilität zwischen der publizierten rRNS-Fragmentierungsmethode und der in dieser Studie verwendete Hybridisierungslösung erklärt werden. Die Erprobung eines neueren RNS-Fragmentierungsprotokolls (Bodrossy *et al.*, 2003) mit dem AOB-Mikroarray konnte zwar ebenso wenig zu Signalsteigerung beitragen, wurde jedoch vor allen weiteren Hybridisierungen mit rRNS durchgeführt, da keine nachteilig erhöhte Hintergrundfluoreszenz festgestellt wurde. Die Verwendung intakter rRNS für Hybridisierungen auf dem Mikroarray hat einerseits den Vorteil, dass die durch Fragmentierung bevorzugt zerstörten (potentiellen) Sondenbinderegionen erhalten bleiben. Andererseits wirkt die Verwendung kurzer rRNS-Fragmente der Bildung unerwünschter Sekundärstrukturen entgegen, so dass sonst schwer zugängliche Zielregionen für Sonden freigelegt werden.

Ungeachtet dessen zeigte die Erfahrung im Labor, dass die Qualität der extrahierten rRNS von entscheidender Bedeutung für den Erfolg von Hybridisierungen auf dem Mikroarray war, und daher stets gründlich beispielsweise mittels Agarosegelelektrophorese zu überprüfen sei.

Der quantitativen FISH-Analyse zufolge war die Sensitivität des Isotope Arrays ausreichend groß, um den Einbau von  $^{14}\text{C}$ -Bikarbonat in die 16S rRNS von AOB, die weniger als 10% bzw. 5% der Bakteriengemeinschaft der Belebtschlämme aus Oberding bzw. Aalborg West ausmachten zu detektieren. Sollte hingegen der Isotope Array auf Ökosysteme mit weniger aktiven, mikrobiellen Lebensgemeinschaften und/oder dünn besiedelten Habitaten angewendet werden, würde er sich in seiner gegenwärtigen Form auf die zahlenmäßig überlegenen Mikroorganismen beschränken. Generell hängt die Sensitivität des Isotope Arrays von einigen Faktoren ab:

Erstens bestimmen die Anzahl der (bakteriellen) Zielzellen des untersuchten Systems, sowie deren zellulärer Ribosomengehalt das Detektionslimit für die Hybridisierung auf dem Mikroarray. Zweitens, wird die Sensitivität durch die spezifische Aktivität des markierten Substrates, aber ebenso durch die (natürliche) Konzentration seines nicht markierten Widerparts in der untersuchten Probe beeinflusst. Drittens, wird die Substratverwertung des untersuchten Organismus nur dann messbar, wenn ausreichende Mengen an  $^{14}\text{C}$  in seine rRNS-Moleküle eingebaut wurden.

Für  $^{14}\text{C}$ -Bikarbonat konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass ca. 19000 CPM pro  $\mu\text{g}$  RNS ausreichen, um die  $\text{CO}_2$ -Fixierungsaktivität einer Ammoniak oxidierenden Reinkultur mittels Isotope Array zu demonstrieren (Abb. 4 und Tab. 5).

Verglichen mit DNS-Markierung mittels stabiler Isotope (=Stable Isotope Probing; SIP) (Whitby *et al.*, 2001a) konnte die Inkubationszeit mit markiertem Substrat, die für einen erfolgreichen Nachweis der Autotrophie von AOB benötigt wurde, für den Isotope Array wesentlich verkürzt werden. Diese Tatsache bestätigte, dass während eines Inkubationsexperiments markierte Kohlenstoffmoleküle wesentlich schneller in die ribosomalen Nukleinsäuren eines untersuchten Organismus als in seine DNS eingebaut werden (Manefield *et al.*, 2002a; Manefield *et al.*, 2002b), was wiederum auf einen höheren rRNS-Umsatz in der Zelle schließen lässt. Es muss jedoch dabei beachtet werden, dass die Einbauraten des markierten Kohlenstoffmoleküls in die rRNS in Abhängigkeit von der Art des zugegebenen Substrates, von der rRNS-Stabilität und nicht zuletzt vom Metabolismus eines Organismus zu sehen sind (obgleich die RNS-Biosynthesewege unter Bakterienspezies konserviert sind). Diese Einschränkung gilt jedoch gleichermaßen für den Isotope Array wie

für das Stable Isotope Probing von RNS bzw. DNS (Radajewski *et al.*, 2000; Manefield *et al.*, 2002a; Manefield *et al.*, 2002b), wohingegen die FISH-MAR-Methode (Lee *et al.*, 1999), die lediglich die Aufnahme markierter Substrate visualisiert, davon nicht betroffen ist.

Zudem muss prinzipiell berücksichtigt werden, dass Angehörige einer mikrobiellen Gemeinschaft gezielt zwischen markierten und natürlichen Substraten selektieren. Obwohl Bakterien  $^{14}\text{C}$ - gegenüber  $^{13}\text{C}$ -markierten Substraten stärker diskriminieren, so ist der Fraktionierungsausmaß nicht so ausgeprägt, dass Experimente wie dieses, die sich vergleichsweise hoher Isotopenkonzentration bedienen, signifikant beeinflusst würden (Northrop, 1981; Jackson und Pardue, 1999; Ekblad *et al.*, 2000).

Ein weiterer, insbesondere für lange Inkubationsversuche zu berücksichtigender Faktor ist das sog. Substrat-„Cross-Feeding“. Einerseits könnte dieser Effekt für Untersuchungen des Kohlenstoffflusses innerhalb einer mikrobiellen Gemeinschaft genutzt werden. Andererseits kann dieses Phänomen die Unterscheidung der Primärkonsumenten von Folgeverwertern, wie beispielsweise Organismen, die von Sekreten oder Lyseprodukten der Primärkonsumenten profitieren, erschweren. Allerdings sind Techniken mit kurzen Inkubationszeiten, wie Isotope Array, RNS-SIP oder FISH-MAR vom „Cross-Feeding“-Effekt weniger gefährdet.

Im Unterschied zu DNS-SIP bietet der Isotope Array leider nicht die Möglichkeit, vom Informationsgehalt genomischer DNS der metabolisch aktiven Mikroorganismen zu profitieren, um ihn in nachfolgenden Analysen zu verwerten. Ungeachtet dessen besitzt der Isotope Array eine Reihe einzigartiger Vorteile gegenüber anderen Methoden. Im Gegensatz zu DNS- oder RNS-SIP wird beim Isotope Array der Substrateinbau in die Nukleinsäuren direkt gemessen, so dass falsch positive Resultate mit unmarkierten Organismen ausgeschlossen werden können. Verglichen mit FISH-MAR werden bei Isotope Array zahlreiche Sonden parallel eingesetzt, was insbesondere für ökophysiologische Studien komplexer mikrobieller Lebensgemeinschaften an Bedeutung gewinnen kann. Können zudem in Zukunft stringente Hybridisierungsbedingungen für alle Sonden erzielt werden, so bietet der Isotope Array zusätzlich die Möglichkeit zu Messung spezifischer Einbauraten von Isotopen in die rRNS von Angehörigen unterschiedlicher, phylogenetischer Gruppen, welche als Verhältnis von Radioaktivität zu Fluoreszenz (oder als der sog. A-Wert, Formel 2, S.52) für einzelne Sonden separat ermittelt werden können.

Zusammenfassend zeigte dieser Teil der Arbeit die Entwicklung sowie Evaluierung eines neuartigen, molekularen Werkzeugs, das auf der Oligonukleotid-Mikroarray-Technologie basiert, und künftig für effiziente Struktur-Funktions-Analysen von komplexen mikrobiellen Lebensgemeinschaften eingesetzt werden kann. Hält der gegenwärtige Fortschritt auf dem

Gebiet der Mikroarraytechnologie (Small *et al.*, 2001; Busti *et al.*, 2002; Loy *et al.*, 2002; Bodrossy *et al.*, 2003; El Fantroussi *et al.*, 2003; Peplies *et al.*, 2003) an, so wird es bald möglich sein, umfassende Habitat-spezifische Mikroarrays zu entwickeln, die es uns erlauben werden, die gesamte mikrobielle Lebensgemeinschaft eines Systems gleichzeitig zu erfassen. Mit einer Technik, wie der des Isotope Arrays wird es dann möglich sein, den detektierten und identifizierten Organismen direkt ihre Funktion innerhalb des Ökosystems zuzuschreiben, sowie Aussagen über ihre Aktivität zu treffen.

## **D.V MOLEKULARE ANALYSEN ZU AOB-GEMEINSCHAFTSSTRUKTUR IN BÖDEN MIT UNTERSCHIEDLICHER DÜNGUNGSPRAXIS**

Der Einsatz von Stickstoffdüngern ist in der heutigen Landwirtschaft nicht wegzudenken. Da Stickstoffmangel im Boden sich ertragslimitierend auf die (Nutz)Pflanzenproduktion auswirkt, und die Ackerflächen möglichst hohe Ernte tragen sollen, muss der N-Pool stets neu aufgefüllt werden. Je nach Bodentyp und anzubauender Pflanzenart werden verschiedene Düngungsstrategien verfolgt; zwei wesentliche seien in diesem Zusammenhang genannt. Die sog. NPK-Dünger, die neben Kalium und Phosphor Nitrat enthalten, liefern den Pflanzen zwar kurzfristig eine leicht assimilierbare, zudem aber sehr mobile, und somit aus dem Erdreich schnell auswaschbare Form von Stickstoff, die zu Grundwasserkontamination und Eutrophierung umliegender Gewässer beitragen kann (Carroll *et al.*, 2003). Durch die Senkung des C/N-Verhältnisses wird zudem ein größerer Anteil des organisch fixierten Kohlenstoffes ( $C_{org.}$ ) den Bodenmikroorganismen verfügbar gemacht, und als Treibhausgas  $CO_2$  aus dem Erdreich freigesetzt (Conrad, 1996; Mendum *et al.*, 1999). Nicht zuletzt dient Nitrat vielen fakultativ anaeroben Mikroorganismen als terminaler Elektronenakzeptor (Denitrifikation), und entweicht in Form von Stickoxiden (=Treibhausgasen) oder  $N_2$  aus dem Erdreich, ohne den Pflanzen zugute gekommen zu sein (Goreau *et al.*, 1980; Bouwman *et al.*, 1993; Conrad, 1996; Schmidt und Bock, 1997; Abbassi und Adams, 1998; Zart und Bock, 1998; Jiang und Bakken, 1999b; Avrahami *et al.*, 2002).

Weitaus älter, jedoch immer noch aktuell ist die organische Düngung mit tierischen oder pflanzlichen Abfällen. Die bei weitem komplexere Zusammensetzung dieser Dünger liefert sowohl schnell verfügbare Nährstoffe, wie Ammonium, als auch schwerer abbaubare, polymere Substanzen (z.B. Lignin), die erst nach längerer Verweilzeit im Boden und mikrobieller Aufbereitung stufenweise freigesetzt werden (Inbar *et al.*, 1993; Kowalchuk *et al.*, 1999). Die höhere Verfügbarkeit an reduziertem Stickstoff führt jedoch zusätzlich, innerhalb kurzer Zeit zu erhöhter Nitrifikationsaktivität von Ammoniak oxidierenden Bakterien, die Ammoniak zu Nitrit umsetzen, das schon bald zu Nitrat oxidiert und dem Boden verloren gehen kann (Kowalchuk *et al.*, 1999; Phillips *et al.*, 2000; Avrahami *et al.*, 2002). Obwohl sich diese Düngungsart nicht zwangsläufig auf den C/N-Wert auswirkt, da z.B. im Stallmist sowohl organischer Stickstoff wie Kohlenstoff vorhanden sind, so bewirkt sie insgesamt einen höheren Nährstoffeintrag, der längerfristig eine Erhöhung der Bodenbiomasse als Konsequenz hat (Woldendorp und Laanbroek, 1989; Stienstra *et al.*, 1994). Wie bereits in zahlreichen Studien unterschiedlicher Böden gezeigt wurde, ging die Zunahme der gesamten Biomasse mit erhöhter Produktivität jedoch gleichzeitiger Abnahme

der (Arten-)Diversität von Pflanzen einher (Bobbink und Willems, 1987; Tilman, 1987; Olf und Bakker, 1991; Marrs, 1993; Stienstra *et al.*, 1994; Gross *et al.*, 1995; Bobbink *et al.*, 1998). Ein solcher Trend wurde ebenfalls für die Gruppe der betaproteobakteriellen AOB in einer Reihe an Untersuchungen unterschiedlicher Bodentypen beobachtet (Bruns *et al.*, 1999; Kowalchuk *et al.*, 2000b; Kowalchuk *et al.*, 2000a). Derartige Populationsverschiebung lässt sich mit Selektion von Spezialisten mit erhöhter Ammoniaktoleranz erklären.

Da Boden ein hochkomplexes Gefüge aus organischem Material und anorganischen Bestandteilen darstellt, bietet er innerhalb seiner unterschiedlichen Korngrößen – Grob- (2000-200  $\mu\text{m}$ ) und Feinsand (200-63  $\mu\text{m}$ ), Schluff (63-2  $\mu\text{m}$ ) und Ton (2-0,1  $\mu\text{m}$ ) – je nach pH, Wasser-, Sauerstoff- und Nährstoffverfügbarkeit, sowie weiterer physikalisch-chemischer Eigenschaften Mikrohabitate für die unterschiedlichen Ansprüche von Bodenmikroorganismen (Hattori, 1988; Ladd *et al.*, 1996). So befassten sich bis dato einige Studien mit der Fragestellung nach bevorzugter Besiedelung der unterschiedlichen Mikronischen durch bestimmte Mikroorganismen, sei es anhand von Elektronenmikroskopie (Foster, 1988) oder physikalischer Partikelauftrennungsmethoden (Kanazawa und Filip, 1986; Brussaard *et al.*, 1990; Jocteur Monrozier *et al.*, 1991; Christensen, 1992; Hassink *et al.*, 1993a; Hassink *et al.*, 1993b; Van Gestel *et al.*, 1996; Kandeler *et al.*, 2000; Sessitsch *et al.*, 2001; Poll *et al.*, 2003). Interessanterweise wurde dabei deutlich, dass präferentiell die kleineren Partikel, wie Schluff und Ton, erhöhte mikrobielle Biomasse und die höchsten Zellzahlen aufweisen (Kanazawa und Filip, 1986; Jocteur Monrozier *et al.*, 1991; Van Gestel *et al.*, 1996; Kandeler *et al.*, 2000; Sessitsch *et al.*, 2001; Poll *et al.*, 2003). Untersuchungen von Stoffflüssen zwischen (Chafetz *et al.*, 2002), sowie Studien zu Stoffumsetzungen innerhalb einzelner Mikroaggregate (Gregorich *et al.*, 1989; Amato und Ladd, 1992; Chotte *et al.*, 1998; Stemmer *et al.*, 1999) lieferten erste, wenn auch nur indirekte Hinweise auf lokale Unterschiede mikrobieller Aktivität und konnten somit die ersten Befunde erhärten. So ließ die erhöhte Aktivität des Markerenzym Xylanase auf das gehäufte Vorkommen von Pilzen insbesondere in den größeren Bodenfraktionen schließen, wohingegen in den beiden kleineren Fraktionen – Schluff und Ton – verstärkte Aktivitäten von Enzymen wie Urease, Invertase oder alkalischer Phosphatase auf bakterielle Präsenz zurückgeführt wurden (Stemmer *et al.*, 1998; Kandeler *et al.*, 1999; Stemmer *et al.*, 1999; Gerzabek *et al.*, 2000; Kandeler *et al.*, 2000; Poll *et al.*, 2003). Durch die Erstellung von Phospholipid-Fettsäureester-Profilen (PLFA) für die einzelnen Korngrößenfraktionen erhielt man weitere Hinweise auf die Konzentration bakterieller Besiedlung innerhalb der Schluff- und Tonfraktion (Kandeler *et al.*, 2000; Poll *et al.*, 2003), und somit auf strukturelle Unterschiede zwischen den einzelnen Mikrohabitaten.

Eine eindeutige Identifizierung von Mikroorganismen lässt diese Methode jedoch nur selten zu (Roslev und Iversen, 1999; Johnsen *et al.*, 2002), da ihr Auflösungspotential begrenzt ist, und zudem phänotypische Ähnlichkeiten nicht zwangsläufig phylogenetische Verwandtschaft widerspiegeln (z.B. Klein *et al.*, 2001).

Erste, phylogenetisch orientierte Ansätze zu Untersuchung der Mikrodiversität innerhalb der unterschiedlichen Bodenpartikelgrößen wurden von Ranjard *et al.*, 2000 mittels RISA (ribosomal intergenic spacer analysis) vorgenommen. Später wurden von Sessitsch *et al.*, 2001 bzw. Poll *et al.*, 2003 T-RFLP-Profile von ca. 530-bp-langen Fragmenten von 16S-rRNS-Genen bakterieller Subpopulationen in fraktionierten Bodenpartikeln erstellt und analysiert. Trotz des reduzierten Informationsgehalts des untersuchten Genfragments und nicht optimaler Wahl von PCR-Primern hinsichtlich möglichst breiter Erfassung aller bekannten bakteriellen Sequenzen, konnten auch diese Studien den Trend zu vergleichsweise größter mikrobieller Diversität innerhalb der zwei kleinsten Korngrößen – Schluff und Ton – bestätigen.

Zudem beschäftigten sich Sessitsch *et al.*, 2001 und Poll *et al.*, 2003 mit eventuell – auch auf Mikrohabitatebene – vorhandenen Unterschieden in der mikrobiellen Diversität in Abhängigkeit von unterschiedlicher Bodendüngung. Interessanterweise kamen beide Studien nicht zu dem gleichen Ergebnis. Die von Sessitsch *et al.*, 2001 durchgeführte Studie zeigte größere Unterschiede zwischen den Lebensgemeinschaften der verschiedenen Mikrohabitate eines Bodens als zwischen denen von Böden mit unterschiedlichen Düngungspraxen. Es wurde daraus gefolgert, dass nicht – wie zunächst angenommen – die Düngungspraxis sondern eher die Partikelgröße, welche die Bildung verschiedener Mikrohabitate im Boden bestimmt, einen höheren Einfluss auf die Diversität mikrobieller Lebensgemeinschaften des Bodens übt. Poll *et al.*, 2003 stellte zwar ebenfalls den Einfluss der Partikelgröße auf die Zusammensetzung mikrobieller Lebensgemeinschaften im Boden fest, beobachtete jedoch zusätzlich, dass die mikrobielle Diversität durch Stallmistdüngung gegenüber ungedüngtem Boden zunahm. An dieser Stelle soll angemerkt werden, dass angesichts der enormen Diversität von Bodenmikroorganismen, die sich laut Torsvik und Ovreas, 2002 auf mehrere Tausend unterschiedliche Genomäquivalente pro Gramm Erde beläuft, eine derart komplexe Fragestellung mit der limitierten Aussagekraft von T-RFLP- bzw. PLFA-Profilen nicht hinreichend beantworten werden kann.

Es erschien daher sinnvoll und hilfreich, eventuelle Populationsveränderungen in Abhängigkeit von Bodendüngung und/oder Partikelgröße anhand einer ausgewählten Modellorganismengruppe zu verfolgen. Hierbei galt ein besonderes Augenmerk den beta-

proteobakteriellen AOB, da sie im Stickstoffkreislauf, in den zugleich die Stickstoffdüngung eingreift, eine Schlüsselrolle spielen. Zudem existierte bereits eine Reihe an Daten aus Untersuchungen zu Populationsveränderungen von AOB in Abhängigkeit von Bodendüngung (Hastings *et al.*, 1997; Ceccherini *et al.*, 1998; Bruns *et al.*, 1999; Kowalchuk *et al.*, 2000b; Kowalchuk *et al.*, 2000a; Phillips *et al.*, 2000; Hermansson und Lindgren, 2001; Oved *et al.*, 2001; Webster *et al.*, 2002; Avrahami und Conrad, 2003; Avrahami *et al.*, 2003; Okano *et al.*, 2004), die als Vergleichsmaterial dienten.

So wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei Fragestellungen hinsichtlich Populationsunterschiede von AOB im Boden erörtert. Zum einen wurde die AOB-Zusammensetzung von stallmistgedüngtem mit der von ungedüngtem Boden verglichen. Zum anderen wurden Unterschiede in der AOB-Besiedlung einzelner Korngrößen der beiden untersuchten Böden herausgearbeitet.

Zu Beantwortung dieser Fragen dienten zwei verschiedene Untersuchungsmethoden. Zuerst wurde der Versuch unternommen, AOB-Populationsunterschiede – falls vorhanden – mit PCR-amplifizierten 16S-rRNS-Genfragmenten auf dem neu entworfenen AOB-Mikroarray aufzuzeigen. Im Anschluss wurden die Proben der vergleichenden *amoA*-Gensequenzanalyse unterzogen, die gleichzeitig als Kontrolle für die neue Methode fungierte. Es wurde zudem die Tatsache genutzt, dass es sich bei *amoA* um ein unabhängiges, da nicht ribosomales Molekül handelt, das neben 16S rRNS als Markermolekül für phylogenetische Analysen von AOB geeignet ist (Purkhold *et al.*, 2000). Gegenüber einem vergleichbaren 16S-rRNS-Ansatz mit über 1500 zu sequenzierenden Basen bringt die *amoA*-Analyse mit einer untersuchten Fragmentlänge von 453 Basen einen erheblichen zeitlichen Vorteil bei der Erstellung und Auswertung von Klondatenbanken, und liefert dabei trotzdem ausreichend phylogenetisch verwertbare Sequenzinformationen (Rotthauwe *et al.*, 1997; Stephen *et al.*, 1999; Purkhold *et al.*, 2000).

#### **D.V.1 Mikroarray-Untersuchungen zu AOB-Gemeinschaftsstruktur in Böden mit PCR-amplifizierten 16S-rRNS-Genfragmenten**

Für die Analysen wurden aus allen Fraktionen (Fein-, Grobsand, Schluff, Ton) des gedüngten sowie ungedüngten Bodens ebenso wie aus nicht fraktioniertem gedüngtem sowie ungedüngtem Boden 16S-rRNS-Genfragmente mit universell bindenden PCR-Primern amplifiziert, fluoreszenzmarkiert und auf dem AOB-Mikroarray hybridisiert. Nach einem stringenten Waschschrift bei 57°C und einem anschließenden Fluoreszenzscan wurde jedoch deutlich, dass außer für die zwei hierarchisch übergeordneten Sonden EUB338 sowie UnivA

für keine der AOB-spezifischen Sonden positive Signale detektierbar waren (Daten nicht gezeigt).

Das Ausbleiben von AOB-spezifischen Sondersignalen kann wahrscheinlich auf eine sehr geringe AOB-Zellzahl in den untersuchten Proben zurückgeführt werden. Da es jedoch im Rahmen dieser Studie nicht möglich war, quantitative Daten über den Anteil der AOB an der bakteriellen Gesamtpopulation im Boden zu erhalten, wurden Zahlen aus anderen Untersuchungen, die sich mit dieser Fragestellung bereits befasst hatten, herangezogen. Aus einer jüngsten Veröffentlichung (Okano *et al.*, 2004), in welcher der Düngungseffekt auf die AOB-Population mit Hilfe von Real-Time-PCR quantitativ untersucht wurde, geht hervor, dass in regelmäßig gedüngtem Ackerland vor Düngung ca.  $4 \cdot 10^6$  AOB-Zellen pro Gramm Erde zu finden waren, während sich die bakterielle Gesamtzellzahl auf ca.  $0,7 \cdot 10^9$ /g Erde belief. Somit machten AOB nur 0,4% der bakteriellen Gesamtpopulation aus. Zieht man andere, quantitative Ergebnisse in Betracht, den ebenfalls molekulare Methoden zugrunde lagen, so schwankten die AOB-Zellzahlen stets in den Größenordnungen zwischen  $10^5$  bis  $10^7$  Zellen/g Erde (Stephen *et al.*, 1996; Bruns *et al.*, 1999; Mendum *et al.*, 1999; Kowalchuk *et al.*, 2000b; Kowalchuk *et al.*, 2000a; Hermansson und Lindgren, 2001). Ein auffällig geringer AOB-Anteil an der bakteriellen Gesamtpopulation im Boden wurde von Phillips *et al.*, 2000 berichtet. Während die mittels DTAF-Färbung mikroskopisch bestimmte, bakterielle Gesamtzellzahl sich auf 6 bis  $9 \cdot 10^9$  Zellen/g Erde belief, wurden in seit über zehn Jahren ungedüngter und ungepflügter Erde ca.  $5 \cdot 10^4$ /AOB-Zellen mittels kompetitiver PCR (cPCR) von 16S-rRNS-Genen identifiziert, und machten somit maximal 0,001% der bakteriellen Gesamtpopulation aus.

Dieser Variationsbreite können unterschiedliche Ursachen zugrunde liegen, wie z.B. geophysiologische Eigenschaften des Bodens, seine Bearbeitung, ebenso wie die Quantifizierung unterschiedlicher Zielmoleküle (*amoA*- oder 16S-rRNS-Gene) mit unterschiedlichen Methoden (Real-Time-PCR oder cPCR), und nicht zuletzt die Verwendung unterschiedlicher Primersätze für das jeweilige Zielmolekül.

Geht man bei dem hier beschriebenen Düngungsversuch von AOB-Zellzahlen in dem oben beschriebenen Intervall von  $10^5$  bis  $10^7$  Zellen/g Erde und bakterieller Gesamtzahl von ca.  $5 \cdot 10^9$  aus, so würde sich ihr Anteil auf maximal 0,2 bis 0,002% der Gesamtpopulation belaufen. Da für die Detektion von AOB-16S-rRNS-Genen auf dem Mikroarray universelle PCR-Primer verwendet wurden, liegt die Erklärung nahe, dass sie angesichts ihrer zahlenmäßigen Unterlegenheit – selbst nach einem PCR-Amplifikationsschritt – unterhalb der Nachweisgrenze des Mikroarrays lagen.

Ein Weg zu Erhöhung der Detektionseffizienz zahlenmäßig unterlegener Mikroorganismen, wie im Falle von AOB, wäre eine gezielte Amplifikation von 16S-rRNS-Gensequenzen mit AOB-spezifischen Primern (McCaig *et al.*, 1994), oder durch einen Nested-PCR-Ansatz (Hiorns *et al.*, 1995; Hastings *et al.*, 1998; Kowalchuk *et al.*, 1999; Phillips *et al.*, 1999; Whitby *et al.*, 1999; Bano und Hollibaugh, 2000; Whitby *et al.*, 2001b). Aus Zeitgründen konnte leider keiner dieser Ansätze weiterverfolgt werden. Zudem deuteten die ersten Ergebnisse der parallel zu Mikroarray-Ansatz angelegten *amoA*-Klonbank auf nur begrenzte Unterschiede auf Speziesebene sowohl zwischen den Böden als auch Korngrößen hin. Ein sichtbarer Trend setzte erst ab einer *amoA*-Nukleinsäuresequenzähnlichkeit von ca. 90% ein, so dass die Unterschiede weit jenseits der Speziesgrenze von ca. 83% (Koops *et al.*, 2003; Purkhold *et al.*, 2003) lagen. Da das Auflösungsvermögen des AOB-Mikroarrays ungefähr auf Speziesebene liegt, erwies sich diese Methode als nicht geeignet, um Populationsunterschiede zwischen den untersuchten Habitaten effektiv nachweisen zu können. Aus diesem Grund galt nun das Augenmerk der *amoA*-Klonbankanalyse.

## **D.V.2 *amoA*-basierende Untersuchungen zu AOB-Gemeinschaftsstruktur in Böden**

### ***D.V.2.a AOB-Populationsunterschiede zwischen gedüngtem und ungedüngtem Boden***

Die Beurteilung des Düngungseinflusses auf die AOB-Diversität kann auf verschiedenen Ebenen stattfinden. Ausgehend von einer nahezu gleich hohen Anzahl an untersuchten *amoA*-Klonen aus dem gedüngten (110) bzw. ungedüngten (115) Boden wurden diese aufgrund ihrer Nukleinsäuresequenzähnlichkeiten zu sog. OTUs (=operational taxonomic units) (Good, 1953) mittels Ähnlichkeitsmatrices gruppiert. Dabei zeigte sich, dass im Bereich zwischen 80 und 97% Sequenzähnlichkeit die gesamte sowie mittlere Anzahl an OTUs aus ungedüngtem Boden die des gedüngten stets übertraf (Abb. 41). Allerdings wurden die Unterschiede erst jenseits der Speziesgrenzen (ab 89%) deutlich erkennbar, bis sie auf Stammesebene ihren Höhepunkt erreichten. Bei 97% Sequenzähnlichkeit wurden insgesamt 29 verschiedene OTUs gezählt, von denen 20 in ungedüngtem, dagegen nur 16 in gedüngtem Boden gefunden wurden. Sieben OTUs kamen in beiden Böden vor (Abb. 41 und Abb. 49).

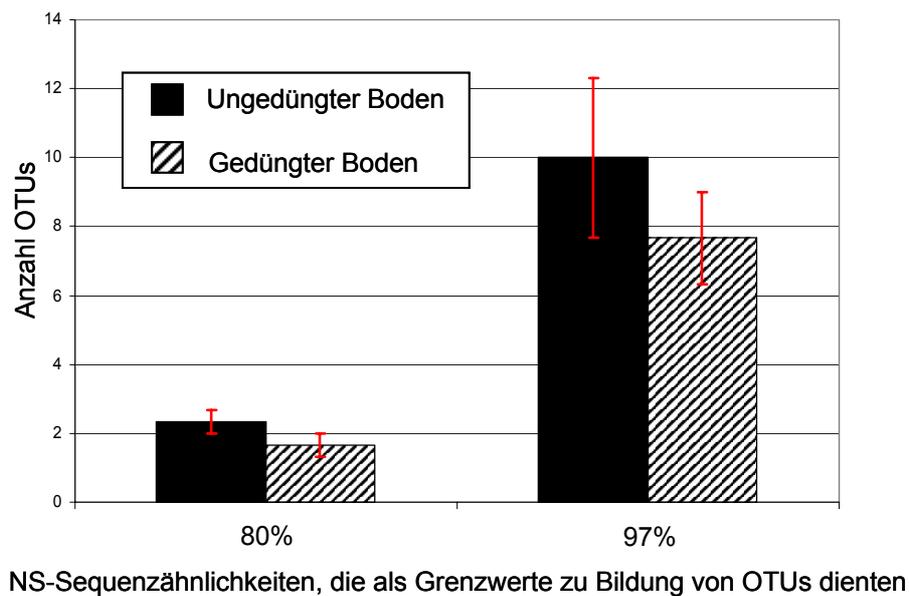


Abb. 49 Balkendiagramm-Darstellung der mittleren OTU-Anzahlen, welche aus beiden Bodentypen bei den Grenzwerten von 80% bzw. 97% Nukleinsäuresequenzähnlichkeit ermittelt wurden. Der Fehlerbalken zeigt den Standardfehler an.

