

**Nitratreduktion, Denitrifikation und  
Dissimilatorische Nitritreduktion zu Ammonium  
in Grünland- und Waldböden:  
Populationen und Einflussfaktoren**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften

der Universität Bayreuth

vorgelegt von

Mirjam Selzer

Bayreuth, am 13. Januar 2016



Die vorliegende Arbeit wurde vom 01.08.2008 bis zum 12.01.2016 unter der Betreuung von Prof. Dr. Harold L. Drake am Lehrstuhl für Ökologische Mikrobiologie der Universität Bayreuth angefertigt.

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Dissertation eingereicht am: 13.01.2016

Zulassung durch die Promotionskommission: 20.01.2016

Wissenschaftliches Kolloquium: 21.04.2016

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Stefan Schuster

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Harold Drake (Erstgutachter)

Prof. Dr. Dirk Schüler (Zweitgutachter)

Prof. Dr. Konrad Dettner (Vorsitz)

Prof. Dr. Egbert Matzner



Diese Arbeit wurde finanziert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft  
(Fördernummer: DFG Dr310/5-1) sowie ein Stipendium der Frauenförderung  
(Aktenzeichen A 4515-I/3) der Universität Bayreuth.

Das Projekt fand im Rahmen des Schwerpunktprogramms SPP 1374  
'Biodiversitätsexploratorien' statt.



# I. Inhaltsverzeichnis

<b>II. Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>VI</b>
<b>III. Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>IX</b>
<b>IV. Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>XIII</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Der Boden.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Zusammensetzung.....	1
1.1.2 Der Boden als Habitat.....	2
1.1.3 Landnutzung.....	3
<b>1.2 Der biologische Stickstoffkreislauf.....</b>	<b>4</b>
<b>1.3 Nitratreduktion.....</b>	<b>6</b>
1.3.1 Der Stoffwechselweg.....	6
1.3.2 Die Regulation.....	9
1.3.3 Die Organismen.....	9
<b>1.4 Denitrifikation.....</b>	<b>9</b>
1.4.1 Der Stoffwechselweg.....	10
1.4.1.1 Nitritreduktion.....	11
1.4.1.2 NO-Reduktion.....	12
1.4.1.3 N <sub>2</sub> O-Reduktion.....	12
1.4.2 Alternative Wege der Denitrifikation.....	13
1.4.3 Die Regulation.....	14
1.4.4 Die Organismen.....	15
<b>1.5 Dissimilatorische Nitritreduktion zu Ammonium (DNRA).....</b>	<b>16</b>
1.5.1 Der Stoffwechselweg.....	17
1.5.2 Die Regulation.....	19
1.5.3 Die Organismen.....	20

## I. Inhaltsverzeichnis

<b>1.6 Das Treibhausgas N<sub>2</sub>O</b> .....	<b>23</b>
<b>1.7 Untersuchung der Diversität von Nitratreduzierern, Denitrifikanten und DNRA</b> ..	<b>24</b>
<b>1.8 Ziele</b> .....	<b>27</b>
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>29</b>
<b>2.1 Untersuchungsstandorte</b> .....	<b>29</b>
<b>2.2 Probenahme</b> .....	<b>31</b>
<b>2.3 Probenvorbereitung</b> .....	<b>33</b>
2.3.1 KCl-Extrakte.....	33
2.3.2 Wässrige Extrakte.....	33
<b>2.4 Analytische Methoden</b> .....	<b>33</b>
2.4.1 Bestimmung des pH-Wertes.....	33
2.4.2 Gravimetrische Wassergehalts- und Trockengewichtsbestimmung.....	34
2.4.3 Nitrat-, Nitrit- und Ammoniumbestimmung.....	34
2.4.4 Gaschromatographie.....	35
<b>2.5 Mikrobiologische Methoden</b> .....	<b>38</b>
2.5.1 Anaerobe Techniken.....	38
2.5.2 Medien und Lösungen.....	38
2.5.3 Anreicherung und Kultivierung.....	41
2.5.4 Diffusionskammern.....	43
2.5.5 Zellzahlbestimmung.....	45
2.5.5.1 Bestimmung der Zellzahlen der Nitratreduzierer.....	45
2.5.5.2 Einfluß des pH-Wertes auf die Denitrifikantenzellzahlen.....	46
2.5.6 Bestimmung der potentiellen Denitrifikationsraten in Abhängigkeit vom pH-Wert.....	47
<b>2.6 Molekularbiologische Methoden</b> .....	<b>48</b>
2.6.1 Isolierung von DNA.....	48
2.6.2 Reinigung von DNA.....	49
2.6.3 Fällung von DNA.....	49
2.6.4 Konzentrationsbestimmung von DNA.....	50

2.6.5 Gelelektrophorese.....	50
2.6.6 Enzymatische Modifikation.....	51
2.6.7 PCR.....	51
2.6.8 Analyse der terminalen Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (t-RFLP).....	54
2.6.9 Sangersequenzierung.....	55
2.6.9.1 Auswertung der Sequenzen aus der Sangersequenzierung.....	55
2.6.10 Pyrosequenzierung.....	56
2.6.10.1 Auswertung der Sequenzen aus der Pyrosequenzierung.....	57
<b>2.7 Berechnung taxonomischer Grenzwerte.....</b>	<b>59</b>
<b>2.8 Statistische Analysen.....</b>	<b>60</b>
2.8.1 Univariate Analysen.....	60
2.8.1.1 Mittelwert und Standardabweichung:.....	60
2.8.1.2 Varianzanalyse:.....	60
2.8.1.3 Weitere Tests:.....	61
2.8.2 Multivariate Analysen.....	61
2.8.2.1 Begriffserklärungen.....	61
2.8.2.2 Verwendete Ordinationsverfahren.....	63
2.8.2.3 Multivariate Analysen in dieser Arbeit.....	65
<b>2.9 Chemikalien und Enzyme.....</b>	<b>66</b>
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>67</b>
<b>3.1 Biogeochemische Eigenschaften der Böden.....</b>	<b>67</b>
3.1.1 pH-Werte .....	67
3.1.2 Wassergehalt .....	69
3.1.3 Nitratgehalt.....	70
<b>3.2 Abhängigkeit der potentiellen Denitrifikationsraten vom pH-Wert.....</b>	<b>71</b>
<b>3.3 Zellzahlen .....</b>	<b>77</b>
3.3.1 Zellzahlen der Nitratreduzierer.....	77
3.3.2 Einfluß des pH-Werts auf die Denitrifikantenzellzahlen.....	78

I. Inhaltsverzeichnis	
3.3.3 Statistische Analyse.....	81
<b>3.4 Isolierung von Nitratreduzierern, Denitrifikanten und DNRA.....</b>	<b>83</b>
3.4.1 Ansatz 1: Ansatz zur Isolierung von Denitrifikanten und DNRA aus CFU- Anreicherungen.....	83
3.4.2 Ansatz 2: Ansatz zur Isolierung von Denitrifikanten bei unterschiedlichen pH-Werten.....	85
3.4.3 Ansatz 3: Isolierung unter selektiven Bedingungen für oligophile Denitrifikanten und DNRA .....	86
3.4.4 Ansatz 4: Isolierung unter selektiven Bedingungen für ammonifizierende und denitrifizierenden Archaeen.....	88
3.4.5 Ansatz 5: Isolierung unter selektiven Bedingungen für grampositive Denitrifikanten und DNRA.....	90
3.4.6 Ansatz 6: Ansatz zur Isolierung von Denitrifikanten und DNRA aus Diffusionskammern.....	92
<b>3.5 Gemeinschaften von Nitratreduzierern, Denitrifikanten und DNRA.....</b>	<b>96</b>
3.5.1 Analyse der isolierten Nitratreduzierer, Denitrifikanten und DNRA.....	96
3.5.2 Analyse von <i>narG</i> -Genen.....	102
3.5.3 Analyse von <i>napA</i> -Genen.....	112
3.5.4 Analyse von <i>nrfA</i> -Genen.....	123
3.5.5 Analyse von <i>nirK</i> -Genen.....	131
3.5.6 Analyse von <i>nirS</i> -Genen.....	141
3.5.7 Analyse von <i>nosZ</i> -Genen.....	150
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>166</b>
<b>4.1 Abhängigkeit der potentiellen Denitrifikationsraten vom pH-Wert.....</b>	<b>166</b>
<b>4.2 Zellzahlen der Nitratreduzierer und Denitrifikanten.....</b>	<b>168</b>
<b>4.3 Isolierung von Nitratreduzierer, Denitrifikanten und DNRA.....</b>	<b>173</b>
4.3.1 Isolierung von Nitratreduzierern, Denitrifikanten und DNRA aus CFU- Anreicherungen.....	174

4.3.2 Isolierung von Denitrifikanten bei unterschiedlichen pH-Werten.....	175
4.3.3 Isolierung unter selektiven Bedingungen für oligophile Denitrifikanten und DNRA.	176
4.3.4 Isolierung unter selektiven Bedingungen für ammonifizierende und denitrifizierende Archaeen.....	177
4.3.5 Isolierung unter selektiven Bedingungen für grampositive Denitrifikanten und DNRA.....	180
4.3.6 Ansatz zur Isolierung von Denitrifikanten und DNRA aus Diffusionskammern.....	182
4.3.7 Zusammenfassung.....	184
<b>4.4 Gemeinschaften von Nitratreduzierern.....</b>	<b>185</b>
4.4.1 <i>narG</i> -Gemeinschaften.....	186
4.4.2 <i>napA</i> -Gemeinschaften.....	189
<b>4.5 Gemeinschaften von DNRA.....</b>	<b>192</b>
4.5.1 <i>nrfA</i> -Gemeinschaften.....	192
<b>4.6 Gemeinschaften von Denitrifikanten.....</b>	<b>197</b>
4.6.1 <i>nirK</i> -Gemeinschaften und <i>nirS</i> -Gemeinschaften.....	197
4.6.2 <i>nosZ</i> -Gemeinschaften.....	202
<b>4.7 Schlussfolgerungen.....</b>	<b>206</b>
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>209</b>
<b>6. Summary.....</b>	<b>211</b>
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>213</b>
<b>8. Anhang.....</b>	<b>250</b>
<b>9. Publikationen.....</b>	<b>256</b>
<b>10. Danksagung.....</b>	<b>259</b>
<b>11. (Eidesstattliche) Versicherungen und Erklärungen.....</b>	<b>260</b>

## II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Der biologische Stickstoffkreislauf. ....	5
Abbildung 2: Lage der drei Exploratorien in Deutschland. ....	29
Abbildung 3: Lage der Probenahmestellen innerhalb des untersuchten Quadrates auf den Flächen.....	32
Abbildung 4: Diffusionskammer zur Kultivierung von Umweltmikroorganismen. ....	44
Abbildung 5: Einfluss des pH-Werts auf die N <sub>2</sub> O-Bildungsraten in den Böden des Exploratoriums Schwäbische Alb.....	72
Abbildung 6: Einfluss des pH-Werts auf die N <sub>2</sub> O-Bildungsraten in den Böden des Exploratoriums Hainich. ....	74
Abbildung 7: Einfluss des pH-Werts auf die N <sub>2</sub> O-Bildungsraten in den Böden des Exploratoriums Schorfheide Chorin. ....	75
Abbildung 8: DCA der Zellzahlen von Nitratreduzierern und Denitrifikanten der verschiedenen Böden.....	82
Abbildung 9: Diffusionskammern nach zwölfwöchiger Inkubation. ....	92
Abbildung 10: Rarefaction-Kurve und 95 % Konfidenzbereiche der OTUs der 16S-rRNA-Gensequenzen auf Speziesebene.....	96
Abbildung 11: Übersicht über die prozentuale Zugehörigkeit der isolierten Bakterien zu Klassen.....	100
Abbildung 12: Phylogenetischer Stammbaum der 16S-rRNA-Gen-Sequenzen der Isolate. ....	101
Abbildung 13: Rarefaction-Kurve und 95 % Konfidenzbereiche der OTUs der <i>narG</i> - Gensequenzen auf Speziesebene.....	103
Abbildung 14: Übersicht über die Zuordnung der <i>narG</i> -besitzenden Bakterien zu taxonomischen Klassen.....	106
Abbildung 15: Phylogenetischer Stammbaum der <i>narG</i> -Sequenzen. ....	107

Abbildung 16: CCA der <i>narG</i> -Speziesdaten .....	110
Abbildung 17: DCA der <i>narG</i> -Speziesdaten. ....	111
Abbildung 18: Rarefaction-Kurve und 95 % Konfidenzbereiche der OTUs der <i>napA</i> - Gensequenzen auf Speziesebene.....	113
Abbildung 19: Übersicht über die Zugehörigkeit der <i>napA</i> -besitzenden Bakterien zu taxonomischen Klassen.....	117
Abbildung 20: Phylogenetischer Stammbaum der <i>napA</i> -Sequenzen. ....	118
Abbildung 21: CCA der <i>napA</i> -Speziesdaten .....	121
Abbildung 22: DCA der <i>napA</i> -Speziesdaten. ....	122
Abbildung 23: Rarefaction-Kurve und 95 % Konfidenzbereiche der OTUs der <i>nrfA</i> - Gensequenzen auf Speziesebene.....	123
Abbildung 24: Übersicht über die Zugehörigkeit der <i>nrfA</i> -besitzenden Bakterien zu taxonomischen Klassen.....	126
Abbildung 25: Phylogenetischer Stammbaum der <i>nrfA</i> -Sequenzen. ....	127
Abbildung 26: CCA der <i>nrfA</i> -Speziesdaten . ....	130
Abbildung 27: DCA der <i>nrfA</i> -Speziesdaten. ....	131
Abbildung 28: Rarefaction-Kurve und 95 % Konfidenzbereiche der OTUs der <i>nirK</i> - Gensequenzen auf Speziesebene.....	132
Abbildung 29: Phylogenetischer Stammbaum der <i>nirK</i> -Sequenzen. ....	135
Abbildung 30: Relative Fluoreszenzen der t-RFs amplifizierter, mit <i>Bsa</i> JI geschnittener <i>nirK</i> -Genfragmente.....	136
Abbildung 31: CCA der <i>nirK</i> -Speziesdaten .....	139
Abbildung 32: DCA der <i>nirK</i> -Speziesdaten. ....	140
Abbildung 33: Rarefaction-Kurve und 95 % Konfidenzbereiche der OTUs der <i>nirS</i> - Gensequenzen auf Speziesebene.....	141
Abbildung 34: Übersicht über die Zugehörigkeit der <i>nirS</i> -besitzenden Bakterien zu taxonomischen Klassen.....	144
Abbildung 35: Phylogenetischer Stammbaum der <i>nirS</i> -Sequenzen. ....	145

## II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 36: Relative Fluoreszenzen der t-RFs amplifizierter, mit <i>Bst</i> UI geschnittener <i>nirS</i> -Genfragmente. ....	146
Abbildung 37: DCA der <i>nirS</i> -Speziesdaten. ....	149
Abbildung 38: Rarefaction-Kurve und 95 % Konfidenzbereiche der OTUs der <i>nosZ</i> -Gensequenzen auf Spezialebene.....	150
Abbildung 39: Übersicht über die Zugehörigkeit der <i>nosZ</i> -besitzenden Bakterien zu taxonomischen Klassen.....	153
Abbildung 40: Phylogenetischer Stammbaum der <i>nosZ</i> -Sequenzen. ....	154
Abbildung 41: CCA der <i>nosZ</i> -Speziesdaten ....	157
Abbildung 42: DCA der <i>nosZ</i> -Speziesdaten. ....	158
Abbildung 43: Relative Fluoreszenzen der T-RFs amplifizierter, mit <i>Bsa</i> HI geschnittener <i>nosZ</i> -Genfragmente. ....	160
Abbildung 44: CCA der <i>nosZ</i> -Speziesdaten ....	163
Abbildung 45: DCA der <i>nosZ</i> -Speziesdaten. ....	164
Abbildung 46: Nitratreduktion, Denitrifikation und DNRA in Grünland- und Waldböden: Bakterienklassen und Einflussfaktoren. ....	206

### III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung mikrobieller Gattungen, die DNRA enthalten.....	21
Tabelle 2: Übersicht über Lage, Bodentyp und Landnutzung der in dieser Arbeit untersuchten Böden.....	30
Tabelle 3: Verwendete Geräte und Parameter der gaschromatographischen Messungen.....	36
Tabelle 4: Bunsenscher Löslichkeitskoeffizient $\alpha$ für die gemessenen Gase in Wasser bei 20 °C und 25 °C.....	38
Tabelle 5: Stammlösungen zur Herstellung von Mineralmedium für Denitrifikanten.....	39
Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete Abwandlungen des anoxischen Mineralmediums für Denitrifikanten und des TSA-Mediums.....	40
Tabelle 7: Als Inokulum verwendete Verdünnungsstufen und Menge der zugegebenen KNO <sub>2</sub> -Lösung.....	45
Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete Primer und ihre Konzentration im Reaktionsansatz.....	52
Tabelle 9: PCR-Programme zur Amplifikation struktureller Gene.....	53
Tabelle 10: PCR-Programme zur Amplifikation bakterieller und archaeeller 16S rRNA- Gene.....	54
Tabelle 11: Primeranhänge zur Codierung der Böden in der Pyrosequenzierung.....	57
Tabelle 12: In dieser Arbeit verwendete taxonomische Grenzwerte. ....	59
Tabelle 13: pH-Werte der Böden in wässrigen Extrakten und KCl-Extrakten.....	68
Tabelle 14: Wassergehalt der Böden.....	70
Tabelle 15: Nitratgehalt der Böden.....	71
Tabelle 16: <i>In situ</i> -pH-Werte und maximale potentielle Denitrifikationsrate der Böden. ....	76
Tabelle 17: Zellzahlen der Nitratreduzierer in den Böden .....	78
Tabelle 18: Zellzahlen der Denitrifikanten in Medien mit unterschiedlichem pH-Wert. ....	79

### III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 19: Variation und Varianz der Zusammensetzung der Nitratreduzierer- und Denitrifikantenzellzahlen der Böden. ....	81
Tabelle 20: Korrelation der Bakteriengemeinschaften und der Bodeneigenschaften.....	82
Tabelle 21: Mit dem Ansatz zur Isolierung von Nitratreduzierern, Denitrifikanten und DNRA aus CFU-Anreicherungen erhaltene Isolate. ....	84
Tabelle 22: Mit dem Ansatz zur Isolierung von Denitrifikanten bei unterschiedlichen pH-Werten erhaltene Isolate.....	86
Tabelle 23: Mit dem Ansatz zur Isolierung unter selektiven Bedingungen für oligophile Denitrifikanten und DNRA erhaltene Isolate.....	87
Tabelle 24: Mit dem Ansatz zur Isolierung unter selektiven Bedingungen für ammonifizierende und denitrifizierende Archaeen erhaltene Isolate. ....	89
Tabelle 25: Mit dem Ansatz zur Isolierung unter selektiven Bedingungen für grampositive Denitrifikanten und DNRA erhaltene Isolate. ....	91
Tabelle 26: Aus den Diffusionskammern bei anoxischer Inkubation erhaltene Isolate. ....	93
Tabelle 27: Aus den Diffusionskammern durch oxische Inkubation erhaltene Isolate. ....	95
Tabelle 28: Diversitätsindices der Böden basierend auf 16S-rRNA-Gensequenzen der Isolate. ....	97
Tabelle 29: Zuordnung aller erhaltener Isolate in OTUs und Taxonomische Zuordnung der OTUs auf Speziesebene. ....	98
Tabelle 30: Diversitätsindices der Böden basierend auf den <i>narG</i> -Gensequenzen.....	104
Tabelle 31: Ähnlichkeit der translatierten Referenzsequenzen der OTUs auf Spezies-ebene zu translatierten <i>narG</i> -Gensequenzen kultivierter Organismen. ....	105
Tabelle 32: Variation und Varianz der Spezieszusammensetzung der <i>narG</i> -Gensequenzen aus den Böden. ....	108
Tabelle 33: Korrelation der <i>narG</i> -Bakteriengemeinschaften und der Bodeneigenschaften.....	109
Tabelle 34: Korrelation der <i>narG</i> -Bakteriengemeinschaften mit den Umweltvariablen pH-Wert und Vegetationstyp.....	109

Tabelle 35: Diversitätsindices der Böden basierend auf <i>napA</i> -Gensequenzen. ....	114
Tabelle 36: Ähnlichkeit der translatierten Referenzsequenzen der OTUs auf Spezies- ebene zu translatierten <i>napA</i> -Gensequenzen kultivierter Organismen. ....	115
Tabelle 37: Variation und Varianz der Spezieszusammensetzung der <i>napA</i> - Gensequenzen aus den Böden. ....	119
Tabelle 38: Korrelation der <i>napA</i> -Bakteriengemeinschaften und der Bodeneigenschaften.....	119
Tabelle 39: Korrelation der <i>napA</i> -Bakteriengemeinschaften mit den Umweltvariablen Vegetationstyp, pH-Wert und Ammoniumgehalt.....	120
Tabelle 40: Diversitätsindices der Böden basierend auf <i>nrfA</i> -Gensequenzen. ....	124
Tabelle 41: Ähnlichkeit der translatierten Referenzsequenzen der OTUs auf Spezies- ebene zu translatierten <i>nrfA</i> -Gensequenzen kultivierter Organismen. ....	125
Tabelle 42: Variation und Varianz der Spezieszusammensetzung der <i>nrfA</i> - Gensequenzen aus den Böden. ....	128
Tabelle 43: Korrelation der <i>nrfA</i> -Bakteriengemeinschaften und der Bodeneigenschaften.....	128
Tabelle 44: Korrelation der <i>nrfA</i> -Bakteriengemeinschaften mit den Umweltvariablen Vegetationstyp, pH-Wert und Kohlenstoffgehalt.....	129
Tabelle 45: Diversitätsindices der Böden basierend auf den <i>nirK</i> -Gensequenzen. ....	132
Tabelle 46: Ähnlichkeit der translatierten Referenzsequenzen der OTUs auf Spezies- ebene zu translatierten <i>nirK</i> -Gensequenzen kultivierter Organismen. ....	133
Tabelle 47: Variation und Varianz der Spezieszusammensetzung der <i>nirK</i> - Gensequenzen aus den Böden. ....	137
Tabelle 48: Korrelation der <i>nirK</i> -Bakteriengemeinschaften und der Bodeneigenschaften.....	137
Tabelle 49: Korrelation der <i>nirK</i> -Bakteriengemeinschaften mit den Umweltvariablen Vegetationstyp, pH-Wert, Wasser- und Ammoniumgehalt.....	138
Tabelle 50: Diversitätsindices der Böden basierend auf den <i>nirS</i> -Gensequenzen.....	142

### III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 51: Ähnlichkeit der translatierten Referenzsequenzen der OTUs auf Spezies- ebene zu translatierten <i>nirS</i> -Gensequenzen kultivierter Organismen. ....	143
Tabelle 52: Variation und Varianz der Spezieszusammensetzung der <i>nirS</i> - Gensequenzen aus den Böden.....	148
Tabelle 53: Korrelation der <i>nirS</i> -Bakteriengemeinschaften und der Bodeneigenschaften.....	148
Tabelle 54: Diversitätsindices der Böden basierend auf den <i>nosZ</i> -Gensequenzen.....	151
Tabelle 55: Ähnlichkeit der translatierten Referenzsequenzen der OTUs auf Spezies- ebene zu translatierten <i>nosZ</i> -Gensequenzen kultivierter Organismen. ....	152
Tabelle 56: Variation und Varianz der Spezieszusammensetzung der <i>nosZ</i> - Gensequenzen aus den Böden. ....	155
Tabelle 57: Korrelation der <i>nosZ</i> -Bakteriengemeinschaften und der Bodeneigenschaften.....	156
Tabelle 58: Korrelation der <i>nosZ</i> -Bakteriengemeinschaften mit den Umweltvariablen Vegetationstyp und pH-Wert.....	156
Tabelle 59: Variation und Varianz der Spezieszusammensetzung der <i>nosZ</i> - Gensequenzen aus den Böden. ....	161
Tabelle 60: Korrelation der <i>nosZ</i> -Bakteriengemeinschaften und der Bodeneigenschaften.....	161
Tabelle 61: Korrelation der <i>nosZ</i> -Bakteriengemeinschaften mit den Umweltvariablen Vegetationstyp, pH-Wert, Ammoniumgehalt und Wassergehalt.....	162
Tabelle 62: Verteilung der OTUs der Isolate auf die einzelnen Böden.....	249
Tabelle 63: Verteilung der <i>narG</i> -OTUs auf Speziesebene auf die einzelnen Böden.....	250
Tabelle 64: Verteilung der <i>napA</i> -OTUs auf Speziesebene auf die einzelnen Böden.....	251
Tabelle 65: Verteilung der <i>nrfA</i> -OTUs auf Speziesebene auf die einzelnen Böden.....	251
Tabelle 66: Verteilung der <i>nirK</i> -OTUs auf Speziesebene auf die einzelnen Böden.....	252
Tabelle 67: Verteilung der <i>nirS</i> -OTUs auf Speziesebene auf die einzelnen Böden.....	252
Tabelle 68: Verteilung der <i>nosZ</i> -OTUs auf Speziesebene auf die einzelnen Böden.....	253

## IV. Abkürzungsverzeichnis

A. dest	destilliertes Wasser
AEG	Grünlandboden des Exploratoriums Schwäbischen Alb
AEW	Waldboden des Exploratoriums Schwäbischen Alb
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BLAST	'Basic Local Alignment Search Tool'
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
ca.	circa
CA	Korrespondenzanalyse
CCA	Kanonische Korrespondenzanalyse
CFU	'colony forming unit': Koloniebildende Einheit
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
DCA	'Detrended' Korrespondenzanalyse
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DGGE	Differentielle Gradientengelelektrophorese
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNRA	Dissimilatorische Nitritreduktion zu Ammonium Dissimilatorische Nitritreduzierer zu Ammonium
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	'et alteri': und andere
g	Erdbeschleunigung
GPS	Global Positioning System
HEG	Grünlandboden des Exploratoriums Hainich
HEW	Waldboden des Exploratoriums Hainich
H <sub>2</sub> O	Wasser
IRD	'infrared dye': Markierung mit Infrarot-Farbstoff
kb	Kilobasenpaare

#### IV. Abkürzungsverzeichnis

KCl	Kaliumchlorid
kPa	Kilopascal
Mg	Magnesium
MPN	'most probable number' (wahrscheinlichste Keimzahl)
N	Stickstoff
N <sub>2</sub>	molekularer Stickstoff
Na	Natrium
Nap	periplasmatische Nitratreduktase
Nar	cytoplasmatische Nitratreduktase
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Ammonium
Nir	Nitritreduktase
NO	Stickstoffmonoxid
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrit
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrat
N <sub>2</sub> O	Distickstoffoxid, Lachgas
Nor	NO-Reduktase
Nos	N <sub>2</sub> O-Reduktase
Nrf	Cytochrom c-Nitritreduktase
O <sub>2</sub>	molekularer Sauerstoff
OD	optische Dichte
OTU	'Operational Taxonomic Unit': künstliche taxonomische Einheit
p	Wahrscheinlichkeitsmaß
PCR	'polymerase chain reaction': Polymerasekettenreaktion
pH	pondus hydrogenii; negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SD	'standard deviation': Standardabweichung
SEG	Grünlandboden des Exploratoriums Schorfheide Chorin
SEW	Waldboden des Exploratoriums Schorfheide Chorin
TG	Trockengewicht
t-RFLP	terminaler Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

#### IV. Abkürzungsverzeichnis

U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
z.B.	zum Beispiel
°C	Grad Celsius
%	Prozent
Ø	Durchmesser



# 1. Einleitung

## 1.1 Der Boden

Der Boden ist der belebte oberste Teil der Erdkruste. Er wird nach unten hin von der Lithosphäre und nach oben hin von der Atmosphäre begrenzt (Simonson, 1959). Es gibt zwei große Gruppen von Böden: Mineralböden und organische Böden. Erstere entstehen durch die Verwitterung von Gestein und anderem anorganischem Material (z.B. Braunerden), letztere durch die Sedimentation von organischem Material (z.B. Moore). Die wichtigsten Faktoren für die Entstehung von Böden sind Ausgangsgestein, Klima (Wasser), Relief, Zeit, Flora und Fauna sowie menschlicher Einfluss (Schlichting, 1986). Diese Faktoren bedingen die Bodenbildungsprozesse Verwitterung und Mineralisierung, Zersetzung und Humifizierung sowie Gefügebildung und Stoffumlagerungen (Marbut, 1951).

### 1.1.1 Zusammensetzung

Böden bestehen aus anorganischen Mineralen und organischem Humus (Simonson, 1959). Der anorganische Teil der Böden entsteht aus dem verwitterten Ausgangsgestein und besteht aus Partikeln verschiedener Größe (Ton, Schluff und Sand) (Nikiforoff, 1959), deren Zusammensetzung als Bodentextur bezeichnet wird. Dabei haben Tonpartikel die größte Reaktionsfähigkeit in Böden. Durch ihre negativ geladene Oberfläche binden sie Kationen, darunter auch solche, die als Nährstoffe für Pflanzen und Mikroorganismen dienen. Dies macht Böden mit einem hohen Gehalt an Tonmineralen besonders fruchtbar (Whitney, 1921). Der organische Humus, die tote organische Substanz des Bodens,

## 1. Einleitung

besteht aus Streustoffen und Huminstoffen. Streustoffe sind nur leicht umgewandelte Pflanzenstoffe und Bodenorganismen bei denen die Gewebestrukturen noch erkennbar sind (Kögel-Knabner *et al.*, 1988). Sie haben eine kurze Verweildauer im Boden und bestehen hauptsächlich aus Lipiden, Proteinen, Polysacchariden und Lignin. Durch weitere Umwandlung der Streustoffe entstehen die Huminstoffe (Kögel-Knabner *et al.*, 1988), welche aufgrund ihrer hochmolekularen Struktur nur sehr langsam abgebaut werden (Macura, 1974). Bei den Huminstoffen handelt es sich um ein Stoffgemisch, dessen Zusammensetzung räumlich und zeitlich variiert (Macura, 1974).

Die anorganischen Partikel verschiedener Größe werden durch kolloidale organische Stoffe und Pflanzenwurzeln zusammengehalten und bilden so Aggregate (Forster, 1990). Die dreidimensionale Anordnung verschiedener Aggregate im Raum ergibt das Bodengefüge. Dieses besteht aus der festen Bodensubstanz und Poren verschiedener Größe (Nikiforoff, 1959), die mit Bodenlösung (Wasser und gelösten Stoffen) (Whitney, 1921) sowie Bodenluft gefüllt sind. Das Porenvolumen hängt hauptsächlich von Größe, Form und Stabilität der Aggregate ab (Wu *et al.*, 1990).

### 1.1.2 Der Boden als Habitat

Böden sind immer belebt. Die Bodenlebewesen spielen eine große Rolle bei der Bodenentwicklung und für die Stabilität der Bodenstruktur. Umgekehrt hat die Bodenstruktur einen großen Einfluss auf die Bodenlebewesen (Oades, 1993). Im Oberboden besteht die Biomasse zu 80 % aus Pilzen, 10 % sind Bakterien und die restlichen 10 % Tiere (Shields *et al.*, 1973). Bodenbakterien spielen eine große Rolle beim Abbau von pflanzlichen und tierischen Resten zu organischer Substanz und zu Nährstoffen, welche dann in den Boden abgegeben werden (Wardle *et al.*, 2004). Als größte Quelle der Erde für organischen Kohlenstoff sind Böden ein wichtiges Habitat für Prokaryoten (Whitman *et*

*al.*, 1998). In einem Quadratmeter Boden befinden sich zwischen  $6 \times 10^{13}$  und  $3,5 \times 10^{15}$  prokaryotische Zellen (Whitman *et al.*, 1998).

Böden sind ein sehr komplexes und heterogenes Habitat, sowohl zeitlich als auch räumlich gesehen. Der Wassergehalt, der sich in kürzester Zeit sehr stark ändern kann, schwankt zwischen Sättigung und Trockenheit (Daniel, 2005). Er beeinflusst die Salzkonzentration ebenso wie die Konzentrationen und den Transport von Gasen und Nährstoffen. Auch die Bodentemperatur variiert im Laufe eines Jahres oder im Oberboden auch innerhalb kürzester Zeit (z.B. bei Sonneneinstrahlung) sehr stark. Diese Heterogenität macht den Boden zu einem extrem dynamischen Habitat (Ettema und Wardle, 2002).

Bedingt durch ihre Struktur bestehen Böden aus einer Vielzahl von Mikrohabitaten. Für Mikroorganismen sind die wichtigsten die Rhizosphäre, die Oberfläche von Aggregaten und das Innere von Poren. Letztere enthalten oft sowohl Wasser als auch Luft (Young und Crawford, 2004), wodurch sich oxische und anoxische Mikrohabitate im Boden bilden, die sich mit dem Wassergehalt ändern (Hattori, 1977). Die meisten Mikroorganismen im Boden sind an Tonminerale angeheftet (Foster, 1988). Ihre Verteilung und ihr Metabolismus werden direkt durch die Verfügbarkeit von Wasser und Nährstoffen beeinflusst (Daniel, 2005).

### **1.1.3 Landnutzung**

Landnutzung bezeichnet den Gebrauch von Böden und Landflächen durch den Menschen. Dabei unterscheidet man Landnutzungsklassen durch den Vegetationstyp (z.B. Siedlungsfläche, Grünland, Laub -und Mischwald, Wasserfläche) und Landnutzungsintensität (intensiv, extensiv oder nachhaltig).

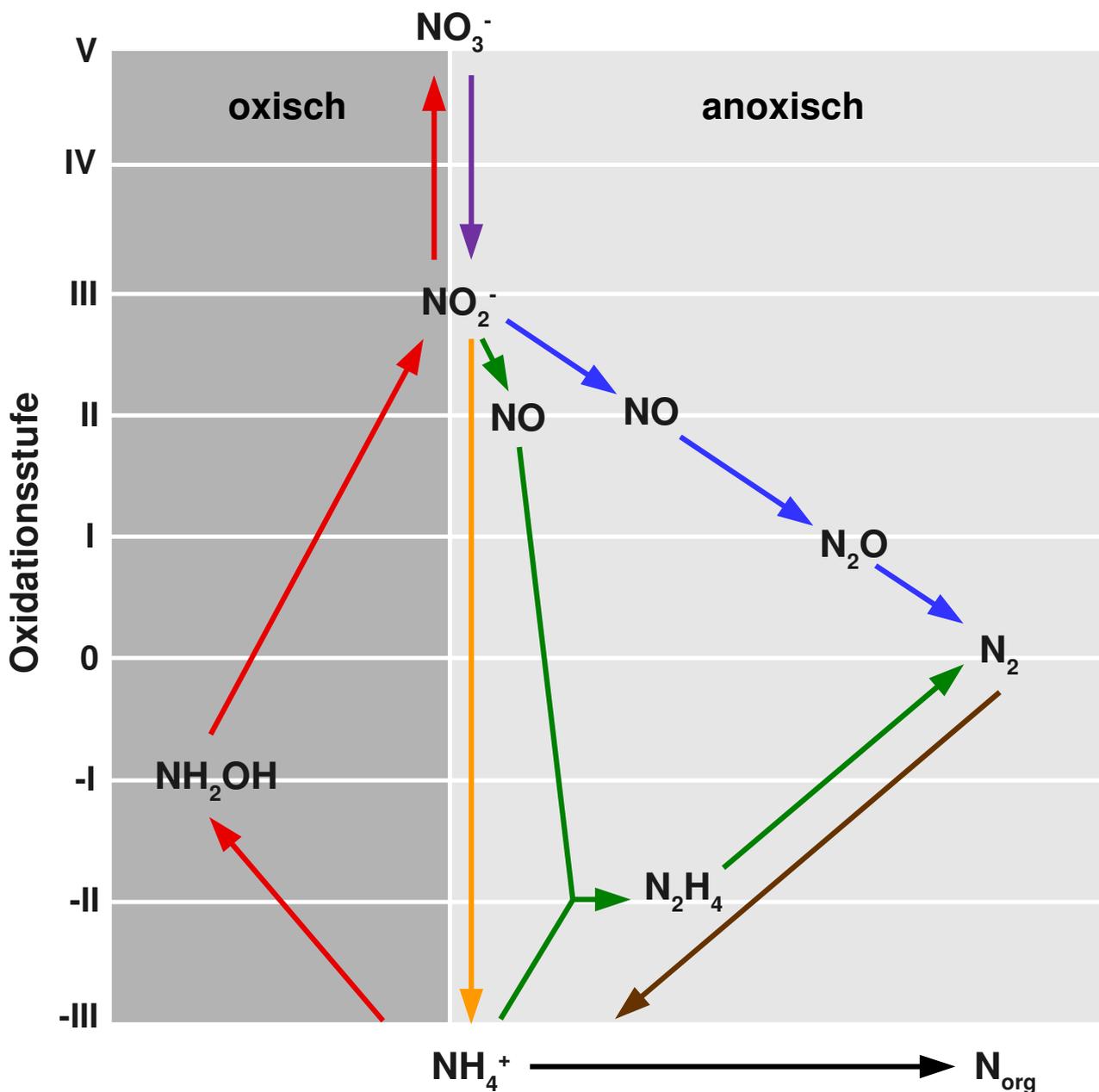
## 1. Einleitung

Als Substrat für Pflanzen war der Boden indirekt schon immer wichtig für den Menschen. Mit der Entwicklung der Landwirtschaft wurde der Mensch unmittelbar abhängig von der Bodenqualität (McNeill und Winiwarter, 2004). Schon früh wurde daher versucht die Produktivität von Böden zu verbessern und Erosion sowie Nährstoffverarmung entgegenzuwirken. Die Art der Landnutzung und ihre Intensität haben sich dadurch seit der Zeit der neolithischen Bauern stetig verändert. So wurden in Deutschland Laubwälder, die die natürliche Vegetation darstellen, größtenteils durch Wirtschaftswälder ersetzt und Grünländer entweder aufgegeben oder intensiver genutzt (Poschlod *et al.*, 2005). Die Veränderung der Landnutzung ist die wichtigste Ursache für aktuelle Veränderungen von Biodiversität sowie Ökosystemprozessen und -leistungen (Sala *et al.*, 2000).

## 1.2 Der biologische Stickstoffkreislauf

Stickstoff ist als Bestandteil von Proteinen und Nukleinsäuren für alle Organismen ein essentielles Element (Ollivier *et al.*, 2011). Seine Abundanz im Boden ist korreliert mit der Produktivität desselben (Dalton und Mortenson, 1972). Stickstoff ist nur in seiner anorganischen Form als Ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) und Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) für Pflanzen verfügbar. Er kommt jedoch hauptsächlich als Stickstoffgas ( $\text{N}_2$ ) in der Luft und als Bestandteil organischen Materials vor.

Molekularer Stickstoff aus der Luft wird von stickstofffixierenden Prokaryoten zu Ammonium reduziert (**Stickstofffixierung**; Beijerinck, 1888). Dieses kann dissimilatorisch durch Nitrifikation zu Nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) und dann Nitrat oxidiert werden (Winogradskij, 1890).



**Abbildung 1: Der biologische Stickstoffkreislauf.**

Violett: Nitratreduktion, blau: Denitrifikation; braun: Stickstofffixierung; rot: Nitrifikation; grün: Anaerobe Ammoniumoxidation (Anammox); orange: Dissimilatorische Nitritreduktion zu Ammonium (DNRA); schwarz: Ammoniumassimilation. Schema nach (Canfield *et al.*, 2010); (Pauleta *et al.*, 2013), verändert.

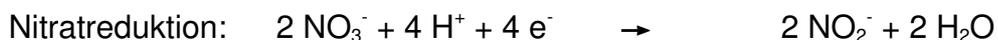
Sowohl Ammonium als auch Nitrat können von Pflanzen und Mikroorganismen aufgenommen und in organische Form überführt werden (**Assimilation von Ammonium/Nitrat**). Nitrat wird dabei assimilatorisch über Nitrit zu Ammonium reduziert, welches in Aminosäuren eingebaut wird. Unter anoxischen Bedingungen wird Nitrat auch

## 1. Einleitung

von vielen Mikroorganismen dissimilatorisch zu Nitrit reduziert (**Nitratreduktion**, Gayon und Dupetit, 1886). Dieses kann weiter zu Ammonium (**Dissimilatorische Nitritreduktion zu Ammonium, DNRA**; Cole und Brown, 1980) oder zu Stickstoffmonoxid (NO), Distickstoffoxid (N<sub>2</sub>O) und zuletzt zu molekularem Stickstoff weiterreduziert werden (**Denitrifikation**; Gayon und Dupetit, 1886). Unter strikt anoxischen Bedingungen kann Nitrit auch mit Ammonium zu molekularem Stickstoff oxidiert werden (**Anaerobe Ammoniumoxidation, Anammox**; Mulder *et al.*, 1995). Zusammengenommen bilden diese Prozesse den biologischen Stickstoffkreislauf (s. Abbildung 1).