Die Verwendung eines PCR-Primersatzes, der alle bekannten, betaproteobakteriellen AOB erfasst, zeugte – im Unterschied zu zahlreichen anderen *amoA*- (Mendum *et al.*, 1999; Webster *et al.*, 2002) bzw. 16S-rRNS-basierenden Studien (Hiorns *et al.*, 1995; Stephen *et al.*, 1996; Bruns *et al.*, 1999; Kowalchuk *et al.*, 1999; Mendum *et al.*, 1999; Phillips *et al.*, 2000; Mintie *et al.*, 2003) – von einer umfassenden Detektion der in beiden Habitaten wesentlichen AOB. Diese Behauptung wird zusätzlich durch die sehr hohen Coverage-Werte (Formel 3, S.93) für die Genanalyse der beiden Böden (Abb. 42), die durch die große Anzahl an analysierten *amoA*-Klonen begründet sind, unterstützt.

Der Vergleich von Bodenreplikaten hinsichtlich der Häufigkeit des Vorkommens einzelner, bei 97% Nukleinsäuresequenzähnlichkeit identifizierter OTUs zeigte jedoch für beide Böden eine relativ hohe Variationsbreite. Während in gedüngtem Boden nur vier von 16 OTUs (25%) in mindestens zwei von drei Bodenreplikaten wiederzufinden waren, tauchten in ungedüngtem Boden sechs von insgesamt 20 OTUs (30%) in mindestens zwei von drei Replikaten auf.

Dies zeigt, dass an beiden Standorten eine hohe räumliche Heterogenität der AOB herrschte, welche vermutlich durch die geologische Beschaffenheit des Bodens und seine physikalisch-chemischen Eigenschaften, sowie äußere Einflüsse, wie Witterung, Tierkoteintrag und Pflügen, bedingt wurden. So wurde auch deutlich, dass für Populationsanalysen heterogener

Habitats, wie die des Bodens, die v.a. bei hohen Nukleinsäuresequenzähnlichkeiten durchgeführt werden, vermutlich mehr als drei Replikate untersucht werden müssten. Zudem müssten pro Replikat so viele Klone untersucht werden, bis in keinem der Replikate mehr „neue“ OTUs gefunden würden.

Darüber hinaus sollte bei Betrachtung hoher Sequenzähnlichkeitswerte stets der Einfluss PCR- und durch Klonierung bedingter Verzerrungseffekten, die eine künstliche Mikrodiversität suggerieren können, mitberücksichtigt werden (Speksnijder *et al.*, 2001).

#### ***D.V.2.b AOB-Besiedlung von unterschiedlichen Korngrößen des gedüngten und ungedüngten Bodens***

Ungeachtet der Düngungspraxis wurde in beiden Böden jeweils eine hohe Anzahl an OTUs, also eine relativ hohe AOB-Diversität insbesondere auf niedriger phylogenetischer Hierarchieebene festgestellt (Abb. 45 und Abb. 50). Es schien daher von Interesse zu sein, herauszufinden, ob die Stallmistdüngung einen Einfluss auf die AOB-Diversität des Bodens in Mikroskala ausübte. Aus diesem Grund wurden einzelne Korngrößenfraktionen hinsichtlich ihrer Besiedlung durch AOB näher untersucht.

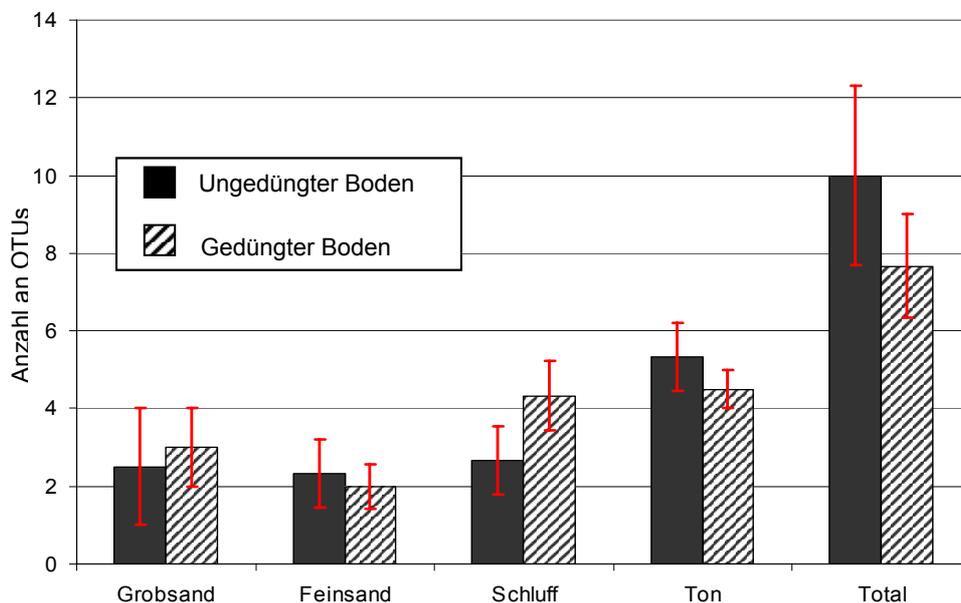


Abb. 50 Balkendiagramm-Darstellung der mittleren OTU-Anzahlen, welche jeweils in den vier Fraktionen (Grob-, Feinsand, Schluff und Ton) des ungedüngten bzw. gedüngten Bodens, sowie im unfraktionierten, ungedüngten bzw. gedüngten Boden bei einem Grenzwert von 97% Nukleinsäuresequenzähnlichkeit ermittelt wurden. Der Fehlerbalken zeigt den Standardfehler an.

Der erste Hinweis auf eine geringere AOB-Besiedlung der größeren Bodenfraktionen, wie Grob- und Feinsand, manifestierte sich durch ihre wesentlich geringeren Ausbeuten an *amoA*-

PCR-Produkten, verglichen mit denen des unfraktionierten Bodens bzw. des Tons und Schluffs (Abb. 39). Der Verdacht auf inhibierende Stoffe in Grob- und Feinsand konnte mittels extern zugegebener Kontroll-DNS ausgeräumt werden. Erste Indizien für eine höhere AOB-Diversität innerhalb der kleineren Partikelgrößen lieferten die Ergebnisse der Gelretardation, mit welcher die amplifizierten *amoA*-Genfragmente ihrem GC-Gehalt nach aufgetrennt wurden. So konnte für die Schluff- als auch Tonfraktion der beiden Böden eine höhere Bandenvielfalt als in den beiden Sandfraktionen festgestellt werden (Abb. 40). Durch eine *amoA*-Klonbankanalyse der einzelnen Bodenfraktionen konnte der oben genannte, ebenso wie der bereits von Sessitsch *et al.*, 2001 und Poll *et al.*, 2003 auf einer höheren Hierarchieebene beschriebene Trend zu steigender Diversität mit sinkender Bodenpartikelgröße bestätigt werden (Abb. 50).

Als signifikant erwies sich der Unterschied im ungedüngten Boden zwischen Ton und den drei verbleibenden Fraktionen. Es wurde dabei ersichtlich, dass über einer *amoA*-Nukleinsäuresequenzähnlichkeit von 89% die Anzahl an OTUs innerhalb des Tons stets zunahm, während für die anderen drei Partikelgrößen ein vergleichbarer Effekt ausblieb. Bei einer 97%-igen Sequenzähnlichkeit wurden im Ton bereits bis zu 9 (durchschnittlich 5,3) OTUs gezählt, während die anderen Fraktionen des ungedüngten Bodens im Schnitt auf 2,3 bis 3 (max. 6) OTUs kamen (Abb. 44A). Ein ebenso deutlicher Trend zur Zunahme an Diversität mit abnehmender Korngröße, insbesondere jenseits der Speziesebene konnte auch in den Fraktionen des gedüngten Bodens festgestellt werden. Dabei erwies sich die Schlufffraktion mit bis zu 9 OTUs (durchschnittlich 4,3 OTUs) als die OTU-reichste, gefolgt von der Tonfraktion mit max. 5 und durchschnittlich 4,5 OTUs (Abb. 44B). Die Diskrepanz zwischen kumulierten und mittleren OTU-Werten kann durch die relativ hohe Variation der vorkommenden OTUs pro Replik der jeweiligen Bodenfraktion erklärt werden.

Auch das Gegenüberstellen der einzelnen Fraktionen des gedüngten gegen die des ungedüngten Bodens lieferte aufschlussreiche Einblicke in die düngungsbedingten Verschiebungen in der AOB-Substruktur (Abb. 51). Während bis ca. 87% Nukleinsäuresequenzähnlichkeit lediglich die Tonfraktion des ungedüngten Bodens mit ihrer mittleren und kumulierten OTU-Zahl die des gedüngten deutlich übertraf (Abb. 50 und Abb. 51D), machte sich der Düngungseinfluss für die anderen Fraktionen erst mit steigenden Ähnlichkeitswerten unterschiedlich bemerkbar. So konnte beobachtet werden, dass die Grobsandfraktion durch Düngung geringfügig an Diversität gewann (Abb. 50 und Abb. 51A), wohingegen die Feinsand- (Abb. 50 und Abb. 51B) und Tonfraktion (Abb. 50 und Abb. 51D) durch den

Düngungseinfluss an Diversität verlor (Abb. 50 und Abb. 51). Interessanterweise stellte sich auch heraus, dass Schluff durch Düngierzufuhr erheblich an OTU-Diversität gewann (Abb. 50 und Abb. 51C).

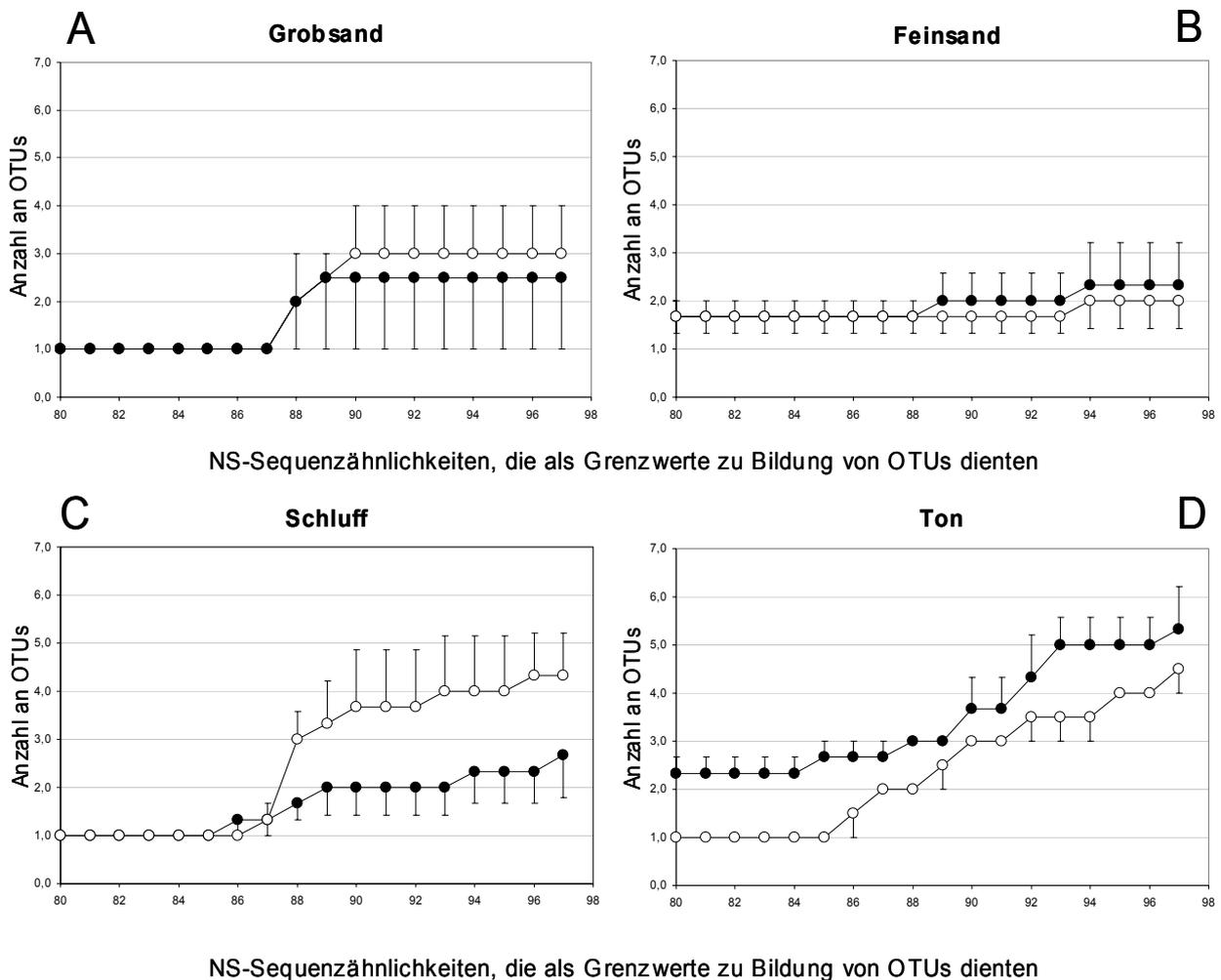


Abb. 51 Gegenüberstellung mittlerer OTU-Anzahlen, welche bei verschiedenen Nukleinsäuresequenzähnlichkeitswerten zwischen 80 und 97% in den einzelnen Fraktionen des ungedüngten (schwarze Symbole) und des gedüngten (weiße Symbole) Bodens ermittelt wurden. Der Fehlerbalken zeigt den Standardfehler an.

Basierend auf durchschnittlichen OTU-Anzahlen, also unter Berücksichtigung von Bodenreplikaten, gebildet bei einer 97%-igen *amoA*-Nukleinsäuresequenzähnlichkeit, erwies sich die Tonfraktion des gedüngten als auch ungedüngten Bodens als die OTU-reichste Partikelgröße, dicht gefolgt vom Schluff des gedüngten Bodens, wohingegen die Feinsandfraktion die geringste AOB-Diversität beinhaltete (Abb. 45 und Abb. 50).

**AOB-Dichte im Ton** Die Tendenz zu einer höheren Konzentration bakterieller Biomasse innerhalb der kleineren Bodenpartikelfractionen ist bereits mehrmals beobachtet worden

(Jocteur Monrozier *et al.*, 1991; Kandeler *et al.*, 2000; Ranjard und Richaume, 2001; Sessitsch *et al.*, 2001; Poll *et al.*, 2003). Als wesentlichen Grund für diese Mikroheterogenität wurden günstige Umstände zu Ausbildung von Mikronischen innerhalb der kleineren Bodenpartikel genannt. Mit einer Bakterienzellen-ähnlichen Partikelgröße von ca. 1-2  $\mu\text{m}$  können komplexe, biofilmartige Strukturen in Verbindung mit exopolymeren Substanzen (EPS) geschaffen werden, die einen besseren Schutz vor Protozoenfraß bieten. Zudem bilden solche Strukturen eine optimale Grundlage für Mikrohabitatbildung mit Substrat-, pH-, Wasser- Sauerstoff- und zahlreichen physiochemischen Mikrogefällen, die sich wiederum positiv auf die Erhaltung von Mikrodiversität auswirken (Tiedje *et al.*, 2001). Zudem wurde bereits mehrmals von günstigem Einfluss negativ geladener Tonpartikel in Gegenwart von Ammoniumionen auf die Nitrifikationsaktivität von AOB berichtet (Powell und Prosser, 1991; Vieira *et al.*, 2001; Campos JL *et al.*, 2002). Wenn auch der Mechanismus noch bislang ungeklärt blieb, ist anzunehmen, dass die Kationentauscher-Kapazität von Ton die Ammoniakoxidation auch in leicht saurer bis saurer Umgebung, wie in den untersuchten Böden, deren pH zwischen 6,2 und 5,6 lag, ermöglicht und somit eine verstärkte Ansiedlung von AOB auf diesen Partikeln zufolge hat (Powell und Prosser, 1991; Vieira *et al.*, 2001). Dieser Effekt steht im Einklang mit dem Befund dieser Studie und könnte die erhöhte AOB-Präsenz in der Tonfraktion – insbesondere des ungedüngten Bodens – erklären.

**AOB und Alfa-Proteobakterien** Umgekehrt wird die geringe bakterielle Besiedlung der größeren Bodenpartikel mit dem Konkurrenzkampf zwischen Protozoen und Bakterien um Nährstoffe sowie dem Räuber-Beute-Verhältnis, das zugunsten der Ersteren verschoben wird, erklärt (Sessitsch *et al.*, 2001; Poll *et al.*, 2003). Gleichzeitig wurde eine erhöhte Präsenz alfa-proteobakterieller Stickstofffixierer in den Sandfraktionen beobachtet (Sessitsch *et al.*, 2001). Da diese Organismen meist zu EPS Bildung befähigt sind, können sie, von Protozoen unbehelligt und von reduziertem Stickstoff unabhängig, dieses Mikrohabitat besiedeln. Diese Tatsache könnte die Existenz von AOB in den Sandfraktionen sowohl des gedüngten als auch ungedüngten Bodens erklären. Da auch zahlreiche AOB in der Lage sind, EPS zu bilden (Stehr *et al.*, 1995b), ist eine Biofilm- oder Konsortienbildung zwischen AOB und Stickstofffixierern nicht auszuschließen. Ein derartiger Zusammenschluss brächte beiden Gilden einen erhöhten Schutz vor Protozoenfraß, während AOB unter Umständen vom gebundenen Ammonium profitierten, und im Gegenzug, die Stickstofffixierer mit wertvollen Sekretstoffen versorgen würden. Allerdings ist eine derartige Hypothese mit Kolokalisationsstudien und umfangreichen Analysen der postulierten Stoffflüsse, noch zu beweisen.

Obwohl Gruppierung der Klone zu OTUs, ebenso wie ihre zahlenmäßige Verteilung zwischen den Böden erste Anhaltspunkte über die AOB-Diversität lieferten, so war es doch unerlässlich, die phylogenetische Zuordnung der einzelnen OTUs zu untersuchen.

Dabei stellte sich jedoch das Problem, dass die auf dem *amoA*-Genfragment basierende AOB-Phylogenie innerhalb der *Nitrosospira*- wie *N.-oligotropha*/*N.-marina*-Linie nur eine, im Vergleich zu 16S-rRNS, begrenzte Auflösung zulässt (Koops *et al.*, 2003; Purkhold *et al.*, 2003). Aus diesem Grund dienten Ähnlichkeiten der einzelnen OTUs zu kultivierten *Nitrosomonas*- bzw. *Nitrosospira*-Reinkulturen vorrangig als Anhaltspunkt. Es konnte dabei festgestellt werden, dass die überwiegende Mehrzahl an Klonen (88%) als Verwandte der *Nitrosospira*-Linie (Koops *et al.*, 2003; Purkhold *et al.*, 2003) identifiziert wurden, welche bei einer 97%-igen Sequenzähnlichkeit in 24 (von insgesamt 29) OTUs untergliedert werden konnten, und nahezu die gesamte *Nitrosospira*-Bandbreite – bis auf das sog. „Cluster“1 – abdeckten (Abb. 46 und Abb. 47). Die verbleibenden Klone erwiesen sich einerseits als Verwandte der *N.-europaea*- andererseits der *N.-oligotropha*/*N.-marina*-Linie. Während die *N.-europaea*-verwandten Klone selbst bei einer Nukleinsäuresequenzähnlichkeit von 97% lediglich eine OTU bildeten, waren es für die *N.-oligotropha*/*N.-marina*-Linie bereits vier OTUs. Diese zeigten zu den zwei beschriebenen Spezies *N. oligotropha* und *N. ureae* die höchsten Ähnlichkeiten. Nach Klassifizierung aller OTUs nach ihrem Ursprung (Abb. 47) wurde zudem deutlich, dass Sequenzen der *N.-oligotropha*/*N.-marina*-Linie lediglich in ungedüngtem Boden auftraten, während Vertreter der die *Nitrosospira*- als auch *N.-europaea*-Linie in beiden Böden vorkamen. Die Dominanz von Nitrosospiren in unterschiedlichsten Böden konnte bereits in zahlreichen, die AOB-Populationsstruktur untersuchenden Studien demonstriert werden (Hiorns *et al.*, 1995; Kowalchuk *et al.*, 1997; Stephen *et al.*, 1998; Aakra *et al.*, 1999; Bruns *et al.*, 1999; Mendum *et al.*, 1999; Stephen *et al.*, 1999; Hastings *et al.*, 2000; Ivanova *et al.*, 2000; Kowalchuk *et al.*, 2000b; Kowalchuk *et al.*, 2000a; Phillips *et al.*, 2000; Laverman *et al.*, 2001; Oved *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2001; Avrahami *et al.*, 2002; Webster *et al.*, 2002; Avrahami und Conrad, 2003; Mintie *et al.*, 2003).

Auch das Vorkommen von *N.-europaea*-Verwandten in verschiedenen, jedoch zumeist eutrophierten Böden ist bereits mehrmals gezeigt worden (Hastings *et al.*, 1997; Ceccherini *et al.*, 1998; Holmes *et al.*, 1999; Campbell, 2000; Phillips *et al.*, 2000; Oved *et al.*, 2001; Morris *et al.*, 2002; Radajewski *et al.*, 2002; Webster *et al.*, 2002). Dies ist vermutlich auf die hohe Toleranz dieser Organismen gegenüber hohen Ammoniak- und NaCl-Konzentrationen bei einer relativ hohen Affinitätskonstante gegenüber Ammoniak (50-100  $\mu\text{mol}$ ) zurückzuführen (Koops und Pommerening-Röser, 2001). Gleichzeitig zeigten einzelne

Studien ihre Präsenz ebenfalls in oligotrophen Böden (Phillips *et al.*, 2000; Webster *et al.*, 2002), ein Fakt, der für die ökophysiologische Anpassungsfähigkeit dieser Organismengruppe spricht.

Die Präsenz von *N.-oligotropha*-verwandten Organismen in ausschließlich ungedüngtem, also nährstoffarmem Boden (Abb. 47) ist vermutlich eine Konsequenz ihrer sehr niedrigen Affinitätskonstante gegenüber Ammoniak bei einer gleichzeitig geringen Toleranz gegenüber hohen Ammonium-Konzentrationen (Stehr *et al.*, 1995a; Bollmann und Laanbroek, 2001; Bollmann *et al.*, 2002). Obwohl der Großteil (Koops *et al.*, 2003) von *N.-oligotropha*-verwandten Organismen aus Kläranlagen (Koops und Harms, 1985; Suwa *et al.*, 1997; Purkhold *et al.*, 2000; Nicolaisen und Ramsing, 2002) und Süßwasserhabitaten (Stehr *et al.*, 1995a; Speksnijder *et al.*, 1998; Radeva *et al.*, 1999; Bollmann und Laanbroek, 2001; Regan *et al.*, 2002) stammt, so wurden wichtige Vertreter dieser Gruppe, wie *N. oligotropha* oder *N. ureae* (Koops *et al.*, 1991), sowie zahlreiche verwandte Klone aus moderat sauren (pH 6,0) Böden (Koops *et al.*, 1991; Stephen *et al.*, 1998; Bruns *et al.*, 1999; Kowalchuk *et al.*, 2000b; Phillips *et al.*, 2000; Whitby *et al.*, 2001b) isoliert oder dort detektiert.

Innerhalb der *Nitrosospira*-Linie (Abb. 46 und Abb. 47) wurde ein gehäuftes Auftreten von *Nitrosospira*-sp.-Ka4- (sog. „Cluster 4“) sowie *Nitrosospira*-sp.-Nsp2-verwandten („Cluster 3“) Sequenzen in beiden Böden beobachtet, was für eine Generalistenstrategie dieser Organismen typen spricht (Stephen *et al.*, 1998; Kowalchuk *et al.*, 2000a). Bei den *Nitrosospira*-sp.-Nsp12-nahen („Cluster 0“) OTUs, die größtenteils aus gedüngtem, nur einmal jedoch aus ungedüngtem Boden gewonnen wurden, konnte nicht eindeutig gezeigt werden, ob diese Organismen bevorzugt in eutrophierter Umgebung auftraten, oder ob es sich um einen Klonierungsartefakt handelt. Es steht jedoch fest, dass Organismen dieser Gruppe mit variierenden Umweltbedingungen zurechtkommen, da sie aus Habitaten unterschiedlichen Nährstoffgehalts isoliert werden konnten (Koops und Harms, 1985). Dagegen konnten *Nitrosospira*-sp.-NspAHB1- („Cluster 2“) bzw. *Nitrosospira*-sp.-Nsp57-verwandte OTUs ausschließlich aus ungedüngtem Boden gewonnen werden. Bisherige Studien zeigten, dass Nitrosospiren aus dem sog. „Cluster 2“ bevorzugt in sauren Böden vorkommen (Stephen *et al.*, 1996; Stephen *et al.*, 1998; Hastings *et al.*, 2000; Kowalchuk *et al.*, 2000b; Burton und Prosser, 2001; Laverman *et al.*, 2001). Wenn auch der pH-Wert (6,2) des gedüngten Bodens nur geringfügig über dem des ungedüngten (pH 5,6) lag, so trug er wohl gemeinsam mit seinem höheren Ammoniumgehalt wegen der langjährigen Stallmistdüngung zu Verdrängung von Nitrosospiren des „Cluster 2“ bei.

Entgegen den Resultaten einiger Studien, die keine Unterschiede zwischen den AOB-Populationen gedüngter und ungedüngter Böden feststellen konnten (Phillips *et al.*, 2000; Webster *et al.*, 2002), wurden hier Trends zu höherer Diversität im ungedüngten Boden erkennbar (Abb. 47 und Abb. 49). Da die Unterschiede jedoch meist jenseits der „Cluster-“ und Speziesgrenze lagen, ist es nicht verwunderlich, dass sie in anderen Studien nicht aufgezeigt werden konnten. Die Mehrzahl der Untersuchungen zu AOB-Populationsstruktur bediente sich zwar hochauflösender DGGE (z.B. Phillips *et al.*, 2000; Webster *et al.*, 2002; Avrahami *et al.*, 2003), mit denen Sequenzunterschiede von Markermolekülen (16S rRNS oder *amoA*) bis zu einer Base visualisiert werden können. Die analysierten Amplifikate wurden jedoch oft mit PCR-Primersätzen von lückenhafter Sensitivität erzeugt und anschließend mit Sonden von unzureichender Spezifität und/oder Sensitivität (Koops *et al.*, 2003) identifiziert. Auch die Sequenzanalyse von Banden beschränkte sich oft auf nur wenige Klone und umfasste zudem nur kurze Genfragmente, die konsequenterweise zu Verlust phylogenetischen Informationsgehalts führten. Es ist daher davon auszugehen, dass diese Art von Diversitätsanalysen nur lückenhaft das tatsächliche Bild der untersuchten Populationsstruktur wiedergibt.

Schließlich wurden die unterschiedlichen Korngrößenfraktionen der beiden Böden hinsichtlich eventueller Besiedlungsmuster durch bestimmte AOB-Gruppen untersucht. Die vorkommenden AOB wurden dabei zunächst ihrer phylogenetischen Linien- („Cluster-“) und anschließend – wenn möglich – der Spezieszugehörigkeit nach klassifiziert (Abb. 46 und Abb. 47). Dabei konnte festgestellt werden, dass die ausschließlich in ungedüngtem Boden gefundenen OTUs der *N.-oligotropha*-/*N.-marina*-Linie sowohl im Feinsand- als auch in der Tonfraktion auftraten. Sie zeigten dabei die höchsten Nukleinsäuresequenzähnlichkeiten zu *N. ureae* sowie *N. oligotropha*, ohne jedoch einen genaueren Aufschluss über eine präferenzielle Besiedlung einer der beiden Fraktionen durch die einzelnen Spezies zu liefern (Abb. 47).

Für die *N.-europaea*-verwandte OTU-Gruppe zeigte sich ein weniger klares Verteilungsmuster, da sie sowohl in der Ton-, den beiden Sandfraktionen des gedüngten aber auch im Feinsand des ungedüngten Bodens nachgewiesen werden konnte (Abb. 47). Aufgrund der bereits erwähnten Präferenz dieser Organismengruppe für eutrophierte – aquatische wie terrestrische – Habitate ist es jedoch erstaunlich, dass die Mehrzahl der *N.-europaea*-verwandten Klone aus Fraktionen eines nährstoffarmen Bodens gewonnen wurde. Allerdings spiegelt die Anzahl an Klonen nicht immer die tatsächliche Häufigkeit des

entsprechenden Organismus innerhalb des untersuchten Habitats wider (Juretschko *et al.*, 1998).

Die mit Abstand am häufigsten identifizierten OTUs gehörten der *Nitrosospira*-Linie an und waren ausnahmslos in allen Bodenfraktionen vertreten (Abb. 47). Die nähere Zuordnung der einzelnen OTUs anhand der höchsten Ähnlichkeiten zu kultivierten Nitrosospiren enthüllte einige deutliche Unterschiede im Verteilungsmuster zwischen den einzelnen Fraktionen. Während *Nitrosospira*-sp.-Ka4-Verwandte gemeinsam mit Organismen des sog. „Clusters 3“ (laut 16S-rRNS-Phylogenie) sich als Generalisten erwiesen, da sie in nahezu allen Fraktionen des sowohl gedüngten als auch ungedüngten Bodens auftraten, konnten Verwandte der beiden Spezies *Nitrosospira* sp. Nsp58 bzw. NspAHB1 („Cluster 2“) ausschließlich in der Schluff- bzw. Tonfraktion des ungedüngten Bodens nachgewiesen werden (Abb. 47). Die *Nitrosospira*-sp.-Nsp12-Verwandten OTUs konnten in allen Fraktionen des gedüngten, aber auch einmal in der Grobsandfraktion des ungedüngten Bodens wiedergefunden werden. So ist es anzunehmen, dass vielmehr die Düngung als die Partikelgröße sich selektiv auf das Vorkommen dieser Organismengruppe auswirkte. Darüber hinaus wurden vereinzelt Vertreter der erst kürzlich beschriebenen (Koops *et al.*, 2003; Purkhold *et al.*, 2003) und auf 16S-rRNS-Ebene definierten *Nitrosospira*-sp.-Nsp65-Linie in unterschiedlichen Fraktionen der beiden Böden (Abb. 47) gefunden. Die einzige Reinkultur dieser Spezies wurde aus Mauerwerk isoliert (Purkhold *et al.*, 2003), zahlreiche verwandte Umweltsequenzen stammen jedoch aus unterschiedlichen Böden (Avrahami und Conrad, 2003), darunter auch aus Reisfeldern (Rotthauwe *et al.*, 1997). Insgesamt betrachtet, können Vertreter der *Nitrosospira*-Linie als autochthone Bodenorganismen bezeichnet werden, da sie in der Lage sind, die mannigfaltigen Mikrohabitate, welche der Lebensraum Boden mit seinen verschiedenen Partikelgrößen bietet, optimal zu nutzen, und sich an wechselnde Umstände anzupassen. Andererseits decken sich die Erkenntnisse dieser Arbeit mit denen anderer Studien, in denen eine erstaunliche ökophysiologische Vielseitigkeit der *Nitrosospira*-Linie trotz ihrer engen Verwandtschaft attestiert wird (Stephen *et al.*, 1996; Stephen *et al.*, 1998; Jiang und Bakken, 1999a; Kowalchuk *et al.*, 2000a).