## 1.3 Nitratreduktion

Nitrat ist, neben Ammonium, die in der Umwelt am weitesten verbreitete Stickstoffspezies. Die dissimilatorische Reduktion von Nitrat zu Nitrit unter sauerstofflimitierten Bedingungen ist daher unter Mikroorganismen weit verbreitet (Philippot, 2005). Ein Großteil der Nitratreduzierer reduziert das gebildete Nitrit weiter zu Ammonium oder zu NO, N<sub>2</sub>O und N<sub>2</sub> (Philippot, 2005). Viele Nitratreduzierer sind also auch DNRA oder Denitrifikanten. Die Nitratreduktion kann zur Energiekonservierung und zur Regeneration von Reduktionsäquivalenten genutzt werden (Cole und Brown, 1980; Zumft, 1997).



### 1.3.1 Der Stoffwechselweg

Die Nitratreduktion wird von einer von zwei respiratorischen Nitratreduktasen katalysiert, die beide im gleichen Organismus vorkommen können. Manche Organismen dagegen besitzen zwei Isoenzyme der gleichen Nitratreduktase (Richardson *et al.*, 2001).

## 1. Einleitung

Die membrangebundene Nitratreduktase ist ein Heterotrimer und wird durch das *nar*-Gencluster codiert (Blasco *et al.*, 1990). Ihre katalytische  $\alpha$ -Untereinheit (NarG) ist etwa 140 kDa groß und enthält einen bis-Molybdopterin-Guanin-Dinukleotid (MGD)-Cofaktor, das aktive Zentrum, und ein [4Fe-4S]-Zentrum (Bertero *et al.*, 2003). Die 60 kDa große NarH-Untereinheit enthält ein [3Fe-4S]- und drei [4Fe-4S]-Zentren (Jormakka *et al.*, 2004). Die NarI-Untereinheit ist 25 kDa groß und enthält zwei Häm b-Cofaktoren (Chaudhry und MacGregor, 1983). Die löslichen Proteine NarG und NarH befinden sich im Cytoplasma und werden durch NarI in der Membran verankert (Ballard und Ferguson, 1988). Auf dessen Häm b-Cofaktoren werden Elektronen von Menachinol oder Ubichinol übertragen (Blasco *et al.*, 2001), wobei Protonen über die Membran transportiert und so ein elektrochemischer Gradient gebildet werden (Gamble *et al.*, 1975). Dieser Gradient kann die Bildung von ATP antreiben. Die Elektronen werden vom Häm über die Schwefel-Eisen-Zentren (von NarH zu NarG) zum MGD-Cofaktor transportiert, wo dann Nitrat unter Verwendung von zwei Protonen aus dem Cytoplasma zu Nitrit reduziert wird (Bertero *et al.*, 2003). Das *nar*-Operon umfasst außerdem das Gen *narJ*, welches das Chaperon NarJ codiert (Blasco *et al.*, 1998). Die membrangebundene Nitratreduktase wird unter anaeroben Bedingungen bei hohen Nitratkonzentrationen exprimiert (Potter *et al.*, 1999).

Die periplasmatische Nitratreduktase besteht aus der 90 kDa großen katalytischen Untereinheit NapA, welche einen MGD-Cofaktor und ein [4Fe-4S]-Zentrum enthält, und der 16 kDa großen Elektronen transferierenden Untereinheit NapB mit zwei Häm c-Cofaktoren (Coelho *et al.*, 2011). Beide Proteine werden vom *nap*-Gencluster codiert, das ebenfalls die Gene für *napC*, *napD*, *napG* und *napH* enthält. NapD ist ein Chaperon für NapA (Berks *et al.*, 1995b) und NapC, ein 25 kDa großes membrangebundenes Tetrahäm Cytochrom c (Roldan *et al.*, 1998). NapG ist ein 20 kDa großes periplasmatisches Protein mit vier [4Fe-4S]-Zentren und wird durch NapH, ein 32 kDa große Membranprotein mit zwei zum Cytoplasma hin gelegenen [4Fe-4S]-Zentren, in der Cytoplasmamembran

## 1. Einleitung

verankert (Brondijk *et al.*, 2004). NapH funktioniert außerdem als Ubichinolreduktase, die zwei Protonen transloziert. Dabei werden zwei Elektronen von NapH über die [4Fe-4S]-Zentren von NapG, Häm c in NapC und NapB über das [4Fe-4S]-Zentrum zum MGD-Cofaktor in NapA transportiert. Dort wird Nitrat zu Nitrit reduziert (Brondijk *et al.*, 2004). Beim Transport der Elektronen von NapG zu NapC werden zwei weitere Protonen transloziert und so ein elektrochemischer Gradient gebildet (Berks *et al.*, 1995a). Dieser Stoffwechselweg wird unter anaeroben Bedingungen bei niedrigen Nitratkonzentrationen verwendet (Potter *et al.*, 1999).

In Organismen denen die Gene für *napG* und *napH* fehlen, wird Menachinol von NapC oxidiert. Dabei werden zwei Protonen transloziert und zwei Elektronen zum Häm c in NapB über das [4Fe-4S]-Zentrum zum MGD-Cofaktor in NapA transportiert. Dort wird Nitrat unter Verwendung der beiden Protonen zu Nitrit reduziert (Berks *et al.*, 1995a). Bei diesem Prozess wird keine Energie konserviert, da kein Protonengradient etabliert wird. Hier wird die Nitratreduktion unter aeroben Bedingungen verwendet, um überschüssige Reduktionsequivalente zu eliminieren (Ellington *et al.*, 2002).

Nitratreduzierer, die auch denitrifizieren, können jede der beiden Nitratreduktasen besitzen (Zumft, 1997). In nitratreduzierenden DNRA kann die cytoplasmatische Nitratreduktase Nar in Verbindung mit jeder der beiden Nitritreduktasen vorkommen (s. Abschnitt 1.5.1). Die periplasmatische Nitratreduktase Nap dagegen wurde bisher nur in Verbindung mit der periplasmatischen Nitritreduktase NrfA nachgewiesen (Blasco *et al.*, 1990; Pope und Cole, 1982).

### 1.3.2 Die Regulation

Die Expression der *nap*-Gene ist bei Anwesenheit hoher Nitratkonzentrationen reprimiert. Unter diesen Bedingungen wird Nar synthetisiert, welche energieeffizienter ist aber keine hohe Affinität zu Nitrat hat (Philippot und Højberg, 1999). Bei geringen Nitratkonzentrationen jedoch wird Nap synthetisiert (González *et al.*, 2006). Das periplasmatische Enzym hat eine hohe Nitrataffinität und erfordert keinen Nitrattransport. Die Expression der *nap*-Gene wird auch durch hohe Nitritkonzentrationen induziert. Die Anwesenheit von Sauerstoff induziert manche periplasmatischen Nitratreduktasen, während andere reprimiert werden oder unbeeinflusst bleiben (Philippot und Højberg, 1999). Die cytoplasmatische Nitratreduktase dagegen wird durch geringe Sauerstoffkonzentrationen induziert (Moreno-Vivián *et al.*, 1999).

### 1.3.3 Die Organismen

Nitratreduzierer sind in der Umwelt weit verbreitet und sind in fast allen prokaryotischen Familien zu finden. Es wird geschätzt, dass 10 - 50 % aller Bakterien zur Nitratreduktion befähigt ist (Philippot und Germon, 2005). Nitratreduktion ist dabei nicht auf Bakterien und Archaeen beschränkt, sondern auch in Eukaryoten wie Protozoa (Finlay *et al.*, 1983) und Fungi (Zhou *et al.*, 2002) zu finden. Da die meisten Nitratreduzierer auch DNRA oder Denitrifikanten sind, findet sich auch die metabolische Vielfalt dieser Organismengruppen (s. Abschnitte 1.4.4 und 1.5.3) bei den Nitratreduzierern wieder.

## 1.4 Denitrifikation

Der Prozess, bei dem Nitrit zu molekularem Stickstoff abgebaut wird heißt Denitrifikation (Gayon und Dupetit, 1886). Er ist ein wichtiger Teil des Stickstoffzyklus, denn der durch

## 1. Einleitung

Fixierung in den Boden eingebrachte Stickstoff wird wieder in die Atmosphäre abgegeben. So wird der Stickstoffeintrag in den Boden- der Entzug des Stickstoffs aus der Luft- wieder ausgeglichen (Zumft, 2005). Dies geschieht durch Reduktion von Nitrit über die gasförmigen Intermediate Stickstoffmonoxid (NO) und Distickstoffmonoxid (N<sub>2</sub>O) zu molekularem Stickstoff (N<sub>2</sub>). Der Prozess findet unter anaeroben Bedingungen statt. Die Stickoxide dienen den denitrifizierenden Organismen als terminaler Elektronenakzeptor, wenn Sauerstoff für die aerobe Atmung nicht zur Verfügung steht. Dabei wird ein elektrochemischer Gradient über der Cytoplasmamembran gebildet und Energie durch Elektronentransportphosphorylierung konserviert.

### 1.4.1 Der Stoffwechselweg

Vollständige Denitrifikation erfolgt in drei Einzelreaktionen.



Nicht alle Denitrifikanten führen unter allen Umständen den kompletten Stoffwechselweg durch, obwohl die meisten dazu befähigt sind (Okereke, 1993). Es gibt jedoch auch Organismen, denen die Gene für die Nitrit- oder N<sub>2</sub>O-Reduktase fehlen (Yoshinari, 1980). Die Reduktion von Nitrit wird jedoch nur als Denitrifikation bezeichnet, wenn als Endprodukt gasförmiger Stickstoff (NO, N<sub>2</sub>O oder N<sub>2</sub>) gebildet und dabei Energie konserviert wird (Zumft, 1997). Die Nitratreduktion wird häufig als erster Schritt der Denitrifikation gezählt. Es gibt jedoch viele Organismen, die Nitrat reduzieren aber nicht denitrifizieren (s. Abschnitt 1.3). In der vorliegenden Arbeit wird daher die Nitratreduktion

als eigenständiger Stoffwechselweg betrachtet.

#### 1.4.1.1 Nitritreduktion

Der erste Schritt der Denitrifikation ist die Reduktion von Nitrit zu Stickstoffmonoxid durch eine im Periplasma lokalisierte Nitritreduktase. Es existieren zwei unterschiedliche Isoenzyme denitrifizierender Nitritreduktasen, nämlich Kupfer- und Cytochrom  $cd_1$ -Reduktasen, wobei fast alle Organismen allerdings nur eins von beiden Enzymen besitzen (Gräf *et al.*, 2014). Die Cytochrom  $cd_1$ -Reduktase kommt dabei deutlich häufiger vor als die Kupfer-Reduktase. Diese ist aber in einer größeren Anzahl von unterschiedlichen Taxa und ökologischen Nischen zu finden (Coyne *et al.*, 1989).

Die kupferabhängige Nitritreduktase wird durch das *nirK*-Gen codiert und ist ein Homotrimer, dessen Untereinheiten 40 kDa groß sind (Godden *et al.*, 1991). Jede Untereinheit enthält je ein Typ I- und Typ II-Kupferzentrum (Adman, 1995). Das Typ I-Zentrum transferiert ein Elektron zum Typ II-Zentrum, an welches dann ein Nitritmolekül bindet. Dieses wird anschließend protoniert und NO und Wasser werden freigesetzt (Murphy *et al.*, 2002).

Die Cytochrom  $cd_1$ -Nitritreduktase wird durch das *nirS*-Gen codiert und besteht aus zwei gleichen Untereinheiten, die jeweils ein Molekulargewicht von ca. 60 kDa haben. Jede Untereinheit enthält ein kovalent gebundenes Häm c, das Elektronen zu einem nicht-kovalent gebundenen Häm  $d_1$  transferiert (Fülöp *et al.*, 1995). An dessen nun reduziertes  $Fe^{2+}$ -Atom bindet das Nitrit-Stickstoffatom. Ein Elektron und zwei Protonen werden auf Nitrit transferiert. Dadurch werden Wasser und NO gebildet, welches vom oxidierten  $Fe^{3+}$ -Häm  $d_1$  (Fülöp *et al.*, 1995) dissoziiert.

## 1. Einleitung

### 1.4.1.2 NO-Reduktion

Die Reduktion von zwei Molekülen NO zu jeweils einem Molekül  $N_2O$  und  $H_2O$  unter Verbrauch von je zwei Protonen und Elektronen wird durch die NO-Reduktase katalysiert.

Die NO-Reduktase ist ein aus drei Untereinheiten bestehendes Membranprotein. Dessen große Untereinheit wird durch das *norB*-Gen codiert (Arai *et al.*, 1995) und hat ein Molekulargewicht von 35 kDa. Sie ist in der Cytoplasmamembran lokalisiert und enthält ein Häm b, ein Häm  $b_3$  sowie ein nicht hämgebundenes Eisenatom (Hino *et al.*, 2010). Dieses bildet zusammen mit dem Häm  $b_3$  das aktive Zentrum (Hendriks *et al.*, 1998). Die kleine Untereinheit wird codiert durch das *norC*-Gen (Arai *et al.*, 1995) und hat ein Molekulargewicht von 17 kDa (Hino *et al.*, 2010). Sie ist mit einer Domäne in der Membran verankert, während ihre zweite Domäne ins Periplasma reicht. Diese enthält ein Häm c, welches zwei Elektronen an das aktive Zentrum überträgt. Dort werden beide Eisenatome zu  $Fe^{2+}$  reduziert und an jedes bindet nun ein Molekül NO. Durch reduktive Kopplung der beiden NO-Moleküle entsteht  $N_2O$  (Collman *et al.*, 2008).

Einige Organismen denen Nitritreduktasen fehlen, exprimieren eine NO-Reduktase (qNor), die nur aus einer Untereinheit besteht. Deren einzige Funktion ist wahrscheinlich die Entgiftung, da größere Mengen an NO für Mikroorganismen toxisch sind (Büsch *et al.*, 2002).

### 1.4.1.3 $N_2O$ -Reduktion

Der letzte Schritt der vollständigen Denitrifikation ist die Reduktion von  $N_2O$  zu  $N_2$  und Wasser. Diese Reaktion verbraucht zwei Protonen und zwei Elektronen und wird durch die  $N_2O$ -Reduktase katalysiert. Die  $N_2O$ -Reduktase ist ein periplasmatisches Homodimer, welches durch das *nosZ*-Gen codiert wird (Viebrock und Zumft, 1988). Jedes Monomer

hat ein Molekulargewicht von 65 kDa und besteht aus zwei Domänen, von denen jede ein Kupfer-Zentrum enthält (Brown *et al.*, 2000). Die N-terminale Domäne bindet das katalytische CuZ-Zentrum, welches aus vier Kupfer-Ionen besteht, die ein verzerrtes Tetraeder bilden. Die C-terminale Domäne enthält ein CuA-Zentrum, welches aus zwei Kupfer-Ionen besteht und Elektronen zum CuZ-Zentrum des zweiten Monomers transloziert (Brown *et al.*, 2000). Dort bindet das Sauerstoffatom eines N<sub>2</sub>O-Moleküls an ein oxidiertes Kupfer-Ion. Von den anderen Kupfer-Ionen des CuZ-Zentrums werden zwei Elektronen werden auf das Sauerstoffatom übertragen. An dieses bindet ein Proton. Gleichzeitig verlagert sich das Elektronenpaar der N-O Bindung auf das Stickstoffatom und N<sub>2</sub> wird freigesetzt. Das immer noch an das Cu<sub>2</sub><sup>+</sup> gebundene Hydroxidion wird protoniert und Wasser freigesetzt (Brown *et al.*, 2000).

Nicht nur bei der Nitratreduktion, sondern auch bei den drei Schritten der Denitrifikation wird Energie konserviert. Dazu werden Elektronen aus (vorwiegend organischen) Elektronendonoren vom Chinonpool auf den Cytochrom bc<sub>1</sub>-Komplex oder Kupferproteine transferiert. Von dort werden die Elektronen auf die Nitrit-, NO- und N<sub>2</sub>O-Reduktasen übertragen (Dell'Acqua *et al.*, 2011; Fülöp *et al.*, 1995; Murphy *et al.*, 2002; Zumft, 2005). Dabei werden Protonen vom Cytoplasma ins Periplasma transportiert und so ein Protonengradient gebildet (Stouthamer *et al.*, 1982; Zumft, 2005).

### 1.4.2 Alternative Wege der Denitrifikation

Die aerobe Denitrifikation oder Co-Denitrifikation verwendet gleichzeitig Sauerstoff und Nitrat als terminalen Elektronenakzeptor. Dies erfolgt, wenn die Denitrifikationsgene bei höheren Sauerstoffkonzentrationen (bis 20 %) aktiviert werden. Das Verhältnis von N<sub>2</sub>O zu N<sub>2</sub> ist dabei größer als bei anaerober Denitrifikation (Thomas *et al.*, 1994). Aerobe Denitrifikation wird häufig von heterotrophen Nitrifikanten durchgeführt, die einen Großteil

## 1. Einleitung

ihrer Oxidationsprodukte direkt zu gasförmigen N-Oxiden reduzieren (Robertson *et al.*, 1989).

Die Nitrifizierer-Denitrifikation ist ein Weg der Nitrifikation, bei dem der Oxidation von Ammonium zu Nitrit die Reduktion von Nitrit zu  $N_2O$  und  $N_2$  folgt und der unter sauerstofflimitierten Bedingungen abläuft (Poth und Focht, 1985).

### 1.4.3 Die Regulation

Die Synthese des Denitrifikationssystems wird hauptsächlich durch geringe Sauerstoffkonzentration und die Anwesenheit reduzierbarer N-Oxide induziert. Die N-Oxid-Reduktasen werden sequenziell und zum großen Teil voneinander unabhängig reguliert. Die Nitrat- und  $N_2O$ -Reduktion können dabei sogar bei vollständiger Denitrifikation als unabhängige Prozesse ablaufen. Die Nitrit- und NO-Reduktion jedoch werden zusammen kontrolliert, um ein Akkumulieren der cytotoxischen Produkte Nitrit und NO zu verhindern. Sowohl die Nitrit- als auch die NO-Reduktase werden daher durch NO aktiviert (Zumft, 2005). Alle N-Oxid-Reduktasen werden von ihren Substraten und die Nitratreduktase zusätzlich von allen N-Oxiden induziert (Körner und Zumft, 1989).

Die Verfügbarkeit von organischem Kohlenstoff beeinflusst die Denitrifikationsaktivität sowohl direkt als Elektronendonator für die meist heterotrophen Denitrifikanten (Knowles, 1982), als auch indirekt durch Stimulation des Sauerstoffverbrauchs durch heterotrophe Organismen.

Weitere Faktoren, die die Denitrifikationsaktivität in Böden beeinflussen sind Wassergehalt, pH-Wert und Temperatur. Der Wassergehalt hat einen großen Einfluss auf die Diffusion und somit auf die Verfügbarkeit von Sauerstoff. Daher kann Denitrifikation im

Boden nur stattfinden, wenn mindesten 60 % des Porenraums mit Wasser gefüllt sind (van Cleemput, 1998). Die Denitrifikationsaktivität ist positiv korreliert mit dem pH-Wert. Bei niedrigen pH-Werten sind die N-Oxid-Reduktasen, besonders die N<sub>2</sub>O-Reduktase inhibiert. Dies bewirkt eine Abnahme der Denitrifikationsaktivität während gleichzeitig der relative N<sub>2</sub>O-Anteil an den gebildeten Endprodukten steigt (Wijler und Delwiche, 1954). Die Denitrifikationsraten nehmen mit sinkender Temperatur ab und das Verhältnis von N<sub>2</sub>O zu N<sub>2</sub> wird größer (van Cleemput, 1998).

### 1.4.4 Die Organismen

Die ersten Denitrifikanten wurden 1886 isoliert (Gayon und Dupetit, 1886; Payne, 1973) und bis heute wurden mehr als 60 Gattungen denitrifizierender Mikroorganismen isoliert (Auflistung in Philippot *et al.*, 2007). Bei den Bakterien sind sie unter den Proteobacteria verbreitet, finden sich aber auch in den Actinobacteria, Aquificae, Bacteroides und Firmicutes (Übersicht in Shapleigh, 2006). Es gibt aber auch Denitrifikanten unter den halophilen und extrem thermophilen Eury- und Crenarchaeota (Übersicht in Cabello *et al.*, 2004) und niederen Eukaryoten wie Ciliata (Finlay *et al.*, 1983), Foraminifera (Risgaard-Petersen *et al.*, 2006) und Fungi (Shoun und Tanimoto, 1991).

Die Gruppe der Denitrifikanten zeichnet sich durch metabolische Vielfalt aus. Sie sind zum großen Teil heterotroph und verwenden Zucker und Fettsäuren als Kohlenstoff- und Energiequelle. Es gibt jedoch auch autotrophe Denitrifikanten, die anorganische Schwefelverbindungen, Eisencarbonat, Wasserstoff, Ammonium oder Nitrit als Elektronendonoren verwenden (Übersicht in Zumft, 1997). Viele Denitrifikanten führen Photosynthese, Stickstofffixierung, anaeroben Abbau von Aromaten (Übersicht in Zumft, 1997) oder auch Nitrifikation durch (Robertson *et al.*, 1989).

## 1. Einleitung

Denitrifikanten sind fakultative Aerobier, die nicht fermentieren und, wenn möglich, Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor nutzen (Übersicht in (Shapleigh, 2006)). Bisher sind nur wenige obligat anaerobe Denitrifikanten, wie *Thiomicrospira denitrificans* (Timmer-Ten Hoor, 1975) und *Azoarcus anaerobius* (Springer *et al.*, 1998), bekannt. *Magnetospirillum magnetotacticum* dagegen ist ein obligat aerober Denitrifikant (Bazylinsky und Blakemore, 1983).

Denitrifikanten sind in allen Ökosystemen- terrestrischen und aquatischen, gemäßigten und extremen- zu Hause. Dabei findet 78 % der globalen Denitrifikation in aquatischen und 32 % in terrestrischen Ökosystemen statt, 66 % in Böden und 34 % in Gewässern (Übersicht in Seitzinger *et al.*, 2006). In extremen Ökosystemen wie Salzseen und heißen Quellen wird Denitrifikation hauptsächlich von den dort vorherrschenden Archaeen durchgeführt (Übersicht in Cabello *et al.*, 2004). Die Denitrifikation ist der vorherrschende Prozess in elektronenarmen, anoxischen Ökosystemen mit hohen Nitratkonzentrationen (Tiedje *et al.*, 1982). Die Denitrifikanten sind eine der erfolgreichsten physiologischen Gruppen von Mikroorganismen. So machen sie etwa 20 % der anaeroben Bakterienpopulation aus (Tiedje *et al.*, 1982). Die am häufigsten aus Böden isolierten Denitrifikanten gehören zum Genus *Pseudomonas*. Dementsprechend sind *Pseudomonas stutzeri* und *Paracoccus denitrificans* die Organismen, in denen die Denitrifikation am häufigsten untersucht wurde (Gamble *et al.*, 1977).

## **1.5 Dissimilatorische Nitritreduktion zu Ammonium (DNRA)**

Nitrit kann auch dissimilatorisch zu Ammonium reduziert werden. Dieser Vorgang heißt Nitrit-Ammonifikation oder Dissimilatorische Nitritreduktion zu Ammonium (DNRA). Dieser Stoffwechselweg überführt Nitrit in eine biologisch besser verfügbare und weniger

bewegliche Form. Im Gegensatz zur Denitrifikation bewahrt er den Stickstoff im Ökosystem (Buresh und Patrick, 1978). Die DNRA erfolgt unter strikt anaeroben Bedingungen und kann zur Energiekonservierung und zur Regeneration von Reduktionsäquivalenten genutzt werden (Cole und Brown, 1980).



### 1.5.1 Der Stoffwechselweg

Die DNRA wird entweder durch eine cytoplasmatische (Nir) oder eine periplasmatische Nitritreduktase (Nrf) katalysiert. Es ist möglich, dass in Organismen nur eine oder auch beide Nitritreduktasen vorkommen (Blasco *et al.*, 1990; Pope und Cole, 1982).

Die cytoplasmatische NADH-abhängige Nitritreduktase (Nir) ist entweder ein einzelnes, großes Polypeptid (NirB) oder ein Heterodimer (NirBD). NirB hat ein Molekulargewicht von 90 kDa und enthält FAD, Eisen-Schwefel-Cluster und einen Sirohäm-Cofaktor (Harborne *et al.*, 1992). NirD hat ein Molekulargewicht von 12 kDa und enthält ein [2Fe-2S]-Cluster (Harborne *et al.*, 1992). Der Elektronendonator NADH reduziert den Chinonpool, von wo die Elektronen direkt auf die Nitritreduktase übertragen werden. Bei der NADH-abhängigen Nitritreduktion wird keine Energie konserviert. Sie dient der Entgiftung des bei der vorhergegangenen Nitratreduktion gebildeten Nitrits und, in Abwesenheit von Nitrat, der Regeneration des bei der Glykolyse gebildeten NADHs (Cole, 1996). Bisher wurde der Nir-Stoffwechselweg nur in einer kleinen Gruppe fakultativ anaerober Bakterien wie Darmbakterien, nitratreduzierenden *Bacilli* und *Staphylococcus carnosus* nachgewiesen (Mohan *et al.*, 2004).

Die formiatabhängige Nitritreduktase NrfA ist ein periplasmatisches Homodimer. Ein Monomer hat ein Molekulargewicht von 58 kDa (Simon *et al.*, 2000) und enthält 5 Häm c-

## 1. Einleitung

Cofaktoren, die in einer Gruppe angeordnet sind (Einsle *et al.*, 2000). Ein Häm ist dabei sehr nah zu seiner Entsprechung im zweiten Monomer angeordnet und interagiert mit diesem. Ein weiteres Häm jedes Monomers befindet sich im aktiven Zentrum (Einsle *et al.*, 2000). Das Eisenatom dieses Häms bindet das Stickstoffatom eines Nitritmoleküls. Bei der Reduktion von Nitrit entstehen NO und Hydroxylamin (NH<sub>2</sub>OH) als Intermediate, die jedoch nicht freigesetzt werden (Einsle *et al.*, 2000).

Es gibt zwei verschiedene *nrf*-Gencluster. In Delta- und Epsilonproteobacteria, Bacteroidia und Clostridia liegt ein *nrfAHIJ*-Operon (Simon *et al.*, 2000), in Gammaproteobacteria dagegen ein *nrfABCDEFG*-Operon vor (Hussain *et al.*, 1994).

Das *nrfH*-Gen codiert für ein membrangebundenes Tetrahäm-Cytochrom c. NrfH ist ein NapC-Homolog mit einem Molekulargewicht von 22 kDa und vier Häm c-Gruppen (Simon *et al.*, 2000). Es leitet Elektronen vom Chinonpool zu NrfA, mit dem es einen Membrankomplex bildet (Simon *et al.*, 2000). NrfI katalysiert den Häm-Einbau in NrfA (Kern *et al.*, 2010; Simon *et al.*, 2000).

Das *nrf*-Operon der Gammaproteobacteria codiert zusätzlich zu NrfA die drei Elektronentransferproteine NrfB, NrfC und NrfD (Hussain *et al.*, 1994). Diese bilden einen Chinoloxidasekomplex, dessen Funktion der von NrfH entspricht. Das integrale Membranprotein NrfD (35 kDa) überträgt Elektronen vom Chinonpool auf NrfC (22 kDa). Die Elektronen werden vom NrfC-[4Fe-4S]-Cluster auf NrfB übertragen (Berks *et al.*, 1995b). NrfB ist ein Pentahäm-Cytochrom c mit einem Molekulargewicht von 20 kDa und der direkte Elektronendonator für NrfA. Dazu bildet NrfB als Dimer mit dem NrfA-Dimer einen Eikosahäm-Elektronentransferkomplex (Clarke *et al.*, 2004). Die Proteine NrfEFG katalysieren die korrekte Faltung von und den Häm-Einbau in NrfA (Clarke *et al.*, 2004).

Verbreitete Elektronendonoren für die Reduktion von Nitrit durch NrfA sind Formiat oder Wasserstoff. In geringerem Maße können auch Pyruvat, Ethanol, Glucose und Lactat als Elektronendonoren dienen. Von diesen werden Elektronen auf den Chinonpool übertragen und zwei Protonen pro Elektronenpaar transloziert, sodass ein Protonengradient etabliert wird (Übersicht in Simon, 2002).

Außer zur Bildung eines Membranpotentials kann DNRA auch zur Regeneration von Reduktionsäquivalenten eingesetzt werden. Dieser Prozess wird als fermentative DNRA bezeichnet. Dabei ersetzt Nitrat oder Nitrit ein Gärungsintermediat als Oxidans zur Regeneration von fermentativ gebildetem NADH. Das Gärungsintermediat kann dann in einem über Substratkettenphosphorylierung energiekonservierenden Schritt weiter fermentiert werden. So wird zum Beispiel Pyruvat in Anwesenheit von Nitrat oder Nitrit nicht zu Ethanol, sondern unter ATP-Bildung zu Acetat fermentiert (Cole und Brown, 1980).

### 1.5.2 Die Regulation

Die Expression der *nrf*-Gene ist bei Anwesenheit hoher Nitratkonzentrationen reprimiert, wird aber durch hohe Nitritkonzentrationen induziert. DNRA ist unter anaeroben Bedingungen stark reprimiert und unter aeroben Bedingungen induziert. Keines der Gene wird jedoch vollständig herunterreguliert. Im Gegensatz zur assimilatorischen Nitratreduktion werden die DNRA-Gene nicht durch Ammonium reprimiert (Übersicht in Cole, 1996).

## 1. Einleitung

### 1.5.3 Die Organismen

Die Dissimilatorischen Nitratreduzierer (DNRA) sind eine Gruppe unterschiedlichster Mikroorganismen aus den Phyla Actinobacteria, Aquificae, Bacteroidetes, Deferribacteres, Firmicutes, Nitrospira und Proteobacteria. Zu ihnen zählen obligate Anaerobier (*Clostridia*), fakultative Anaerobier (*Citrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Klebsiella*), fakultative Aerobier (*Bacillus*, *Pseudomonas*) (Simon, 2002) sowie Bakterien, die als obligate Aerobier betrachtet wurden (*Arthrobacter*, *Nitrobacter*) (Eschbach *et al.*, 2003; Freitag *et al.*, 1987). Inzwischen wurde fermentative DNRA auch in Rhizobien (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*) nachgewiesen (Polcyn und Podeszwa, 2009). Die meisten bekannten DNRA gehören zu den Enterobacteria, der einzigen prokaryotischen Gruppe aus der kein Denitrifizierer bekannt ist (Zumft, 1997). Die Fähigkeit zur DNRA ist weit verbreitet unter Bodenpilzen, besonders unter den Ascomycota (Zhou *et al.*, 2002) und findet sich auch in Archaea (Blöchl *et al.*, 1997).

Die metabolische Vielfalt der DNRA umfasst Eisen-, Sulfat- und Schwefelatmung, Eisen(II)-, Wasserstoff- und Sulfidoxidation (Simon, 2002) sowie Anammox (Kartal *et al.*, 2007), Nitrifikation, Denitrifikation (Behrendt *et al.*, 2010; Freitag *et al.*, 1987) und Stickstofffixierung (Polcyn und Podeszwa, 2009). Ebenso wie manche Denitrifikanten koppeln auch chemolithoautotrophe DNRA die Nitratreduktion an die Oxidation reduzierter Schwefelspezies wie z.B. Schwefelwasserstoff ( $\text{H}_2\text{S}$ ;  $\text{S}^{2-}$ ) und elementaren Schwefel (S) (Brunet und Garcia-Gil, 1996).

Tabelle 1: Auflistung mikrobieller Gattungen, die DNRA enthalten.

Taxon	Habitat	Referenz
<b>Archaea</b>		
<b>Crenarchaeota</b>		
<i>Pyrolobus</i>	Hydrothermale Quelle	(Blöchl <i>et al.</i> , 1997)
<b>Bacteria</b>		
<b>Alphaproteobacteria</b>		
<i>Bradyrhizobium</i>	Wurzelknöllchen	(Polcyn und Lucinski, 2003)
<i>Mesorhizobium</i>	Wurzelknöllchen	(Polcyn und Podeszwa, 2009)
<i>Nitrobacter</i>	Boden, Süßwasser, Meerwasser	(Freitag <i>et al.</i> , 1987)
<i>Rhizobium</i>	Wurzelknöllchen	(Polcyn und Podeszwa, 2009)
<b>Betaproteobacteria</b>		
<i>Neisseria</i>	Atemwege	(Grant und Payne, 1981)
<b>Gammaproteobacteria</b>		
<i>Acinetobacter</i>	Boden, Wasser, Abwasser	(Cole und Brown, 1980)
<i>Aeromonas</i>	Wasser, Abwasser	(Cole und Brown, 1980)
<i>Citrobacter</i>	Boden, Abwasser	(Smith, 1982)
<i>Enterobacter</i>	Boden, Abwasser	(Hadjipetrou und Stouthamer, 1965)
<i>Erwinia</i>	Boden	(Bleakley und Tiedje, 1982)
<i>Escherichia</i>	Boden, Abwasser	(Liu <i>et al.</i> , 1981)
<i>Haemophilus</i>	Schleimhäute des Menschen	(Mohan <i>et al.</i> , 2004)
<i>Klebsiella</i>	Boden, Abwasser	(Hadjipetrou und Stouthamer, 1965)
<i>Pasteurella</i>	Schleimhäute von Säugetieren und Vögeln	(Mohan <i>et al.</i> , 2004)
<i>Photobacterium</i>	Meerwasser	(Prakash und Sadana, 1973)
<i>Pseudomonas</i>	Boden, Wasser	(Cole und Brown, 1980)
<i>Salmonella</i>	Mensch, Tiere, Lebensmittel	(Mills <i>et al.</i> , 2008)
<i>Serratia</i>	Boden, Wasser, Tiere, Pflanzen	(Bleakley und Tiedje, 1982)
<i>Shewanella</i>	Wasser	(Cruz-Garcia <i>et al.</i> , 2007)
<i>Thioploca</i>	Sediment	(Zopfi <i>et al.</i> , 2001)
<i>Vibrio</i>	Sediment	(Rehr und Klemme, 1986)
<b>Deltaproteobacteria</b>		
<i>Anaeromyxobacter</i>	Boden	(Sanford <i>et al.</i> , 2002)
<i>Desulfobacterium</i>	Sediment	(Szewzyk und Pfennig, 1987)
<i>Desulfobulbus</i>	Sediment	(Widdel und Pfennig, 1982)
<i>Desulforhopalus</i>	Salzmarsch	(Lie <i>et al.</i> , 1999)
<i>Desulfovibrio</i>	Sediment	(Steenkamp und Peck, 1981)

## 1. Einleitung

<i>Geobacter</i>	Boden, Sediment	(Lovley <i>et al.</i> , 1993); (Sung <i>et al.</i> , 2006)
<b>Epsilonproteobacteria</b>		
<i>Caminibacter</i>	Hydrothermale Quelle	(Alain <i>et al.</i> , 2002)
<i>Campylobacter</i>	Mundhöhle	(de Vries <i>et al.</i> , 1980)
<i>Hydrogenimonas</i>	Hydrothermale Quelle	(Takai <i>et al.</i> , 2004)
<i>Nautilia</i>	Hydrothermale Quelle	(Perez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2012)
<i>Sulfurospirillum</i>	Meerwasser	(Schumacher <i>et al.</i> , 1994)
<i>Thioreductor</i>	Hydrothermale Quelle	(Nakagawa <i>et al.</i> , 2005)
<i>Wolinella</i>	Rumen	(Tanner <i>et al.</i> , 1981)
<b>Nitrospira</b>		
<i>Thermodesulfovibrio</i>	Hydrothermale Quelle	(Sonne-Hansen und Ahring, 1999)
<b>Firmicutes</b>		
<i>Ammonifex</i>	Hydrothermale Quelle	(Huber <i>et al.</i> , 1996)
<i>Bacillus</i>	Boden	(Verhoeven, 1950)
<i>Carboxydotherrmus</i>	Hydrothermale Quelle	(Henstra und Stams, 2004)
<i>Clostridium</i>	Boden, Sediment	(Keith <i>et al.</i> , 1982)
<i>Desulfitobacterium</i>	Boden, Abwasserschlam, Sedimente	(Madsen und Licht, 1992)
<i>Desulfotomaculum</i>	Klärschlamm	(Mitchell <i>et al.</i> , 1986)
<i>Paenibacillus</i>	Boden	(Behrendt <i>et al.</i> , 2010)
<i>Selenomonas</i>	Rumen	(de Vries <i>et al.</i> , 1974)
<i>Staphylococcus</i>	fermentierte Lebensmittel	(Hartmann <i>et al.</i> , 1995)
<i>Thermodesulfovibrium</i>	Hydrothermale Quelle	(Mori <i>et al.</i> , 2003)
<i>Thermoterrabacterium</i>	Hydrothermale Quelle	(Henstra und Stams, 2004)
<i>Veillonella</i>	Intestinaltrakt	(Inderlied und Delwiche, 1973)
<b>Actinobacteria</b>		
<i>Arthrobacter</i>	Boden	(Eschbach <i>et al.</i> , 2003)
<i>Slackia</i>	Intestinaltrakt	(Lanigan, 1976)
<b>Planctomyces</b>		
<i>Pirellula</i>	Wasser	(Schlesner und Hirsch, 1987)
<b>Deferribacteres</b>		
<i>Caldithrix</i>	Hydrothermale Quelle	(Miroshnichenko <i>et al.</i> , 2003)
<i>Deferribacter</i>	Hydrothermale Quelle	(Slobodkina <i>et al.</i> , 2009)
<b>Bacteroidetes</b>		
<i>Capnocytophaga</i>	Säugetiere	(Socransky <i>et al.</i> , 1979)
<i>Porphyromonas</i>	Mundhöhle	(Mohan <i>et al.</i> , 2004)
<b>Crysiogenetes</b>		
<i>Desulfurispirillum</i>	Sediment	(Rauschenbach <i>et al.</i> , 2011)

**Aquificae**

<i>Desulfurobacterium</i>	Hydrothermale Quelle	(Huber <i>et al.</i> , 2002)
<i>Phorcysia</i>	Hydrothermale Quelle	(Perez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2012)
<i>Thermovibrio</i>	Hydrothermale Quelle	(Huber <i>et al.</i> , 2002)

**Eukarya****Ascomycota**

<i>Fusarium</i>	Pflanzen	(Zhou <i>et al.</i> , 2002)
-----------------	----------	-----------------------------

Die Reduktion von Nitrit zu Ammonium verbraucht sechs Elektronen (Cole und Brown, 1980). Daher findet DNRA, im Gegensatz zur Denitrifikation, hauptsächlich in Ökosystemen mit großen Mengen an Elektronendonoren und geringen Nitratkonzentrationen statt (Cole und Brown, 1980). Beide Prozesse können jedoch auch simultan stattfinden (Paul und Beauchamp, 1989). DNRA kann zusätzlich zu Ammonium auch zur Bildung von  $N_2O$  führen (Smith und Zimmerman, 1981). Dabei handelt es sich möglicherweise um einen Mechanismus zur Entgiftung von Nitrit (Kaspar, 1982). Besonders bei einem geringen Verhältnis von C/N werden mehr Nitrit und  $N_2O$  gebildet als bei einem hohen C/N-Verhältnis. Auch bei hohen Nitratkonzentrationen in der Umwelt wird während der DNRA vermehrt  $N_2O$  gebildet (Streminska *et al.*, 2012).

## 1.6 Das Treibhausgas $N_2O$

Treibhausgase sind Gase in der Atmosphäre, die den Treibhauseffekt bedingen. Kurzwellige Sonnenstrahlung durchdringt fast ungehindert die Atmosphäre und erwärmt die Erdoberfläche. Diese emittiert dann langwellige Strahlung im Infrarotbereich. Treibhausgase in der Atmosphäre absorbieren diese Strahlung teilweise und reduzieren so deren Abstrahlung ins All. Gleichzeitig geben sie die erhaltene Wärmeenergie in alle Richtungen wieder ab. Dadurch wird die Erdoberfläche erwärmt und ihre Auskühlung verhindert. Durch anthropogenen Einfluss werden immer mehr Treibhausgase in die Atmosphäre abgegeben, was eine globale Erwärmung verursacht (Übersicht in Mitchell, 1989).

## 1. Einleitung

Die wichtigsten Treibhausgase sind Wasserdampf, Kohlendioxid ( $\text{CO}_2$ ), Methan ( $\text{CH}_4$ ),  $\text{N}_2\text{O}$  und Fluorchlorkohlenwasserstoffe (FCKW).  $\text{N}_2\text{O}$  gilt dabei als das viertwichtigste Treibhausgas. Sein Beitrag zum anthropogenen Treibhauseffekt beträgt nur 5-6 %, (Bouwman, 1998) sein Klimaerwärmungspotential ist jedoch 289 Mal höher als das von  $\text{CO}_2$ . Zusätzlich verbleibt es durchschnittlich 114 Jahre in der Atmosphäre (Montzka *et al.*, 2003). In der Stratosphäre ist es außerdem an photochemischen Reaktionen beteiligt, die zur Zerstörung der Ozonschicht beitragen.  $\text{N}_2\text{O}$  gilt als die vorherrschende ozon-schädigende Substanz des 21. Jahrhunderts (Ravishankara *et al.*, 2009).