Wie bereits für die einzelnen OTUs wurde auch die Häufigkeit der identifizierten AOB-Linien (oder sog. „Cluster“) in den drei jeweiligen Bodenreplikaten überprüft. Es ging daraus hervor, dass die Variationsbreite innerhalb des ungedüngten Bodens höher als die des gedüngten war. Bei einer nahezu gleich hohen Anzahl untersuchter Klone für beide Böden wurden in dem nährstoffärmeren Boden insgesamt mehr OTUs, die zudem in mehr phylogenetische Entwicklungslinien aufgeteilt werden konnten, identifiziert, die jedoch

insgesamt stärker unter den einzelnen Replikaten variierten. Umgekehrt zeigte der gedüngte Boden ein mehr ausgeglichenes Verteilungsprofil der auftretenden Entwicklungslinien. Dieser Sachverhalt ist ein indirekter Hinweis auf die Selektionierung optimal angepasster AOB-Organismen an die seit nahezu 150 Jahren unverändert erhöhte ( $12t$  Stallmist  $ha^{-1} y^{-1}$ ) Nährstoffverfügbarkeit mit der Konsequenz der Reduzierung der natürlichen AOB-Diversität.

Der in anderen Studien (Sessitsch *et al.*, 2001; Poll *et al.*, 2003) bereits gezeigte Trend zu erhöhter Heterogenität in Mikroskala, insbesondere die Zunahme an bakterieller Biomasse einhergehend mit zunehmender Diversität in Zusammenhang mit sinkender Partikelgröße konnte auch im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. Während jedoch Poll *et al.*, 2003 eine Erhöhung gesamt bakterieller Mikrodiversität in den beiden stallmistgedüngten Sandfraktionen mittels PFLA- sowie T-RFLP-Analysen feststellten, ohne dabei nennenswerte Veränderungen in den kleineren Partikelgrößen zu beobachten, konnte hier für die AOB-Population das Gegenteil aufgezeigt werden. Einerseits stellen AOB nur einen Bruchteil der bakteriellen Gesamtpopulation des Bodens dar, so dass eventuelle Verschiebungen ihrer Populationsstruktur sich kaum auf die Gesamtstruktur auswirken dürften (Okano *et al.*, 2004). Andererseits findet die Untersuchung der Diversitätsverschiebung auf einer anderen Hierarchieebene statt, so dass sie mit der dieser Studie nicht direkt verglichen werden kann. Zudem ist bei Diversitätsuntersuchungen – insbesondere auf globaler Ebene – die Erfassung aller (zumindest der Mehrzahl) bekannten Organismen das oberste Gebot, die bei Methoden wie T-RFLP bei einer sorgfältigen Wahl universeller PCR-Primer beginnt. Eine genauere Betrachtung des von Poll *et al.*, 2003 verwendeten Primersatzes zeigte jedoch eine eingeschränkte Spezifität mit der Konsequenz, dass die Ergebnisse nicht allgemein gültig und somit auf AOB nicht übertragbar sind.

**E. ZUSAMMENFASSUNG/**

**SUMMARY**



Eines der zentralen Themen der mikrobiellen Ökologie ist die Erfassung von Strukturen komplexer, mikrobieller Lebensgemeinschaften sowie das Verständnis ihrer Funktionsweisen. Um diese Fragestellung sinnvoll bearbeiten zu können, bedarf es neuer, molekularer Nachweissysteme, mit denen in einem Versuchsschritt zahlreiche Mikroorganismen innerhalb des untersuchten Systems phylogenetisch identifiziert und deren Funktionen geklärt werden können. Die vorliegende Arbeit zeigt u.a. die Entwicklung, Evaluierung und Anwendung eines neuartigen molekularen Werkzeugs für derartige Struktur-Funktions-Analysen, des sog. Isotope Arrays. Die Methode beruht auf der Kombination der hoch parallelen Identifizierung von Mikroorganismen mittels der Mikroarray-Technologie, und dem spezifischen Nachweis der Inkorporationsaktivität von Isotop-markierten Substraten in Nukleinsäuren von Organismen, welche auf dem Mikroarray identifizierter werden. Als Modellorganismen dienten hierfür die Ammoniak oxidierenden Bakterien (AOB), welche weltweit in natürlichen sowie anthropogenen Lebensräumen vorkommen und eine wesentliche Rolle im globalen Stickstoffkreislauf spielen. Da alle Vertreter dieser Bakteriengruppe in der Lage sind, autotroph zu leben, und somit in ihrem aktiven Zustand durch Zugabe von radioaktiven  $^{14}\text{C}$  markiert werden können, eignen sie sich besonders für die Austestung des Isotope-Array-Ansatzes.

Um die Realisierbarkeit dieser Methodik zu überprüfen („proof of principle“), wurde zunächst ein Prototyp des Isotope Arrays mit einer geringen Anzahl an bereits publizierten und gegen die 16S rRNS von AOB gerichteten Oligonukleotidsonden konstruiert. Im ersten Schritt wurde die rRNS von einer *Nitrosomonas-eutropha*-Reinkultur, welche mit  $^{14}\text{C}$ -markiertem Bikarbonat inkubiert wurde, auf dem Mikroarray hybridisiert. Das Signalmuster für Fluoreszenz bzw. Radioaktivität zeigte sowohl Präsenz als auch Assimilationsaktivität von *N. eutropha* an. Im Kontrollversuch mit rRNS von *N. eutropha*, welche zusätzlich zu  $^{14}\text{C}$ -Bikarbonat mit dem spezifischen Nitrifikationshemmstoff Allylthioharnstoff inkubiert wurde, blieben die radioaktiven AOB-Sondensignale aus. Nachdem es gelang, den spezifischen Einbau von  $^{14}\text{C}$ -Bikarbonat in rRNS von *N. eutropha* auf dem Isotope Array eindeutig zu zeigen, wurden Versuche mit nitrifizierenden Belebtschlämmen zweier Kläranlagen durchgeführt. Zunächst wurde die Populationstruktur beider Belebtschlämme mit quantitativer FISH- sowie vergleichender *amoA*-Gensequenzanalyse untersucht. Ferner wurde über einen Zeitraum von 26 h die  $^{14}\text{CO}_2$ -Assimilationsaktivität der Nitrifikanten in beiden Belebtschlämme (mit und ohne Zugabe von Allylthioharnstoff) mit Hilfe der Szintillationsmessung überwacht. In beiden aktiven Belebtschlämme konnte ein kontinuierlicher Radioaktivitätsanstieg in der Biomasse beobachtet werden; kein

nennenswerter Radioaktivitätseinbau fand hingegen in die gehemmte Biomasse statt. Zusätzlich wurde die CO<sub>2</sub>-Assimilation beider Belebtschlämme mit Hilfe der FISH-MAR-Analyse untersucht. Beide aktiven Schlämme zeigten eine eindeutige Akkumulation von Radioaktivität an den Nitrifikantenkolonien, wohingegen nach Inhibition keine vergleichbare Radioaktivitätsanhäufung lokalisiert wurde. Die Resultate der im Anschluss durchgeführten Hybridisierungen auf dem Prototyp des Isotope Arrays mit rRNS beider Belebtschlämme bestätigten die Befunde der Kontrollversuche hinsichtlich Präsenz und Aktivität von AOB in beiden Proben.

Um mit dem Isotope Array künftig alle bekannten AOB zu erfassen, wurde im folgenden Schritt ein aus 123 überwiegend neuen, gegen die 16S rRNS gerichteten und AOB-spezifischen Oligonukleotiden bestehender Sondensatz gemäß dem Mehrfachsondenkonzept entworfen, und mit über 30 PCR-amplifizierten sowie *in-vitro*-transkribierten 16S-rRNS-Genen von AOB-Reinkulturen evaluiert. Trotz der zum Zeitpunkt seiner Evaluierung herrschenden, ungünstigen Umstände, wie hoher Raumtemperatur und Fehlfunktionen des Arrayspotters, konnte prinzipiell die Tauglichkeit des neuen AOB-Mikroarrays bestätigt werden. Als nächstes wurde die Eignung des neuen AOB-Mikroarrays für den Isotope-Array-Ansatz überprüft. Die für den Prototyp des Isotope Arrays bereits verwendete, radioaktiv- und fluoreszenzmarkierte rRNS aus Belebtschlämmen zweier Kläranlagen wurde auf dem neuen Isotope Array hybridisiert. Dabei konnte grundsätzlich festgestellt werden, dass die auf dem Isotope-Array-Prototyp durchgeführten Struktur-Funktions-Analysen der beiden Proben mit dem Isotope Array bestätigt werden konnten. Gleichzeitig muss jedoch erwähnt werden, dass zum einen die Stringenzbedingungen einer weiteren Feinabstimmung bedürfen, und zum anderen, dass, aufgrund von – vermutlich durch Fehlfunktionen des Arrayspotters verursachtem – Signalausfall einzelner Sonden, einige Hybridisierungen mit AOB-Reinkulturen wiederholt werden sollten. Insgesamt betrachtet erwies sich jedoch der Isotope Array als ein effizientes, molekulares Werkzeug für Struktur-Aktivitäts-Analysen von AOB, die in den untersuchten Proben in Häufigkeiten zwischen 5-10% vorkamen.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde auch versucht, Unterschiede der Zusammensetzung von AOB-Lebensgemeinschaften in Böden mit unterschiedlicher Düngungspraxis mit Hilfe des AOB-Mikroarrays aufzuzeigen. Da jedoch die Diversitätsunterschiede vor allem unterhalb des Speziesniveaus und damit jenseits der Auflösungsgrenze des AOB-Mikroarrays lagen, wurden AOB-Populationsstudien der beiden Böden mittels der vergleichenden *amoA*-Gensequenzanalyse durchgeführt.

Der Vergleich der AOB-Populationsstruktur des ungedüngten mit dem mit Stallmist gedüngten Boden zeigte, dass die Unterschiede auf niedriger phylogenetischer Ebene, also vermutlich auf Stammesebene lagen, und dass der ungedüngte Boden eine höhere Anzahl an OTU (=operational taxonomic units) AOB als der gedüngte Boden beherbergte. Eine weitere Untersuchung von AOB-Besiedlungsunterschieden mit Mikroskalaauflösung, d.h. unter Berücksichtigung der einzelnen Korngrößenfraktionen, wie Grob- und Feinsand, Schluff und Ton, zeigte hingegen deutlich, dass die AOB-Diversität sowohl im gedüngten als auch im ungedüngten Boden mit abnehmender Partikelgröße zunahm. Die Beobachtung, dass einige OTUs in nahezu allen Fraktionen beider Böden vorkamen, während andere nur auf einen Bodentyp oder wenige Fraktionen beschränkt blieben, deutet zudem darauf hin, dass die detektierten AOB in zwei Strategentypen, nämlich im Generalisten bzw. Spezialisten unterteilt werden konnten.

Die faszinierende Vielfalt AOB in den untersuchten Böden demonstrierte uns einerseits, dass für die Erforschung von so hochkomplexen Lebensgemeinschaften weitere Experimente mit einer höheren Anzahl an Replikaten erforderlich sind, um die gegenwärtigen Befunde abzusichern. Andererseits wurde erneut deutlich, dass die molekulare mikrobielle Ökologie des Bodens eine noch relativ junge Disziplin mit großem Forschungsbedarf und zahlreichen, spannenden und noch zu erörternden Fragestellungen darstellt.

Deciphering the structure and function of complex microbial communities is one of the central themes in microbial ecology. Therefore, new molecular detection systems are required, which allow the investigation of phylogeny and function of numerous microorganisms in one step.

This work presents the development, evaluation and application of a novel molecular tool for structure-function analyses called the Isotope Array. This approach merges two methods: the highly parallel microarray technique for the identification of microorganisms, and the detection of specific incorporation activity of isotope-labeled substrates into nucleic acids for the investigation of the function of microorganisms. As model organisms served Ammonia-Oxidizing Bacteria (AOB), the key players in the global nitrogen cycle, which are present in natural and man-made habitats world wide. Due to their autotrophic way of life, the metabolically active AOB are suited for labeling studies in presence of radioactive CO<sub>2</sub>, a feature that was exploited for operability tests of the Isotope Array. For the proof of principle an Isotope Array prototype was constructed, which consisted of six previously published oligonucleotide probes detecting the 16S rRNA of AOB. At first the rRNA of a pure culture of *Nitrosomonas europaea*, which was incubated with <sup>14</sup>C-labeled bicarbonate, was hybridized on a microarray. The patterns of fluorescent and radioactive signals proved the presence and the assimilation activity of *N. europaea*. In a control hybridization experiment with rRNA of *N. europaea*, which was incubated with <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> and the specific nitrification inhibitor Allylthiourea (ATU), only fluorescent but no radioactive signals were observed, indicating the lack of assimilation activity. After successful demonstration of specific incorporation of <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> into rRNA of *N. europaea* via the Isotope Array prototype, nitrifying activated sludges of two wastewater treatment plants were used for Isotope Array experiments. Initially, control experiments with standard methods were conducted with both sludges: the AOB communities of both sludges were determined by quantitative FISH analysis, as well as by comparative sequence analysis of the *amoA*. Then, the <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-assimilation activities of AOB in both sludges (within and without ATU) were monitored for 26 hours by scintillation. Both active sludges exhibited a continuous increase of radioactivity in their biomasses whereas in the inhibited sludges only a minor radioactivity accumulation was observed. Additionally, the <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> assimilation in the biomasses of both sludges was analyzed by FISH-MAR. In both active sludges apparent accumulations of radioactivity in colonies of the nitrifiers were observed but no equivalent accumulations were detected in the inhibited counterparts. Finally, rRNA from both sludges and treatments was hybridized on the Isotope Array prototype. The identity and activity of AOB determined with the Isotope Array coincided with results of

control experiments described above. For an encompassing detection of all known AOB on the Isotope Array a new oligonucleotide probe set according to the multiple probe concept was designed. It consisted of 123 predominantly novel probes targeting the 16S rRNA of AOB, and it was evaluated with *in vitro* transcribed and PCR-amplified rRNA genes of more than 30 AOB pure cultures. Despite of disadvantageous conditions during the evaluation experiments of the probe set (e.g. high room temperature, defects on array spotter) the new AOB microarray could generally be considered as suitable for detection of AOB. Subsequently, the new AOB probe set was applied to the Isotope Array with radioactively and fluorescently labeled rRNA from sludges of two wastewater treatment plants used previously for the Isotope Array prototype. The results of structure-function analyses achieved with the Isotope Array as well as with its prototype turned out to be congruent for both samples, respectively. For future applications, it should however be mentioned that the stringency conditions for the AOB probe set still need to be fine-tuned, and some hybridizations with pure cultures should be repeated in order to clarify signal ambiguities, most probably caused by the defective array spotter. Eventually, the Isotope Array proved to be an efficient molecular tool for structure-activity analyses of AOB with an occurrence of 5-10% in the total biovolume of the samples.

The new AOB microarray was also applied to elucidate differences in community structure of AOB in soil lacking and receiving fertilizer, respectively. As noteworthy differences in diversity emerged beyond the species level and thus beyond the detection limit of the AOB microarray, the AOB population studies of both soils were conducted by comparative *amoA* gene sequence analysis. It revealed that (i) the differences in AOB community structures between both soils lied on a low phylogenetic level (probably on strain level), and (ii) that the manure-fertilized soil contained less operational taxonomic units (OTU) of AOB than the unfertilized soil did. Furthermore, the AOB populations were analyzed at the grain size level in both soils (coarse and fine sand, silt and clay), considered as microhabitats, showing for both soils that the AOB diversity increased when the particle size decreased (silt and clay). Additionally, some OTU were present in all particle sizes of both soils whereas other few OTU were limited to one soil or its few fractions, dividing the AOB detected into generalists and specialist, respectively. The vast AOB diversity in both soils revealed on one hand, that for investigation of such complex communities further experiments with more replicates are necessary in order to validate present results. On the other hand, again it became obvious that soil molecular microbial ecology is an emerging discipline with great need for research and a multitude of thrilling questions to be answered.



## **F. LITERATURVERZEICHNIS**



- Aakra, A., J.B. Utaaker, I.F. Nes, and L.R. Bakken 1999.** An evaluated improvement of the extinction dilution method for isolation of ammonia-oxidizing bacteria. *J. Microbiol. Methods* **39**(1): 23-31.
- Abbassi, M.K., and W.A. Adams 1998.** Loss of nitrogen in compacted grassland soil by simultaneous nitrification and denitrification. *Plant Soil* **200**: 265-277.
- Adamczyk, J., M. Hesselsoe, N. Iversen, M. Horn, A. Lehner, P.H. Nielsen, M. Schloter, P. Roslev, and M. Wagner 2003.** The Isotope Array, a New Tool That Employs Substrate-Mediated Labeling of rRNA for Determination of Microbial Community Structure and Function. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(11): 6875-6887.
- Alzerreca, J.J., J.M. Norton, and M.G. Klotz 1999.** The *amo* operon in marine, ammonia-oxidizing gamma-proteobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **180**: 21-29.
- Amann, R., and K.-H. Schleifer 2001.** Nucleic acid probes and their application in environmental microbiology. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. G.M. Garrity. New York, Springer. **1**: 67-82.
- Amann, R.I. 1995.** In situ identification of microorganisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. *Molecular Microbial Ecology Manual*. A.D.C. Akkeman, J.D. van Elsas and F.J. de Bruijn. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers. **3.3.6**: 1-15.
- Amann, R.I., B.J. Binder, R.J. Olson, S.W. Chisholm, R. Devereux, and D.A. Stahl 1990.** Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**(6): 1919-1925.
- Amann, R.I., W. Ludwig, and K.-H. Schleifer 1995.** Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**(1): 143-169.
- Amato, M., and J.N. Ladd 1992.** Decomposition of <sup>14</sup>C-labelled glucose and legume material in soils: properties influencing the accumulation of organic residue C and microbial biomass C. *Soil Biol. Biochem.* **24**: 455-466.
- Avrahami, S., and R. Conrad 2003.** Patterns of Community Change among Ammonia Oxidizers in Meadow Soils upon Long-Term Incubation at Different Temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(10): 6152-6164.
- Avrahami, S., R. Conrad, and G. Braker 2002.** Effect of Soil Ammonium Concentration on N<sub>2</sub>O Release and on the Community Structure of Ammonia Oxidizers and Denitrifiers. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**(11): 5685-5692.
- Avrahami, S., W. Liesack, and R. Conrad 2003.** Effects of temperature and fertilizer on activity and community structure of soil ammonia oxidizers. *Environ. Microbiol.* **5**(8): 691-705.
- Bano, N., and J.T. Hollibaugh 2000.** Diversity and distribution of DNA sequences with affinity to ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class *Proteobacteria* in the Arctic Ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 1960-1969.
- Baribeau, H., C.A. Kinner, J.R. Stephen, R. de Leon, P.A. Rochelle, and D.L. Clark 2000.** Microbial population characterization of suspended and fixed biomass in drinking water reservoirs. American Water Works Association Water Quality Technology Conference Proceedings.
- Battaglia, C., G. Salani, C. Consolandi, L.R. Bernardi, and G. De Bellis 2000.** Analysis of DNA microarrays by non-destructive fluorescent staining using SYBR green II. *Biotechniques* **29**(1): 78-81.
- Bavykin, S.G., J.P. Akowski, V.M. Zakhariev, V.E. Barsky, A.N. Perov, and A.D. Mirzabekov 2001.** Portable system for microbial sample preparation and oligonucleotide microarray analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**(2): 922-928.
- Becker, S., P. Boger, R. Oehlmann, and A. Ernst 2000.** PCR bias in ecological analysis: a case study for quantitative Taq nuclease assays in analyses of microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**(11): 4945-4953.
- Bedard, C., and R. Knowles 1989.** Physiology, biochemistry, and specific inhibitors of CH<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, and CO oxidation by methanotrophs and nitrifiers. *Microbiol. Rev.* **53**(1): 68-84.
- Behr, T., C. Koob, M. Schedl, A. Mehlen, H. Meier, D. Knopp, E. Frahm, U. Obst, K.-H. Schleifer, R. Niessner, and W. Ludwig 2000.** A nested array of rRNA targeted probes for the detection and identification of enterococci by reverse hybridization. *Syst. Appl. Microbiol.* **23**(4): 563-572.
- Behrens, S., B.M. Fuchs, F. Mueller, and R. Amann 2003a.** Is the In Situ Accessibility of the 16S rRNA of *Escherichia coli* for Cy3-Labeled Oligonucleotide Probes Predicted by a Three-Dimensional Structure Model of the 30S Ribosomal Subunit? *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(8): 4935-4941.

- Behrens, S., C. Ruhland, J. Inacio, H. Huber, A. Fonseca, I. Spencer-Martins, B.M. Fuchs, and R. Amann 2003b.** In Situ Accessibility of Small-Subunit rRNA of Members of the Domains Bacteria, Archaea, and Eucarya to Cy3-Labeled Oligonucleotide Probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(3): 1748-1758.
- Belser, L.W. 1979.** Population ecology of nitrifying bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **33**: 309-333.
- Belser, L.W. 1984.** Bicarbonate uptake by nitrifiers: effects of growth rate, pH, substrate concentration and metabolic inhibitors. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 1100-1104.
- Bloom, A.J. 1994.** Crop acquisition of ammonium and nitrate. *Physiology and Determination of Crop Yield.* K.J. Boote, J.M. Bennett, T.R. Sinclair and G.M. Paulsen. Madison, WI, ASA, CSA, SSSA: 303-310.
- Bloom, A.J., S.S. Sukrapanna, and R.L. Warner 1992.** Root respiration associated with ammonium and nitrate absorption and assimilation by barley. *Plant Physiol* **99**: 1294-1301.
- Bobbink, R., M. Hornung, and J.G.M. Roelofs 1998.** The effects of air-borne nitrogen pollutants on species diversity in natural and semi-natural European vegetation. *J. Ecol.* **86**: 717-738.
- Bobbink, R., and J.H. Willems 1987.** Increasing dominance of *Brachypodium pinnatum* (L.) Beauv. in chalk grasslands: a threat to a species-rich ecosystem. *Biol. Conserv.* **40**: 301-314.
- Bock, E., and W. Sand 1993.** The Microbiology of masonry biodeterioration. *J. Appl. Bacteriol.* **74**: 503-514.
- Bodrossy, L., N. Stralis-Pavese, M.J. C., S. Radajewski, A. Weilharter, and A. Sessitsch 2003.** Development and validation of a diagnostic microbial microarray for methanotrophs. *Environ. Microbiol.* **5**(7): 566-582.
- Bollmann, A., M.J. Bar-Gilissen, and H.J. Laanbroek 2002.** Growth at Low Ammonium Concentrations and Starvation Response as Potential Factors Involved in Niche Differentiation among Ammonia-Oxidizing Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**(10): 4751-4757.
- Bollmann, A., and H.J. Laanbroek 2001.** Continuous culture enrichments of ammonia-oxidizing bacteria at low ammonium concentrations. *FEMS Microbiol. Ecol.* **37**: 211-221.
- Boon, N., E.M. Top, W. Verstraete, and S.D. Siciliano 2003.** Bioaugmentation as a Tool To Protect the Structure and Function of an Activated-Sludge Microbial Community against a 3-Chloroaniline Shock Load. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(3): 1511-1520.
- Boschker, H.T.S., S.C. Nold, P. Wellsbury, D. Bos, W. de Graaf, R. Pel, R.J. Parkes, and T.E. Cappenberg 1998.** Direct linking of microbial populations to specific biogeochemical processes by <sup>13</sup>C-labelling of biomarkers. *Nature* **392**: 801-805.
- Bothe, H., G. Jost, M. Schloter, B.B. Ward, and K.-P. Witzel 2000.** Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments. *FEMS Microbiology Reviews* **24**(5): 673-690.
- Bouwman, A.F., I. Fung, E. Matthews, and J. John 1993.** Global analysis of the potential for N<sub>2</sub>O production in natural soils. *Global Biogeochem. Cycles* **7**: 557-597.
- Bremner, J.M., and A.M. Blackmer 1978.** Nitrous oxide: emission from soils during nitrification of fertilizer nitrogen. *Science* **199**: 295-296.
- Briones, A.M., S. Okabe, Y. Umehiya, N.-B. Ramsing, W. Reichardt, and H. Okuyama 2002.** Influence of Different Cultivars on Populations of Ammonia-Oxidizing Bacteria in the Root Environment of Rice. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**(6): 3067-3075.
- Brock, T.D., M.T. Madigan, J.M. Martinko, and J. Parker 1997.** *Biology of microorganisms*, Prentice Hall.
- Brock, W.H. 1999.** Justus von Liebig. Braunschweig, Vieweg.
- Bruns, M.A., J.R. Stephen, G.A. Kowalchuk, J.I. Prosser, and E.A. Paul 1999.** Comparative diversity of ammonia oxidizer 16S rRNA gene sequences in native, tilled, and successional soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 2994-3000.
- Brussaard, L., L.A. Bouwman, M. Geurs, J. Hassink, and K.B. Zwart 1990.** Biomass composition and temporal dynamics of soil organisms of a silt loam soil under conventional and integrated management. *Neth. J. Agric. Sci.* **38**: 283-302.
- Burrell, P.C., C.M. Phalen, and T.A. Hovanec 2001.** Identification of bacteria responsible for ammonia oxidation in freshwater aquaria. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**(12): 5791-5800.

- Burton, S.A., and J.I. Prosser 2001.** Autotrophic ammonia oxidation at low pH through urea hydrolysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**(7): 2952-2957.
- Busti, E., R. Bordoni, B. Castiglioni, P. Monciardini, M. Sosio, S. Donadio, C. Consolandi, L. Rossi Bernardi, C. Battaglia, and G. De Bellis 2002.** Bacterial discrimination by means of a universal array approach mediated by LDR (ligase detection reaction). *BMC Microbiol.* **2**(1): 27.
- Campbell, G.R. 2000.** Community analysis of beta-subgroup ammonia-oxidising bacteria in sewage sludge amended soil. University of Aberdeen.
- Campos JL, Garrido JM, Mendez R, and L. JM 2002.** The effect of kaolin particles on the behavior of nitrifying activated sludge units. *Bioresour. Technol.* **81**(3): 225-231.
- Carroll, J.A., S.J. Caporn, D. Johnson, M.D. Morecroft, and J.A. Lee 2003.** The interactions between plant growth, vegetation structure and soil processes in semi-natural acidic and calcareous grasslands receiving long-term inputs of simulated pollutant nitrogen deposition. *Environ. Pollut.* **121**(3): 363-376.
- Cebon, A., T. Berthe, and J. Garnier 2003.** Nitrification and Nitrifying Bacteria in the Lower Seine River and Estuary (France). *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(12): 7091-7100.
- Ceccherini, M.T., M. Castialdini, C. Piovaneli, R.C. Hastings, A.J. McCarthy, M. Bazzicalupoet, and N. Miclaus 1998.** Effects of swine manure on autotrophic ammonia-oxidizing bacteria in soil microcosms. *Appl. Soil Ecol.* **7**: 149-157.
- Chai, X.S., Q. Luo, and J.Y. Zhu 2001.** Analysis of nonvolatile species in a complex matrix by headspace gas chromatography. *J. Chromatogr.* **909**(2): 249-257.
- Chandler, D.P., R.W. Schreckhise, J.L. Smith, and H. Bolton 1997.** Electroelution to remove humic compounds from soil DNA and RNA extracts. *J. Microbiol. Methods* **28**: 11-19.
- Chang, Y.J., A.K. Hussain, J.R. Stephen, M.D. Mullen, D.C. White, and A. Peacock 2001.** Impact of herbicides on the abundance and structure of indigenous beta-subgroup ammonia-oxidizer communities in soil microcosms. *Environ. Toxicol. Chem.* **20**: 2462-2468.
- Chapin III, F.S., A.J. Bloom, C.B. Field, and R.H. Waring 1987.** Interaction of environmental factors in the control of plant growth. *BioScience* **37**: 49-57.
- Chefetz, B., J. Tarchitzky, A.P. Deshmukh, P.G. Hatcher, and Y. Chen 2002.** Structural Characterization of Soil Organic Matter and Humic Acids in Particle-Size Fractions of an Agricultural Soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **66**(1): 129-141.
- Chotte, J.L., J.N. Ladd, and M. Amato 1998.** Sites of microbial assimilation, and turnover of soluble and particulate <sup>14</sup>C-labelled substrates decomposing in a clay soil. *Soil Biol. Biochem.* **30**(2): 205-218.
- Christensen, B.T. 1992.** Physical fractionation of soil and organic matter in primary particle size and density separates. *Adv. Soil Sci.* **20**: 1-90.
- Colliver, B.B., and T. Stephenson 2000.** Production of nitrogen oxide and dinitrogen oxide by autotrophic nitrifiers. *Biotechnol. Adv.* **18**: 219-232.
- Conrad, R. 1996.** Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H<sub>2</sub>, CO, CH<sub>4</sub>, OCS, N<sub>2</sub>O, and NO). *Microbiol. Rev.* **60**(4): 609-640.
- Cottrell, M.T., and D.L. Kirchman 2000.** Natural assemblages of marine proteobacteria and members of the *Cytophaga-Flavobacter* cluster consuming low- and high-molecular-weight dissolved organic matter. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**(4): 1692-1697.
- Cottrell, M.T., and D.L. Kirchman 2003.** Contribution of major bacterial groups to bacterial biomass production (thymidine and leucine incorporation) in the Delaware estuary. *Limnol. Oceanogr.* **48**(1): 168-178.
- Crosby, L.D., and C.S. Criddle 2003.** Understanding bias in microbial community analysis techniques due to *rrn* operon copy number heterogeneity. *Biotechniques* **34**(4): 790-802.
- Cytryn, E., I. Gelfand, Y. Barak, J. van Rijn, and D. Minz 2003.** Diversity of microbial communities correlated to physiochemical parameters in a digestion basin of a zero-discharge mariculture system. *Environ. Microbiol.* **5**(1): 55-63.
- Daims, H., A. Brühl, R. Amann, K.-H. Schleifer, and M. Wagner 1999.** The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all *Bacteria*: Development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst. Appl. Microbiol.* **22**: 434-444.

- Daims, H., J.L. Nielsen, P.H. Nielsen, K.H. Schleifer, and M. Wagner 2001a.** In situ characterization of *Nitrospira*-like nitrite-oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 5273-5284.
- Daims, H., N.B. Ramsing, K.H. Schleifer, and M. Wagner 2001b.** Cultivation-independent, semiautomatic determination of absolute bacterial cell numbers in environmental samples by fluorescence in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 5810-5818.
- de Bie, M.J.M., A.G.C.L. Speksnijder, G.A. Kowalchuk, T. Schuurmann, G. Zwart, J.R. Stephen, O.E. Diekmann, and H.J. Laanbroek 2001.** Shifts in the dominant populations of ammonia-oxidizing  $\beta$ -subclass Proteobacteria along the eutrophic Schelde estuary. *Aquat. Microb. Ecol.* **23**: 225-236.
- de Saizieu, A., U. Certa, J. Warrington, C. Gray, W. Keck, and J. Mous 1998.** Bacterial transcript imaging by hybridization of total RNA to oligonucleotide arrays. *Nat. Biotechnol.* **16**(1): 45-48.
- Denef, V.J., J. Park, J.L.M. Rodrigues, T.V. Tsoi, S.A. Hashsham, and J.M. Tiedje 2003.** Validation of a more sensitive method for using spotted oligonucleotide DNA microarrays for functional genomics studies on bacterial communities. *Environ. Microbiol.* **5**(10): 933-943.
- Dijkhuizen, L., and W. Harder 2000.** Microbial metabolism of carbon dioxide. *Comprehensive Biotechnology*. H. Dalton. Oxford, Pergamon Press Ltd. **1**: 409-423.
- Dionisi, H.M., G. Harms, A.C. Layton, I.R. Gregory, J. Parker, S.A. Hawkins, K.G. Robinson, and G.S. Saylor 2003.** Power Analysis for Real-Time PCR Quantification of Genes in Activated Sludge and Analysis of the Variability Introduced by DNA Extraction. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(11): 6597-6604.
- Dionisi, H.M., A.C. Layton, G. Harms, I.R. Gregory, K.G. Robinson, and G.S. Saylor 2002.** Quantification of *Nitrosomonas oligotropha*-like ammonia-oxidizing bacteria and *Nitrospira* spp. from full-scale wastewater treatment plants by competitive PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 245-253.
- Donaldson, J.M., and G. S. Henderson. 1989.** A dilute medium to determine population size of ammonium oxidizers in forest soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **53**: 1608-1611.
- Dong, W., P. Eichhorn, S. Radajewski, D. Schleheck, K. Denger, T.P. Knepper, J.C. Murrell, and A.M. Cook 2004.** Parvibaculum lavamentivorans converts linear alkylbenzenesulphonate surfactant to sulphophenylcarboxylates, alpha,beta-unsaturated sulphophenylcarboxylates and sulphophenyldicarboxylates, which are degraded in communities. *J. Appl. Microbiol.* **96**(3): 630-640.
- Drozd, J.W. 1976.** Energy coupling and respiration in *Nitrosomonas europaea*. *Arch. Microbiol.* **101**: 257-262.
- Egli, K., U. Fanger, P.J. Alvarez, H. Siegrist, J.R. van der Meer, and A.J. Zehnder 2001.** Enrichment and characterization of an anammox bacterium from a rotating biological contactor treating ammonium-rich leachate. *Arch. Microbiol.* **175**(3): 198-207.
- Eighmy, T.T., and P.L. Bishop 1989.** Distribution and role of nitrifying populations in nitrogen removal in aquatic treatment systems. *Water Res.* **23**: 947-955.
- Ekblad, A., G. Nyberg, and P. Hogberg 2000.** C-13-discrimination during microbial respiration of added C-3-, C-4- and C-13-labelled sugars to a C-3-forest soil. *Oecologia* **131**: 245-249.
- El Fantroussi, S., H. Urakawa, A.E. Bernhard, J.J. Kelly, P.A. Noble, H. Smidt, G.M. Yershov, and D.A. Stahl 2003.** Direct profiling of environmental microbial populations by thermal dissociation analysis of native rRNAs hybridized to oligonucleotide microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(4): 2377-2382.
- Foster, R.C. 1988.** Microenvironments of soil microorganisms. *Biol. Fert. Soils* **6**: 189-203.
- Fox, G.E., E. Stackebrandt, R.B. Hespell, J. Gibson, J. Maniloff, T.A. Dyer, R.S. Wolfe, W.E. Balch, R.S. Tanner, L.J. Magrum, L.B. Zablen, R. Blakemore, R. Gupta, L. Bonen, B.J. Lewis, D.A. Stahl, K.R. Luehrsen, K.N. Chen, and C.R. Woese 1980.** The phylogeny of prokaryotes. *Science* **209**: 457-463.
- Frank, E.F. 1998.** History of the Guano Mining Industry. *Journal of Cave and Karst Studies* **60**(2): 121-125.
- Freitag, T.E., and J.I. Prosser 2003.** Community structure of ammonia-oxidizing bacteria within anoxic marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(3): 1359-1371.
- Fuchs, B.M., G. Wallner, W. Beisker, I. Schwippl, W. Ludwig, and R. Amann 1998.** Flow cytometric analysis of the in situ accessibility of *Escherichia coli* 16S rRNA for fluorescently

- labeled oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**(12): 4973-4982.
- Gazzarrini, S., L. Lejay, A. Gojon, O. Ninnemann, W.B. Frommer, and N. von Wiren 1999.** Three Functional Transporters for Constitutive, Diurnally Regulated, and Starvation-Induced Uptake of Ammonium into Arabidopsis Roots. *Plant Cell* **11**(5): 937-948.
- Gerzabek, M.H., G. Haberhauer, E. Kandeler, A. Sessitsch, and H. Kirchmann 2000.** Response of organic matter pools and enzyme activities in particle size fractions to organic amendments in a long-term field experiment. Proceedings of the Third Symposium ISMOM, Naples-Capri, Italy.
- Gibson, G. 2002.** Microarrays in ecology and evolution: a preview. *Mol. Ecol.* **11**(1): 17-24.
- Gieseke, A., U. Purkhold, M. Wagner, R. Amann, and A. Schramm 2001.** Community structure and activity dynamics of nitrifying bacteria in a phosphate-removing biofilm. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**(3): 1351-1362.
- Gilroy, S., and D.L. Jones 2000.** Through form to function: root hair development and nutrient uptake. *Trends in Plant Science* **5**(2): 56-60.
- Ginige, M.P., P. Hugenholtz, H. Daims, M. Wagner, J. Keller, and L.L. Blackall 2004.** Use of Stable-Isotope Probing, Full-Cycle rRNA Analysis, and Fluorescence In Situ Hybridization-Microautoradiography To Study a Methanol-Fed Denitrifying Microbial Community. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**(1): 588-596.
- Good, I.J. 1953.** The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika* **40**(237-264).
- Goreau, T.W., W.A. Kaplan, S.C. Wofsy, M.B. McElroy, F.W. Valois, and S.W. Watson 1980.** Production of NO<sub>2</sub><sup>-</sup> and N<sub>2</sub>O by nitrifying bacteria at reduced concentrations of oxygen. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**: 526-532.
- Gray, N.D., and I.M. Head 2001.** Linking genetic identity and function in communities of uncultured bacteria. *Environ. Microbiol.* **3**(8): 481-492.
- Gray, N.D., R. Howarth, R.W. Pickup, J.G. Jones, and I.M. Head 2000.** Use of combined microautoradiography and fluorescence in situ hybridization to determine carbon metabolism in mixed natural communities of uncultured bacteria from the genus *Achromatium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**(10): 4518-4522.
- Gregorich, E.G., R.G. Kachanoski, and R.P. Voroney 1989.** Carbon mineralization in soil size fractions after various amounts of aggregate disruption. *Journal of Soil Science* **40**: 649-659.
- Gross, K.L., K.S. Pregitzer, and A.J. Burton 1995.** Spatial variation in nitrogen availability in three successional plant communities. *J. Ecol.* **83**: 357-367.
- Guschin, D.Y., B.K. Mobarry, D. Proudnikov, D.A. Stahl, B.E. Rittmann, and A.D. Mirzabekov 1997.** Oligonucleotide microchips as genosensors for determinative and environmental studies in microbiology. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**(6): 2397-2402.
- Harms, G., A.C. Layton, H.M. Dionisi, I.R. Gregory, V.M. Garrett, S.A. Hawkins, K.G. Robinson, and G.S. Sayler 2003.** Real-time PCR quantification of nitrifying bacteria in a municipal wastewater treatment plant. *Environ. Sci. Technol.* **37**(2): 343-351.
- Harms, H., H.-P. Koops, H. Martiny, and W. Wullenweber 1981.** D-ribulose-1,5-biphosphate carboxylase and polyhedral inclusions in *Nitrosomonas* sp. *Arch. Microbiol.* **128**: 280-281.
- Hassink, J., L.A. Bouman, K.B. Zwart, J. Bloem, and L. Brussaard 1993a.** Relationships between soil texture, physical protection of organic matter, soil biota, and C and N mineralization in grassland soils. *Geoderma* **57**: 105-128.
- Hassink, J., L.A. Bouwman, K.B. Zwart, and L. Brussaard 1993b.** Relationships between habitable pore space, soil biota and mineralization rates in grassland soils. *Soil Biol. Biochem.* **25**: 47-55.
- Hastings, R.C., C. Butler, I. Singleton, J.R. Saunders, and A.J. McCarthy 2000.** Analysis of ammonia-oxidizing bacteria populations in acid forest soil during conditions of moisture limitation. *Lett. Appl. Microbiol.* **30**(1): 14-18.
- Hastings, R.C., M.T. Ceccherini, N. Miclaus, J.R. Saunders, M. Bazzicalupo, and A.J. McCarthy 1997.** Direct molecular biological analysis of ammonia oxidising bacteria populations in cultivated soil plots treated with swine manure. *FEMS Microbiol. Ecol.* **23**: 45-54.
- Hastings, R.C., J.R. Saunders, G.H. Hall, R.W. Pickup, and A.J. McCarthy 1998.** Application of molecular biological techniques to a seasonal study of ammonia oxidation in a eutrophic freshwater lake. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**(10): 3674-3682.
- Hattori, T. 1988.** Soil aggregates as habitats of microorganisms. *Rep. Inst. Agric. Res. Tohoku Univ.* **37**: 23-36.

- Head, I.M., W.D. Hiorns, T.M. Embley, A.J. McCarthy, and J.R. Saunders 1993.** The phylogeny of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria as determined by analysis of 16S ribosomal RNA gene sequences. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 1147-1153.
- Head, I.M., J.R. Saunders, and R.W. Pickup 1998.** Microbial evolution, diversity, and ecology: A decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microb. Ecol.* **35**: 1-21.
- Heilenz, S. 1994.** Eine Führung durch das Liebig Museum in Gießen. Gießen, Verlag Liebig-Gesellschaft.
- Hermansson, A., and P.-E. Lindgren 2001.** Quantification of Ammonia-Oxidizing Bacteria in Arable Soil by Real-Time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**(2): 972-976.
- Hiorns, W.D., R.C. Hastings, I.M. Head, A.J. McCarthy, J.R. Saunders, R.W. Pickup, and G.H. Hall 1995.** Amplification of 16S ribosomal RNA genes of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria demonstrates the ubiquity of nitrosospiras in the environment. *Microbiology* **141**(Pt 11): 2793-2800.
- Hollibaugh, J.T., N. Bano, and H.W. Ducklow 2002.** Widespread distribution in polar oceans of a 16S rRNA gene sequence with affinity to *Nitrosospira*-like ammonia-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 1478-1484.
- Holmes, A.J., P. Roslev, I.R. McDonald, N. Iversen, K. Henriksen, and J.C. Murrell 1999.** Characterization of methanotrophic bacterial populations in soils showing atmospheric methane uptake. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(8): 3312-3318.
- Hooper, A.B. 1968.** A nitrite-reducing enzyme from *Nitrosomonas europaea*. Preliminary characterization with hydroxylamine as electron donor. *Biochim. Biophys. Acta* **162**: 49-65.
- Hooper, A.B. 1969.** Lag phase of ammonia oxidation of resting cells of *Nitrosomonas europaea*. *J. Bacteriol.* **97**: 968-969.
- Horz, H.P., J.H. Rotthauwe, T. Lukow, and W. Liesack 2000.** Identification of major subgroups of ammonia-oxidizing bacteria in environmental samples by T-RFLP analysis of *amoA* PCR products. *J. Microbiol. Methods* **39**(3): 197-204.
- Hovanec, T.A., and E.F. DeLong 1996.** Comparative analysis of nitrifying bacteria associated with freshwater and marine aquaria. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**(8): 2888-2896.
- Hugenholtz, P., B.M. Goebel, and N.R. Pace 1998.** Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.* **180**(18): 4765-4774.
- Inbar, Y., Y. Hadar, and Y. Chen 1993.** Recycling of cattle manure: the composting process and characterization of maturity. *J. Environ. Qual.* **22**: 857-863.
- Ivanova, I.A., J.R. Stephen, Y.J. Chang, J. Bruggemann, P.E. Long, J.P. McKinley, G.A. Kowalchuk, D.C. White, and S.J. Macnaughton 2000.** A survey of 16S rRNA and *amoA* genes related to autotrophic ammonia-oxidizing bacteria of the beta-subdivision of the class *Proteobacteria* in contaminated groundwater. *Can. J. Microbiol.* **46**: 1012-1020.
- Jackson, A., and J. Pardue 1999.** Quantifying the mineralization of contaminants using stable carbon isotope ratios. *Org. Geochem.* **30**: 787-792.
- Jetten, M.S., O. Sliemers, M. Kuypers, T. Dalsgaard, L. van Niftrik, I. Cirpus, K. van de Pas-Schoonen, G. Lavik, B. Thamdrup, D. Le Paslier, H.J. Op den Camp, S. Hulth, L.P. Nielsen, W. Abma, K. Third, P. Engstrom, J.G. Kuenen, B.B. Jorgensen, D.E. Canfield, J.S. Sinninghe Damste, N.P. Revsbech, J. Fuerst, J. Weissenbach, M. Wagner, I. Schmidt, M. Schmid, and M. Strous 2003.** Anaerobic ammonium oxidation by marine and freshwater planctomycete-like bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63**(2): 107-114.
- Jetten, M.S., M. Wagner, J. Fuerst, M. van Loosdrecht, G. Kuenen, and M. Strous 2001.** Microbiology and application of the anaerobic ammonium oxidation ('anammox') process. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**(3): 283-288.
- Jiang, Q.Q., and L.R. Bakken 1999a.** Comparison of *Nitrosospira* strains isolated from terrestrial environments. *FEMS Microbiol. Ecol.* **30**(2): 171-186.
- Jiang, Q.-Q., and L.R. Bakken 1999b.** Nitrous Oxide Production and Methane Oxidation by Different Ammonia-Oxidizing Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(6): 2679-2684.
- Joeteur Monrozier, L., J.N. Ladd, A.W. Fitzpatrick, R.C. Foster, and M. Raupach 1991.** Components and microbial biomass content of size fractions in soils of contrasting aggregation. *Geoderma* **49**: 37-62.
- Johsen, A.R., A. Winding, U. Karlson, and P. Roslev 2002.** Linking of microorganisms to phenanthrene metabolism in soil by analysis of <sup>13</sup>C-labeled cell lipids. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**(12): 6106-6113.

- Jukes, T.H., and C.R. Cantor 1969.** Evolution of protein molecules. *Mammalian Protein Metabolism*. H.N. Munro. New York, Academic Press: 21-132.
- Juretschko, S., A. Loy, A. Lehner, and M. Wagner 2002.** The microbial community composition of a nitrifying-denitrifying activated sludge from an industrial sewage treatment plant analyzed by the full-cycle rRNA approach. *Syst. Appl. Microbiol.* **25**: 84-99.
- Juretschko, S., G. Timmermann, M. Schmid, K.H. Schleifer, A. Pommerening-Röser, H.-P. Koops, and M. Wagner 1998.** Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**(8): 3042-3051.
- Kanazawa, S., and Z. Filip 1986.** Distribution of microorganisms, total biomass, and enzyme activities in different particles of brown soil. *Microb. Ecol.* **12**: 205-215.
- Kandeler, E., M. Stemmer, and E.-M. Klimanek 1999.** Response of soil microbial biomass, urease and xylanase within particle size fractions to long-term soil management. *Soil Biol. Biochem.* **31**(2): 261-273.
- Kandeler, E., D. Tschirko, K.D. Bruce, M. Stemmer, P.J. Hobbs, R.D. Bardgett, and W. Amelung 2000.** Structure and function of the soil microbial community in microhabitats of a heavy metal polluted soil. *Biol. Fert. Soils* **32**: 390-400.
- Kane, M.D., L.K. Poulsen, and D.A. Stahl 1993.** Monitoring the enrichment and isolation of sulfate-reducing bacteria by using oligonucleotide hybridization probes designed from environmentally derived 16S rRNA sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**(3): 682-686.
- Kerkhof, L., and P. Kemp 1999.** Small ribosomal RNA content in marine Proteobacteria during non-steady-state growth. *FEMS Microbiol. Ecol.* **30**(3): 253-260.
- Kiefer, D.M. 2001.** Capturing Nitrogen Out of the Air. *Today's Chemist at Work* by American Chemical Society.
- Klein, M., M. Friedrich, A.J. Roger, P. Hugenholtz, S. Fishbain, H. Abicht, L.L. Blackall, D.A. Stahl, and M. Wagner 2001.** Multiple Lateral Transfers of Dissimilatory Sulfite Reductase Genes between Major Lineages of Sulfate-Reducing Prokaryotes. *J. Bacteriol.* **183**(20): 6028-6035.
- Knief, C., A. Lipski, and P.F. Dunfield 2003.** Diversity and Activity of Methanotrophic Bacteria in Different Upland Soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(11): 6703-6714.
- Knowles, R. 1982.** Denitrification. *Microbiol. Rev.* **46**(1): 43-70.
- Kohut, A. 1904.** Justus von Liebig. Sein Leben und Wirken. Gießen, Emil Roth Verlag.
- Koizumi, Y., J.J. Kelly, T. Nakagawa, H. Urakawa, S. El-Fantroussi, S. Al-Muzaini, M. Fukui, Y. Urushigawa, and D.A. Stahl 2002.** Parallel characterization of anaerobic toluene- and ethylbenzene- degrading microbial consortia by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis, RNA-DNA membrane hybridization, and DNA microarray technology. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**(7): 3215-3225.
- Koops, H.-P., B. Böttcher, U.C. Möller, A. Pommerening-Röser, and G. Stehr 1990.** Description of a new species of *Nitrosococcus*. *Arch. Microbiol.* **154**: 244-248.
- Koops, H.-P., B. Böttcher, U.C. Möller, A. Pommerening-Röser, and G. Stehr 1991.** Classification of eight new species of ammonia-oxidizing bacteria: *Nitrosomonas communis* sp. nov., *Nitrosomonas ureae* sp. nov., *Nitrosomonas aestuarii* sp. nov., *Nitrosomonas marina* sp. nov., *Nitrosomonas nitrosa* sp. nov., *Nitrosomonas eutropha* sp. nov., *Nitrosomonas oligotropha* sp. nov., and *Nitrosomonas halophila* sp. nov. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 1689-1699.
- Koops, H.P., and H. Harms 1985.** Deoxyribonucleic acid homologies among 96 strains of ammonia-oxidizing bacteria. *Arch. Microbiol.* **141**(3): 214-218.
- Koops, H.-P., H. Harms, and H. Wehrmann 1976.** Isolation of a moderate halophilic ammonia-oxidizing bacterium, *Nitrosococcus mobilis* nov. sp. *Arch. Microbiol.* **10**: 277-282.
- Koops, H.-P., and A. Pommerening-Röser 2001.** Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species. *FEMS Microbiol. Ecol.* **37**: 1-9.
- Koops, H.-P., U. Purkhold, A. Pommerening-Röser, G. Timmermann, and M. Wagner 2003.** The lithoautotrophic ammonia-oxidizing bacteria. *The Prokaryotes. An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*. S.F. M. Dworkin, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, and E. Stackebrandt. New York, Springer Verlag.

- Kowalchuk, G.A., Z.S. Naoumenko, P.J.L. Derikx, A. Felske, J.R. Stephen, and I.A. Arkhipchenko 1999.** Molecular Analysis of Ammonia-Oxidizing Bacteria of the beta Subdivision of the Class Proteobacteria in Compost and Composted Materials. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(2): 396-403.
- Kowalchuk, G.A., Z.S. Naoumenko, P.J.L. Derikx, A. Felske, J.R. Stephen, and H.J. Laanbroek 1998.** Community analysis of ammonia-oxidising bacteria, in relation to oxygen availability in soils and root-oxygenated sediments, using PCR, DGGE and oligonucleotide probe hybridisation. *FEMS Microbiol. Ecol.* **27**: 339-350.
- Kowalchuk, G.A., and J.R. Stephen 2001.** Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**: 485-529.
- Kowalchuk, G.A., J.R. Stephen, W. De Boer, J.I. Prosser, T.M. Embley, and J.W. Woldendorp 1997.** Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class *Proteobacteria* in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1489-1497.
- Kowalchuk, G.A., A.W. Stienstra, G.H. Heilig, J.R. Stephen, and J.W. Woldendorp 2000a.** Changes in the community structure of ammonia-oxidizing bacteria during secondary succession of calcareous grasslands. *Environ. Microbiol.* **2**: 99-110.
- Kowalchuk, G.A., A.W. Stienstra, G.H. Heilig, J.R. Stephen, and J.W. Woldendorp 2000b.** Molecular analysis of ammonia-oxidising bacteria in soil of successional grasslands of the Drentsche A (The Netherlands). *FEMS Microbiol. Ecol.* **31**: 207-215.
- Krogulska, B., and R. Mycielski 1979.** Removal of nitrogen from industrial wastewaters by three-step nitrification and denitrification. *Acta Microbiol. Pol.* **28**(4): 301-309.
- Kuypers, M.M., A.O. Slikers, G. Lavik, M. Schmid, B.B. Jorgensen, J.G. Kuenen, J.S. Sinninghe Damste, M. Strous, and M.S. Jetten 2003.** Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea. *Nature* **422**(6932): 608-611.
- Ladd, J.N., M. Van Gestel, L. Jocteur Monrozier, and M. Amato 1996.** Distribution of organic  $^{14}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  in particle-size fractions of soils incubated with  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ -labelled glucose/ $\text{NH}_4$ , and legume and wheat straw residues. *Soil Biol. Biochem.* **28**(7): 893-905.
- Lauter, F.-R., O. Ninnemann, M. Bucher, J.W. Riesmeier, and W.B. Frommer 1996.** Preferential expression of an ammonium transporter and of two putative nitrate transporters in root hairs of tomato. *PNAS* **93**(15): 8139-8144.
- Laverman, A.M., A.G. Speksnijder, M. Braster, G.A. Kowalchuk, H.A. Verhoef, and V.V. H.W. 2001.** Spatiotemporal Stability of an Ammonia-Oxidizing Community in a Nitrogen-Saturated Forest Soil. *Microb. Ecol.* **42**(1): 35-45.
- Lebedeva, E.V., N.N. Lialikova, and I. Bugel'skii 1978.** Participation of nitrifying bacteria in the disintegration of serpentinous ultrabasic rock. *Mikrobiologiya* **47**(6): 1101-1107.
- Lee, N., P.H. Nielsen, K.H. Andreasen, S. Juretschko, J.L. Nielsen, K.-H. Schleifer, and M. Wagner 1999.** Combination of fluorescent in situ hybridization and microautoradiography - a new tool for structure-function analyses in microbial ecology. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(3): 1289-1297.
- Liebig von, J. 1840.** Die Chemie in ihrer Anwendung auf Agricultur und Physiologie. Braunschweig, Friedrich Vieweg Verlag.
- Liu, W.T., A.D. Mirzabekov, and D.A. Stahl 2001.** Optimization of an oligonucleotide microchip for microbial identification studies: a non-equilibrium dissociation approach. *Environ. Microbiol.* **3**(10): 619-629.
- Loy, A., M. Horn, and M. Wagner 2003.** probeBase: an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Nucleic Acids Res.* **31**(1): 514-516.
- Loy, A., A. Lehner, N. Lee, J. Adamczyk, H. Meier, J. Ernst, K.-H. Schleifer, and M. Wagner 2002.** Oligonucleotide microarray for 16S rRNA gene-based detection of all recognized lineages of sulfate-reducing prokaryotes in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**(10): 5064-5081.
- Loy, A., C. Schulz, S. Lücker, A. Schöpfer-Wendels, K. Stoecker, C. Baranyi, A. Lehner, and M. Wagner 2004.** 16S rRNA gene-based oligonucleotide microarray for environmental monitoring of the betaproteobacterial order *Rhodocyclales*. *Appl. Environ. Microbiol.* **in press**.
- Ludwig, W., O. Strunk, S. Klugbauer, N. Klugbauer, M. Weizenegger, J. Neumaier, M. Bachleitner, and K.H. Schleifer 1998.** Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. *Electrophoresis* **19**(4): 554-568.
- Lueders, T., and M.W. Friedrich 2003.** Evaluation of PCR amplification bias by terminal

restriction fragment length polymorphism analysis of small-subunit rRNA and *mcrA* genes by using defined template mixtures of methanogenic pure cultures and soil DNA extracts. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(1): 320-326.

**Manefield, M., A.S. Whiteley, R.I. Griffiths, and M.J. Bailey 2002a.** RNA stable isotope probing, a novel means of linking microbial community function to phylogeny. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**(11): 5367-5373.

**Manefield, M., A.S. Whiteley, N. Ostle, P. Ineson, and M.J. Bailey 2002b.** Technical considerations for RNA-based stable isotope probing: an approach to associating microbial diversity with microbial community function. *Rapid Commun. Mass. Sp.* **16**(23): 2179-2183.

**Marrs, R.H. 1993.** Soil fertility and nature conservation in Europe: theoretical considerations and practical management solutions. *Adv. Ecol. Res. M. Begon and A.H. Fitter. London, Academic Press.* **24**: 242-292.

**Marschner, H. 1995.** The soil-root interface (rhizosphere) in relation to mineral nutrition. *Mineral Nutrition of Higher Plants. London, UK, Academic Press:* 537-595.

**Martinez-Romero, E. 2003.** Dinitrogen-Fixing Prokaryotes. *The Prokaryotes. An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community. S.F. M. Dworkin, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, and E. Stackebrandt. New York, Springer Verlag.*

**Maskos, U., and E.M. Southern 1992.** Parallel analysis of oligodeoxyribonucleotide (oligonucleotide) interactions. I. Analysis of factors influencing oligonucleotide duplex formation. *Nucleic Acids Res.* **20**(7): 1675-1678.

**McCaig, A.E., T.M. Embley, and J.I. Prosser 1994.** Molecular analysis of enrichment cultures of marine ammonia oxidisers. *FEMS Microbiol. Lett.* **120**: 363-367.

**McCaig, A.E., C.J. Phillips, J.R. Stephen, G.A. Kowalchuk, S.M. Harvey, R.A. Herbert, T.M. Embley, and J.I. Prosser 1999.** Nitrogen cycling and community structure of proteobacterial beta-subgroup ammonia-oxidizing bacteria within polluted marine fish farm sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 213-220.

**Meincke, M., E. Kreig, and E. Bock 1989.** *Nitrosovibrio* spp., the dominant ammoniaoxidizing bacteria in building stones. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 2108-2110.

**Mendum, T.A., R.E. Sockett, and P.R. Hirsch 1999.** Use of molecular and isotopic techniques to monitor the response of autotrophic ammonia-oxidizing populations of the beta subdivision of the class *Proteobacteria* in arable soils to nitrogen fertilizer. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(9): 4155-4162.

**Merbach, W., and M. Körschens 1999.** Dauerdüngungsversuche als Grundlage für nachhaltige Landnutzung und Quantifizierung von Stoffkreisläufen. *International symposium: The value of long-term field experiments, Leipzig-Halle.*

**Mintie, A.T., R.S. Heichen, K. Cromack, Jr., D.D. Myrold, and P.J. Bottomley 2003.** Ammonia-Oxidizing Bacteria along Meadow-to-Forest Transects in the Oregon Cascade Mountains. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(6): 3129-3136.

**Mobarry, B.K., M. Wagner, V. Urbain, B.E. Rittmann, and D.A. Stahl 1996.** Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria [published erratum appears in *Appl Environ Microbiol* 1997 Feb;63(2):815]. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**(6): 2156-2162.

**Moebius, F. 1930.** Handwörterbuch des Kaufmanns. In: *Lexikon für Handel und Industrie. Hamburg, Hanseatische.* **1**: 696f.

**Morgenroth, E., A. Obermayer, E. Arnold, A. Brühl, M. Wagner, and P.A. Wilderer 2000.** Effect of long-term idle periods on the performance of sequencing batch reactors. *Water Sci. Technol.* **41**(1): 105-113.

**Morris, S.A., S. Radajewski, T.W. Willison, and J.C. Murrell 2002.** Identification of the functionally active methanotroph population in a peat soil microcosm by stable-isotope probing. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**(3): 1446-1453.

**Muyzer, G., E.C. de Waal, and A.G. Uitterlinden 1993.** Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**(3): 695-700.

**Nicolaisen, M.H., and N.B. Ramsing 2002.** Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) approaches to study the diversity of ammonia-oxidizing bacteria. *J. Microbiol. Methods* **50**(2): 189-203.

**Nielsen, A.T., W.T. Liu, C. Filipe, L. Grady, S. Molin, and D.A. Stahl 1999.** Identification of a novel group of bacteria from a deteriorated

biological phosphorus removal reactor. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(3): 1251-1258.

**Nielsen, J.L., D. Christensen, M. Kloppenborg, and P.H. Nielsen 2003.** Quantification of cell-specific substrate uptake by probe-defined bacteria under in situ conditions by microautoradiography and fluorescence in situ hybridization. *Environ. Microbiol.* **5**(3): 202–211.

**Nielsen, J.L., S. Juretschko, M. Wagner, and P.H. Nielsen 2002.** Abundance and phylogenetic affiliation of iron reducers in activated sludge as assessed by fluorescence in situ hybridization and microautoradiography. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**(9): 4629-4636.

**Nogueira, R., L.F. Melo, U. Purkhold, S. Wuertz, and M. Wagner 2002.** Nitrifying and heterotrophic population dynamics in biofilm reactors: effects of hydraulic retention time and the presence of organic carbon. *Water Res.* **36**(2): 469-481.

**Nold, S.C., J. Zhou, A.H. Devol, and J.M. Tiedje 2000.** Pacific Northwest marine sediments contain ammonia-oxidizing bacteria in the beta subdivision of the *Proteobacteria*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 4532-4535.

**Northrop, D.B. 1981.** The expression of isotope effects on enzyme-catalyzed reactions. *Annu. Rev. Biochem.* **50**: 103-131.

**Oda, Y., S. Slagman, W.G. Meijer, L.J. Forney, and J.C. Gottschal 2000.** Influence of growth rate and starvation on fluorescent in situ hybridization of *Rhodospseudomonas palustris*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **32**(3): 205-213.

**Okabe, S., H. Satoh, and Y. Watanabe 1999.** *In situ* analysis of nitrifying biofilms as determined by *in situ* hybridization and the use of microelectrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(7): 3182-3191.

**Okano, Y., K.R. Hristova, C.M. Leutenegger, L.E. Jackson, R.F. Denison, B. Gebreyesus, D. Lebauer, and K.M. Scow 2004.** Application of Real-Time PCR To Study Effects of Ammonium on Population Size of Ammonia-Oxidizing Bacteria in Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**(2): 1008-1016.