Die atmosphärische  $\text{N}_2\text{O}$ -Konzentration ist seit 1750 von 270 ppb um etwa 20 % auf 322 ppb gestiegen. Dabei betrug der Anstieg in den letzten Jahrzehnten pro Jahr etwa 0,26 ppb (Alley *et al.*, 2007). Dafür verantwortlich sind Abgase von Verkehrsmitteln, Industrie sowie der Verbrennung von Biomasse. Die Hauptursache anthropogener  $\text{N}_2\text{O}$ -Emissionen sind jedoch, aufgrund hoher Einträge von Stickstoffdünger, landwirtschaftlich genutzte Böden (Alley *et al.*, 2007; Mosier, 1998). Der größte Teil des in Böden produzierten  $\text{N}_2\text{O}$  wird durch Denitrifikation gebildet, wobei das Verhältnis von gebildetem  $\text{N}_2\text{O}$  zu  $\text{N}_2$  von den Bodenbedingungen abhängt (Smith *et al.*, 2003).  $\text{N}_2\text{O}$  kann durch Denitrifikation in Böden auch verbraucht werden. Dieser Prozess hängt ebenfalls von den Bodenbedingungen ab (Übersicht in Chapuis-Lardy *et al.*, 2007). Somit hat nicht nur die Denitrifikation, sondern auch die Bodeneigenschaften Auswirkungen auf das Klima.

## **1.7 Untersuchung der Diversität von Nitratreduzierern, Denitrifikanten und DNRA**

Die klassische Methode zur Untersuchung der Diversität von Mikroorganismen ist die Kultivierung. Deren Bedeutung für die Mikrobiologie wird in den Koch'schen Postulaten

deutlich: Um einen Mikroorganismus mit einem Prozess in Verbindung zu bringen, muss der Organismus in einer Reinkultur isoliert werden (Koch, 1884). Seit der Entwicklung dieser Techniken wurden über 10000 prokaryotische Spezies beschrieben (DSMZ, 2015). Doch schon vor einem Jahrhundert wurde eine Diskrepanz zwischen der Gesamtkeimzahl und der Zahl kultivierbarer Mikroorganismen entdeckt (Amann, 1911). Dieses Phänomen wurde "The Great Plate Count Anomaly" (Die große Keimzahl-Anomalie) genannt (Staley und Konopka, 1985) und führte zur Überzeugung, dass der Großteil der Prokaryoten unkultivierbar ist (Amann *et al.*, 1995). Um dieses Problem zu umgehen, wurden in den letzten 20 Jahren überwiegend molekulare Methoden zur Untersuchung prokaryotischer Diversität angewandt. Zu diesen Methoden, die auf der Isolierung von Nucleinsäuren aus Umweltproben basieren, gehören die Sequenzierung der 16S rRNA-Gene, Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH), Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE) und terminaler Restriktionsfragmentlängen Polymorphismus (t-RFLP) (Übersicht in Riesenfeld *et al.*, 2004).

Die Untersuchung der Diversität polyphyletischer funktioneller Gruppen kann jedoch nicht über die Analyse der 16S rRNA-Gene erfolgen. Stattdessen werden Gene als molekulare Marker verwendet, deren Produkt Teil des jeweiligen Stoffwechselwegs ist und deren Phylogenie mit der des 16S rRNA-Gens konsistent ist (Ueda *et al.*, 1995). Zur kultivierungsunabhängigen Untersuchung der Denitrifikanten werden an der Denitrifikation beteiligte Gene als Marker verwendet. Die Gene der Nitrit- und N<sub>2</sub>O-Reduktase (*nirK*, *nirS* und *nosZ*) werden verwendet um Denitrifikanten zu untersuchen (Throbäck *et al.*, 2004), die Gene der Nitratreduktasen (*narG* und *napA*) zur Untersuchung von Nitratreduzierern (Übersicht in Philippot, 2005). Als spezifischer Marker zur Untersuchung der Diversität von DNRA wird das Gen der katalytischen Untereinheit der Cytochrom c-Nitritreduktase (*nrfA*) verwendet (Mohan *et al.*, 2004).

## 1. Einleitung

Die mit molekularen Methoden detektierte Diversität hängt jedoch von der Extraktion der Nucleinsäuren, der Wahl der PCR-Primer und der PCR ab (Übersicht in Dahllöf, 2002). Außerdem kann so die Funktion bestimmter Mikroorganismen in der Umwelt bestenfalls indirekt untersucht werden. Die Isolierung eines Mikroorganismus ist Voraussetzung für seine phänotypische Charakterisierung, die notwendig ist um Erkenntnisse über seine tatsächlichen Fähigkeiten und dadurch Hinweise über seine Funktion in der Umwelt zu gewinnen. Durch die Kultivierung von Mikroorganismen kann also die Verbindung zwischen ihrer Diversität und ihrer Aufgabe in der Umwelt und in den Stoffkreisläufen hergestellt werden (Nichols, 2007; Stewart, 2012). Die Entwicklung neuer Isolierungsansätze und -techniken rückt daher wieder mehr in den Vordergrund.

Klassische Kultivierungsmethoden von Nitratreduzierern, DNRA und Denitrifikanten bestanden im Ausbringen von Probenmaterial auf mit Nitrat supplementiertem Agarmedium und anschließender Inkubation unter anoxischen Bedingungen (Gamble *et al.*, 1977). Der Hauptgrund warum viele Bakterien nicht kultiviert werden können ist, dass Umweltbedingungen, die für das Wachstum dieser Bakterien essentiell sind, nicht rekonstruiert werden (Balestra und Misaghi, 1997; Bruns *et al.*, 2002; Button *et al.*, 1993); Übersicht in Vartoukian *et al.*, 2010). Neue Kultivierungsansätze versuchen daher die Kultivierungsbedingungen an die Bedingungen der prokaryotischen Habitate anzupassen. Dazu zählen einfache Veränderungen der klassischen Ansätze (Davis *et al.*, 2005; Guan *et al.*, 2000; Janssen *et al.*, 2002), Co-Kultivierung mit einem Helferstamm (Nichols *et al.*, 2008) und Kultivierung in einer Imitation der natürlichen Umgebung (Kaeberlein *et al.*, 2002) sowie die Kombination verschiedener Techniken (Nichols *et al.*, 2008).

Entscheidende Fortschritte in der Untersuchung der Diversität von Mikroorganismen und ihrer Aufgabe in der Umwelt und in Stoffkreisläufen können nur durch eine ergänzende Anwendung von kultivierungsabhängigen und kultivierungsunabhängigen Methoden erzielt

werden (Nichols, 2007).

## 1.8 Ziele

Nitrat ist ein wichtiger Nährstoff im Boden, der unter anoxischen Bedingungen von drei biologischen Prozessen abgebaut wird: der Nitratreduktion, der Denitrifikation und der DNRA. Dabei entstehen unterschiedliche Endprodukte. Die Prozesse unterscheiden sich dadurch auch in ihrer Bedeutung für den Boden. Gemeinsam ist ihnen jedoch die mögliche Freisetzung des Intermediates  $N_2O$ , des viertwichtigsten Treibhausgases. Die Bildung von  $N_2O$  und das Verhältnis des gebildeten  $N_2O$ s zum Endprodukt hängt von den nitratabbauenden Prokaryoten ab: den Denitrifikanten und den DNRA. Deren Diversität bestimmt welche Stoffwechselschritte ablaufen können, ihre Aktivität welche auch tatsächlich ablaufen, während aus ihrer Abundanz die absolute Menge der gebildeten Stoffe resultiert. Diversität, Abundanz und Aktivität der Bodenbakterien werden hauptsächlich von den Bedingungen ihres Habitats beeinflusst. Die  $N_2O$ -Emission von Böden ist somit von deren Eigenschaften abhängig. Landnutzung übt einen wichtigen Einfluss auf die Bodeneigenschaften und damit möglicherweise auch auf die Nitratreduzierer, Denitrifikanten und DNRA im Boden aus.

Daraus ergibt sich die in dieser Arbeit untersuchte Hypothese:

*Die Gemeinschaften von Nitratreduzieren, Denitrifikanten und DNRA werden nicht nur durch die direkten Eigenschaften von Böden, sondern auch durch den Vegetationstyp und die Landnutzungsintensität beeinflusst.*

## 1. Einleitung

Zur Untersuchung der Hypothese wurden folgende Ziele definiert:

1. Bestimmung des Einflusses des pH-Wertes auf die Aktivität der Denitrifikanten
2. Bestimmung des Einflusses des pH-Wertes auf die Abundanz von Nitratreduzierern und Denitrifikanten
3. Isolierung neuartiger Nitratreduzierer, Denitrifikanten und DNRA
4. Bestimmung des Einflusses der Bodeneigenschaften auf Abundanz und Diversität von Nitratreduzierern, Denitrifikanten und DNRA
5. Bestimmung des Einflusses von Vegetationstyp und Landnutzungintensität auf Abundanz und Diversität von Nitratreduzierern, Denitrifikanten und DNRA

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Untersuchungsstandorte

Als Teil des DFG Schwerpunktprogramms 1374 „Infrastruktur-Biodiversitäts-Exploratorien“ (Fischer *et al.*, 2010)([www.biodiversity-exploratories.de](http://www.biodiversity-exploratories.de)) wurden in dieser Studie Böden von drei Exploratorien (Langzeituntersuchungsgebiete) in Deutschland, dem Biosphärenreservat Schwäbische Alb, dem Nationalpark Hainich und dem Biosphärenreservat Schorfheide-Chorin, untersucht (s. Abbildung 2). Aus jedem Exploratorium wurden zwei Wald- und zwei Grünlandböden, von denen jeweils einer unter intensiver und einer unter weniger intensiver Landnutzung stand, untersucht (s. Tabelle 2).



**Abbildung 2: Lage der drei Exploratorien in Deutschland.**

Quelle: [www.biodiversity-exploratories.de](http://www.biodiversity-exploratories.de).

## 2. Material und Methoden

Das Biosphärengebiet Schwäbische Alb ist ein kalkreicher Gebirgszug mit Verkarstungen im Südwesten Deutschlands. Aus diesem Gebiet wurden zwei Grünlandflächen mit Rendzinaböden untersucht: eine gedüngte Wiese (intensiv genutzt) und eine ungedüngte Schafweide (weniger intensiv genutzt). Die beiden untersuchten Waldflächen- ein Buchen-Altersklassenwald mit Baumholz (intensiv genutzt) und ein extensiv bewirtschafteter Buchenwald mit Dauerbestockung (weniger intensiv genutzt)- haben Braunerdeböden.

**Tabelle 2: Übersicht über Lage, Bodentyp und Landnutzung der in dieser Arbeit untersuchten Böden.** Alle Daten sind der Datenbank des Projektes „Infrastruktur-Biodiversitäts-Exploratorien“ entnommen (<https://exploratories.bgcjena.mpg.de:444/Login/Account.aspx>).

Exploratorium	Landnutzung	Plot	Bodentyp	GPS-Daten (Nord-Ost)
<b>Schwäbische Alb</b>				
	Wiese, gedüngt <sup>a</sup>	AEG 2	Rendzina	48.3768589 - 9.4727908
	Weide, ungedüngt	AEG 7	Rendzina	48.3916017 - 9.3770576
	Wald, bewirtschaftet	AEW 5	Braunerde	48.4196201 - 9.4146885
	Wald, unbewirtschaftet	AEW 8	Braunerde	48.3825912 - 9.3823912
<b>Hainich</b>				
	Mähweide, gedüngt	HEG 6	Pseudogley	51.2150746 - 10.3912285
	Weide, ungedüngt	HEG 9	Pseudogley	51.1242374 - 10.3244092
	Wald, bewirtschaftet	HEW 5	Parabraunerde	51.2641475 - 10.2405244
	Wald, unbewirtschaftet	HEW 12	Parabraunerde	51.1008739 - 10.4551840
<b>Schorfheide Chorin</b>				
	Mähweide, gedüngt	SEG 2	Erdniedermoor	53.0893159 - 13.9800591
	Mähweide, ungedüngt	SEG 6	Mulmniedermoor	53.1036840 - 13.6228391
	Wald, bewirtschaftet	SEW 5	Braunerde	53.0570425 - 13.8853781
	Wald, unbewirtschaftet	SEW 9	Braunerde	53.0441364-13.8093536

<sup>a</sup>Böden unter intensiver Landnutzung

Der Nationalpark Hainich liegt auf einem kalkreichen Gebirgszug in Mitteldeutschland und ist Teil eines der größten zusammenhängenden Laubwaldgebiete in Deutschland. Aus diesem Gebiet wurden zwei Pseudogleyböden untersucht, darunter eine gedüngte, von Rindern beweidete Mähweide (intensiv genutzt) und eine ungedüngte Mähweide (weniger intensiv genutzt). Weiterhin wurden zwei Waldflächen mit Parabraunerdeböden untersucht. Die intensiv genutzte Waldfläche ist ein Buchen-Altersklassenwald mit

schwachem Baumholz, während die weniger intensiv genutzte Waldfläche ein unbewirtschafteter Buchenwald ist. Letztere Fläche ist ein Naturwald mit Bäumen im Alter von 1- 250 Jahren, der in der Zeit von 1945- 1990 nicht betreten wurde.

Das Biosphärenreservat Schorfheide-Chorin liegt im eiszeitlich überformten Teil Deutschlands und weist reiche Vorkommen an Seen, Mooren und Feuchtgebieten auf. Die beiden untersuchten Grünlandböden sind anmoorgleyige Torfböden, eine gedüngte Mähweide (intensiv genutzt) und eine ungedüngte Rinderweide (weniger intensiv genutzt). Es wurden außerdem zwei Buchenwälder auf Braunerdeböden untersucht, von denen einer bewirtschaftet (intensiv genutzt) und einer unbewirtschaftet (weniger intensiv genutzt) ist.

## 2.2 Probenahme

Probenahmen fanden in der Zeit vom 20.- 28.04. (Aprilprobenahme), 18.- 25.06. (Juni-probenahme), 24.08.- 04.09. (Augustprobenahme) und 19.- 23.10.2009 (Oktoberprobe-nahme) statt. Proben aus den Exploratorien Schwäbische Alb und Hainich wurden von Mitgliedern des Projektes „Infrastruktur-Biodiversitäts-Exploratorien“ entnommen.

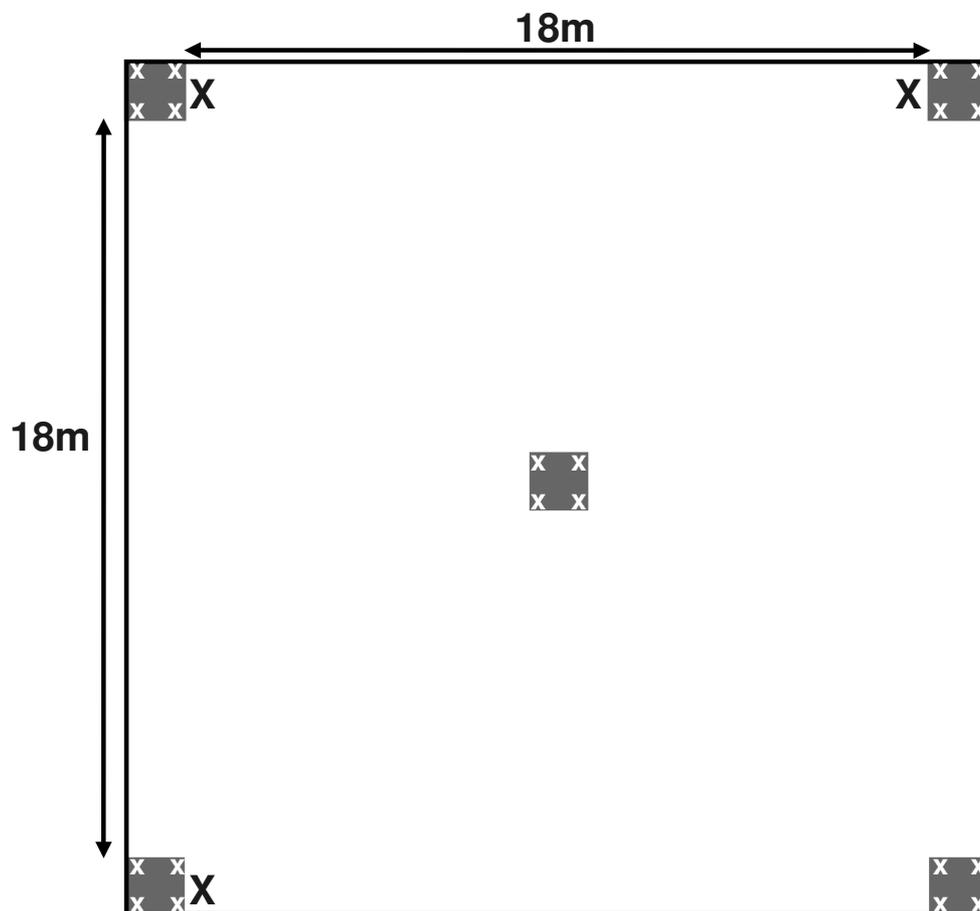
Wegen Beweidung konnten von den Flächen HEG 9 und SEG 6 während der Juni-probenahme, sowie von den Flächen HEG 6 und SEG 2 während der Augustprobenahme keine Proben entnommen werden.

Auf jeder Fläche wurden fünf Stellen beprobt (jede Ecke eines 20 m<sup>2</sup> großen Quadrates und dessen Mitte). Von jeder Stelle wurden vier Bohrkerne ( $\varnothing$  10 cm, Länge 10 cm) ent-nommen und deren A-Horizonte gemischt. Von jeder Mischung wurden 50 g Boden abgefüllt und auf Trockeneis transportiert. Die fünf Proben von jeder Fläche wurden

## 2. Material und Methoden

gemischt und dann bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Diese Proben wurden für molekulare Analysen verwendet.

Zusätzlich wurden während der Aprilprobenahme (Hainich: zusätzlich am 14.05.2009) an drei Stellen auf den Flächen je ein Spatenstich entnommen und im Ganzen transportiert. Dann wurde von allen Spatenstichen der gesamte A-Horizont entnommen, die drei Proben von jeder Fläche gemischt und bei  $2\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Diese Proben wurden für Isolierungen, Mikrokosmen und die Bestimmung von pH-Werten, Wassergehalt und Nitratgehalt verwendet.



**Abbildung 3: Lage der Probenahmestellen innerhalb des untersuchten Quadrates auf den Flächen.**

Dunkelgrau: Die fünf Beprobungspunkte; weiße Markierung: Entnahmestellen der Bohrkerne; schwarze Markierung: Entnahmestellen der Spatenstiche

Von den Flächen des Exploratoriums Hainich wurden zusätzlich am 01.12.2008 je vier Spatenstiche entnommen und wie oben beschrieben behandelt. Diese Proben wurden für Vorversuche verwendet. Außerdem wurden pH-Werte, Wassergehalt und Nitratgehalt bestimmt.

### **2.3 Probenvorbereitung**

#### **2.3.1 KCl-Extrakte**

Zur Herstellung von KCl-Extrakten wurden die Böden jeweils 1:5 in 1M KCl-Lösung aufgeschlämmt und geschüttelt. Anschließend wurde 15 min bei 17640 x g zentrifugiert und der Überstand abgenommen.

#### **2.3.2 Wässrige Extrakte**

Zur Herstellung wässriger Extrakte wurden die Böden jeweils 1:2,5 mit ddH<sub>2</sub>O aufgeschlämmt und durch Schütteln gemischt. Anschließend wurde 15 min bei 17640 x g zentrifugiert und der Überstand abgenommen.

### **2.4 Analytische Methoden**

#### **2.4.1 Bestimmung des pH-Wertes**

Zur Messung von pH-Werten wurde eine pH-Elektrode (InLab R422, Mettler Toledo GmbH, Gießen) und ein digitales pH-Meter (WTW pH 330, Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim) verwendet. Die pH-Werte der Böden wurden in KCl-Extrakten bzw. wässrigen Extrakten (Abschnitt 2.3) bestimmt.