**Olf, H., and J.P. Bakker 1991.** Long-term dynamics of standing crop and species composition after cessation of fertiliser application to mown grassland. *J. Appl. Ecol.* **28**: 1040-1052.

**Olsen, G.J., H. Matsuda, R. Hagstrom, and R. Overbeek 1994.** fastDNAm1: A tool for construction of phylogenetic trees of DNA sequences using maximum likelihood. *Comput. Appl. Biosci.* **10**: 41-48.

**Ouverney, C.C., and J.A. Fuhrman 1999.** Combined microautoradiography-16S rRNA probe technique for determination of radioisotope uptake by specific microbial cell types in situ. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(4): 1746-1752.

**Oved, T., A. Shaviv, T. Goldrath, R.T. Mandelbaum, and D. Minz 2001.** Influence of effluent irrigation on community composition and function of ammonia-oxidizing bacteria in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 3426-3433.

**Painter, H.A. 1986.** Nitrification in the treatment of sewage and waste waters. *Nitrification*. J.I. Prosser. Oxford, UK, IRL Press: 185-211.

**Peplies, J., F.O. Glockner, and R. Amann 2003.** Optimization strategies for DNA microarray-based detection of bacteria with 16S rRNA-targeting oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(3): 1397-1407.

**Phillips, C.J., D. Harris, S.L. Dollhopf, K.L. Gross, J.I. Prosser, and E.A. Paul 2000.** Effects of agronomic treatments on structure and function of ammonia-oxidizing communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 5410-5408.

**Phillips, C.J., Z. Smith, T.M. Embley, and J.I. Prosser 1999.** Phylogenetic differences between particle-associated and planktonic ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class *Proteobacteria* in the Northwestern Mediterranean Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 779-786.

**Poll, C., A. Thiede, N. Werbter, A. Sessitsch, and E. Kandeler 2003.** Micro-scale distribution of microorganisms and microbial enzyme activities in a soil with long-term organic amendment. *Eur. J. Soil Sci.* **54**(4): 715-724.

**Polz, M.F., and C.M. Cavanaugh 1998.** Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**(10): 3724-3730.

**Pommerening-Röser, A., G. Rath, and H.-P. Koops 1996.** Phylogenetic diversity within the genus *Nitrosomonas*. *Syst. Appl. Microbiol.* **19**: 344-351.

**Poughon, L., C.-G. Dussap, and J.-B. Gros 2001.** Energy model and metabolic flux analysis for autotrophic nitrifiers. *Biotechnol. Bioeng.* **72**(4): 416 - 433.

**Poulsen, L.K., G. Ballard, and D.A. Stahl 1993.** Use of rRNA fluorescence in situ hybridization for measuring the activity of single cells in young and established biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**(5): 1354-1360.

- Powell, S.J., and J.I. Prosser 1991.** Protection of *Nitrosomonas europaea* colonizing clay minerals from inhibition by nitrapyrin. *J. Gen. Microbiol.* **137**(8): 1923-1929.
- Prosser, J.I. 1989.** Autotrophic nitrification in bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* **30**: 125-181.
- Prosser, J.I., and T. Martin Embley 2002.** Cultivation-based and molecular approaches to characterisation of terrestrial and aquatic nitrifiers. *Antonie van Leeuwenhoek* **81**(1-4): 165-179.
- Purkhold, U. 2003.** Untersuchungen zur Phylogenie und Verbreitung Ammoniak oxidierender Bakterien. Technische Universität München.
- Purkhold, U., A. Pommerening-Roser, S. Juretschko, M.C. Schmid, H.-P. Koops, and M. Wagner 2000.** Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and *amoA* sequence analysis: implications for molecular diversity surveys. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 5368-5382.
- Purkhold, U., M. Wagner, G. Timmermann, A. Pommerening-Roser, and H.-P. Koops 2003.** 16S rRNA and *amoA*-based phylogeny of 12 novel betaproteobacterial ammonia-oxidizing isolates: extension of the dataset and proposal of a new lineage within the nitrosomonads. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**(5): 1485-1494.
- Radajewski, S., P. Ineson, N.R. Parekh, and J.C. Murrell 2000.** Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature* **403**(6770): 646-649.
- Radajewski, S., G. Webster, D.S. Reay, S.A. Morris, P. Ineson, D.B. Nedwell, J.I. Prosser, and J.C. Murrell 2002.** Identification of active methylotroph populations in an acidic forest soil by stable-isotope probing. *Microbiology* **148**(8): 2331-2342.
- Radeva, G., K. Flemming, and S. Selenska-Pobell 1999.** Molecular analysis of bacterial populations in ground water pollutes with heavy metals. Annual report, Institute of Biochemistry. G. Bernhard: 57.
- Ranjard, L., F. Poly, J. Combrisson, A. Richaume, F. Gourbiere, and e. al. 2000.** Heterogeneous cell density and genetic structure of bacterial pools associated with various soil microenvironments as determined by enumeration and DNA fingerprinting approach (RISA). *Microb. Ecol.* **39**: 263-272.
- Ranjard, L., and A. Richaume 2001.** Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil. *Res. Microbiol.* **152**(8): 707-716.
- Rappe, M.S., and S.J. Giovannoni 2003.** The uncultured microbial majority. *Ann. Revi. Microbiol.* **57**(1): 369-394.
- Rath, G. 1996.** Entwicklung eines Nachweissystems zur *in situ*-Analyse nitrifizierender Bakterienpopulationen auf der Basis spezifischer 16S rRNA-Gensequenzen. Universität Hamburg.
- Regan, J.M., G.W. Harrington, and D.R. Noguera 2002.** Ammonia- and nitrite-oxidizing bacterial communities in a pilot-scale chloraminated drinking water distribution system. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 73-81.
- Remde, A., and R. Conrad 1990.** Production of nitric oxide by *Nitrosomonas europaea* by reduction of nitrite. *Arch. Microbiol.* **154**: 187-191.
- Reyes-Lopez, M.A., A. Mendez-Tenorio, R. Maldonado-Rodriguez, M.J. Doktycz, J.T. Fleming, and K.L. Beattie 2003.** Fingerprinting of prokaryotic 16S rRNA genes using oligodeoxyribonucleotide microarrays and virtual hybridization. *Nucleic Acids Res.* **31**(2): 779-789.
- Romanenko, V.I. 1964.** Heterotrophic assimilation of CO<sub>2</sub> by bacterial flora of water. *Microbiology* **33**: 610-614.
- Roslev, P., and N. Iversen 1999.** Radioactive fingerprinting of microorganisms that oxidize atmospheric methane in different soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(9): 4064-4070.
- Roslev, P., P.L. Madsen, J.B. Thyme, and K. Henriksen 1998.** Degradation of phthalate and Di-(2-Ethylhexyl)phthalate by indigenous and inoculated microorganisms in sludge-amended soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**(12): 4711-4719.
- Rotthauwe, J.H., K.P. Witzel, and W. Liesack 1997.** The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**(12): 4704-4712.
- Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis, and H.A. Ehrlich 1988.** Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.
- Sakano, Y., K.D. Pickering, P.F. Strom, and 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**: 2285-2293.

- Sambrook, J., and D.W. Russell 2001.** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. NY, Cold Spring Harbor, Laboratory Press: 6.51-56.52, 10.35, 10.38.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson 1977.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**(12): 5463-5467.
- Schena, M., D. Shalon, R. Heller, A. Chai, P.O. Brown, and R.W. Davis 1996.** Parallel human genome analysis: Microarray-based expression monitoring of 1000 genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**(20): 10614-10619.
- Schleifer, K.-H. 2004.** Microbial diversity: facts, problems and prospects. Syst. Appl. Microbiol. **27**(1): 3-9.
- Schmid, M., S. Schmitz-Esser, M. Jetten, and M. Wagner 2001.** 16S-23S rDNA intergenic spacer and 23S rDNA of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria: implications for phylogeny and *in situ* detection. Environ. Microbiol. **3**: 450-459.
- Schmid, M., U. Twachtmann, M. Klein, M. Strous, S. Juretschko, M. Jetten, J.W. Metzger, K.-H. Schleifer, and M. Wagner 2000.** Molecular evidence for a genus-level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation. Syst. Appl. Microbiol. **23**: 93-106.
- Schmid, M., K. Walsh, R. Webb, W.I. Rijpstra, K. van de Pas-Schoonen, M.J. Verbruggen, T. Hill, B. Moffett, J. Fuerst, S. Schouten, J.S. Damste, J. Harris, P. Shaw, M. Jetten, and M. Strous 2003.** Candidatus "Scalindua brodae", sp. nov., Candidatus "Scalindua wagneri", sp. nov., two new species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. Syst Appl Microbiol **26**(4): 529-538.
- Schmidt, E.L. 1982.** Nitrification in soil. Nitrogen in agricultural soils. F.J. Stevenson. Madison, WI: 253-288.
- Schmidt, I., and E. Bock 1997.** Anaerobic ammonia oxidation with nitrogen dioxide by *Nitrosomonas eutropha*. Arch. Microbiol. **167**: 106-111.
- Schramm, A., D. de Beer, J.C. van den Heuvel, S. Ottengraf, and R. Amann 1999.** Microscale distribution of populations and activities of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. along a macroscale gradient in a nitrifying bioreactor: quantification by *in situ* hybridization and the use of microsensors. Appl. Environ. Microbiol. **65**(8): 3690-3696.
- Schramm, A., D. De Beer, M. Wagner, and R. Amann 1998.** Identification and activities *in situ* of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. as dominant populations in a nitrifying fluidized bed reactor. Appl. Environ. Microbiol. **64**(9): 3480-3485.
- Schramm, A., L.H. Larsen, N.P. Revsbech, N.B. Ramsing, R. Amann, and K.-H. Schleifer 1996.** Structure and function of a nitrifying biofilm as determined by *in situ* hybridization and the use of microelectrodes. Appl. Environ. Microbiol. **62**(12): 4641-4647.
- Schulz, C. 2003** Diplomarbeit. Technische Universität München.
- Schwoerbel, J. 1993.** Einführung in die Limnologie. Stuttgart, Gustav Fischer Verlag.
- Sessitsch, A., A. Weilharter, M.H. Gerzabek, H. Kirchmann, and E. Kandeler 2001.** Microbial Population Structures in Soil Particle Size Fractions of a Long-Term Fertilizer Field Experiment. Appl. Environ. Microbiol. **67**(9): 4215-4224.
- Shevchenko, M.I., D.A. Mel'nichuk, and A.V. Romanenko 1979.** [Effect of carbon dioxide on the initial rate of the isocitrate and malate dehydrogenase reactions in rat liver]. Ukr. Biokhim. Zh. **51**(1): 53-55.
- Silyn-Roberts, G., and G. Lewis 2001.** *In situ* analysis of *Nitrosomonas* spp. in wastewater treatment wetland biofilms. Water Res. **35**: 2731-2739.
- Small, J., D.R. Call, F.J. Brockman, T.M. Straub, and D.P. Chandler 2001.** Direct detection of 16S rRNA in soil extracts by using oligonucleotide microarrays. Appl. Environ. Microbiol. **67**(10): 4708-4716.
- Smith, Z., A.E. McCaig, J.R. Stephen, T.M. Embley, and J.I. Prosser 2001.** Species Diversity of Uncultured and Cultured Populations of Soil and Marine Ammonia Oxidizing Bacteria. Microb. Ecol. **42**: 228-237.
- Smorzewski, W.T., and E.I. Schmidt 1991.** Numbers, activities, and diversity of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria in a freshwater, eutrophic lake sediment. Can. J. Microbiol. **37**: 828-833.
- Sorokin, D., T. Tourova, M.C. Schmid, M. Wagner, H.P. Koops, J.G. Kuenen, and M. Jetten 2001.** Isolation and properties of obligately chemolithoautotrophic and extremely alkali-tolerant ammonia-oxidizing bacteria from Mongolian soda lakes. Arch. Microbiol. **176**: 170-177.
- Southern, E., K. Mir, and M. Shchepinov 1999.** Molecular interactions on microarrays. Nat. Genet. **21**(1): 5-9.

- Speksnijder, A.G., G.A. Kowalchuk, S. De Jong, E. Kline, J.R. Stephen, and H.J. Laanbroek 2001.** Microvariation artifacts introduced by PCR and cloning of closely related 16S rRNA gene sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**(1): 469-472.
- Speksnijder, A.G., G.A. Kowalchuk, K. Roest, and H.J. Laanbroek 1998.** Recovery of a *Nitrosomonas*-like 16S rDNA sequence group from freshwater habitats. *Syst. Appl. Microbiol.* **21**: 321-330.
- Stahl, D.A., B. Flesher, H.R. Mansfield, and L. Montgomery 1988.** Use of phylogenetically based hybridization probes for studies of ruminal microbial ecology. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**(5): 1079-1084.
- Stehr, G., B. Böttcher, P. Dittberner, G. Rath, and H.P. Koops 1995a.** The ammonia-oxidizing nitrifying population of the River Elbe estuary. *FEMS Microbiol. Ecol.* **17**: 177-186.
- Stehr, G., S. Zörner, B. Böttcher, and H.-P. Koops 1995b.** Exopolymers: A ecological characteristic of a Floc-Attached, Ammonia-Oxidizing Bacterium. *Microb. Ecol.* **30**: 115-126.
- Stemmer, M., M.H. Gerzabek, and E. Kandeler 1998.** Organic matter and enzyme activity in particle-size fractions of soils obtained after low-energy sonication. *Soil Biol. Biochem.* **30**(1): 9-17.
- Stemmer, M., M.H. Gerzabek, and E. Kandeler 1999.** Invertase and xylanase activity of bulk soil and particle-size fractions during maize straw decomposition. *Soil Biol. Biochem.* **31**: 9-18.
- Stephen, J.R., Y.J. Chang, S.J. Macnaughton, G.A. Kowalchuk, K.T. Leung, C.A. Flemming, and D.C. White 1999.** Effect of toxic metals on indigenous soil beta-subgroup proteobacterium ammonia oxidizer community structure and protection against toxicity by inoculated metal-resistant bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(1): 95-101.
- Stephen, J.R., G.A. Kowalchuk, M.A.V. Bruns, A.E. McCaig, C.J. Phillips, T.M. Embley, and J.I. Prosser 1998.** Analysis of beta-subgroup proteobacterial ammonia oxidizer populations in soil by denaturing gradient gel electrophoresis analysis and hierarchical phylogenetic probing. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**(8): 2958-2965.
- Stephen, J.R., A.E. McCaig, Z. Smith, J.I. Prosser, and T.M. Embley 1996.** Molecular Diversity of Soil and Marine 16S rRNA Gene Sequences Related to  $\beta$ -Subgroup Ammonia-Oxidizing Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**(11): 4147-4154.
- Stienstra, A.W., P. Klein-Gunnewiek, and H.J. Laanbroek 1994.** Repression of nitrification in soils under a climax grassland vegetation. *FEMS Microbiol. Ecol.* **14**: 45-52.
- Stralis-Pavese, N., A. Sessitsch, A. Weilharter, T. Reichenauer, J. Riesing, J. Csontos, J.C. Murrell, and L. Bodrossy 2004.** Optimization of diagnostic microarray for application in analysing landfill methanotroph communities under different plant covers. *Environ Microbiol* **6**(4): 347-363.
- Strous, M., J.A. Fuerst, E.H.M. Kramer, S. Logemann, G. Muyzer, K.T. van de Pas-Schoonen, R.I. Webb, J.G. Kuenen, and M.S.M. Jetten 1999.** Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature* **400**: 446-449.
- Strube, W. 1988.** Justus Liebig: Eine Biographie. Beucha, Sax-Verlag.
- Strunk, O., and W. Ludwig 2001.** Arb - a software environment for sequence data.
- Stumpe, H., J. Garz, and W. Schliephake 1995.** Das Versuchsfeld der Landwirtschaftlichen Fakultät in Halle und seine Dauerversuche. *Mitteilungen der Deutschen Bodenkundlichen Gesellschaft* **77**: 375-382.
- Stumpe, H., and W. Schliephake 1995.** Anreicherung und Freisetzung von Stickstoff im Boden bei Änderung von Düngung und Anbauverhältnis (nach Ergebnissen von Dauerfeldversuchen). *Mitteilungen der Deutschen Bodenkundlichen Gesellschaft* **76**: 947-950.
- Stüven, R., M. Vollmer, and E. Bock 1992.** The impact of organic matter on NO formation by *Nitrosomonas europaea*. *Arch. Microbiol.* **158**: 439-443.
- Sutton, P.M., K.L. Murphy, and R.N. Dawson 1975.** Low-temperature biological denitrification of wastewater. *J. Water Pollut Control Fed* **47**(1): 122-134.
- Suwa, Y., T. Sumino, and K. Noto 1997.** Phylogenetic relationships of activated sludge isolates of ammonia oxidizers with different sensitivities to ammonium sulfate. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **43**: 373-379.
- Suzuki, I., U. Dular, and S.-C. Kwok 1974.** Ammonia or ammonium ion as substrate for oxidation by *Nitrosomonas* cells and extracts. *J. Bacteriol.* **120**: 556-558.
- Suzuki, M.T., and 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): 625-630.

**Tankere, S.P., D.G. Bourne, F.L. Muller, and V. Torsvik 2002.** Microenvironments and microbial community structure in sediments. *Environ. Microbiol.* **4**(2): 97-105.

**Taroncher-Oldenburg, G., E.M. Griner, C.A. Francis, and B.B. Ward 2003.** Oligonucleotide microarray for the study of functional gene diversity in the nitrogen cycle in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(2): 1159-1171.

**Teske, A., E. Alm, J.M. Regan, T. S., B.E. Rittmann, and D.A. Stahl 1994.** Evolutionary Relationships among Ammonia- and Nitrite-Oxidizing Bacteria. *J. Bacteriol.* **176**(21): 6623-6630.

**Tiedje, J.M., J. Cho, A.E. Murray, D. Treves, B. Xia, and J. Zhou 2001.** Soil Teeming with Life: New Frontiers for Soil Science. Sustainable Management of Soil Organic Matter. B.C.B. R.M. Rees, C.D. Campbell, and C.A. Watson. Wallingford, U.K., CAB International: 393-412.

**Tilman, D. 1987.** Secondary succession and the pattern of plant dominance along experimental nitrogen gradients. *Ecol. Monogr.* **57**: 189-214.

**Torsvik, V., and L. Ovreas 2002.** Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**(3): 240-245.

**Torsvik, V., R. Sorheim, and J. Goksoyr 1996.** Total bacterial diversity in soil and sediment communities: a review. *J. Indust. Microbiol.* **17**: 170-178.

**Utaaker, J.B., L. Bakken, Q.Q. Jiang, and I.F. Nes 1995.** Phylogenetic Analysis of Seven New Isolates of Ammonia-Oxidizing Bacteria Based on 16S rRNA Gene Sequences. *Syst. Appl. Microbiol.* **18**: 549-559.

**Utaaker, J.B., and I.F. Nes 1998.** A qualitative evaluation of the published oligonucleotides specific for the 16S rRNA gene sequences of the ammonia-oxidizing bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* **21**(1): 72-88.

**Van Gestel, M., R. Merckx, and K. Vlassak 1996.** Spatial distribution of microbial biomass in microaggregates of a silty-loam soil and the relation with the resistance of microorganisms to soil drying. *Soil Biol. Biochem.* **28**(4-5): 503-510.

**Vieira, M.J., A.P. Pacheco, I.A. Pinho, and L.F. Melo 2001.** The effect of clay particles on the activity of suspended autotrophic nitrifying bacteria

and on the performance of an air-lift reactor. *Environ. Technol.* **22**(2): 123-135.

**von Wintzingerode, F., U.B. Gobel, and E. Stackebrandt 1997.** Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* **21**(3): 213-229.

**von Wiren, N., F.-R. Lauter, O. Ninnemann, B. Gillissen, P. Walch-Liu, C. Engels, W. Jost, and W.B. Frommer 2000.** Differential regulation of three functional ammonium transporter genes by nitrogen in root hairs and by light in leaves of tomato. *Plant J* **21**(2): 167-175.

**Voytek, M.A., and B.B. Ward 1995.** Detection of ammonium-oxidizing bacteria of the beta-subclass of the class Proteobacteria in aquatic samples with the PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**(7): 2811.

**Wagner, M., R. Amann, P. Kämpfer, B. Assmus, A. Hartmann, P. Hutzler, N. Springer, and K.-H. Schleifer 1994a.** Identification and *in situ* detection of gram-negative filamentous bacteria in activated sludge. *Syst. Appl. Microbiol.* **17**: 405-417.

**Wagner, M., R. Amann, H. Lemmer, and K.-H. Schleifer 1993.** Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**(5): 1520-1525.

**Wagner, M., R. Erhart, W. Manz, R. Amann, H. Lemmer, D. Wedi, and K.-H. Schleifer 1994b.** Development of an rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for the genus *Acinetobacter* and its application for *in situ* monitoring in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**(3): 792-800.

**Wagner, M., and A. Loy 2002.** Bacterial community composition and function in sewage treatment systems. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**(3): 218-227.

**Wagner, M., A. Loy, R. Nogueira, U. Purkhold, N. Lee, and H. Daims 2002.** Microbial community composition and function in wastewater treatment plants. *Antonie Van Leeuwenhoek* **81**(1-4): 665-680.

**Wagner, M., G. Rath, R. Amann, H.-P. Koops, and K.-H. Schleifer 1995.** *In situ* identification of ammonia-oxidizing bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* **18**: 251-264.

**Wagner, M., G. Rath, H.-P. Koops, J. Flood, and R. Amann 1996.** *In situ* analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants. *Water Sci. Technol.* **34**(1-2): 237-244.

- Wallace, W., and D.J.D. Nicholas 1969.** The biochemistry of nitrifying microorganisms. *Biol. Rev.* **44**: 359-391.
- Wallner, G., R. Amann, and W. Beisker 1993.** Optimizing fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry* **14**(2): 136-143.
- Wang, R.F., M.L. Beggs, L.H. Robertson, and C.E. Cerniglia 2002.** Design and evaluation of oligonucleotide-microarray method for the detection of human intestinal bacteria in fecal samples. *FEMS Microbiol. Lett.* **213**(2): 175-182.
- Ward, B.B. 1996.** Nitrification and Denitrification: Probing the Nitrogen Cycle in Aquatic Environments. *Microb. Ecol.* **32**(3): 247-261.
- Ward, B.B., and A.F. Carlucci 1985.** Marine ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria: serological diversity determined by immunofluorescence in sewage plants by flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**: 194-201.
- Ward, B.B., D.P. Martino, M.C. Diaz, and S.B. Joye 2000.** Analysis of ammonia-oxidizing bacteria from hypersaline Mono Lake, California, on the basis of 16S rRNA sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 2873-2881.
- Ward, B.B., and G.D. O'Mullan 2002.** Worldwide Distribution of *Nitrosococcus oceani*, a Marine Ammonia-Oxidizing gamma-Proteobacterium, Detected by PCR and Sequencing of 16S rRNA and *amoA* Genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**(8): 4153-4157.
- Ward, B.B., M.A. Voytek, and K. Witzel 1997.** Phylogenetic Diversity of Natural Populations of Ammonia Oxidizers Investigated by Specific PCR Amplification. *Microb. Ecol.* **33**(2): 87-96.
- Warrington, R. 1878.** On Nitrification. *J. Chem. Soc.* **33**: 44-51.
- Wasserbauer, R., Z. Zadak, and J. Novotny 1998.** Nitrifying bacteria on the asbestos-cement roofs of stable buildings. *Int. Biodeterior.* **24**: 153-165.
- Watson, S.W. 1974.** *Nitrobacteraceae*. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. R.E. Buchanan and N.E. Gibbons. Baltimore, Williams & Wilkins: 450-456.
- Watson, S.W., and C.C. Remsen 1970.** Cell envelope of *Nitrosocystis oceanus*. *J. Ultrastr. Res.* **33**: 148-160.
- Wawer, C., H. Rüggeberg, G. Meyer, and G. Muyzer 1995.** A simple and rapid electrophoresis method to detect sequence variation in PCR-amplified DNA fragments. *Nucleic Acids Res.* **23**: 4928-4929.
- Webster, G., T.M. Embley, and J.I. Prosser 2002.** Grassland management regimens reduce small-scale heterogeneity and species diversity of beta-proteobacterial ammonia oxidizer populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 20-30.
- Weischedel, K., S. Kaiser, and G. Schwedt 2003.** Prüfung eines Guano-Düngers. TU Clausthal und Institut Dr. Flad.
- Whitby, C.B., G. Hall, R. Pickup, J.R. Saunders, P. Ineson, N.R. Parekh, and A. McCarthy 2001a.** <sup>13</sup>C incorporation into DNA as a means of identifying the active components of ammonia-oxidizer populations. *Lett. Appl. Microbiol.* **32**(6): 398-401.
- Whitby, C.B., J.R. Saunders, R.W. Pickup, and A.J. McCarthy 2001b.** A comparison of ammonia-oxidiser populations in eutrophic and oligotrophic basins of a large freshwater lake. *Antonie Van Leeuwenhoek* **79**: 179-188.
- Whitby, C.B., J.R. Saunders, J. Rodriguez, R.W. Pickup, and A. McCarthy 1999.** Phylogenetic differentiation of two closely related *Nitrosomonas* spp. that inhabit different sediment environments in an oligotrophic freshwater lake. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 4855-4862.
- Wilson, A.S., B.G. Hobbs, T.P. Speed, and P.E. Rakoczy 2002a.** The microarray: potential applications for ophthalmic research. *Mol. Vis.* **8**: 259-270.
- Wilson, K.H., W.J. Wilson, J.L. Radosevich, T.Z. DeSantis, V.S. Viswanathan, T.A. Kuczmarski, and G.L. Andersen 2002b.** High-density microarray of small-subunit ribosomal DNA probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**(5): 2535-2541.
- Wilson, W.J., C.L. Strout, T.Z. DeSantis, J.L. Stilwell, A.V. Carrano, and G.L. Andersen 2002c.** Sequence-specific identification of 18 pathogenic microorganisms using microarray technology. *Mol. Cell. Probes* **16**(2): 119-127.
- Winogradsky, S. 1890.** Recherches sur les organismes de la nitrification. *Ann. Inst. Pasteur* **4**: 213-331.
- Woese, C.R. 1987.** Bacterial Evolution. *Microbiol. Rev.* **51**(2): 221-271.
- Woese, C.R., O. Kandler, and M.L. Wheelis 1990.** Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and

Eucarya. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87**(12): 4576-4579.

**Woese, C.R., E. Stackebrandt, T.J. Macke, and G.E. Fox 1985.** A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa. Syst. Appl. Microbiol. **6**: 143-151.

**Woese, C.R., W.G. Weisburg, B.J. Paster, C.M. Hahn, R.S. Tanner, N.R. Krieg, H.-P. Koops, H. Harms, and E. Stackebrandt 1984.** The phylogeny of the purple bacteria: the beta subdivision. Syst. Appl. Microbiol. **5**: 327-336.

**Woldendorp, J.W., and H.J. Laanbroek 1989.** Activity of nitrifiers in relation to nitrogen nutrition of plants in natural ecosystems. Plant Soil **115**: 217-228.

**Wood, P.M. 1986.** Nitrification as a bacterial energy source. Nitrification. J.I. Prosser. Oxford, UK, IRL Press: 39-62.

**Wu, L., D.K. Thompson, G. Li, R.A. Hurt, J.M. Tiedje, and J. Zhou 2001.** Development and evaluation of functional gene arrays for detection of selected genes in the environment. Appl. Environ. Microbiol. **67**: 5780-5790.

**Ye, R.W., T. Wang, L. Bedzyk, and K.M. Croker 2001.** Applications of DNA microarrays in microbial systems. J. Microbiol. Methods **47**(3): 257-272.

**You, S.J., C.L. Hsu, S.H. Chuang, and C.F. Ouyang 2003.** Nitrification efficiency and nitrifying bacteria abundance in combined AS-RBC and A2O systems. Water Res. **37**(10): 2281-2290.

**Zart, D., and E. Bock 1998.** High rate of aerobic nitrification and denitrification by *Nitrosomonas eutropha* grown in a fermentor with complete biomass retention in the presence of gaseous NO<sub>2</sub> or NO. Arch. Microbiol. **169**(4): 282-286.

**Zehr, J.P., and B.B. Ward 2002.** Nitrogen Cycling in the Ocean: New Perspectives on Processes and Paradigms. Appl. Environ. Microbiol. **68**(3): 1015-1024.

**Zhou, J., and D.K. Thompson 2002.** Challenges in applying microarrays to environmental studies. Curr. Opin. Biotechnol. **13**(3): 204-207.

**Zumft, W.G. 1997.** Cell biology and molecular basis of denitrification. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **61**(4): 533-616.

# **G. ANHANG**

**The Isotope Array, a New Tool  
That Employs Substrate-Mediated Labeling of rRNA  
for Determination of Microbial Community Structure and Function.**

Adamczyk, J., M. Hesselsoe, N. Iversen,  
M. Horn, A. Lehner, P.H. Nielsen, M. Schlöter,  
P. Roslev, and M. Wagner

veröffentlicht in:

Applied and Environmental Microbiology **69**(11): 6875-6887 (2003).

# The Isotope Array, a New Tool That Employs Substrate-Mediated Labeling of rRNA for Determination of Microbial Community Structure and Function

Justyna Adamczyk,<sup>1</sup> Martin Hesselsoe,<sup>2</sup> Niels Iversen,<sup>2</sup> Matthias Horn,<sup>3</sup> Angelika Lehner,<sup>1</sup> Per Halkjaer Nielsen,<sup>2</sup> Michael Schloter,<sup>4</sup> Peter Roslev,<sup>2\*</sup> and Michael Wagner<sup>3</sup>

*Lehrstuhl für Mikrobiologie, Technische Universität München, D-85350 Freising,<sup>1</sup> and GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH, D-85764 Neuherberg,<sup>4</sup> Germany; Section of Environmental Engineering, Aalborg University, DK-9000 Aalborg, Denmark<sup>2</sup>; and Abteilung für Mikrobielle Ökologie, Institut für Ökologie und Naturschutz, Universität Wien, A-1090 Vienna, Austria<sup>3</sup>*

Received 7 May 2003/Accepted 14 August 2003

**A new microarray method, the isotope array approach, for identifying microorganisms which consume a <sup>14</sup>C-labeled substrate within complex microbial communities was developed. Experiments were performed with a small microarray consisting of oligonucleotide probes targeting the 16S rRNA of ammonia-oxidizing bacteria (AOB). Total RNA was extracted from a pure culture of *Nitrosomonas eutropha* grown in the presence of [<sup>14</sup>C]bicarbonate. After fluorescence labeling of the RNA and microarray hybridization, scanning of all probe spots for fluorescence and radioactivity revealed that specific signals were obtained and that the incorporation of <sup>14</sup>C into rRNA could be detected unambiguously. Subsequently, we were able to demonstrate the suitability of the isotope array approach for monitoring community composition and CO<sub>2</sub> fixation activity of AOB in two nitrifying activated-sludge samples which were incubated with [<sup>14</sup>C]bicarbonate for up to 26 h. AOB community structure in the activated-sludge samples, as predicted by the microarray hybridization pattern, was confirmed by quantitative fluorescence in situ hybridization (FISH) and comparative *amoA* sequence analyses. CO<sub>2</sub> fixation activities of the AOB populations within the complex activated-sludge communities were detectable on the microarray by <sup>14</sup>C incorporation and were confirmed independently by combining FISH and microautoradiography. AOB rRNA from activated sludge incubated with radioactive bicarbonate in the presence of allylthiourea as an inhibitor of AOB activity showed no incorporation of <sup>14</sup>C and thus was not detectable on the radioactivity scans of the microarray. These results suggest that the isotope array can be used in a PCR-independent manner to exploit the high parallelism and discriminatory power of microarrays for the direct identification of microorganisms which consume a specific substrate in the environment.**

Deciphering the structure and function of complex microbial communities is a central theme in microbial ecology. However, traditional cultivation-dependent methods are inadequate to fulfill this task because most members of microbial communities in natural and engineered systems cannot be cultured (2, 69). In contrast, the cultivation-independent 16S rRNA approach allows one to obtain more complete inventories of such microorganisms present in a particular system. If this approach is combined with quantitative gene probe techniques, such as dot blot (66) or fluorescence in situ hybridization (FISH) (14), the compositions of microbial communities can be determined accurately (27, 37, 56, 57, 61, 62). However, these techniques are very time-consuming; therefore, the number of samples for which quantitative data can be obtained is relatively limited. This limitation can be (at least partially) overcome by the inclusion of DNA microarray technology for the detection of bacterial 16S rRNA or its genes (3, 7, 23, 29, 32, 48, 64, 77). Although precise quantitative data are difficult to obtain with this format, it allows one to apply many rRNA-targeted oligonucleotide probes in parallel and is therefore ideally suited to

the selection of probes for subsequent quantitative dot blot or FISH analyses. However, only a few studies have actually applied DNA microarrays to the detection of 16S rRNA (genes) of indigenous microorganisms in environmental samples (19, 29, 32, 75, 77).

Unfortunately, 16S rRNA-based identification generally does not provide information on the physiology of the detected microorganisms. For cultured bacteria, the physiological potential can be determined in the laboratory, but the data obtained do not necessarily provide information on the actual functions of these bacteria in an ecosystem. For uncultured bacteria, for which only 16S rRNA sequence information is available, the inference of physiological traits is impossible if these microorganisms are not closely related to cultured microorganisms. Therefore, in recent years there have been considerable efforts to develop methods which allow study of the functions of microorganisms without cultivation (for a review, see reference 21). Several studies have used the cellular rRNA concentration, which can be quantified by FISH and image analyses, as a measure of the rate of growth of a given organism in the environment (28, 50). However, at least for some microorganisms, the cellular rRNA content is influenced largely not only by the actual growth rate but also by the physiological history of the microorganisms (46). Furthermore, some slowly growing chemolithoautotrophs retain a high cel-

\* Corresponding author. Mailing address: Section of Environmental Engineering, Department of Life Sciences, Aalborg University, Sohngaardsholmsvej 57, DK-9000 Aalborg, Denmark. Phone: 45 9635 8505. Fax: 45 9635 0558. E-mail: pr@bio.auc.dk.

lular rRNA content even after complete physiological inhibition (63, 71) or after starvation (39). Consequently, it is almost impossible to deduce the physiological status of an organism in its environment by measuring its cellular rRNA content.

The addition of substrates labeled with stable or radioactive isotopes to microbial communities has been applied to the identification of microorganisms which consume specific compounds in the environment. Identification can be performed by using molecular tools after the separation of labeled DNA (40, 54, 55, 76) or RNA (35, 36) from unlabeled nucleic acids. Alternatively, the incorporation of labeled substrates into polar lipid ester-linked fatty acids (6, 25, 59) or biphytanyl membrane lipids (79) has been used to monitor bacteria with specific activities in the environment, but the identification of as-yet-uncultured microorganisms generally is not possible with membrane lipids.

The recently developed combination of FISH and microautoradiography (MAR) (9, 20, 31, 47) allows one to record the substrate uptake profiles of probe-identified prokaryotes at the single-cell level under different environmental conditions. This method has found widespread application in environmental microbiology (10, 13, 42–44) and is ideally suited to monitoring the functions of selected cultured and uncultured microorganisms; however, the numbers of experiments which can be performed in parallel are limited due to the tediousness of the method.

The goal of the present study was to develop a method which allows simultaneous monitoring of the diversity and substrate incorporation of complex microbial communities by DNA microarray technology. Nitrifying activated sludge amended with radioactive bicarbonate served as a model system. After extraction and fluorescence labeling of community rRNA, the diversity and bicarbonate incorporation of ammonia-oxidizing bacteria (AOB) were measured by using a prototype DNA microarray for AOB detection.

## MATERIALS AND METHODS

**Isotope labeling of pure cultures.** A pure culture of *Nitrosomonas europaea* Nm57 (provided by H. P. Koops, University of Hamburg) was grown in liquid mineral medium (LM medium) with the following composition (per liter):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.5 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.2 g;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 20 mg;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 40 mg;  $\text{FeNaEDTA}$ , 3.8 mg; phenol red, 1  $\mu\text{g}$ ; HEPES buffer, 4.8 g; and trace element solution, 1 ml (17). The medium was adjusted to pH 7.5 with 10 M NaOH and autoclaved.  $\text{NaHCO}_3$  was subsequently added to a final concentration of 1.5 mM. Growing cultures were stirred continuously at 30°C in the dark, until phenol red turned yellow and all ammonia was oxidized to nitrite. The culture was routinely screened for contaminants by drop plating on tryptic soy agar incubated at 30°C (Becton Dickinson, Bedford, Mass.). The culture was assumed to be axenic if no growth on agar occurred after 4 days.

*N. europaea* was harvested from a late-log-phase culture (250 ml) by centrifugation ( $10,000 \times g$ , 20 min) (Centrifon T-42K; Kontron Instruments, Milan, Italy) and resuspended in 15 ml of fresh LM medium devoid of added  $\text{NaHCO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , and phenol red.  $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$  (58 mCi of C  $\text{mmol}^{-1}$ ; Amersham Life Science, Little Chalfont, United Kingdom) was added to the concentrated culture (60  $\mu\text{M}$   $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ ; 3.6  $\mu\text{Ci ml}^{-1}$ ). Immediately after this step, 2.5 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  was added, and the culture was incubated in a shaker (150 rpm) at 30°C in the dark for 48 h. Incorporation of radioactive substrate into the biomass was monitored after 48 h by filtration with cellulose filters (see below). For RNA extraction, labeled cells were harvested by centrifugation ( $10,000 \times g$ , 10 min) and resuspended in 90% RNAlater (Ambion, Austin, Tex.)–10% LM medium. According to the instructions of the manufacturer, samples in RNAlater were kept on ice for approximately 2 h, followed by incubation for 24 h at 4°C, and then were stored at  $-20^\circ\text{C}$  until RNA extraction.

**Isotope labeling of activated sludge.** Activated sludge was collected from the nitrification tanks of industrial (Oberding) and municipal (Aalborg West) wastewater treatment plants. Activated-sludge samples were kept at 5°C in the dark for no more than 3 days before isotope labeling. Before the addition of labeled bicarbonate, the concentration of bicarbonate in the sludge was minimized by centrifugation of the activated sludge ( $10,000 \times g$ , 15 min), disposal of the supernatant, and subsequent resuspension of the pellet in HEPES-buffered LM medium devoid of added  $\text{NaHCO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , and phenol red. In addition, the resuspended sludge was flushed with  $\text{CO}_2$ -free air for 1 h to remove the remaining bicarbonate, as previously suggested by Whitby et al. (76). The concentrations of bicarbonate (alkalinity) in the sludge before and after this treatment were determined by gas chromatography after acidification, as described previously by Chai et al. (8).  $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$  was added to a final concentration of approximately 1.85 mM  $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$  (107  $\mu\text{Ci ml}^{-1}$ ). Immediately after this step, 2.5 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  was added, and the amended sludge was incubated on a shaker (150 rpm) at 30°C in the dark for up to 26 h. Parallel activated-sludge samples were incubated with  $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , and 5 mg of allylthiourea  $\text{liter}^{-1}$  as a specific inhibitor of ammonia monooxygenase (5). Allylthiourea is a reversible inhibitor of ammonia monooxygenase which prevents ammonia oxidation by chelating Cu ions. The incorporation of radioactive material into activated-sludge biomass was continuously monitored after filtration of the activated sludge with cellulose filters (see below). Parallel activated-sludge samples were incubated with nonradioactive  $\text{HCO}_3^-$  and used to monitor the concentrations of  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ , and  $\text{NH}_4^+$  with color-reaction strips (Merck AG, Darmstadt, Germany) at different times.  $\text{NH}_4^+$  was continuously added to radioactive and nonradioactive samples when the concentrations decreased to values below 1 mM. After radioactive labeling, all samples were stored in RNAlater as described for pure-culture samples.

**Quantification of radioactivity incorporation.** Subsamples (10  $\mu\text{l}$ ) from radioactive incubations (pure culture or activated sludge) were harvested with a needle and syringes. The subsamples were added to approximately 10 ml of LM medium and filtered through 0.2- $\mu\text{m}$ -pore-size mixed-cellulose filters (Advantec MFS Inc., Pleasanton, Calif.). Subsequently, 5 ml of 0.1 N HCl was added to the filtration unit in order to remove inorganic carbonates. After 3 min of acidification, the HCl was removed by filtration, and the filters were transferred to scintillation vials and dissolved in 10 ml of scintillation fluid (Filter-Count; Packard, Groningen, The Netherlands). Dissolved filters were analyzed for 3 min by liquid scintillation counting (Packard 1600 TR). All samples were corrected for quenching by using external standards.

**RNA extraction.** To eliminate RNase activity, all reagents and plastic ware were treated with 0.1% (vol/vol) diethylpyrocarbonate (DEPC; Sigma, St. Louis, Mo.) for at least 3 h at 37°C and subsequently autoclaved. Reagents containing primary amino groups were not directly exposed to DEPC but were prepared with DEPC-pretreated double-distilled  $\text{H}_2\text{O}$  (dd $\text{H}_2\text{O}$ ). Total RNA was extracted from biomass by using a modified RNAwiz (Ambion) protocol. Briefly, RNAlater was removed from the samples before extraction by centrifugation ( $23,645 \times g$ , 15 min, 4°C) (Rotina 35R; Hettich, Tuttingen, Germany). The pelleted samples were resuspended in 1 ml of RNAwiz reagent in a 2-ml screw-lid tube (Sarstedt, Nürnbrecht, Germany), and the contents of one tube of lysing matrix E (containing a mixture of ceramic and silica particles) (FastDNA kit for soil; Bio 101, La Jolla, Calif.) were added. Homogenization of *N. europaea* pure-culture cells was carried out by bead beating (FastPrep120; Bio 101) for 40 s at a speed of 4.5. For activated-sludge samples, bead beating was repeated four times. After 5 min of incubation at room temperature, 0.2 ml of chloroform (Sigma) was added; after vigorous shaking, the samples were incubated for 10 min at room temperature. In the next step, phase separation was achieved by centrifugation (15 min,  $23,645 \times g$ , 4°C). The aqueous phase was transferred to a new tube and stored on ice. To increase the RNA extraction efficiency for activated-sludge samples, RNA was extracted again from the organic phase. For this purpose, 0.4 ml of RNAwiz was added to the organic sample fraction (which still contained the lysing matrix), vigorously vortexed for 1 min, heated at 65° for 10 min, vortexed again for 30 s, and chilled on ice for 5 min. Then, 0.2 ml of chloroform was added, followed by thorough shaking and incubation for 10 min at room temperature. After centrifugation (15 min,  $23,645 \times g$ , 4°C), the aqueous phase was pooled with that from the first extraction step. RNA was precipitated after the addition of 0.5 ml of water and 1 ml of isopropanol (J. T. Baker, Deventer, The Netherlands) by incubating the tubes in a dry ice-ethanol mixture for 5 min. Subsequently, RNA was pelleted by centrifugation (20 min,  $23,645 \times g$ , 4°C), washed with 75% ethanol, air dried for 3 min at 90°C, resuspended in a buffer containing 10 mM Tris and 1 mM EDTA (pH 8), and fully dissolved by heating at 90°C for 3 min. RNA from activated sludge was further purified by using an RNA purification kit according to the recommendations of the manufacturer (Qiagen, Hilden, Germany). Extracted RNA was stored in aliquots at  $-20^\circ\text{C}$ .

TABLE 1. Oligonucleotide probes used for FISH and microarray hybridization experiments<sup>a</sup>

Probe name	Probe sequence (5'-3')	Target site (positions)	Target organism(s)	Reference(s)
EUB338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	338-355	Most but not all <i>Bacteria</i>	1, 12
EUB338-II	GCAGCCACCCGTAGGTGT	338-355	<i>Planctomycetales</i>	12
EUB338-III	GCTGCCACCCGTAGGTGT	338-355	<i>Verrucomicrobiales</i>	12
Nso1225	CGCCATTGTATTACGTGTGA	1224-1243	Most but not all beta-proteobacterial AOB (30)	38
Nso190	CGATCCCCTGCTTTTCTCC	189-207	Many but not all beta-proteobacterial AOB (30)	38
Nsv443	CCGTGACCGTTTCGTTCCG	443-461	<i>Nitrosospora</i> cluster 1-3 (30)	38
Ncmob	TCCTCAGAGACTACGCGG	174-191	<i>Nitrosococcus mobilis</i> (30)	26
NEU	CCCCTCTGCTCACTCTA	651-668	Most halophilic and halotolerant nitrosomonads (30)	71
Cte	TTCCATCCCCCTCTGCCG	659-676	Competitor probe for NEU; <i>Comamonas</i> spp., <i>Acidovorax</i> spp., <i>Hydrogenophaga</i> spp., <i>Aquaspirillum</i> spp. (30)	71
6a192	CTTTCGATCCCCCTACTTTCC	192-212	<i>Nitrosomonas oligotropha</i> lineage	52
c6a192	CTTTCGATCCCCGACTTTCC	192-212	Competitor probe for 6a192; <i>Nitrosomonas eutropha</i>	52
NONEUB	ACTCCTACGGGAGGCAGC			74
NONSENSE	AGAGAGAGAGAGAGAGAG			32
CONT	AGGAAGGAAGGAAGGAAG		Control oligonucleotide	32
CONT-COMP	CTTCCTTCCTTCCTTCCT		Complementary to CONT	32

<sup>a</sup> More detailed information for each probe can be obtained at the oligonucleotide online resource probeBase (33). All but CONT and CONT-COMP were used for FISH. All but EUB338-II, EUB338-III, and Cte were used for microarray analysis.

after precipitation with 0.1 volume of 5 M NaCl and 3 volumes of 96% ethanol (J. T. Baker).

The amount and purity of extracted RNA were determined spectrophotometrically (SmartSpec 3000; Bio-Rad, Hercules, Calif.) at 260 and 280 nm and by gel electrophoresis (0.9% SeaPlaque GTG agarose; BioWhittaker Molecular Applications, Rockland, Maine) in a buffer containing 40 mM Tris, 10 mM sodium acetate, and 1 mM EDTA (pH 8.0).

**Quantification of radioactivity in RNA.** The incorporated radioactivity in rRNA was determined by excising the 16S and 23S rRNA bands from the agarose gel. The RNA-containing gel pieces were melted at 95°C in 1 ml of ddH<sub>2</sub>O, mixed with scintillation fluid (InstaGel-Plus; Packard), and measured for 11 min in a liquid scintillation counter (LS-1800; Beckman Instruments, Inc., Pasadena, Calif.).

**Probes and microarray processing.** A prototype array with eight probes was applied for the detection of AOB (Table 1). All oligonucleotide probes were purchased from MWG Biotech (Ebersberg, Germany). Probes were resuspended in spotting buffer (Exiqon AS, Vedbaek, Denmark) to a final concentration of 50 pmol  $\mu\text{l}^{-1}$  and subsequently spotted onto Immobilizer MicroArray slides (Exiqon AS). Slides with two different spot diameters (125 and 500  $\mu\text{m}$ ) were manufactured by using a GMS 417 contact array spotter (Affymetrix, Santa Clara, Calif.). Additionally, manually spotted arrays (approximate diameter, 1,000  $\mu\text{m}$ ) were prepared by applying probe droplets with a pipette tip to the slide surface. Coupling of the aminated oligonucleotides to the slides was performed as proposed by the supplier (Exiqon AS).

**In vitro transcription of rRNA genes.** To obtain sufficient amounts of rRNA from several AOB which were used as reference organisms for DNA microarray evaluation, their cloned 16S rRNA genes (51) were transcribed in vitro. For this purpose, pCR2.1-TOPO (Invitrogen, Frederick, Md.) plasmids containing the respective 16S rRNA gene insert were linearized by digestion with restriction enzyme *Bam*HI (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Germany). The RNA was synthesized by using a commercially available T7 transcription kit (MBI Fermentas) containing the T7 RNA polymerase in accordance with the recommendations of the manufacturer. The DNA template was removed by DNase I digestion (Promega, Madison, Wis.) in accordance with the manufacturer's instructions. For purification of the RNA, the phenol-chloroform extraction method was used as described by Griffiths et al. (22). The correct size of the in vitro-transcribed RNA was verified by gel electrophoresis, and the RNA concentration was determined spectrophotometrically.

**Fluorescence labeling of RNA and microarray hybridization.** For RNA labeling with fluorescent dyes (Cy3 and Cy5), a CyScribe direct mRNA labeling kit (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) was used. This kit covalently labels guanine residues at the N<sub>7</sub> position and thus does not interfere with subsequent base pairing. For labeling, 0.5  $\mu\text{g}$  of precipitated RNA was pelleted by centrifugation (15 min, 23,645  $\times$  g, 4°C), washed with 70% ethanol, air dried, and resuspended in an appropriate amount of ddH<sub>2</sub>O. Labeling was carried out according to the manufacturer's recommendations. To remove the excess dye, the labeled RNA was precipitated with 0.1 volume of 5 M NaCl and 3 volumes

of 96% ethanol at -80°C on a dry ice-ethanol mixture, centrifuged (30 min, 23,645  $\times$  g, 4°C), washed with 70% ethanol, and air dried. The RNA pellet was resuspended in 30  $\mu\text{l}$  of freshly prepared hybridization buffer (6 $\times$  SSC [1 $\times$  SSC is 0.15 M NaCl plus 0.015 M sodium citrate], 5 $\times$ Denhardt's solution, 5 to 30% formamide, 0.5% sodium dodecyl sulfate, 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> [pH 8.0]), denatured by heating to 90°C for 5 min, and subsequently chilled on ice. The RNA-containing hybridization solution was transferred to the slide surface, covered with a coverslip, and inserted into a hybridization chamber (32) containing 120  $\mu\text{l}$  of hybridization buffer. Hybridization was performed overnight (18 h) at 42°C with a water bath and terminated by washing the slide for 5 min in 2 $\times$  SSC at room temperature, in ice-chilled ddH<sub>2</sub>O for 1 min, in ice-chilled 96% ethanol for 10 s, and in ice-chilled ddH<sub>2</sub>O for 10 s. It should be noted that the hybridization and wash buffers used in this study differed significantly in composition from those used by Loy et al. (32) for the detection of 16S rRNA gene fragments. The buffer composition was changed to improve signal-to-noise ratios for rRNA detection on the microarrays (data not shown).

Subsequently, the slide was air dried at room temperature in the dark. For qualitative and quantitative evaluation of fluorescence signals, a GMS 418 array scanner (Affymetrix) equipped with ImaGene 4.0 software (BioDiscovery, Inc., Los Angeles, Calif.) was used. For each spot, signal-to-noise ratios were calculated as outlined by Loy et al. (32), and hybridizations were scored positive for ratios above 2. Radioactivity signals were recorded with a  $\beta$ -Imager (BioSpace Mesure, Paris, France), and the radioactivity for each spot was quantified with  $\beta$ -Vision software (BioSpace Mesure). Cumulative fluorescence intensity values for manually applied spots were determined by using the public domain software package Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

**FISH and MAR.** The abundance of AOB in activated-sludge samples was determined by quantitative FISH with fluorescence-labeled derivatives of the respective rRNA-targeted probes by following the approach outlined by Daims et al. (14) and Schmid et al. (62). Probe NEU and probe 6a192 were used with the respective competitor probes to enhance specificity (52, 71). Probes were used as Cy3- and Cy5-labeled derivatives (Thermo Hybaid, Ulm, Germany). All probes were applied under the optimal hybridization conditions determined in the original publications. Simultaneous hybridizations with probes requiring different stringencies were performed with subsequent hybridization procedures (70).

In parallel to the isotope array approach, the incorporation of a radioactive substrate into activated-sludge microorganisms was also monitored by using the combination of FISH and MAR (31). For this purpose, activated-sludge samples were incubated with H<sup>14</sup>CO<sub>3</sub><sup>-</sup> (10  $\mu\text{Ci ml}^{-1}$ ). Nonradioactive bicarbonate was added to obtain the same total concentration of carbonate as in the samples used for the isotope array experiment (1.85 mM). The FISH-MAR procedure was carried out as described previously (31).

**amoA gene fragment-based diversity analysis of AOB.** Total genomic DNA was extracted from 0.5-ml sludge subsamples with a FastDNA spin kit for soil (Bio 101) according to the manufacturer's instructions. A 453-bp fragment (excluding primers) of the *amoA* gene was amplified from 50 ng of DNA by using

A	10 % FA	REFERENCE ORGANISM								
		Nsp40	Nm45	Nm51	Nm50	Nm57	Nm107	Nm41	Nm55	Nc4
PROBE										
EUB338										
Nso1225							19A:G			
No190			5G:U 10U:G			5G:U	5U:U	5G:U		
Nsv443										
Ncmob										
NEU		8U:G	18A:C	8U:G 10A:C			8U:G		8U:G	
6a192						7A:A		7A:A		
NONEUB										
NONSENSE										

B	20 % FA	REFERENCE ORGANISM								
		Nsp40	Nm45	Nm51	Nm50	Nm57	Nm107	Nm41	Nm55	Nc4
PROBE										
EUB338										
Nso1225		2MM	2MM			1MM	19A:G	2MM	2MM	
No190		2MM					5U:U	5G:U		
Nsv443		2MM								
Ncmob										
NEU			18A:C				8U:G			
6a192			2MM							
NONEUB										
NONSENSE										

	0MM
	1MM
	2MM
	false negative

FIG. 1. DNA microarray evaluation. Hybridizations were performed with 10% (A) and 20% (B) formamide (FA) in the hybridization buffer. Individual hybridization results are shown for probes with the following AOB reference organisms (phylogenetic affiliations are as in references 30 and 53): *Nitrosospira* sp. strain Nsp40 (belonging to *Nitrosospira* cluster 3); *N. oligotropha* Nm45 (affiliated with the *N. oligotropha* lineage); *Nitrosomonas* sp. strain Nm51 (affiliated with the *N. marina* lineage); *N. europaea* Nm50, *N. europaea* Nm57, and *N. mobilis* Nm107 (all belonging to the *N. europaea*-*N. mobilis* lineage); *Nitrosomonas* sp. strain Nm41 (affiliated with the *N. communis* lineage); *N. cryotolerans* Nm55; and *N. oceani* Nc4 (a gamma-proteobacterial AOB). Shaded boxes indicate hybridization signals with a signal-to-noise ratio above the threshold value of 2, as indicated by the key below the panels. 0MM indicates hybridization to an AOB with a target sequence fully complementary to the probe. 1MM and 2MM indicate hybridizations to target sequences having one and two mismatches, respectively. False-negative signals represented the absence of duplex formation despite the presence of a fully matched target sequence. For each of the observed mismatch hybridizations, the position and type of the mismatch(es) within the duplex are shown.

the optimized (67) primers *amoA*-1F and *amoA*-2R (60) for PCR with a Primus cyclor (MWG Biotech). Reaction mixtures containing 50 pmol of each primer (1  $\mu$ M) were prepared in a total volume of 50  $\mu$ l by using 2 mM MgCl<sub>2</sub> reaction buffer and 1.5 U of *Taq* polymerase (Promega). Thermal cycling was carried out with an initial denaturation step at 94°C for 1 min, followed by 30 cycles of denaturation at 94°C for 20 s, annealing at 52°C for 30 s, and elongation at 72°C for 40 s. Cycling was completed by a final elongation step at 72°C for 10 min. The amplified *amoA* gene fragments were separated by gel retardation (62), visualized with SYBR Gold (Molecular Probes, Inc., Eugene, Oreg.), excised from the gel, and cloned into pCR2.1-TOPO TA vectors (Invitrogen, San Diego, Calif.) according to the manufacturer's instructions. After plasmid purification (Qiagen), sequences were determined by using a Thermo Sequenase cycle sequencing kit (Amersham Life Science), infrared-labeled primers (IRD800 and IRD700), and an automated DNA sequencer (Li-Cor, Inc., Lincoln, Nebr.). The sequences obtained were imported into the *amoA* database by using the ARB program package (<http://www.arb-home.de>) and aligned manually. Phylogenetic analyses were performed based on nucleic acid (*amoA*) and amino acid (AmoA) sequences by applying distance-matrix (Phylip and FITCH), maximum-parsimony, and maximum-likelihood methods with the respective tools in the ARB program package.

**Nucleotide sequence accession numbers.** For each wastewater treatment plant, representative *amoA* sequences were deposited at GenBank under accession numbers AY367275 to AY367276 (Aalborg West) and AY367277 (Oberding).

## RESULTS

**DNA microarray prototype for AOB.** Initially, a prototype DNA microarray for the detection of beta-proteobacterial AOB in the environment was spotted by using six previously published 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. The microarray was complemented by a bacterial probe and several control probes. For evaluation, in vitro-transcribed 16S rRNA of nine different AOB (eight affiliated with the *Betaproteobacteria* and one affiliated with the *Gammaproteobacteria*) was used under conditions of increasing stringency by varying the formamide concentration in the hybridization buffer (Fig. 1). With 10% formamide, all probes hybridized to the 16S rRNA

TABLE 2. Incorporation of  $^{14}\text{C}$  into biomass and rRNA of *N. eutropha* and activated sludge from two wastewater treatment plants after incubation with radioactive bicarbonate

Sample	Incubation time (h)	Addition of:		Incorporation of $^{14}\text{C}$ into:		
		ATU (mg liter $^{-1}$ )	$^{14}\text{C}$ ( $\mu\text{Ci ml}^{-1}$ )	Total biomass (%)	Purified rRNA	
					%	cpm of RNA $\mu\text{g}^{-1}$
<i>N. eutropha</i> Nm57	48	0	3.6	38.8	0.19	19,000
Wastewater treatment plant Aalborg West	3	0	107	4.4	0.05	9,000
	13	0	107	10.2	0.06	16,000
	26	0	107	12.4	0.13	37,000
	3	5	107	0.7	0.02	3,000
	13	5	107	2.6	0.03	6,000
	26	5	107	2.7	0.04	10,000
Oberding	2.5	0	107	7.5	0.10	10,000
	11	0	107	20.7	0.33	31,000
	25	0	107	22.8	0.29	29,000
	2.5	5	107	0.6	0.01	2,000
	11	5	107	2.1	0.03	2,000
	25	5	107	3.2	0.02	4,000

of AOB which possessed a fully matched target site. However, several probes also bound to target sites containing one or (in two cases) two mismatches. Increasing the formamide concentration to 20% increased the specificity of the probes, but for probes Nso1225, Nsv443, Nso190, and 6a192, false-negative signals were observed (Fig. 1). At 30% formamide, signal-to-noise ratios above the threshold level were observed only for probe EUB338 (data not shown). Based on these results, we selected 10% formamide in the hybridization buffer for all subsequent experiments.

In addition to using nonfragmented 16S rRNA, we also evaluated fragmented 16S rRNA for microarray hybridization. Fragmented rRNA was produced by application of the Affymetrix protocol (15) or by alkaline hydrolysis. However, in our experiments, fragmentation of rRNA did impair the signal-to-noise ratio of microarray hybridization (data not shown). Consequently, a fragmentation protocol was excluded from all further experiments.

**Isotope array experiments with *N. eutropha* Nm57.** A pure culture of *N. eutropha* was incubated with radioactively labeled bicarbonate. After 48 h, 39% of the added  $^{14}\text{C}$  was detected in the biomass, and 19,000 cpm of  $^{14}\text{C}$  was found per  $\mu\text{g}$  of RNA (corresponding to 9 nCi of  $^{14}\text{C}$  per  $\mu\text{g}$  of RNA) (Table 2). Extracted rRNA was fluorescently labeled, and 0.5  $\mu\text{g}$  of rRNA was hybridized to the DNA microarray with 125- $\mu\text{m}$ -diameter spots, which were subsequently scanned for fluorescence and radioactivity. While the expected fluorescence signals were observed, no radioactivity could be detected with the  $\beta$ -Imager for the individual spots (Fig. 2A). The same result was obtained when 1  $\mu\text{g}$  of rRNA was applied per microarray hybridization (data not shown). The use of higher rRNA concentrations led to significantly enhanced background fluorescence and did not allow the detection of radioactivity (data not shown).

Since the 125- $\mu\text{m}$ -diameter spot was close to the resolution limit of the  $\beta$ -Imager, we tested larger spot sizes to improve the

detection of  $^{14}\text{C}$  incorporation into the rRNA of *N. eutropha*. For this purpose, microarrays with 500- $\mu\text{m}$ -diameter spots were produced by automated spotting. Furthermore, even larger spots with an approximate diameter of 1 mm were produced by manually spotting approximately 0.1  $\mu\text{l}$  of the probe solutions onto the microarray slides with a 1- $\mu\text{l}$  pipette. After hybridization with 0.5  $\mu\text{g}$  of rRNA of *N. eutropha*, the expected fluorescence and radioactivity signals were detected for the 500- $\mu\text{m}$  and 1-mm spots (Fig. 2B and C). However, after initial successful experiments, the pins used for automated spotting of the 500- $\mu\text{m}$ -diameter spots became bent and started to damage the surface of the plastic slides. Therefore, for practical reasons, we used manually spotted arrays (with spot diameters of about 1 mm) for all subsequent experiments, despite the obvious disadvantage that the amount of probe applied per spot varies more significantly than it does with automatically generated spots.

**Isotope array experiments with activated sludge.** The suitability of the developed isotope array approach for analysis of complex microbial communities was tested by using two different nitrifying activated-sludge sources (Aalborg West and Oberding). Initially, however, the AOB community structure in both sludge sources was analyzed by quantitative FISH and the *amoA* approach in order to generate microarray-independent reference data for comparison.