## 2. Material und Methoden

Zur Messung der pH-Werte anoxischer Mikrokosmen wurden pH-Stäbchen (pH-Indikatorstäbchen pH 0- 6,0 und pH-Indikatorstäbchen pH 5,0- 10,0, Merck KgaA, Darmstadt) eingesetzt. Dazu wurde aus den Mikrokosmen etwa 0,2 ml der Bodenaufschlammung steril entnommen und auf die pH-Stäbchen getropft. Diese Ergebnisse erlauben eine Genauigkeit von 0,5 pH-Einheiten.

### **2.4.2 Gravimetrische Wassergehalts- und Trockengewichtsbestimmung**

Zur Bestimmung des Trockengewichts der Böden wurden je drei Gramm Boden in eine Petrischale eingewogen. Nach Trocknung des Bodens für zehn Tage bei 60 °C wurde der Boden gewogen und so das Trockengewicht bestimmt. Die Gewichts Differenz ergibt den Wassergehalt des Bodens, der im Folgenden immer auf das Frischgewicht bezogen wurde.

### **2.4.3 Nitrat-, Nitrit- und Ammoniumbestimmung**

Die Bestimmung der Nitratkonzentration erfolgte in 1:10-Verdünnungen [w/v] der Böden in A. dest nach Velghe und Claeys (Velghe und Claeys, 1985), jedoch wurde der Test in 96-Well-Platten durchgeführt. Dazu wurden 85 µl der jeweiligen Probe, 4 µl Resorcinol-lösung und 111 µl Schwefelsäure verwendet.

Zur Bestimmung der Nitrit- und Ammoniumkonzentration wurden jeweils 60 µl von MPN-Anreicherungen 1:50 mit DM-Medium (Abschnitt 2.5.1) ohne Nitrat verdünnt. Die Bestimmung der Nitritkonzentration erfolgte nach Harrigan und Cance (Harrigan und Mc Cance, 1966), jedoch in 96-Well-Platten. Dazu wurden 80 µl der jeweiligen Probe, 40 µl Gieß-Reagenz A und 40 µl Gieß-Reagenz B verwendet.

## 2. Material und Methoden

Die Ammoniumkonzentration wurde wie von Gadkari beschrieben bestimmt (Gadkari, 1984), jedoch in 96-Well-Platten. Dazu wurden 100 µl der jeweiligen Probe, 50 µl Na-Phenolat, 25 µl Na-Nitroprussid und 25 µl Na-Hypochlorit verwendet.

Die photometrischen Messungen wurden mit dem µQuant Universal Microplate Spectrophotometer (BIO-TEK Instruments GmbH, Bad Friedrichshall) und der Software Gen5 1.04.5 (BioTek Instruments, Inc., Winooski, USA) durchgeführt.

Tests zur Bestimmung der Nitratkonzentrationen wurden teilweise von Anita Gößner (Technische Angestellte) pipettiert. Die Werte der Nitratkonzentrationen in den Böden HEG 9 und HEW 12 in den Proben vom April 2009 wurden von Astrid Naether (Universität Bremen) zur Verfügung gestellt (persönliche Kommunikation). Tests zur Bestimmung der Nitrit- und Ammoniumkonzentrationen wurden von Anita Gößner und Kristin Schacht (Studentische Hilfskraft) pipettiert.

### 2.4.4 Gaschromatographie

Die Konzentration von N<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub> und O<sub>2</sub> in der Gasphase wurde gaschromatographisch (James und Martin, 1952) bestimmt. Aus den jeweiligen Gefäßen wurde ein Teil der Gasphase (s. Abschnitte 2.5.5 und 2.5.6) mithilfe einer sterilen Plastikspritze entnommen und im Gaschromatographen (s. Tabelle 3) analysiert.

Zur Bestimmung der potentiellen Denitrifikationsraten (s. Abschnitt 2.5.6) wurde N<sub>2</sub>O mit dem Elektroneneinfangdetektor (Electron Capture Detector, ECD) eines Hewlett Packard 5890 series II Gaschromatographen (Hewlett-Packard Company, Palo Alto, USA) (s. Tabelle 3). Gasmessungen zur MPN-Bestimmung (s. Abschnitt 2.5.5.1) erfolgten mit dem Multiple Gas Analyser #2 SRI 8610C (SRI Instruments, Torrance, USA). N<sub>2</sub>O und O<sub>2</sub>

## 2. Material und Methoden

wurden mit einem Elektroneneinfangdetektor (Electron Capture Detector, ECD), CO<sub>2</sub> mit einem Flammenionisationsdetektor + Methanisierer (Flame Ionization Detector, FID) und N<sub>2</sub> mit einem Wärmeleitfähigkeitsdetektor (Thermal Conductivity Detector, TCD) gemessen (s. Tabelle 3).

Für jeden Versuch wurde von den jeweiligen Gasen eine Eichreihe mit Standards bekannter Konzentrationen aufgenommen. Der Überdruck wurde mit dem Nadelmanometer DMG 2120 (Ballmoos AG, Horgen, Schweiz) bestimmt.

**Tabelle 3: Verwendete Geräte und Parameter der gaschromatographischen Messungen.**

	Denitrifikationsraten	MPN
Gerät	Hewlett Packard 5890 series II (Hewlett-Packard Company, Palo Alto, USA)	Multiple Gas Analyser #2 SRI 8610C (SRI Instruments, Torrance, USA)
Software	EuroChrom for Windows (Dr. Ing. Herbert Knauer GmbH, Berlin)	PeakSimple (Chromatography Acquisition and Integration Software, SRI Instruments, Torrance, USA)
Säule 1	Porapak Q 80/100, 4 m x 1,8" (Supelco Bellefonte, PA, USA)	2 m x 1/8" Hayesep-D an ECD und FID (SRI Instruments, Torrance, USA)
Säule 2	/	2 m x 1/8" Molekularsieb an TCD (Thames Restek UK Limited, Saunderton, UK)
Trärgas	95 % Argon, 5 % Methan	Helium
Flußrate	40 ml min <sup>-1</sup>	40 ml min <sup>-1</sup>
Ofentemperatur	60 °C	60 °C
Injektortemperatur	150 °C	150 °C
Detektortemperatur	300 °C	ECD: 300 °C FID: 380 °C TCD: 175 °C
Injektionsvolumen	200 µl	500 µl

Die Gesamtstoffmenge der Gase ( $n_{\text{ges}}$ ) setzt sich aus dem gasförmigen ( $n_{\text{gas}}$ ), dem physikalisch gelösten Anteil ( $n_{\text{gelp}}$ ) und für CO<sub>2</sub> noch zusätzlich aus dem chemisch gelösten Anteil ( $n_{\text{gelc}}$ ) zusammen (Gleichung 1).

$$n_{\text{ges}} = n_{\text{gas}} + n_{\text{gelp}} (+n_{\text{gelc}}) \quad (1)$$

Der gasförmige Anteil eines bestimmten Volumens wird mit Gleichung 2 bestimmt:

$$n_{\text{gas}} = v_{\text{gas}} \times \frac{c}{v_{\text{akt}}} \times \frac{p_{\text{akt}} + p_{\text{ü}}}{p_{\text{akt}}} \quad (2)$$

$V_{\text{gas}}$ : Volumen der Gasphase [ml];  $c$ : gemessene Gaskonzentration [ppm];  $V_{\text{akt}}$ : Molvolumen des Gases unter aktuellen Bedingungen [ml];  $p_{\text{akt}}$ : aktueller Luftdruck [mbar];  $p_{\text{ü}}$ : Überdruck im Gefäß [mbar].

Das Molvolumen der Gase unter aktuellen Bedingungen errechnet sich durch die allgemeine Gasgleichung für ideale Gase (Gleichung 3).

$$V_{\text{akt}} = \frac{p_1 \times V_1 \times T_{\text{akt}}}{T_1 \times p_{\text{akt}}} \quad (3)$$

$V_{\text{akt}}$ : Molvolumen des Gases unter aktuellen Bedingungen [ml];  $P_1$ : Luftdruck unter Standardbedingungen [mbar];  $V_1$ : Molvolumen unter Standardbedingungen [ml];  $T_1$ : Temperatur unter Standardbedingungen [K];  $T_{\text{akt}}$ : aktuelle Temperatur [K];  $p_{\text{akt}}$ : aktueller Luftdruck [mbar].

Der physikalisch gelöste Anteil eines Gases wird mit Gleichung 4 berechnet.

$$n_{\text{gelp}} = V_{\text{fl}} \times \frac{c}{V_{\text{akt}}} \times \alpha \times \frac{p_{\text{akt}} + p_{\text{ü}}}{p_{\text{akt}}} \quad (4)$$

$V_{\text{fl}}$ : Volumen der Flüssigphase [ml];  $V_{\text{akt}}$ : Molvolumen des Gases unter aktuellen Bedingungen [ml];  $\alpha$ : Bunsenscher Löslichkeitskoeffizient;  $p_{\text{akt}}$ : aktueller Luftdruck [mbar];  $p_{\text{ü}}$ : Überdruck im Gefäß [mbar].

Der chemisch gelöste Anteil von  $\text{CO}_2$  hängt größtenteils vom pH-Wert der Lösung ab (Gleichung 5).

$$n_{\text{gelc}} = n_{\text{gelp}} \times 10^{\text{pK}_a + \text{pH}} \quad (5)$$

Der Bunsensche Löslichkeitskoeffizient  $\alpha$  ist abhängig von der Temperatur (s. Tabelle 4).

## 2. Material und Methoden

**Tabelle 4: Bunsenscher Löslichkeitskoeffizient  $\alpha$  für die gemessenen Gase in Wasser bei 20 °C und 25 °C.**

Gas	$\alpha$		Referenz
	20 °C (293 °K)	25 °C (298 °K)	
CO <sub>2</sub>	0,85	0,74	Widdel, 1980
O <sub>2</sub>	0,031	0,028	Gmelin, 1958
N <sub>2</sub>	0,047	0,043	Gmelin, 1936
N <sub>2</sub> O	0,674	0,602	Gmelin, 1936

## 2.5 Mikrobiologische Methoden

### 2.5.1 Anaerobe Techniken

Die Herstellung anoxischer Medien und das Arbeiten mit anaeroben Kulturen erfolgte in der Anaerobenkammer (GR-60-B- MecaPlex, Grenchen, Schweiz) unter einer Atmosphäre aus N<sub>2</sub>. Sauerstoffspuren wurden durch Kupferkatalysatoren entfernt. Anoxische Lösungen wurden für mindestens 1 Stunde mit N<sub>2</sub> oder Ar durchströmt, anschließend gasdicht verschlossen und autoklaviert oder in der Anaerobenkammer sterilfiltriert. Anaerobisieren der Lösungen sowie Begasung von Anaerobentöpfen erfolgte an einer Gasstation (Balch *et al.*, 1979).

### 2.5.2 Medien und Lösungen

Anreicherung und Kultivierung von Nitratreduzierern, Denitrifikanten und DNRA sowie Mikrokosmosversuche erfolgten in anoxischem Mineralmedium für Denitrifikanten (Stanier *et al.*, 1966) oder in verdünntem TSA-Medium (Bacto Tryptic Soy Broth) (s. Tabelle 6) in unterschiedlichen Abwandlungen.

Zur Herstellung von 1 L Mineralmedium wurde 980 ml Lösung A aufgekocht (s. Tabelle 5).

## 2. Material und Methoden

Anschließend wurden je 10 ml Lösung B und Lösung C zugegeben und die Mischung wurde unter Argonstrom abgekühlt. Wenn nötig wurde der pH-Wert unter Argonstrom eingestellt und das Medium aliquotiert. Für Festmedien wurde in der Anaerobenkammer (s. Abschnitt 2.5.1) 1 % [w/v] Agar Agar (bzw. Gellan zu den Medien DN4, DN6 und DN8) zugegeben. C-Quellen, Vitamine und N-Quellen sowie Erdextrakt (s. unten) und Antibiotika wurden sterilfiltriert (Porengröße 0,2 µm) nach dem Autoklavieren nach Bedarf zugegeben (s. Tabelle 6). Alle verwendeten Lösungen wurden anoxisch hergestellt.

**Tabelle 5: Stammlösungen zur Herstellung von Mineralmedium für Denitrifikanten.**

Stammlösung	Substanz/Prozeß	Menge	Mediumkonzentration	
<b>Lösung A</b>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 g	31,11 mM	
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 3 H <sub>2</sub> O	0,87 g	3,81 mM	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,54 g	3,968 mM	
	wenn benötigt	KNO <sub>3</sub>	0,3 g	3 mM
	H <sub>2</sub> O bidest.	ad 980 ml		
	autoklavieren			
<b>Lösung B</b>	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	5 g	0,81 mM	
	H <sub>2</sub> O bidest.	ad 250 ml		
	autoklavieren			
<b>Lösung C</b>	CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,2 g	18,02 µM	
	FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,1 g	3,6 µM	
	MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	0,05 g	2,96 µM	
	CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,01 g	0,627 µM	
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,01 g	0,457 µM	
	HCl (0,1 N)	100 ml		
	sterilfiltrieren			
<b>C-Quellenstammlösung (500 mM)</b> pH 6 – 7	di-Na-Succinat	6,75 g	1,5 mM	
	Na-Formiat	1,7 g	1,5 mM	
	Ethanol	1,15 g	1,5 mM	
	Na-Acetat x 3 H <sub>2</sub> O	3,4 g	1,5 mM	
	Na-Butyrat	2,2 g	1,5 mM	
	Na-Glutamat	4,23 g	1,5 mM	

## 2. Material und Methoden

	H <sub>2</sub> O bidest.	ad 50 ml	
	sterilfiltrieren		
<b>Vitaminlösung</b>	4-Aminobenzoesäure	4 mg	0,058 µM
pH 6,5 – 7	D+-Biotin	2 mg	4 µM
	Nicotinsäure	10 mg	0,162 µM
	Calciumpantothersäure	5 mg	0,039 µM
	Pyridoxin-HCl	15 mg	0,147 µM
	Folsäure	4 mg	0,018 µM
	Liponsäure	1 mg	9,698 nM
	Thiamin-HCl	10 mg	0,059 µM
	Cyanocobalamin	5 mg	7,378 nM
	H <sub>2</sub> O bidest.	ad 100 ml	
	sterilfiltrieren		
<b>Nitritstammlösung (500 mM)</b>	KNO <sub>2</sub>	2,13 g	3 mM
	H <sub>2</sub> O bidest.	ad 50 ml	
	sterilfiltrieren		

**Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete Abwandlungen des anoxischen Mineralmediums für Denitrifikanten und des TSA-Mediums.**

Name	N-Quelle	Anmerkungen	Supplement	pH
DM	3 mM Nitrat	/	/	6-7
DN	3 mM Nitrit	/	/	6-7
DN4	3 mM Nitrit	/	/	4
DN6	3 mM Nitrit	/	/	6
DN8	3 mM Nitrit	/	/	8
DG	3 mM Nitrit	20 mg/l Polymyxin B	/	6-7
DGE	3 mM Nitrit	20 mg/l Polymyxin B	Erdextrakt 1:20	6-7
DA	3 mM Nitrit	100 mg/l Carbenicillin, 1,5 mg/l Clindamycin	/	6-7
DAE	3 mM Nitrit	100 mg/l Carbenicillin, 1,5 mg/l Clindamycin	Erdextrakt 1:20	6-7
DNE	3 mM Nitrit	1:10 verdünntes DN-Medium	Erdextrakt 1:20	6-7
DND	1,5 mM Nitrit	1:10 verdünntes DN-Medium	Erdextrakt 1:200	6-7
VM	/	keine C-Quellen, keine Vitamine	/	6-7
TS1	/	1:10 TSA-Agar (mit Glucose)	Erdextrakt 1:200	6-7
TS2	/	1:10 TSA-Agar (mit Glucose)	Erdextrakt 1:20	6-7
TS3	3 mM Nitrit	1:10 TSA-Agar (ohne Glucose), C-Quellen, Vitamine	Erdextrakt 1:20	6-7

## 2. Material und Methoden

Zur Herstellung von Erdextrakt wurden unterschiedliche Anteile der in dieser Arbeit untersuchten Böden, insgesamt 300 g, getrocknet, in 600 ml A. dest suspendiert und abzentrifugiert. Der Überstand wurde zuerst durch einen Faltenfilter (87 g m<sup>-2</sup>, 5-8 µm) passiert und anschließend sterilfiltriert (durchgeführt von den Technischen Angestellten Anita Gößner und Ralf Mertel).

Die Herstellung von Zwei-Schicht-Agarplatten erfolgte unter der Sterilbank. Dazu wurden 0,25 g gemahlene Bodens in eine sterile Petrischale gegeben, eine sterile dreiprozentige Agarlösung zugegeben und gemischt. Sofort wurde die Mischung mit einer sterilen Polycarbonatmembran (0,03 µm, Pieper Filter GmbH, Bad Zwischenahn) abgedeckt und trocknen gelassen. Anschließend wurden 2 ml einer 1,5 %igen Gellanlösung auf die Membran gegossen. Nach dem Trocknen wurden die Platten in die Anaerobenkammer eingeschleust und dort vier Tage anoxisch werden gelassen. Dann wurden die Platten bei 4 °C in Anaerobentöpfen gelagert. Mit jedem Boden wurden vier Zwei-Schicht-Agarplatten hergestellt (durchgeführt von Anita Gößner (Technische Angestellte)).

### 2.5.3 Anreicherung und Kultivierung

Anzucht von 5 ml-Kulturen erfolgte in 20 ml Balchgefäßen (Balch *et al.*, 1979). Abgefülltes Flüssigmedium wurde vor Verwendung 48 h bei 20 °C inkubiert, um Kontaminierungen ausschließen zu können. Kultivierung auf festem Medium erfolgte in Anaerobentöpfen (Balch und Wolfe, 1976), die mit 50 kPa N<sub>2</sub> begast wurden. Anreicherungen wurden 10 Wochen bei 15 °C, Aufreinigungen und Isolate 10 Wochen bei 20 °C inkubiert. Aufreinigungen erfolgten durch fraktionierten Verdünnungsausstrich. Kolonien aus Anreicherungen wurden mindestens einmal aufgereinigt, bevor eine Kolonie-PCR (s. Abschnitt 2.6.7) durchgeführt wurde.

## 2. Material und Methoden

- Zur Anreicherung grampositiver Denitrifikanten und DNRA wurden 0,5 ml oder 1 ml einer  $10^{-2}$  Verdünnung jeden Bodens in 4 ml flüssiges DG Medium eingebracht und zwei Tage unter oxischen Bedingungen bei 20 °C inkubiert. Anschließend wurden Vitaminstammlösung, C-Quellenstammlösung und Nitritstammlösung bis zum Erreichen der Mediumendkonzentrationen (s. Tabelle 5) zugegeben. Dann wurden die Röhrcchen mit sterilen Butylgummistopfen gasdicht verschlossen und weitere sechs Tage bei 20 °C inkubiert. Von diesen Anreicherungen wurden jeweils 10 µl, 20 µl und 50 µl auf DG-Agar und DGE-Agar ausplattiert (Durchführung: Anita Gößner (Technische Angestellte) und Kristin Schacht (Studentische Hilfskraft)) und 10 Wochen bei 15 °C anoxisch inkubiert.
- Um archaeelle Denitrifikanten und DNRA anzureichern, wurden 300 µl Lysepuffer (25 mM EDTA, 10 mM Tris-Cl (pH 8), 2 mg/ml Lysozym) zu 6 ml Aufschlammung jeden Bodens ( $10^{-1}$ -Verdünnung) zugegeben und 75 min bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurden je 10 µl, 20 µl und 50 µl auf DA-Agar und DAE-Agar ausplattiert (durchgeführt von Anita Gößner (Technische Angestellte)) und zehn Wochen bei 15 °C inkubiert.
- Um oligophile (an nährstoffarme Bedingungen angepasste) Denitrifikanten und DNRA anzureichern, wurden von jedem Boden 50 µl von je drei Verdünnungsstufen (AEW 8, HEW 12, SEW 5, SEW 9:  $10^{-2}$ -  $10^{-4}$ ; AEG 2, AEG 7, AEW 5, HEG 6, SEG 2, SEG 6:  $10^{-3}$ -  $10^{-5}$ ; HEG 9, HEW 5:  $10^{-4}$ -  $10^{-6}$ ) auf DND-Agar ausplattiert. Weiterhin wurden von jedem Boden 50 µl von je zwei Verdünnungsstufen (AEG 2, AEG 7, AEW 5, HEG 6, SEG 2, SEG 6:  $10^{-3}$  und  $10^{-4}$ ; AEW 8, SEW 5, SEW 9:  $10^{-2}$  und  $10^{-3}$ ; HEG 9, HEW 5:  $10^{-4}$  und  $10^{-5}$ ) auf DNE-Agar ausplattiert.