In the Aalborg West sludge,  $4.7\% \pm 0.5\%$  (mean and standard deviation) of the bacterial population detectable with the EUB338 probe set (12) hybridized with probe Nso1225. All cells which showed a signal with this probe also bound probe 6a192 in the presence of the competitor probe c6a192. No hybridization signals were detectable with probes NEU (in the presence of unlabeled competitor probe Cte), Nsv443, and Nemob, and only a few cells (<1%) hybridized with probe Nso190. This hybridization pattern indicates that members of the *Nitrosomonas oligotropha* lineage almost exclusively represented the AOB community in the Aalborg West activated

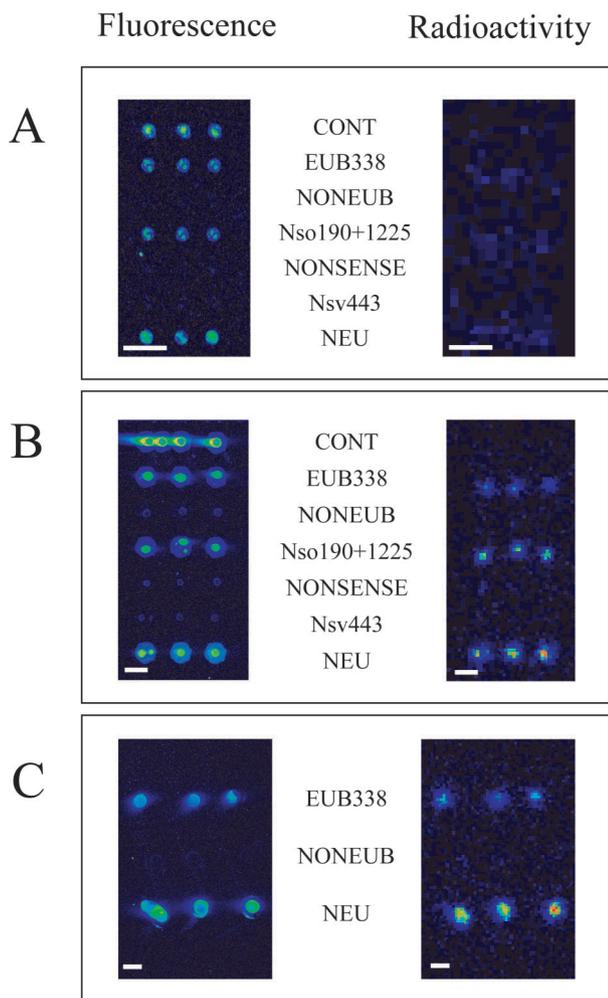


FIG. 2. Isotope array experiment with *N. eutropha* Nm57. rRNA was extracted from *N. eutropha* cultures after incubation with [ $^{14}\text{C}$ ]bicarbonate. After labeling of the rRNA with Cy5, a single slide carrying three prototype arrays with different spot sizes was hybridized, washed, and scanned for fluorescence and radioactivity. (A) Spot diameter, 125  $\mu\text{m}$ . (B) Spot diameter, 500  $\mu\text{m}$ . (C) Approximate spot diameter, 1 mm. Bars, 500  $\mu\text{m}$ .

sludge. In the Oberding sludge,  $9.3\% \pm 1.1\%$  of the cells detectable with the bacterial probe mix hybridized with probe Nso1225. All cells hybridizing with this probe also bound probes Nso190 and NEU (in the presence of unlabeled competitor probe Cte). No hybridization signals could be detected after the application of probes Ncmob, Nsv443, and 6a192. This hybridization pattern suggests that in the Oberding activated sludge, members of the *Nitrosomonas europaea* and *N. eutropha* lineages were dominant. After the addition of allylthiourea to the activated-sludge samples from Aalborg West and Oberding, AOB remained detectable by FISH for the entire experimental period. Nonspecific binding of probes could be excluded for all samples by the application of probe NONEUB338 (complementary to probe EUB338) labeled with the respective fluorophores (data not shown).

In addition to FISH analysis, comparative *amoA* gene sequence analysis was used to determine the species richness of

AOB from both sludge sources. Nineteen randomly chosen *amoA* clones were sequenced for the Aalborg West plant. Eighteen of these sequences were highly similar to each other and most closely related to *amoA* clones from other environments, including other wastewater treatment plants. These clones formed a monophyletic grouping within the *N. oligotropha* and *Nitrosomonas marina* lineages and could not be separated from each other at the *amoA* level (30). One *amoA* clone from Aalborg West had an *amoA* sequence which was identical at the amino acid level to that from *Nitrosomonas* sp. strain Nm59, which is a close relative of *N. oligotropha* (Fig. 3). For the Oberding plant, the 13 *amoA* clones sequenced were identical to each other and very closely related to *N. europaea*.

Samples from both sludge sources were incubated with [ $^{14}\text{C}$ ]bicarbonate (at a concentration typically found in activated sludge) after the natural bicarbonate content of the sludge samples was minimized by washing and degassing. The incorporation of radioactivity in the activated sludge after different time periods was monitored by scintillation counting of filtered biomass. As controls, parallel experiments were performed for both plants with activated sludge amended with allylthiourea, a specific inhibitor of autotrophic ammonia oxidation (Fig. 4 and Table 2). During the first 10 h, a rapid increase in  $^{14}\text{C}$  incorporation was observed for samples from both noninhibited nitrifying activated-sludge sources. Incubation beyond 10 h did not significantly increase the amount of incorporated radioactivity. In the presence of allylthiourea, significantly less incorporation of radioactively labeled bicarbonate into the sludge biomass was detected. This incorporation in the presence of allylthiourea probably was caused by heterotrophic  $\text{CO}_2$  fixation.

Intact rRNA was extracted from the activated-sludge samples (for an agarose gel image, please see [www.microbial-ecology.net/supplements.html](http://www.microbial-ecology.net/supplements.html)), and after agarose gel separation and purification, the amount of incorporated radioactivity within the 16S and 23S rRNA molecules (5S rRNA is selectively excluded by the purification columns) was determined by scintillation counting (Table 2). The sum of incorporated  $^{14}\text{C}$  in 16S and 23S rRNA molecules extracted from noninhibited activated sludge was 0.05 to 0.33% the amount of  $^{14}\text{C}$  added to the activated sludge and corresponded to 1 to 2% the isotope assimilated in the biomass. As expected, lower percentages of rRNA incorporation (0.01 to 0.04%) were found for the inhibited sludge samples (Table 2).

After fluorescence labeling of the rRNA, manually spotted microarrays were hybridized and then scanned for fluorescence and radioactivity (Fig. 5). In total, each sludge sample (with and without allylthiourea) was analyzed after three different incubation times with [ $^{14}\text{C}$ ]bicarbonate. The fluorescence hybridization patterns observed were generally congruent with the ammonia oxidizer diversity analyses performed by FISH and *amoA* sequencing. For the Aalborg West plant, probes Nso1225, 6a192, Nso190, and NEU had signal-to-noise ratios above the threshold value of 2 and were thus scored positive. Consistent with the results of the FISH analysis, probes Nsv443 and Ncmob had signal-to-noise ratios below the threshold value in the microarray analysis. For the Oberding plant, probes Nso1225, Nso190, and NEU had signal-to-noise ratios above the threshold value of 2, while probes 6a192, Nsv443, and Ncmob had values below this threshold. For the Oberding

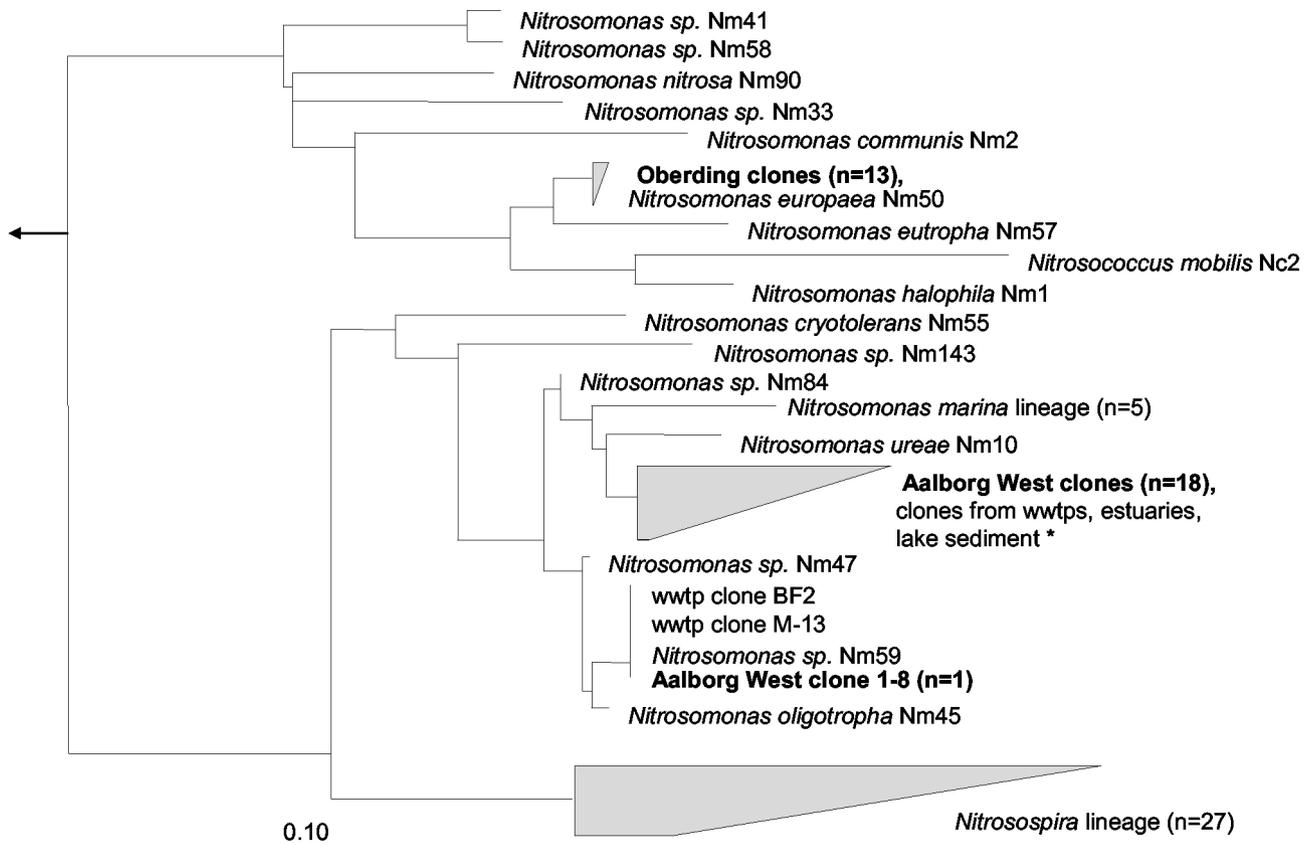


FIG. 3. Phylogenetic tree showing the affiliations of the *AmoA* sequences obtained from the Aalborg West and Oberding wastewater treatment plants (wwtps). The tree was calculated based on the *AmoA* amino acid sequences deduced from the FITCH algorithm with global rearrangements and a randomized input order. The bar shows 10% estimated sequence divergence. *AmoA* sequences of gammaproteobacterial AOB were used as outgroups (not shown). The accession numbers for the clones from wwtps, estuaries, and lake sediment were as follows: estuary clone—AF367463 (Duc-27); freshwater clones—AJ388566 (pGtA.2), AJ388570 (pG5B.1), and AJ388571 (pG5B.2); wwtps clones—AF420298 (M-13), AF272442 (IA-32), AF272482 (BF1-1), AF489661 (S\_3), and AF489660 (S\_2); and lake sediment clone—AF489645 (T\_2). *amoA* sequences of reference organisms were published elsewhere (30, 41, 51, 53, 65).

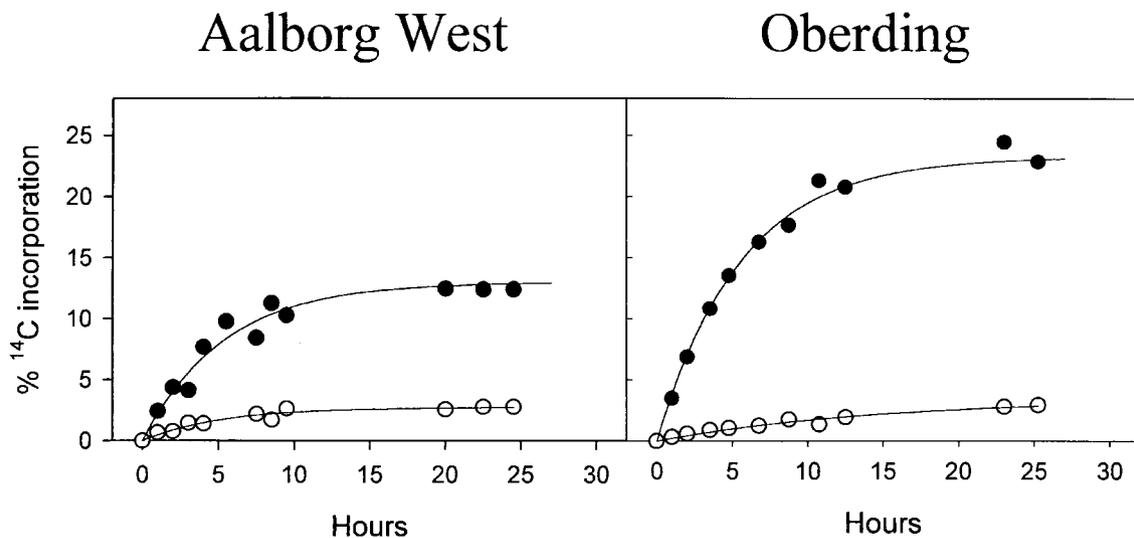


FIG. 4. Incorporation of radioactive <sup>14</sup>C into nitrifying activated-sludge biomass after incubation with [<sup>14</sup>C]bicarbonate. Filled symbols indicate incorporation in the absence of the inhibitor allylthiourea. Open symbols indicate incorporation in the presence of allylthiourea.

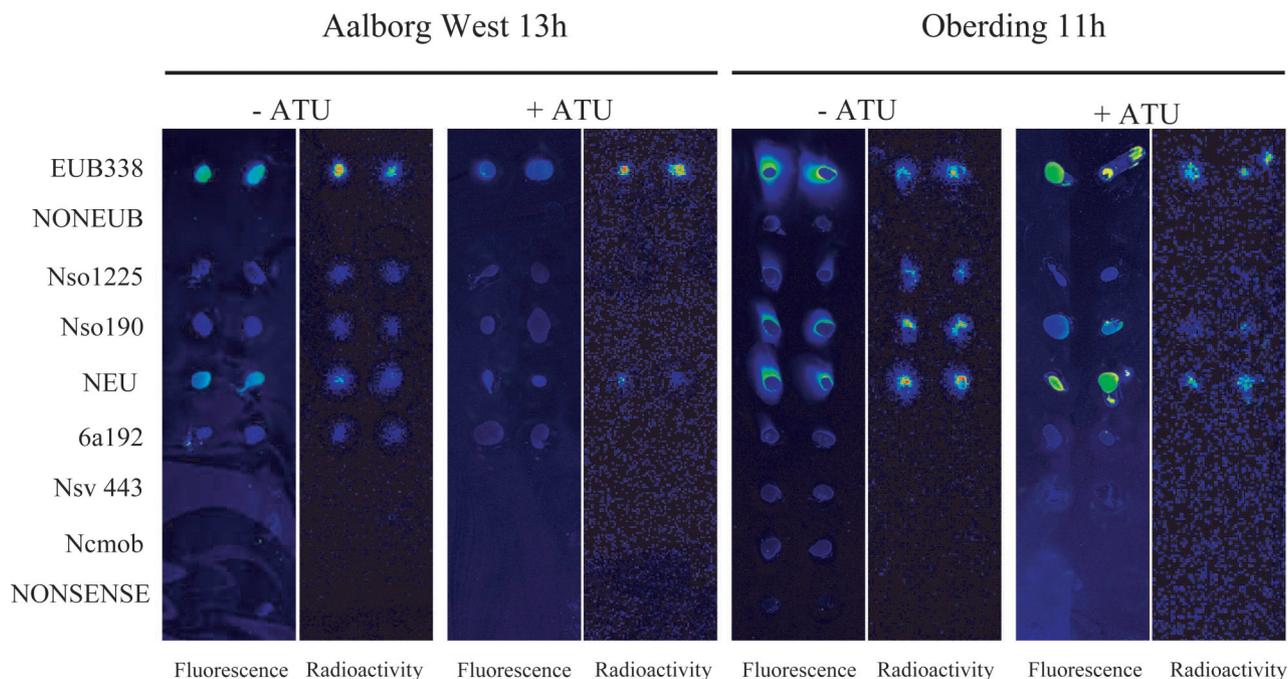


FIG. 5. Isotope array experiment with activated sludge. rRNA was extracted from inhibited and noninhibited activated sludge from the Aalborg West and Oberding wastewater treatment plants after incubation with [ $^{14}\text{C}$ ]bicarbonate for 13 and 11 h, respectively. After labeling of the rRNA with Cy3, the manually spotted microarrays were hybridized and scanned for fluorescence and radioactivity. In order to enhance clarity, recorded spot signals were aligned by using Adobe Photoshop. Within each slide, blue indicates low signals and green, yellow, and red indicates increased signals. It should be noted that signal intensities in the radioactivity scans cannot be compared directly between slides. ATU, allylthiourea.

plant, the fluorescence microarray hybridization patterns of the activated-sludge samples did not differ significantly between uninhibited and inhibited samples. However, for the Aalborg West plant, probe NEU was the only AOB-specific probe which gave a positive signal after inhibition with allylthiourea.

After scanning of the microarrays for radioactivity, we found that the rRNA immobilized by the bacterial and ammonia oxidizer probes had incorporated sufficient amounts of  $^{14}\text{C}$  to be detectable (Fig. 5). As expected, the level of incorporation of  $^{14}\text{C}$  into ammonia oxidizer rRNA was very low or even absent in activated-sludge samples inhibited by allylthiourea. The radioactive labeling of rRNA in the presence of allylthiourea, as detected with probe EUB338, probably reflects heterotrophic  $\text{CO}_2$  fixation.

In the next step, digital image analysis was used to extract quantitative information on  $^{14}\text{C}$  incorporation into rRNA from the fluorescence and radioactivity scans of the microarrays. For quantification, the ratio of the radioactive signal to the fluorescence signal for rRNA hybridized to a probe (A-value) was determined with the formula  $(X_p - X_{\text{PLB}}) \times (I_p - I_{\text{PLB}})^{-1}$ , where  $X_p$  and  $I_p$  are the cumulative intensities of a manually applied probe spot in radioactivity and fluorescence scans, respectively, and  $X_{\text{PLB}}$  and  $I_{\text{PLB}}$  are the cumulative intensities of a local background area identical in size to the analyzed probe spot in radioactivity and fluorescence scans, respectively.

Figure 6A and B show that  $^{14}\text{C}$  incorporation into ammonia oxidizer rRNA steadily increased with incubation time. Interestingly, for both plants, the increases in A-values for the different ammonia oxidizer-specific probes varied at given in-

hibition times. The A-value of probe Nso1225 was always higher than the A-values of probes Nso190, NEU, 6a192, and EUB338. For sludge samples inhibited with allylthiourea, very low A-values were determined for all probes and incubation times (Fig. 6C and D).

The incorporation of [ $^{14}\text{C}$ ]bicarbonate into ammonia oxidizers was independently monitored for both wastewater treatment plants by using a combination of FISH and MAR. As expected, the ammonia oxidizers in noninhibited sludge incorporated significant amounts of labeled bicarbonate, while no incorporation could be observed after inhibition with allylthiourea (for a FISH-MAR image of this experiment, please see [www.microbial-ecology.net/supplements.html](http://www.microbial-ecology.net/supplements.html)).

## DISCUSSION

A major challenge in microbial ecology is to reveal the composition and function of complex microbial communities. While several methods for cultivation-independent analysis of community structure are available, the number of approaches which allow inference of the activity and specific function of a microorganism in its environment is still very limited. In this study, an approach was developed to allow simultaneous investigation of community structure and specific substrate consumption by community members via direct detection of environmentally retrieved 16S rRNA on a microarray (Fig. 7).

**AOB prototype microarray.** A prototype microarray for AOB consisting of probes which were developed previously for AOB detection via FISH or dot blot hybridization (26, 38, 52, 71) was used. Evaluation of the prototype microarray with 16S

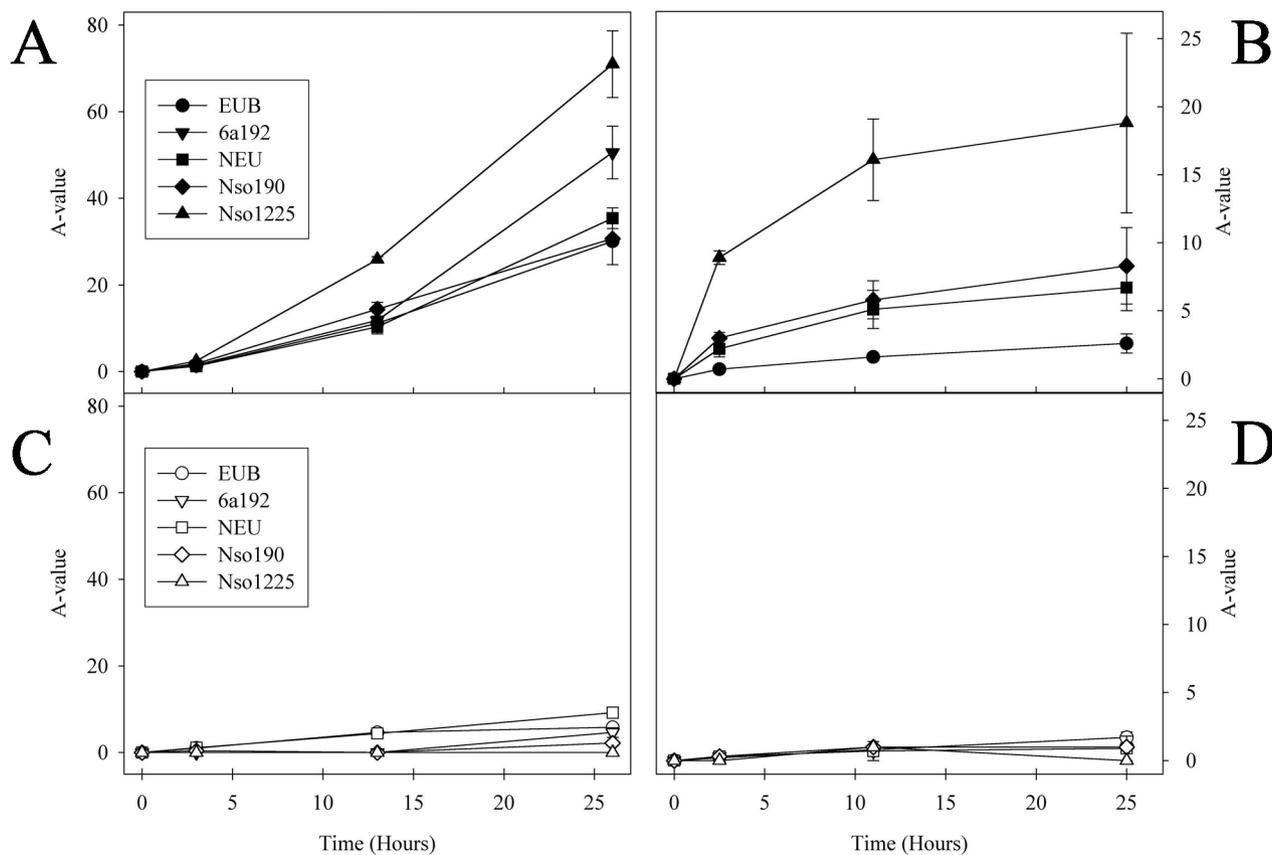


FIG. 6. Incorporation of radioactivity into rRNA of phylogenetic subgroups, as measured by A-value determination for each probe (see the text for details). Isotope experiments (as displayed in Fig. 5) were performed after three different lengths of incubation of activated sludge with [ $^{14}\text{C}$ ]bicarbonate. A-values were determined for each probe and experiment. Error bars indicate standard deviations of the A-values from duplicate or triplicate experiments. (A) Aalborg West activated sludge. (B) Oberding activated sludge. (C) Aalborg West activated sludge inhibited by allylthiourea. (D) Oberding activated sludge inhibited by allylthiourea. In panels A and B, only probes which had a fluorescence signal-to-noise ratio above the threshold value of 2 are depicted.

rRNAs of nine different AOB reference cultures under optimized conditions showed that all probes detected their target 16S rRNAs. However, duplex formation also occurred for some 16S rRNA molecules, with one (and, in two cases, even two) mismatches within the probe target sites (Fig. 1). No false-positive results were obtained with 16S rRNA molecules having more than two mismatches with the probes. For probes NEU and 6a192, the lack of perfect specificity on the microarray may be explained by the absence of the respective competitor probes in the hybridization solution. In addition, the length and GC content of the probes obviously influenced their specificity on the microarray. Although not perfect, the level of specificity achieved with the prototype array allowed the acquisition of important information about the AOB community structure of environmental samples. Under the conditions applied, the AOB prototype microarray is suited (i) to the detection of all recognized beta-proteobacterial AOB (positive signals with probe Nso190 and probe Nso1225) and (ii) to the specific identification of the occurrence of nitrospiras (probe Nsv443) and *N. mobilis* (probe Ncmob) in a sample. Furthermore, if probe Nsv443 is negative and other AOB-specific probes on the array have a signal-to-noise ratio above the threshold, this finding is strongly indicative of the presence of

nitrospiras. We considered this level of resolution sufficient for the purpose of this study, because (i) the AOB microarray was primarily used to demonstrate the feasibility of the isotope array approach and (ii) the AOB community composition of the activated-sludge samples was analyzed in parallel by quantitative FISH and by the *amoA* approach.

**Analysis of AOB in activated sludge by using the isotope array approach.** To demonstrate the feasibility of the isotope array approach, this method was used to investigate the community composition and  $\text{CO}_2$  fixation activity of AOB in samples from two nitrifying activated-sludges. Parallel analysis of both sludges with FISH and comparative *amoA* sequence analysis showed that they harbored different AOB. The Aalborg West sludge was dominated by AOB of the *N. oligotropha* lineage (30, 53), while *N. europaea* was detected as the only AOB in the Oberding sludge. These AOB are typical members of nitrifying activated-sludge communities (51, 72, 73). The same probes which were used for FISH analysis were also applied to the isotope array analysis. For both types of sludge, all probes which gave positive FISH signals were also positive in the fluorescence readouts of the isotope array experiments (Fig. 5). However, for the Aalborg West sludge, probe NEU was scored positive on the isotope array but did not yield

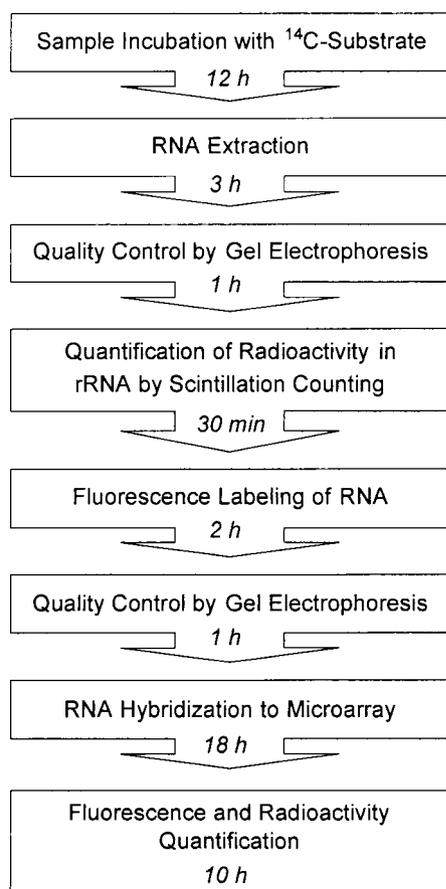


FIG. 7. Flowchart of the isotope array approach.

detectable FISH signals. This discrepancy reflects the fact that the competitor probe (Cte), which is required to obtain specific FISH signals with probe NEU (71), could not be applied on the microarray format. Because probe NEU has a single mismatch with the 16S rRNAs of several heterotrophic bacteria, it detects these organisms in the absence of the competitor probe. After the inhibition of AOB in the Aalborg West sludge by the addition of allylthiourea, no signals could be obtained with the AOB-specific probes (with the exception of probe NEU) on the isotope array. In contrast, no significant changes in isotope array hybridization patterns were found between uninhibited and inhibited sludge samples from Oberding. These data suggest that the AOB of the *N. oligotropha* lineage in the Aalborg West sludge did reduce their cellular ribosome contents during inhibition (but still retained ribosome concentrations sufficient for FISH detection), while no indications of this effect were found for *N. europaea* in the Oberding sludge. Past research has shown that at least some AOB do maintain high cellular ribosome concentrations during inhibition with allylthiourea (71) and starvation (39). We are presently investigating whether species-specific differences in the control of cellular ribosome concentrations exist among AOB.

The isotope array successfully detected  $^{14}\text{CO}_2$  incorporation into the rRNA of AOB (Fig. 5). As expected, very low levels of radioactive rRNA labeling were observed in the control experiments with sludge samples containing an inhibitor for AOB.

Radioactive labeling of rRNA in the presence of the inhibitor allylthiourea likely is caused by heterotrophic  $\text{CO}_2$  assimilation, as previously described (16, 58). For each probe and incubation time, the A-value was determined (Fig. 6). This value allows one to compare substrate incorporation between different time points in an incubation experiment and between different probe-defined populations. As expected, the A-values obtained with the AOB-specific probes and with the general bacterial probe increased during incubation with radioactive bicarbonate for both types of sludge, while very low A-values were determined for the samples amended with the inhibitor allylthiourea. The higher A-values obtained with the AOB-specific probes than with the general bacterial probe reflect the fact that the latter probe also targets nonradioactive rRNA from heterotrophic microorganisms. Interestingly, different A-values were observed for different AOB-specific probes after hybridization with rRNA from the same sludge and incubation time point. These differences could reflect differences in  $\text{CO}_2$  fixation activity between different AOB populations, illustrating the possibility of using A-value determinations for revealing important ecophysiological traits of analyzed microbial communities. However, the observation that, at least in the Oberding plant, only one AOB population was present is inconsistent with this assumption. If all AOB-specific probes were absolutely specific in this plant, then one would expect for a given incubation time point identical A-values for each of these probes. Therefore, the most likely explanation for differences in A-values between the AOB-specific probes is that the probes with lower A-values bind (different amounts of) non-radioactive rRNAs of heterotrophic microorganisms. For all experiments, probe Nso1225 showed the highest A-values, indicating that this probe had the highest specificity for AOB and thus bound no rRNA or only very small amounts of rRNA from heterotrophic organisms on the microarray. This notion is in accordance with a recent specificity reevaluation of all AOB-specific probes (30), which showed that in present publicly available 16S rRNA databases, there are only four 16S rRNA sequences of non-AOB with no mismatches or one mismatch with this probe. For probe Nso190, which had much lower A-values, database checks revealed the same small number of non-AOB with no mismatch or one mismatch. However, the dissociation temperature of this probe is much higher than that of probe Nso1225 (38); therefore, the hybridization conditions applied to the microarray were less stringent for probe Nso190 than for probe Nso1225, allowing for more nonspecific binding of nontarget rRNA by probe Nso190. The lower A-values of probes NEU and 6a192 than of probe Nso1225 also reflected their nonperfect specificity because their respective competitor probes, designed to increase their specificity, were not applied during microarray hybridization.

**Strength and limitations of the isotope array approach.** The isotope array approach exploits environmentally retrieved rRNA as a marker for the phylogenetic affiliation and substrate consumption of target organisms. Therefore, this approach is not affected by the multiple biases associated with PCR amplification of rRNA genes (4, 11, 34, 49, 68, 78) but requires efficient extraction of rRNA from the environment under investigation. In contrast to the results reported in previous publications (3, 19, 23, 29, 64), fragmentation of rRNA prior to microarray hybridization did not enhance hybridization effi-

ciency but increased background fluorescence after hybridization. This inconsistency might be explained by the fact that we applied a different microarray format and varied the composition of the hybridization buffer. The use of intact rRNA for microarray hybridization has the advantage that nonrandom destruction of probe target sites, which might be caused by fragmentation, can be excluded. Consequently, for our approach the quality of the extracted rRNA must be checked carefully by agarose or polyacrylamide electrophoresis prior to labeling and microarray hybridization.

The sensitivity of the isotope approach was sufficient to detect  $^{14}\text{C}$  incorporation into the 16S rRNA of community members which made up less than 10 and 5% of the bacterial communities in the analyzed systems, as demonstrated by quantitative FISH. However, in ecosystems with less active and dense prokaryotic communities, the applicability of the isotope array in its present format probably will be limited to numerically more abundant microorganisms. In general, the sensitivity of the isotope array depends on several factors. First, the number of bacterial target cells in the system and their mean cellular ribosome content determine the limit of detection of the organism by microarray hybridization. Second, the specific activity of the labeled substrate and the concentration of the nonlabeled substrate in the sample influence sensitivity. Third, the substrate consumption of a detectable organism can be measured only if sufficient  $^{14}\text{C}$  is incorporated into its rRNA molecules. For [ $^{14}\text{C}$ ]bicarbonate, we could demonstrate that 19,000 cpm of  $^{14}\text{C}$  per  $\mu\text{g}$  of RNA was sufficient to detect  $\text{CO}_2$  fixation by an ammonia-oxidizing pure culture via the isotope array approach (Table 2 and Fig. 2). The substrate incubation time required for successful analysis of AOB autotrophy was significantly lower for the isotope array approach than for DNA stable-isotope probing (76). This finding confirms that during incubation experiments, the rRNA of a particular organism is enriched for labeled carbon much faster than is its DNA (35), reflecting the more rapid turnover of the former molecules in the cell. However, it must be considered that rates of incorporation of labeled carbon into rRNA might vary significantly depending on the type of labeled substrate administered, on the stability of rRNA, and on the metabolism of the consuming organism (although the biosynthetic pathways for RNA production are quite similar among bacterial species). This limitation is not restricted to the isotope array approach and also influences DNA and RNA stable-isotope probing (35, 36, 54), whereas this bias does not apply to FISH-MAR experiments (31), which purely monitor the assimilation of labeled substrates.

The exploitation of labeled substrates also causes other potential limitations. In principle, the possibility that members of a microbial community discriminate between an isotope-labeled substrate and its natural counterpart cannot be excluded. Although bacteria discriminate against  $^{14}\text{C}$ -labeled compounds more than against  $^{13}\text{C}$ -labeled substrates, the extent of fractionation is often negligible (18, 24, 45) and unlikely to affect the assimilation of substrates in experiments (as ours) with large amounts of isotope enrichment.

Another important factor which must be considered is substrate cross-feeding, which is of particular importance at prolonged substrate incubation times. This effect could be exploited to investigate the transfer of carbon through microbial

communities but can cause problems in differentiating between primary substrate consumers and microorganisms which live on the secretions or lysis products of those primary consumers. Again, these limitations are not inherent to the isotope array approach but affect stable isotope probing and the combination of FISH and MAR.

Unlike DNA stable-isotope probing, isotope array analysis does not allow one to harvest and exploit the genomic DNA of metabolically active microorganisms for subsequent analyses and thus does not provide insights into the genetic compositions of the target organisms. On the other hand, isotope array analysis has several unique advantages. In contrast to DNA or RNA stable-isotope probing, substrate incorporation into target nucleic acids is measured directly by using the isotope array approach; thus, organisms which do not possess labeled nucleic acids cannot be detected in error. Compared to FISH-MAR, the isotope array allows one to apply many probes in parallel, a feature which will be of major importance if the ecophysiology of complex microbial communities is of interest. Additionally, the isotope array may (if stringent hybridization conditions can be achieved for all probes) permit examination of the specific incorporation of isotopes into the rRNAs of members of different phylogenetic groups, expressed as A-values.

In conclusion, this study reports on the development and evaluation of a novel approach for structure-function analyses of complex microbial communities with oligonucleotide microarrays. Continuing advances in microarray technology (19, 32, 48, 64) suggest that it will soon become feasible to develop encompassing habitat-specific microarrays which will allow an investigator to monitor the entire microbial community of a system. Equipped with such tools, the isotope array will provide a new means to directly link the detected organisms with their specific activities and functions in an ecosystem.

#### ACKNOWLEDGMENTS

J.A. and M. Hesselsoe contributed equally to this work.

The excellent technical assistance of Sibylle Schadhauer, Carmen Krammer, Kirsten Maagaard, and Marianne Stevenson is acknowledged.

This research was supported by the following grants: bmb+f 01 LC 0021 (Subproject 2 in the framework of the BIOLOG Program) (to M.W.), a Bayerischen Forschungsförderung grant (for development of oligonucleotide DNA chips, in cooperation with MWG Biotech; project 368/99) (to M.W.), travel grant 21-02-0166 from the Danish Natural Science Research Council (to M. Hesselsoe), grant QLK3-2000-01528 from the European Commission (Framework Program 5) (to M.H., N.I., and P.R.), and a grant from the Danish Technical Research Council (Framework Program Activity and Diversity in Complex Microbial Systems) (to P.H.N., N.I., and P.R.).

#### REFERENCES

1. Amann, R. I., B. J. Binder, R. J. Olson, S. W. Chisholm, R. Devereux, and D. A. Stahl. 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:1919–1925.
2. Amann, R. I., W. Ludwig, and K.-H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**:143–169.
3. Baykin, S. G., J. P. Akowski, V. M. Zakhariyev, V. E. Barsky, A. N. Perov, and A. D. Mirzabekov. 2001. Portable system for microbial sample preparation and oligonucleotide microarray analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:922–928.
4. Becker, S., P. Boger, R. Oehlmann, and A. Ernst. 2000. PCR bias in ecological analysis: a case study for quantitative *Taq* nuclease assays in analyses of microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:4945–4953.
5. Bedard, C., and R. Knowles. 1989. Physiology, biochemistry, and specific

- inhibitors of  $\text{CH}_4$ ,  $\text{NH}_4^+$ , and CO oxidation by methanotrophs and nitrifiers. *Microbiol. Rev.* **53**:68–84.
6. **Boschker, H. T. S., S. C. Nold, P. Wellsburry, D. Bos, W. de Graaf, R. Pel, R. J. Parkes, and T. E. Cappenberg.** 1998. Direct linking of microbial populations to specific biogeochemical processes by  $^{13}\text{C}$ -labelling of biomarkers. *Nature* **392**:801–805.
  7. **Busti, E., R. Bordoni, B. Castiglioni, P. Monciardini, M. Sosio, S. Donadio, C. Consolandi, L. Rossi Bernardi, C. Battaglia, and G. De Bellis.** 2002. Bacterial discrimination by means of a universal array approach mediated by LDR (ligase detection reaction). *BMC Microbiol.* **2**:27.
  8. **Chai, X. S., Q. Luo, and J. Y. Zhu.** 2001. Analysis of nonvolatile species in a complex matrix by headspace gas chromatography. *J. Chromatogr.* **909**:249–257.
  9. **Cottrell, M. T., and D. L. Kirchman.** 2000. Natural assemblages of marine proteobacteria and members of the *Cytophaga-Flavobacter* cluster consuming low- and high-molecular-weight dissolved organic matter. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:1692–1697.
  10. **Cottrell, M. T., and D. L. Kirchman.** 2003. Contribution of major bacterial groups to bacterial biomass production (thymidine and leucine incorporation) in the Delaware estuary. *Limnol. Oceanogr.* **48**:168–178.
  11. **Crosby, L. D., and C. S. Criddle.** 2003. Understanding bias in microbial community analysis techniques due to rrn operon copy number heterogeneity. *BioTechniques* **34**:790–794, 796, 798.
  12. **Daims, H., A. Brühl, R. Amann, K.-H. Schleifer, and M. Wagner.** 1999. The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all *Bacteria*: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst. Appl. Microbiol.* **22**:434–444.
  13. **Daims, H., J. L. Nielsen, P. H. Nielsen, K. H. Schleifer, and M. Wagner.** 2001. In situ characterization of *Nitrospira*-like nitrite-oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:5273–5284.
  14. **Daims, H., N. B. Ramsing, K. H. Schleifer, and M. Wagner.** 2001. Cultivation-independent, semiautomatic determination of absolute bacterial cell numbers in environmental samples by fluorescence in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:5810–5818.
  15. **de Saizieu, A., U. Certa, J. Warrington, C. Gray, W. Keck, and J. Mous.** 1998. Bacterial transcript imaging by hybridization of total RNA to oligonucleotide arrays. *Nat. Biotechnol.* **16**:45–48.
  16. **Dijkhuizen, L., and W. Harder.** 2000. Microbial metabolism of carbon dioxide, p. 409–423. *In* H. Dalton (ed.), *Comprehensive bio/technology*, vol. 1. Pergamon Press Ltd., Oxford, United Kingdom.
  17. **Donaldson, J. M., and G. S. Henderson.** 1989. A dilute medium to determine population size of ammonium oxidizers in forest soils. *Soil. Sci. Soc. Am. J.* **53**:1608–1611.
  18. **Ekblad, A., G. Nyberg, and P. Hogberg.** 2000. C-13-discrimination during microbial respiration of added C-3-, C-4- and C-13-labelled sugars to a C-3-forest soil. *Oecologia* **131**:245–249.
  19. **El Fantroussi, S., H. Urakawa, A. E. Bernhard, J. J. Kelly, P. A. Noble, H. Smidt, G. M. Yershov, and D. A. Stahl.** 2003. Direct profiling of environmental microbial populations by thermal dissociation analysis of native rRNAs hybridized to oligonucleotide microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:2377–2382.
  20. **Gray, N. D., R. Howarth, R. W. Pickup, J. G. Jones, and I. M. Head.** 2000. Use of combined microautoradiography and fluorescence in situ hybridization to determine carbon metabolism in mixed natural communities of uncultured bacteria from the genus *Achromatium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:4518–4522.
  21. **Gray, N. D., and I. M. Head.** 2001. Linking genetic identity and function in communities of uncultured bacteria. *Environ. Microbiol.* **3**:481–492.
  22. **Griffiths, R. L., A. S. Whiteley, A. G. O'Donnell, and M. J. Bailey.** 2000. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:5488–5491.
  23. **Guschin, D. Y., B. K. Mobarrey, D. Proudnikov, D. A. Stahl, B. E. Rittmann, and A. D. Mirzabekov.** 1997. Oligonucleotide microchips as biosensors for determinative and environmental studies in microbiology. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:2397–2402.
  24. **Jackson, A., and J. Pardue.** 1999. Quantifying the mineralization of contaminants using stable carbon isotope ratios. *Org. Geochem.* **30**:787–792.
  25. **Johnsen, A. R., A. Winding, U. Karlson, and P. Roslev.** 2002. Linking of microorganisms to phenanthrene metabolism in soil by analysis of  $^{13}\text{C}$ -labeled cell lipids. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:6106–6113.
  26. **Juretschko, S., G. Timmermann, M. Schmid, K. H. Schleifer, A. Pommerening-Roser, H.-P. Koops, and M. Wagner.** 1998. Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:3042–3051.
  27. **Juretschko, S., A. Loy, A. Lehner, and M. Wagner.** 2002. The microbial community composition of a nitrifying-denitrifying activated sludge from an industrial sewage treatment plant analyzed by the full-cycle rRNA approach. *Syst. Appl. Microbiol.* **25**:84–99.
  28. **Kerkhof, L., and P. Kemp.** 1999. Small ribosomal RNA content in marine Proteobacteria during non-steady-state growth. *FEMS Microbiol. Ecol.* **30**:253–260.
  29. **Koizumi, Y., J. J. Kelly, T. Nakagawa, H. Urakawa, S. El-Fantroussi, S. Al-Muzaini, M. Fukui, Y. Urushigawa, and D. A. Stahl.** 2002. Parallel characterization of anaerobic toluene- and ethylbenzene-degrading microbial consortia by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis, RNA-DNA membrane hybridization, and DNA microarray technology. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:3215–3225.
  30. **Koops, H.-P., U. Purkhold, A. Pommerening-Röser, G. Timmermann, and M. Wagner.** March 2003, posting date. The lithoautotrophic ammonia-oxidizing bacteria. *In* M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, and E. Stackebrandt (ed.), *The prokaryotes. An evolving electronic resource for the microbiological community*, 3rd ed., release 3.13. [Online.] Springer-Verlag, New York, N.Y. <http://link.springer-ny.com/link/service/books/10125/>.
  31. **Lee, N., P. H. Nielsen, K. H. Andreasen, S. Juretschko, J. L. Nielsen, K.-H. Schleifer, and M. Wagner.** 1999. Combination of fluorescence in situ hybridization and microautoradiography—a new tool for structure-function analyses in microbial ecology. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:1289–1297.
  32. **Loy, A., A. Lehner, N. Lee, J. Adamczyk, H. Meier, J. Ernst, K.-H. Schleifer, and M. Wagner.** 2002. Oligonucleotide microarray for 16S rRNA gene-based detection of all recognized lineages of sulfate-reducing prokaryotes in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:5064–5081.
  33. **Loy, A., M. Horn, and M. Wagner.** 2003. probeBase: an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Nucleic Acids Res.* **31**:514–516.
  34. **Lueders, T., and M. W. Friedrich.** 2003. Evaluation of PCR amplification bias by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of small-subunit rRNA and *mcrA* genes by using defined template mixtures of methanogenic pure cultures and soil DNA extracts. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:320–326.
  35. **Manefield, M., A. S. Whiteley, R. I. Griffiths, and M. J. Bailey.** 2002. RNA stable isotope probing, a novel means of linking microbial community function to phylogeny. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:5367–5373.
  36. **Manefield, M., A. S. Whiteley, N. Ostle, P. Ineson, and M. J. Bailey.** 2002. Technical considerations for RNA-based stable isotope probing: an approach to associating microbial diversity with microbial community function. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **16**:2179–2183.
  37. **Minz, D., S. Fishbain, S. J. Green, G. Muyzer, Y. Cohen, B. E. Rittmann, and D. A. Stahl.** 1999. Unexpected population distribution in a microbial mat community: sulfate-reducing bacteria localized to the highly oxic chemocline in contrast to a eukaryotic preference for anoxia. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:4659–4665.
  38. **Mobarrey, B. K., M. Wagner, V. Urbain, B. E. Rittmann, and D. A. Stahl.** 1996. Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:2156–2162. (Erratum, **63**:815, 1997.)
  39. **Morgenroth, E., A. Obermayer, E. Arnold, A. Brühl, M. Wagner, and P. A. Wilderer.** 2000. Effect of long-term idle periods on the performance of sequencing batch reactors. *Water Sci. Technol.* **41**:105–113.
  40. **Morris, S. A., S. Radajewski, T. W. Willison, and J. C. Murrell.** 2002. Identification of the functionally active methanotroph population in a peat soil microcosm by stable-isotope probing. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:1446–1453.
  41. **Nicolaisen, M. H., and N. B. Ramsing.** 2002. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) approaches to study the diversity of ammonia-oxidizing bacteria. *J. Microbiol. Methods* **50**:189–203.
  42. **Nielsen, J. L., S. Juretschko, M. Wagner, and P. H. Nielsen.** 2002. Abundance and phylogenetic affiliation of iron reducers in activated sludge as assessed by fluorescence in situ hybridization and microautoradiography. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:4629–4636.
  43. **Nielsen, J. L., D. Christensen, M. Kloppenborg, and P. H. Nielsen.** 2003. Quantification of cell-specific substrate uptake by probe-defined bacteria under in situ conditions by microautoradiography and fluorescence in situ hybridization. *Environ. Microbiol.* **5**:202–211.
  44. **Nielsen, P. H., M. A. de Muro, and J. L. Nielsen.** 2000. Studies on the in situ physiology of *Thiothrix* spp. present in activated sludge. *Environ. Microbiol.* **2**:389–398.
  45. **Northrop, D. B.** 1981. The expression of isotope effects on enzyme-catalyzed reactions. *Annu. Rev. Biochem.* **50**:103–131.
  46. **Oda, Y., S. Slagman, W. G. Meijer, L. J. Forney, and J. C. Gottschal.** 2000. Influence of growth rate and starvation on fluorescent in situ hybridization of *Rhodospseudomonas palustris*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **32**:205–213.
  47. **Ouverney, C. C., and J. A. Fuhrman.** 1999. Combined microautoradiography-16S rRNA probe technique for determination of radioisotope uptake by specific microbial cell types in situ. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:1746–1752.
  48. **Peplies, J., F. O. Glockner, and R. Amann.** 2003. Optimization strategies for DNA microarray-based detection of bacteria with 16S rRNA-targeting oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:1397–1407.
  49. **Polz, M. F., and C. M. Cavanaugh.** 1998. Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:3724–3730.
  50. **Poulsen, L. K., G. Ballard, and D. A. Stahl.** 1993. Use of rRNA fluorescence

- in situ hybridization for measuring the activity of single cells in young and established biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:1354–1360.
51. Purkhold, U., A. Pommering-Röser, S. Juretschko, M. C. Schmid, H.-P. Koops, and M. Wagner. 2000. Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and *amoA* sequence analysis: implications for molecular diversity surveys. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:5368–5382.
  52. Purkhold, U. 2003. Untersuchungen zur Phylogenie und Verbreitung Ammoniak oxidierender Bakterien. Ph.D. thesis. Technische Universität München, Munich, Germany.
  53. Purkhold, U., M. Wagner, G. Timmermann, A. Pommering-Röser, and H.-P. Koops. 2003. 16S rRNA and *amoA*-based phylogeny of 12 novel betaproteobacterial ammonia oxidizing isolates: extension of the data set and proposal of a new lineage within the nitrosomonads. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**:1485–1494.
  54. Radajewski, S., P. Ineson, N. R. Parekh, and J. C. Murrell. 2000. Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature* **403**:646–649.
  55. Radajewski, S., G. Webster, D. S. Reay, S. A. Morris, P. Ineson, D. B. Nedwell, J. I. Prosser, and J. C. Murrell. 2002. Identification of active methylotroph populations in an acidic forest soil by stable-isotope probing. *Microbiology* **148**:2331–2342.
  56. Ravensschlag, K., K. Sahn, and R. Amann. 2001. Quantitative molecular analysis of the microbial community in marine arctic sediments (Svalbard). *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:387–395.
  57. Risatti, J. B., W. C. Capman, and D. A. Stahl. 1994. Community structure of a microbial mat: the phylogenetic dimension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:10173–10177.
  58. Romanenko, V. I. 1964. Heterotrophic assimilation of CO<sub>2</sub> by bacterial flora of water. *Microbiology* **33**:610–614.
  59. Roslev, P., P. L. Madsen, J. B. Thyme, and K. Henriksen. 1998. Degradation of phthalate and di-(2-ethylhexyl)phthalate by indigenous and inoculated microorganisms in sludge-amended soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:4711–4719.
  60. Rothhauwe, J. H., K. P. Witzel, and W. Liesack. 1997. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:4704–4712.
  61. Sahn, K., B. J. MacGregor, B. B. Jorgensen, and D. A. Stahl. 1999. Sulphate reduction and vertical distribution of sulphate-reducing bacteria quantified by rRNA slot-blot hybridization in a coastal marine sediment. *Environ. Microbiol.* **1**:65–74.
  62. Schmid, M., U. Twachtman, M. Klein, M. Strous, S. Juretschko, M. Jetten, J. W. Metzger, K.-H. Schleifer, and M. Wagner. 2000. Molecular evidence for a genus-level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation. *Syst. Appl. Microbiol.* **23**:93–106.
  63. Schmid, M., S. Schmitz-Esser, M. Jetten, and M. Wagner. 2001. 16S-23S rDNA intergenic spacer and 23S rDNA of anaerobic ammonium oxidizing bacteria: implications for phylogeny and *in situ* detection. *Environ. Microbiol.* **3**:450–459.
  64. Small, J., D. R. Call, F. J. Brockman, T. M. Straub, and D. P. Chandler. 2001. Direct detection of 16S rRNA in soil extracts by using oligonucleotide microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:4708–4716.
  65. Speksnijder, A. G., G. A. Kowalchuk, K. Roest, and H. J. Laanbroek. 1998. Recovery of a *Nitrosomonas*-like 16S rDNA sequence group from freshwater habitats. *Syst. Appl. Microbiol.* **21**:321–330.
  66. Stahl, D. A., B. Flesher, H. R. Mansfield, and L. Montgomery. 1988. Use of phylogenetically based hybridization probes for studies of ruminal microbial ecology. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:1079–1084.
  67. Stephen, J. R., Y. J. Chang, S. J. Macnaughton, G. A. Kowalchuk, K. T. Leung, C. A. Flemming, and D. C. White. 1999. Effect of toxic metals on indigenous soil beta-subgroup proteobacterium ammonia oxidizer community structure and protection against toxicity by inoculated metal-resistant bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:95–101.
  68. Suzuki, M. T., and S. J. Giovannoni. 1996. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:625–630.
  69. Wagner, M., R. Amann, H. Lemmer, and K.-H. Schleifer. 1993. Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:1520–1525.
  70. Wagner, M., R. Amann, P. Kämpfer, B. Assmus, A. Hartmann, P. Hutzler, N. Springer, and K.-H. Schleifer. 1994. Identification and *in situ* detection of gram-negative filamentous bacteria in activated sludge. *Syst. Appl. Microbiol.* **17**:405–417.
  71. Wagner, M., G. Rath, R. Amann, H.-P. Koops, and K.-H. Schleifer. 1995. *In situ* identification of ammonia-oxidizing bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* **18**:251–264.
  72. Wagner, M., and A. Loy. 2002. Bacterial community composition and function in sewage treatment systems. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**:218–227.
  73. Wagner, M., A. Loy, R. Nogueira, U. Purkhold, N. Lee, and H. Daims. 2002. Microbial community composition and function in wastewater treatment plants. *Antonie Leeuwenhoek* **81**:665–680.
  74. Wallner, G., R. Amann, and W. Beisker. 1993. Optimizing fluorescent *in situ* hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry* **14**:136–143.
  75. Wang, R. F., M. L. Beggs, L. H. Robertson, and C. E. Cerniglia. 2002. Design and evaluation of oligonucleotide-microarray method for the detection of human intestinal bacteria in fecal samples. *FEMS Microbiol. Lett.* **213**:175–182.
  76. Whitby, C. B., G. Hall, R. Pickup, J. R. Saunders, P. Ineson, N. R. Parekh, and A. McCarthy. 2001. <sup>13</sup>C incorporation into DNA as a means of identifying the active components of ammonia-oxidizer populations. *Letts. Appl. Microbiol.* **32**:398–401.
  77. Wilson, K. H., W. J. Wilson, J. L. Radosevich, T. Z. DeSantis, V. S. Viswanathan, T. A. Kuczumski, and G. L. Andersen. 2002. High-density microarray of small-subunit ribosomal DNA probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:2535–2541.
  78. Wintzigerode, F., and U. B. Goebel. 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* **21**:213–229.
  79. Wuchter, C., S. Schouten, H. T. Boschker, and J. S. Sinninghe Damste. 2003. Bicarbonate uptake by marine Crenarchaeota. *FEMS Microbiol. Lett.* **219**:203–207.

# **H. PUBLIKATIONEN**

**VORTRÄGE**

**POSTER**



## PUBLIKATIONEN

1. **Adamczyk, J., M. Hesselsoe, N. Iversen, M. Horn, A. Lehner, P.H. Nielsen, M. Schloter, P. Roslev, and M. Wagner 2003.** The Isotope Array, a New Tool That Employs Substrate-Mediated Labeling of rRNA for Determination of Microbial Community Structure and Function. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(11): 6875-6887.
2. **Loy, A., A. Lehner, N. Lee, J. Adamczyk, H. Meier, J. Ernst, K.-H. Schleifer, and M. Wagner 2002.** Oligonucleotide microarray for 16S rRNA gene-based detection of all recognized lineages of sulfate-reducing prokaryotes in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**(10): 5064-5081.

## VORTRÄGE

1. **Lehner A., Loy A., Adamczyk J., Lee N., Schöpfer A., and Wagner M. 2001** Development of phylogenetic DNA Micro Arrays (PhyloChips) - Rapid tools for microbial community profiling and functional analysis. Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie e.V. (VAAM). Oldenburg, Germany, 25.-28. March 2001.
2. **Lehner A., Loy A., Adamczyk J., Lee N., Schöpfer A., Wagner M. 2001** Development and application of phylogenetic DNA-Microarrays (PhyloChips) for microbial community profiling and functional analysis. Ninth International Conference on Microbial Ecology (ISME-9). Amsterdam, Netherlands. 26.-31. August 2001.
3. **Adamczyk J., Purkhold U., Roslev P., Lehner A., Koops H.P., Hesselsoe M., Nielsen P.H., Schloter M., and Wagner M. 2002** Novel Microarray Tools to Investigate Ammonia Oxidizing Bacteria (AOB) in complex environments. Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie e.V. (VAAM). Göttingen, Germany. 24.-27. March 2002.
4. **Loy A., Adamczyk J., Lehner A., Lee N., Stubner S., Küsel K., Drake H., and Wagner M. 2002** The SRP-PhyloChip - a 16S rRNA gene-based oligonucleotide microarray as biodiversity screening tool for sulfate-reducing prokaryotes in the environment. Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie e.V. (VAAM). Göttingen, Germany. 24.-27. March 2002.

## POSTERPRÄSENTATIONEN

1. **Adamczyk, J., Beier, C., Daims, H., Horn, M., Juretschko, S., Klein, M., Lee, N., Lehner, A., Loy, A., Purkhold, U., Schlatter, B., Schmid, M., Schmid, M., Walcher, M., and Wagner, M. 2000** Molecular microbial ecology - exploring the unseen majority on planet earth. *BioLog 2000*, 2. Münchner Kongress für Biowissenschaften, München, Nov. 2000.
2. **Loy A., Adamczyk J., Lehner A., and Wagner M. 2001** Biodiversity of nitrifying and sulfate-reducing prokaryotes. *BIOLOG status report 2001 - German programme on biodiversity and global change*. Bonn, Germany. 05.-07. December 2001.
3. **Loy A., Lehner A., Adamczyk J., Schulz C., and Wagner M. 2002** rRNA-targeted oligonucleotide microarrays for identification of microorganisms in environmental and clinical samples. Late Summer Workshop, Pathogenomics - from Genes to Function. Würzburg, Germany. 29. September - 02. October 2002.



## DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Technischen Universität München unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Michael Wagner im Zeitraum von Februar 2000 bis April 2004 angefertigt.

An dieser Stelle möchte ich meinen Dank all jenen Personen aussprechen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. K.-H. Schleifer für die fundierte Ausbildung an seinem Lehrstuhl, sein Interesse und seine Unterstützung.

Herrn Prof. Michael Wagner, für sein Engagement, seine Unterstützung, die Myriaden von (durchführbaren und manchmal weniger durchführbaren) Ideen, und nicht zuletzt für seinen unkonventionellen Führungsstil, dank dem stets ein angenehmes Arbeitsklima herrschte.

Den „Wagners“, der stets (zahlenmäßig) fluktuierenden, bunten und aufgeschlossenen Gruppe: Marion, Uli, Angelika, Assi, Claudia, Cora, Lotte, Regina, Natuschka, Alex, Klein- und Big-Mike, Markus, Holgi, Stephan, Stefane; meinen „Wiener-WG-Jungs“: Matthias, Kilian und Basti, aber auch all den „neuen“ Wiener-Wagners..., kurz, einer Gruppe, mit der ich sowohl wissenschaftlich als auch privat eine aufregende Zeit verbracht habe.

Dem technischen Personal des Lehrstuhls für Mikrobiologie, insbesondere Frau Sibylle Schadhauer und Frau Helga Gaenge, für die Organisation, Krisenmanagement und die Unterstützung bei spannenden und manchmal auch weniger spannenden doch essentiellen Arbeiten.

Meinen „HiWis“ Julia Wopperer, Carmen Kramer und Tobias Schweinitzer, die stets tapfer zwischen meinen Parallelprojekten „mitjonglierten“.

Herrn Dr. Peter Roslev, Herrn Dr. Martin Hesselsoe und Herrn Prof. Per Nielsen von der Universität Aalborg in Dänemark für die Durchführung radioaktiver Markierungen, den wissenschaftlichen Austausch und meinen spannenden Forschungsaufenthalt in Aalborg.

Herrn Dr. Michael Schloter von der GSF in Neuherberg, für die Bereitstellung des  $\mu$ IMAGERS zu allen möglichen und unmöglichen Zeiten.

Herrn Prof. Hock und Herrn Martin Alberti (WZ Weihenstephan; TUM); Herrn Dr. Thomas Joos (NMI, Reutlingen) und Herrn Dr. Levente Bodrossy (ARC, Seibersdorf) für das zur Verfügung Stellen ihrer Arrayspotter.

Frau Prof. Ellen Kandeler (Universität Hohnheim) für die Bereitstellung der fraktionierten Bodenproben aus dem Julius-Kühn-Areal in Halle.

Herrn PD Dr. Leo Eberl und den „Eberls“ sowie Herrn Dr. Wolfgang Ludwig sowie den „Ludwigs“ für eine angenehme Zusammenarbeit am Lehrstuhl.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, die mich immer gefördert und unterstützt haben.

Meinen Freunden, die ich nicht selten vernachlässigt habe, und die trotzdem immer zu mir standen.

Mein besonderer Dank gilt Bassem, meinem Mann, dafür dass er immer für mich da war, für seine Engelsgeduld, sein Verständnis, und dafür, dass er mir in den scheinbar ausweglosen und hoffnungslosen Situationen immer Mut und Kraft gegeben hat, weiterzumachen.