- Zur Bestimmung des pH-Wert-Einflusses auf die Denitrifikantenzellzahl wurden von sieben Verdünnungen von jedem Boden Anreicherungen in DN4-, DN6- und DN8-Medium hergestellt (s. Tabelle 6). Von den DN4-, DN6- und DN8-Anreicherungen jedes Bodens wurden nach zehnwöchiger Inkubation von je zwei Verdünnungsstufen 50 µl auf das entsprechende Festmedium (DN4, DN6 oder DN8) ausplattiert.

Die Aufreinigung von Kolonien aus den Anreicherungen erfolgte jeweils auf dem Medium, das zur Anreicherung verwendet worden war.

Zur Aufreinigung von Kolonien aus den Diffusionskammern (s. Abschnitt 2.5.4) wurden von jedem Boden vier Kolonien auf Zwei-Schicht-Agarplatten aus dem entsprechenden Boden ausgestrichen und sechs Wochen bei 15 °C anoxisch inkubiert. Anschließend wurden die Kolonien zweimal auf TS3-Agar bei den gleichen Inkubationsbedingungen aufgereinigt. Zusätzlich wurden mehrere Kolonien oder, wenn möglich, Einzelkolonien auf TS1- und TS2-Agar überimpft. Die Inkubation erfolgte für sieben Tage unter oxidischen Bedingungen bei 25 °C.

Die Aufreinigung von Kolonien aus CFU-Anreicherungen der Böden (Haedicke, 2008) erfolgte auf DM-Medium.

### **2.5.4 Diffusionskammern**

Diffusionskammern sollen die natürliche Umgebung der Mikroorganismen so gut wie möglich imitieren, um die Isolierung von bisher unkultivierten Prokaryoten zu ermöglichen (Kaeberlein *et al.*, 2002). Dazu wurde je eine sterile Polycarbonatmembran (0,03 µm, Pieper Filter GmbH, Bad Zwischenahn) mit Silikonkleber auf einen sterilen O-Ring aus Polyethylen geklebt (s. Abbildung 4). Auf die Membran wurde 1 %ige Gellanlösung

## 2. Material und Methoden

gegossen. Dies wurde von Anita Gössner (technische Angestellte) durchgeführt. Nach dem Trocknen des Gellans wurde darauf 0,9 ml Inokulum, eine von je zwei Verdünnungen pro Boden (s. Tabelle 7), ausplattiert. Durch Aufkleben einer zweiten Membran wurde die Kammer verschlossen und dann in ein Becherglas mit 500 g des Bodens, dem das Inokulum entstammte, gelegt. Die Kammern waren dabei von beiden Seiten von mindestens 3 cm des Bodens umgeben und wurden mit sterilen Steinen beschwert. Anschließend wurde steriles künstliches Regenwasser (0,04 mM  $\text{CaSO}_4$ , 0,02 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0,09 mM  $\text{KNO}_3$ , 0,06 mM  $\text{KCl}$ , 0,02 mM  $\text{NaCl}$ , 0,1 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) zugegeben, bis die Kammern gerade nicht bedeckt waren und 12 Wochen bei 15 °C inkubiert. Alle 10-14 Tage wurde das Wasser nachgefüllt und 325 mM  $\text{KNO}_2$ -Lösung zugegeben. Es wurde soviel Nitritlösung zugegeben, dass nach komplettem Verbrauch des Nitrats im Boden der Stickstoffgehalt dem *in situ*-Nitratgehalt entsprach (s. Tabelle 7).



**Abbildung 4: Diffusionskammer zur Kultivierung von Umweltmikroorganismen.**

Die Kammer besteht aus einem Polyethylenring zwischen zwei Polycarbonatmembranen. In die Mitte des Ringes wird Gellan gegossen und nach dem Trocknen inokuliert.

**Tabelle 7: Als Inokulum verwendete Verdünnungsstufen und Menge der zugegebenen KNO<sub>2</sub>-Lösung.**

Boden	Verdünnungsstufen	Zugabe an 325 mM KNO <sub>2</sub> -Lösung
AEG 2	10 <sup>-3</sup> und 10 <sup>-4</sup>	1,4 ml
AEG 7	10 <sup>-3</sup> und 10 <sup>-4</sup>	1,9 ml
AEW 5	10 <sup>-3</sup> und 10 <sup>-4</sup>	1,6 ml
AEW 8	10 <sup>-2</sup> und 10 <sup>-3</sup>	0,6 ml
HEG 6	10 <sup>-3</sup> und 10 <sup>-4</sup>	0,4 ml
HEG 9	10 <sup>-4</sup> und 10 <sup>-5</sup>	1,2 ml
HEW 5	10 <sup>-4</sup> und 10 <sup>-5</sup>	0,2 ml
HEW 12	10 <sup>-2</sup> und 10 <sup>-3</sup>	0,2 ml
SEG 2	10 <sup>-3</sup> und 10 <sup>-4</sup>	0,1 ml
SEG 6	10 <sup>-3</sup> und 10 <sup>-4</sup>	0,25 ml
SEW 5	10 <sup>-2</sup> und 10 <sup>-3</sup>	0,4 ml
SEW 9	10 <sup>-2</sup> und 10 <sup>-3</sup>	0,3 ml

## 2.5.5 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Bakterienzellzahlen in den Böden erfolgte nach der MPN-Methode (de Man, 1975). Dabei wurden sowohl die Zellzahlen der Nitratreduzierer als auch der Einfluß des pH-Werts auf die Zellzahlen der Denitrifikanten ermittelt. Die Berechnung der Zellzahlen aus den nitratreduktions- und denitrifikationspositiven Anreicherungen erfolgte jeweils mit dem MPN-Calculator VB6 (<http://www.i2workout.com/mcuriale/mpn/index.html>).

### 2.5.5.1 Bestimmung der Zellzahlen der Nitratreduzierer

Die Bestimmung der Zellzahlen der Nitratreduzierer erfolgte im 10 ml-Maßstab. Dazu wurde zuerst eine anoxische 10<sup>-1</sup>-Verdünnung des jeweiligen Bodens in VM-Medium hergestellt und über Nacht bei 4 °C im Über-Kopf-Schüttler homogenisiert. Dann wurden von jedem Boden anoxische Verdünnungen der Stufen 10<sup>-2</sup>- 10<sup>-10</sup> in VM-Medium her-

## 2. Material und Methoden

gestellt. 9 ml DM-Medium wurden mit 1 ml von jeder Verdünnungsstufe in drei Parallelen anoxisch angeimpft und bei 15 °C inkubiert. Negativkontrollen (ebenfalls in drei Parallelen) enthielten VM-Medium statt einer Bodenverdünnung. Nach acht Wochen und nach 10 Wochen Inkubation wurde die OD<sub>660</sub> mit dem Spectronic 501 Spectrophotometer (Milton Roy Europe, Pont-Saint-Pierre, Frankreich) gemessen und nach 12 Wochen die N<sub>2</sub>O-, CO<sub>2</sub>-, N<sub>2</sub>- und O<sub>2</sub>-Konzentrationen gaschromatographisch bestimmt (s. Abschnitt 2.4.4). Dabei wurden von jeder Kultur 2 ml entnommen, bei -20 °C gelagert und später daraus der Nitratgehalt der Kultur colorimetrisch bestimmt (s. Abschnitt 2.4.3). Kulturen wurden als positiv angesehen, wenn eine Zunahme der OD<sub>660</sub> (> 0,2), die Bildung von CO<sub>2</sub> (> 37 µmol), die Abwesenheit von O<sub>2</sub> und der Abbau von Nitrat (um mindestens 70 %) nachgewiesen wurden.

Die Konzentrationen von N<sub>2</sub>O und N<sub>2</sub> wurden gemessen, um Denitrifikanten von Nitratreduzierern und DNRA zu unterscheiden. Diese Werte waren jedoch teilweise unrealistisch hoch und somit nicht verlässlich. Daher kann nur die Anwesenheit von Nitratreduzierern in den positiven Kulturen, nicht jedoch die von Denitrifikanten als gesichert angesehen werden.

### **2.5.5.2 Einfluß des pH-Wertes auf die Denitrifikantenzellzahlen**

Eine anoxische Verdünnungsreihe aller Böden im VM-Medium wurde wie oben beschrieben hergestellt. Je 50 µl der Verdünnungsstufen 10<sup>-3</sup>– 10<sup>-9</sup> wurden in sechs Parallelen zu 150 µl DN4-, DN6- oder DN8-Medium in Mikrotiterplatten gegeben und gemischt. Negativkontrollen (ebenfalls in sechs Parallelen) enthielten VM-Medium statt einer Bodenverdünnung. Die Inkubation erfolgte bei 15 °C in Anaerobentöpfen mit N<sub>2</sub> als Gasphase mit 0,1 mbar Überdruck. Nach 10 Wochen wurde die OD<sub>660</sub> mit dem µQuant Universal Microplate Spectrophotometer (BIO-TEK Instruments GmbH, Bad Friedrichshall)

und dem Programm Gen5 1.04.5 (BioTek Instruments, Inc., Winooski, USA) bestimmt. Dies wurde von Anita Gößner (Technische Angestellte) und Kristin Schacht (Studentische Hilfskraft) durchgeführt. Von den HEG 9-Anreicherungen wurden von den höchsten bewachsenen Verdünnungsstufen und den niedrigsten unbewachsenen Verdünnungsstufen je 60 µl entnommen und 1:50 mit DM-Medium ohne Nitrat verdünnt. Von diesen wurden der Nitrit- und der Ammoniumgehalt bestimmt (s. Abschnitt 2.4.3). Von diesen Stichproben zeigten Anreicherungen mit hoher OD<sub>660</sub> (> 0,5) durchweg eine Abnahme des Nitritgehalts um mindestens 90 % während der Ammoniumgehalt um höchstens 40 % verringert war. Daher kann davon ausgegangen werden, dass Anreicherungen mit hoher OD<sub>660</sub> denitrifikationspositiv waren.

Nach Abschluss des Versuchs wurden die Anreicherungen zur Kultivierung verwendet (s. Abschnitt 2.5.3).

### **2.5.6 Bestimmung der potentiellen Denitrifikationsraten in Abhängigkeit vom pH-Wert**

Die Bestimmung der potentiellen Denitrifikationsraten in Abhängigkeit vom pH-Wert erfolgte in Mikrokosmen mit einer Modifikation des Denitrification Enzyme Assay (DEA; (Tiedje *et al.*, 1989). Dazu wurden 5 g Boden in 120 ml MK-Flaschen eingewogen und 20 ml DM-Medium zugegeben. Für jeden Boden wurden pro pH-Wert drei parallele Mikrokosmen angesetzt. Der gewünschte pH-Wert wurde mit NaOH und HCl eingestellt. Aufgrund der großen Eigenpufferkapazität der Böden wurde der pH-Wert über einen Zeitraum von sechs Stunden stündlich neu eingestellt. In der Zwischenzeit wurden die Mikrokosmen bei 15 °C auf einem Flachsüttler inkubiert. Anschließend wurden in den Mikrokosmen durch Begasung mit sterilem Ar anoxische Bedingungen mit einem Überdruck von  $3 \times 10^4$  Pa eingestellt. Dann erfolgte eine Vorinkubation über Nacht bei

## 2. Material und Methoden

15 °C auf dem Flachschtüttler, um den Nitrat- und Nitritgehalt der Böden zu reduzieren. Vor Beginn der Messungen wurde der pH-Wert zweimal im Abstand von einer Stunde unter anoxischen Bedingungen korrigiert. Es war jedoch nicht möglich, die pH-Werte wie gewünscht auf 4,0, 5,1, 6,2, 7,3 und 8,4 (jeweils drei Replikate) einzustellen. Stattdessen wurde versucht, sich diesen Werten so gut wie möglich anzunähern. Dabei wurden Werte zwischen 4,0 und 8,5 erreicht (s. Abschnitt 3.2).

Unmittelbar vor Beginn der Messung wurden 0,5 µl Vitaminlösung, Kaliumnitrat (Endkonzentration: 2 mM), sowie Acetylen (Endkonzentration: 10 % [v/v]) zugegeben. Von diesem Zeitpunkt an wurden die N<sub>2</sub>O- und CO<sub>2</sub>-Konzentrationen stündlich gaschromatographisch bestimmt (s. Abschnitt 2.4.4) und der pH-Wert unter oxischen Bedingungen gemessen (durchgeführt von den studentischen Hilfskräften Christian Seybold und Verena Zahn). Anschließend wurden die Denitrifikationsraten als die Änderung der N<sub>2</sub>O-Emissionen über einen Zeitraum von vier Stunden berechnet. Die während der Messung ermittelten pH-Werte jedes Replikates wurden gemittelt.

## 2.6 Molekularbiologische Methoden

### 2.6.1 Isolierung von DNA

Die Extraktion von DNA aus Böden zur Amplifikation funktioneller Gene und anschließender Pyrosequenzierung erfolgte nach Degelmann *et al.* (Degelmann *et al.*, 2009). Die DNA wurde nach der Extraktion in 30 µl A. dest gelöst und bei -20 °C aufbewahrt.

### **2.6.2 Reinigung von DNA**

Die Aufreinigung von PCR-Produkten für die Pyrosequenzierung und die t-RFLP-Analyse erfolgte durch Gelelution mit dem Gel Extraction Kit (Millipore Corporation, Billerica, USA) nach Herstellerangaben.

Mit Endonuklease behandelte Proben sowie PCR-Produkte, die für die Sangersequenzierung verwendet werden sollten, wurden mit dem Millipore Multiscreen 96-well Filtration System (Millipore Corporation, Billerica, USA) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

Die Aufreinigung von DNA wurde teilweise von Anita Gößner (Technische Angestellte), Linda Hink (Studentische Hilfskraft) und Ralf Mertel (Technischer Angestellter) durchgeführt.

### **2.6.3 Fällung von DNA**

Zur Fällung von DNA wurden 0,7 Volumina 100 %-iges Isopropanol und 0,1 Volumen NaCl (3 M) zur DNA-Lösung gegeben und gemischt. Dann wurde die Mischung über Nacht bei -20 °C präzipitiert und anschließend eine Stunde bei 15 °C und 18000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und 500 µl eiskaltes Ethanol (70 %) zum Pellet gegeben. Nach 10 minütiger Inkubation bei RT wurde 5 min bei 16500 x g zentrifugiert, der Überstand erneut abgenommen und das Pellet an der Luft getrocknet. Das Pellet wurde in 30 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert.

## 2. Material und Methoden

### 2.6.4 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von für die Sangersequenzierung bestimmter DNA wurde spektrophotometrisch mit dem NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) und dem Programm NanoDrop ND 1000 3.3 (National Instruments Corporation, Austin, USA) bestimmt.

Die Konzentration von DNA, die zur Pyrosequenzierung verwendet werden sollte, wurde mit dem Quant-it™ PicoGreen® System (Invitrogen, Darmstadt) von Ralf Mertel (Technischer Angestellter) bestimmt. Dazu wurde der FLx800 Fluorescence Microplate Reader (BIO-TEK Instruments GmbH, Bad Friedrichshall) und das Programm Gen5 1.04.5 (BioTek Instruments, Inc., Winooski, USA) verwendet.

### 2.6.5 Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden in 1 %igen Agarosegelen [w/v] mit TAE-Elektrophoresepuffer (40 mM Tris, 11,42% [v/v] Eisessigsäure, 2 mM Na<sub>2</sub>EDTA x 2 H<sub>2</sub>O) als Laufpuffer mit einer Spannung von 100 V aufgetrennt. Der Gellösung wurde 0,001 % Ethidiumbromid (v/v) beigefügt. Die Visualisierung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen erfolgte durch Bestrahlung des Gels mit UV-Licht (302 nm). Die Fluoreszenz des in der DNA interkalierenden Ethidiumbromids wurde im Dunkeln fotografisch mit der Canon PowerShot G5 Kamera (Canon, Krefeld, Deutschland) und dem Programm Canon Utilities Remote Capture 2.7.3.23 (Canon, Inc., New York, USA) festgehalten. Alle Proben wurden vor dem Beladen der Geltaschen mit DNA-Auftragspuffer (5% Glycerin, 4,2% Tris/EDTA-Puffer (10 mM Tris/Cl (pH 7,4), 1 mM EDTA (pH 8,0)), 0,8% H<sub>2</sub>O, 0,4% Orange G, 0,03% Bromphenolblau, 0,03% Xylenzylanol FF) versetzt.

Zur Gelelektion wurde modifizierter TAE-Elektrophoresepuffer (40 mM Tris-Acetat, 0,25 mM Na<sub>2</sub>EDTA, (pH 8,0)) verwendet.

### 2.6.6 Enzymatische Modifikation

Methoden zur Manipulation von DNA erfolgten nach den Angaben des Herstellers. Das Entfernen einzelträngiger Enden von DNA erfolgte durch Inkubation mit 1 U Mung Bean Nuclease und Mung Bean-Puffer für 1 h bei 30 °C. Zur Restriktion aufgereinigter PCR-Produkte wurden 5 µl PCR-Produkt mit 5 U Restriktionsenzym und Restriktionspuffer in 7 µl-Ansätzen 16 h inkubiert und anschließend 20 min bei 80 °C hitzeinaktiviert. Restriktionsansätze mit *Bsa*HI enthielten BSA. Restriktionen mit *Bsa*JI erfolgten bei 37 °C. Restriktionen mit *Bst*UI wurden nicht hitzeinaktiviert.

### 2.6.7 PCR

Amplifikation von DNA zur Pyrosequenzierung erfolgte in einem 100 µl-Ansatz unter Verwendung von TaqMaster PCR Enhancer (5 Prime, Hamburg, Deutschland) und 40 ng Template-DNA. Die Reaktionsansätze wurden teilweise von Ralf Mertel (Technischer Angestellter) pipettiert. Um DNA zur tRFLP-Analyse zu amplifizieren wurden 50 µl-Ansätze mit 20 ng Template-DNA und TaqMaster PCR Enhancer eingesetzt. Dabei war jeweils ein Primer fluoreszenzmarkiert (s. Tabelle 8). Die Reaktionsansätze wurden von Linda Hink (Studentische Hilfskraft) pipettiert. Zur Amplifikation der 16S rRNA-Gene von Isolaten wurde eine Kolonie-PCR im 50 µl-Maßstab durchgeführt. Dazu wurden ganze Zellen als Matritze eingesetzt, die zuvor im Mikrowellenherd 1 min bei 600 W aufgebrochen worden waren. Die Reaktionsansätze wurden teilweise von Anita Gößner (Technische Angestellte) pipettiert.

## 2. Material und Methoden

Ein Reaktionsansatz enthielt jeweils 5Prime Mastermix (5 Prime, Hamburg, Deutschland), TaqMaster PCR Enhancer (5 Prime, Hamburg, Deutschland), 18 mM BSA und 0,5 mM Mg<sup>2+</sup> (bzw. 1 mM zur Amplifizierung der 16S rRNA-Gene und 1,5 mM zur Amplifizierung von *nrfA*-Genen). Die jeweils eingesetzten Primer und Primerkonzentrationen sind der Tabelle 8 zu entnehmen, die verwendeten PCR-Programme finden sich in den Tabellen 9 und 10.

**Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete Primer und ihre Konzentration im Reaktionsansatz.**

Name	Sequenz (5' → 3')	Konzentration	Zielgen	Referenz
narG1960f	TAY GTS GGS CAR GAR AA	2 pmol/μl	<i>narG</i>	Phillipot <i>et al.</i> , 2002
narG2650r	TTY TCR TAC CAB GTB GC	2 pmol/μl	<i>narG</i>	Phillipot <i>et al.</i> , 2002
nosZ-FRich	CGC TGT TCI TCG ACA GYC AG	0,6 pmol/μl	<i>nosZ</i>	Rich <i>et al.</i> , 2003
nosZR-Rich	ATG TGC AKI GCR TGG CAG AA	0,6 pmol/μl	<i>nosZ</i>	Rich <i>et al.</i> , 2003
F1aCu <sup>a</sup>	ATC ATG GTS CTG CCG CG	4 pmol/μl	<i>nirK</i>	Hallin und Lindgren, 1999
R3Cu	GCC TCG ATC AGR TTG TGG TT	4 pmol/μl	<i>nirK</i>	Hallin und Lindgren, 1999
cd3aF <sup>a</sup>	GTS AAC GTS AAG GAR ACS GG	4 pmol/μl	<i>nirS</i>	Michotey <i>et al.</i> , 2000
R3cd	GAS TTC GGR TGS GTC TTG A	4 pmol/μl	<i>nirS</i>	Michotey <i>et al.</i> , 2000
napA_F1	CTG GAC IAT GGG YTT IAA CCA	2 pmol/μl	<i>napA</i>	Alcántara-Hernández <i>et al.</i> , 2009
napA_R1	CCT TCY TTY TCI ACC CAC AT	2 pmol/μl	<i>napA</i>	Alcántara-Hernández <i>et al.</i> , 2009
F1	ACA CAC GCI TGY TGG WSN TGY AA	2 pmol/μl	<i>nrfA</i>	Mohan <i>et al.</i> , 2004
7R1	ACA CAC TWI GGC ATR TGR CAR TC	2 pmol/μl	<i>nrfA</i>	Mohan <i>et al.</i> , 2004
4Fa	TCC GGT TGA TCC TGC CRG	0,4 pmol/μl	16S rRNA	Hershberger <i>et al.</i> , 1996
27F	AGA GTT TGA TCM TGG CTC	0,4 pmol/μl	16S rRNA	Weisburg <i>et al.</i> , 1991
1492R	GGT TAC CTT GTT ACG ACT T	0,4 pmol/μl	16S rRNA	Weisburg <i>et al.</i> , 1991

<sup>a</sup>Für die t-RFLP-PCR am 5'-Ende mit dem Infrarotfarbstoff IRD-700 fluoreszenzmarkiert

**Tabelle 9: PCR-Programme zur Amplifikation struktureller Gene.**

Schritt	<i>napA</i> -PCR		<i>narG</i> -PCR		<i>nirK</i> -PCR		<i>nirS</i> -PCR		<i>nosZ</i> -PCR		<i>nrfA</i> -PCR	
	Temperatur	Dauer	Temperatur	Dauer	Temperatur	Dauer	Temperatur	Dauer	Temperatur	Dauer	Temperatur	Dauer
1. Anfangsdenaturierung	95 °C	2 min	95 °C	5 min	95 °C	5 min	95 °C	5 min	95 °C	10 min	95 °C	5 min
2. Denaturierung	95 °C	1 min	95 °C	1 min	95 °C	0,5 min	95 °C	0,5 min	95 °C	0,5 min	95 °C	1 min
3. Anlagerung	57 °C	1 min	58 °C /-0,5 °C <sup>a</sup>	1 min	67 °C /-0,5 °C <sup>a</sup>	0,66 min	67 °C /-0,5 °C <sup>a</sup>	1 min	58 °C /- 0,5 °C <sup>a</sup>	1 min	60 °C /-0,5 °C <sup>a</sup>	1 min
4. Elongation	72 °C	1 min	72 °C	1,5 min	72 °C	1 min	72 °C	1 min	72 °C	1 min	72 °C	1,5 min
5. Schritt 2 bis 4		35 x		10 x		9 x		14 x		10 x		30 x
6. Denaturierung			95 °C	1 min	95 °C	0,5 min	94 °C	0,5 min	95 °C	0,5 min	94 °C	0,5 min
7. Anlagerung			55 °C	1 min	62,5 °C	0,66 min	63 °C	1 min	52 °C	1 min	45 °C	0,5 min
8. Elongation			72 °C	1 min	72 °C	1 min	72 °C	1 min	72 °C	1 min	72 °C	1 min
9. Schritt 6 bis 8				25 x		30 x		30 x		30 x		30 x
10. Endelongation	75 °C	10 min	72 °C	5 min	75 °C	10 min	75 °C	10 min	72 °C	10 min	72 °C	10 min

<sup>a</sup>Touchdown: Die Temperatur wurde in jedem Zyklus um 0,5 °C verringert

## 2. Material und Methoden

**Tabelle 10: PCR-Programme zur Amplifikation bakterieller (A) und archaeeller (B) 16S rRNA-Gene.**

A			B		
Schritt	Temperatur	Dauer	Schritt	Temperatur	Dauer
1. Anfangsdenaturierung	95 °C	10 min	1. Anfangsdenaturierung	95 °C	18 min
2. Denaturierung	95 °C	1 min	2. Denaturierung	95 °C	0,5 min
3. Anlagerung	40 °C/+0,5 °C <sup>1</sup>	1 min	3. Anlagerung	55 °C	0,5 min
4. Elongation	72 °C	1 min	4. Elongation	72 °C	1,5 min
5. Schritt 2 bis 4		5 x	5. Schritt 2 bis 4		35 x
6. Denaturierung	95 °C	0,66 min	6. Endelongation	72 °C	5 min
7. Anlagerung	43 °C	0,66 min			
8. Elongation	72 °C	1 min			
9. Schritt 6 bis 8		35 x			
10. Endelongation	75 °C	10 min			

<sup>a</sup>Touchdown: Die Temperatur wurde in jedem Zyklus um 0,5 °C erhöht

### 2.6.8 Analyse der terminalen Restriktionsfragmentlängen-polymorphismen (t-RFLP)

Zum Vergleich der Denitrifikantendiversität der verschiedenen Böden wurde eine t-RFLP-Analyse von *nirK*-, *nirS*- und *nosZ*-Genen durchgeführt. Dazu wurden von DNA aus allen Böden und von allen Probennahmezeitpunkten fluoreszenzmarkierte Amplifikate generiert und durch Gelelektion aufgereinigt. Einzelsträngige Enden der PCR-Produkte wurden durch Behandlung der Eluate mit Mung Bean Nuclease entfernt. Die DNA wurde anschließend durch Filtrieren gereinigt und dann mit Restriktionsenzymen (*nirK*-PCR-Produkte mit *BsaJI*, *nirS*-PCR-Produkte mit *BstUI* und *nosZ*-PCR-Produkte mit *BsaHI*) geschnitten. 1 µl einer 1ng/µl-Lösung der geschnittenen PCR-Produkte wurde mit 1 µl Stop Solution (Li-Cor Biosciences, Bad Homburg) und 1 µl des Längenstandards mit 2 µl Stop Solution versetzt. Anschließend wurde. Dann wurden die Proben für 5 min bei 95 °C denaturiert und anschließend auf Eis gestellt. Von jeder Proben wurde 1 µl, vom Längenstandard 0,5 µl, auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Der t-RFLP-Lauf wurde durchgeführt, wie an

anderer Stelle beschrieben (Depkat-Jakob *et al.*, 2010). Aus den so entstandenen Gelbildern wurde mit dem Programm GelQuest 2.7.0 (SequentiX, Klein Raden, Deutschland) die relative Fluoreszenzintensität der t-RFs ermittelt. Bei den weiteren Analysen wurden nur diejenigen berücksichtigt, die in mindestens einer Probe eine relative Fluoreszenz von mindestens 5 % zeigten. Die Werte der t-RFs aller vier Probenahmezeitpunkte eines Bodens wurden gemittelt. Diese Mittelwerte dienten als Grundlage für multivariate Gradientenanalysen (s. Abschnitt 2.8.2.).

### 2.6.9 Sangersequenzierung

Zuvor aufgereinigte PCR-Produkte aus der 16S-Kolonie-PCR von Isolaten wurden von der Firma Macrogen (Seoul, Südkorea) sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte mit dem Primer "27F" (s. Tabelle 8).

#### 2.6.9.1 Auswertung der Sequenzen aus der Sangersequenzierung

Von den 16S rRNA-Sequenzen der Isolate wurde der Bereich zwischen den Basen 81- 680 weiterverwendet. Die Identifizierung von chimären 16S rRNA-Sequenzen erfolgte mit dem chimera.slayer des mothur-Projektes ([www.mothur.org](http://www.mothur.org)) (Schloss *et al.*, 2009). Chimäre Sequenzen wurden von weiteren Analysen ausgeschlossen. Die Sequenzen jedes Isolierungsansatzes wurden auf Speziesebene (s. Abschnitt 2.7) mit JAguc 2.0 (<http://www.wagak.informatik.uni-kl.de/research/JAguc>) (Nebel *et al.*, 2011) geclustert (UPGMA (Sokal und Michener, 1958)). Die Referenzsequenzen der so erhaltenen Cluster wurden mit der Datenbank des NCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA) verglichen, um die nächsten kultivierten Verwandten zu ermitteln. Dabei zeigte sich, dass eine Zuordnung der Sequenzen auf Speziesebene häufig nicht möglich war. Der Sequenzabgleich mit der NCBI-Datenbank wurde mit dem BLAST-Algorithmus

## 2. Material und Methoden

(Altschul *et al.*, 1997) durchgeführt. Die Taxonomie der ermittelten Spezies wurde der "List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature" (<http://www.lpsn.lautre.net/>) (Euzéby, 1997) entnommen.

Die Sequenzen aller durch anoxische Kultivierung erhaltenen Isolate wurden auf Speziesebene geclustert. Die so erhaltene Spezies-OTU-Tabelle wurde als Grundlage für eine Korrespondenzanalyse verwendet. Durch Datenbankabgleich der Referenzsequenzen wurden die nächsten kultivierten Verwandten ermittelt. Die Referenzsequenzen der Cluster und die Sequenzen der 16S rRNA-Gene ihrer nächsten kultivierten Verwandten wurden für eine phylogenetische Analyse in MEGA5 ([www.megasoftware.net](http://www.megasoftware.net)) (Tamura *et al.*, 2011) verwendet. Dazu wurden sie mit dem Clustal W-Aligner (Thompson *et al.*, 1994) aliniert, die evolutionäre Distanz mit der "p distance"-Methode bestimmt und ein Neighbor Joining-Stammbaum (Saitou und Nei, 1987) mit 1000 Bootstrap-Replikaten (Felsenstein, 1985) berechnet.

Sequenzvergleiche erfolgten mit Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>) (Sievers *et al.*, 2011).

### 2.6.10 Pyrosequenzierung

Zur Untersuchung der Diversität funktioneller Gene in den untersuchten Böden wurde eine Pyrosequenzierung der *narG*-, *napA*-, *nrfA*-, *nirK*-, *nirS*- und *nosZ*-Gene durchgeführt. Dazu wurden die entsprechenden Genmarker mit speziellen Primern amplifiziert, an deren 5'-Ende eine sechs Basen lange Sequenz (Primeranhang) zur Codierung der einzelnen Böden angehängt ist (s. Tabelle 11).

**Tabelle 11: Primeranhänge zur Codierung der Böden in der Pyrosequenzierung.**

Nummer	Sequenz	Boden
1	ACA CAC	AEG 2
2	ACG TAC	AEG 7
3	AGC GTC	AEW 5
4	ATA TAC	AEW 8
5	ACA CTG	HEG 6
5a	ACA GAG	HEG 6, <i>nosZ</i>
6	ACT GCG	HEG 9
7	AGT ATG	HEW 5
8	TAC AGC	HEW 12
9	TAT CGC	SEG 2
10	TCT CAC	SEG 9
10a	TGA CAC	SEG 9, <i>nirS</i>
11	TGT CTC	SEW 5
12	TAC TAG	SEW 9

Zur Amplifikation wurden die dem Boden der jeweiligen Template-DNA entsprechenden Primer verwendet. Die so gewonnenen PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgereinigt. Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma LGC Genomics (Berlin). Da von einigen Amplikons nur wenige Sequenzen erhalten wurden, wurde die Prozedur für die entsprechenden Genmarker wiederholt und die aufgereinigten PCR-Produkte durch das Göttingen Genomics Laboratory (Göttingen) sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte jeweils mit dem Roche/454 Genome Sequencer mit FLX Titanium Technologie.

### 2.6.10.1 Auswertung der Sequenzen aus der Pyrosequenzierung

Die durch Pyrosequenzierung erhaltenen Daten wurden entrauscht und die so erhaltenen Sequenzen vorsortiert. Dies wurde von Dr. Charles K. Lee (University of Waikato, Hamilton, Neuseeland) mit AmpliconNoise V1.25 (Quince *et al.*, 2011) durchgeführt. Die weitere Bearbeitung erfolgte mit dem Qiime-Paket ([www.qiime.org](http://www.qiime.org)) (Caporaso *et al.*,

## 2. Material und Methoden

2010): Es wurden nur Sequenzen mit einer Mindestlänge von 350 b, die kein N (unbestimmte Base) enthielten und keine Fehler in der Primersequenz und dem Primeranhang aufwiesen, weiterverwendet. Diese Sequenzen wurden nach Genmarker und Boden sortiert und Reste des Adapters entfernt.

Die Sequenzen jedes Genmarkers wurden auf Speziesebene (s. Abschnitt 2.7) in JAguc 2.0 (<http://www.agak.informatik.uni-kl.de/research/JAguc>) (Nebel *et al.*, 2011) geclustert (UPGMA; Sokal und Michener, 1958). Die translatierten Referenzsequenzen jedes Clusters wurden mit den translatierten Sequenzen der Nukleotiddatenbank des NCBI verglichen. Der Sequenzabgleich wurde mit dem BLAST-Algorithmus (Altschul *et al.*, 1997) durchgeführt. Referenzsequenzen, die nur zum Teil oder gar nicht mit Sequenzen des Zielproteins übereinstimmten oder deren Übereinstimmung einen Höchstwert (max. score) von 100 unterschritt, wurden als fehlerhaft deklariert. Sequenzen eines Clusters mit fehlerhafter Referenzsequenz wurden von weiteren Analysen ausgeschlossen. Die danach verbliebenen Sequenzen wurden erneut geclustert und die so erhaltene Spezies-OTU-Tabelle wurde als Grundlage für eine Korrespondenzanalyse verwendet (s. Abschnitt 2.8.2.2). Die nächsten kultivierten Verwandten wurden durch Datenbankabgleich der translatierten Referenzsequenzen mit der Proteindatenbank des NCBI ermittelt. Die Taxonomie der ermittelten Spezies wurde der "List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature" (<http://www.lpsn.lautre.net/>) (Euzéby, 1997) entnommen. Die Referenzsequenzen der Cluster und die Sequenzen der funktionellen Gene ihrer nächsten kultivierten Verwandten wurden für eine phylogenetische Analyse verwendet. Dazu wurden sie translatiert, mit dem Clustal W-Aligner aliniert, die evolutionäre Distanz mit der "p distance"-Methode bestimmt und ein Neighbour Joining-Stammbaum mit 1000 Bootstrap-Replikaten berechnet. Dazu wurde das Programm MEGA5 ([www.megasoftware.net](http://www.megasoftware.net)) (Tamura *et al.*, 2011) verwendet.

Auf der Grundlage der Spezies-OTU-Tabelle wurde der Diversitätsindex nach Shannon (Shannon, 1948) und die Äquität (Smith und Wilson, 1996) berechnet. Für die Abschätzung der Artenzahl wurde der Chao1-Schätzer (Chao, 1984) verwendet. Zur Überprüfung, ob die Stichprobengröße ausreichend war, wurde die Coverage berechnet (Schloss *et al.*, 2004). Die Diversitätsindizes, Coverage und Sättigungskurven wurden mit PAST 2.15 (<http://folk.uio.no/ohammer/past/>) (Hammer *et al.*, 2001).

## 2.7 Berechnung taxonomischer Grenzwerte

Ähnlichkeits-Grenzwerte weisen Umweltsequenzen einer operativen taxonomischen Einheit (OTU) zu. Die Grenzwerte für die Gene *narG* und *nosZ* wurden Palmer *et al.* (Palmer *et al.*, 2009) entnommen, die für die Gene *nirK* und *nirS* wurden von Peter Depkat-Jakob berechnet (persönliche Mitteilung). Die Bestimmung der Ähnlichkeits-Grenzwerte für die Gene *napA* und *nrfA* sowie für die 16S rRNA-Gene der Isolate (diese Sequenzen sind nur 600 bp lang) erfolgte, wie an anderer Stelle beschrieben (Palmer *et al.*, 2009). Alle Grenzwerte wurden abgerundet (s. Tabelle 12).

**Tabelle 12: In dieser Arbeit verwendete taxonomische Grenzwerte.**

Genmarker	Ähnlichkeits-Grenzwerte						Referenz
	Spezies		Gattung		Familie		
	DNA	Protein	DNA	Protein	DNA	Protein	
16S rRNA-Gen (komplettes Gen)	97 %	/	94 %	/	87 %	/	(Yarza <i>et al.</i> , 2008)
16S rRNA-Gen (600 bp)	95 %	/	90 %	/	85 %	/	diese Arbeit
<i>narG</i>	67 %	59 %	71 %	n.a. <sup>a</sup>	80 %	n.a.	(Palmer <i>et al.</i> , 2009)
<i>napA</i>	85 %	94 %	77 %	84 %	64 %	67 %	diese Arbeit
<i>nirK</i>	83 %	91 %	72 %	70 %	71 %	67 %	Depkat-Jakob (pers. Mitteilung)
<i>nirS</i>	82 %	86 %	70 %	61 %	66 %	58 %	Depkat-Jakob (pers. Mitteilung)
<i>nosZ</i>	80 %	86 %	67 %	n.a.	60 %	n.a.	(Palmer <i>et al.</i> , 2009)
<i>nrfA</i>	83 %	90 %	68 %	79 %	57 %	55 %	diese Arbeit

<sup>a</sup>n.a.: nicht angegeben

## 2.8 Statistische Analysen

### 2.8.1 Univariate Analysen

In allen Fällen wurden p-Werte  $\leq 0,05$  als signifikant angesehen. Univariate Analysen wurden mit PAST 2.15 (<http://folk.uio.no/ohammer/past/>) (Hammer *et al.*, 2001) durchgeführt.

#### 2.8.1.1 Mittelwert und Standardabweichung:

Von jedem Boden wurden zu 2-4 Zeitpunkten pH-Wert, Wassergehalt und Nitratgehalt bestimmt. Von allen gemessenen Werten jedes Parameters wurden das arithmetische Mittel und die Standardabweichung berechnet.

#### 2.8.1.2 Varianzanalyse:

Unifaktorielle Varianzanalysen wurden verwendet, um Unterschiede der Böden in Bezug auf ihre Eigenschaften (pH-Wert, Wassergehalt und Nitratgehalt) sowie den Einfluss des *in situ*-pH Wertes auf die potentiellen Denitrifikationszahlen und die Zellzahlen zu ermitteln. Zur Untersuchung des Einflusses der pH-Werte der Mikrokosmen auf die potentiellen Denitrifikationsraten der Böden wurde eine Klassenliste erstellt. Dazu wurden die gemessenen Denitrifikationsraten nach den pH-Werten, bei denen sie gemessen wurden, in sechs Klassen eingeteilt: pH 3,5-4,4; pH 4,5-5,4; pH 5,5-6,4; pH 6,5-7,4; pH 7,5-8,4 und pH 8,5-9,4. Diese Klassenliste wurde als Grundlage einer unifaktoriellen Varianzanalyse verwendet.

Zur Untersuchung des Einflusses vom Vegetationstyp und der Landnutzungsintensität auf

die Bodeneigenschaften wurden bifaktorielle Varianzanalysen durchgeführt (pH-Wert, Wassergehalt, Nitratgehalt, potentielle Denitrifikationsraten).

Die Homogenität der Varianzen wurde mit dem Levene Test (Levene, 1960) basierend auf Medianen untersucht. Im Falle von streuenden Varianzen wurde anstelle der Varianzanalyse ein Welch-F-Test (Welch, 1947) durchgeführt.

### **2.8.1.3 Weitere Tests:**

Ein Wilcoxon-Test (Wilcoxon, 1946) wurde angewandt, um Unterschiede zwischen den *in situ* pH-Werten der Böden und den pH-Werten, bei denen die Böden ihre maximalen potentiellen Denitrifikationsraten erreichten, zu ermitteln.

Um die Korrelation zwischen Bodeneigenschaften und Zellzahlen zu untersuchen, wurden Streudiagramme erstellt und der Korrelationskoeffizient Kendalls Tau berechnet (Kendall, 1938). Anschließend wurde die Signifikanz von Kendalls Tau mit Permutationstests bestimmt. Von Bodeneigenschaften, die mit den Zellzahlen korrelieren, und den Zellzahlen wurde eine lineare multiple Regression durchgeführt. Die Signifikanz des Korrelationskoeffizienten wurde durch eine Varianzanalyse getestet.

## **2.8.2 Multivariate Analysen**

### **2.8.2.1 Begriffserklärungen**

**Objekt:** Stichprobeneinheit- in dieser Arbeit: der untersuchte Boden.

**Ordination:** Verfahren der multivariaten Statistik, die Objekte in Koordinatensystemen auf der Basis von Daten über die Spezieszusammensetzungen der Objekte anordnen. Dabei

## 2. Material und Methoden

erfolgt eine Dimensionsreduktion, da multivariate Datensätze zu zwei- oder dreidimensionalen Diagrammen vereinfacht werden. Die den Spezieszusammensetzungen der Objekte zugrundeliegenden Gradienten werden herausgearbeitet und als Achsen verwendet. Ordinationsverfahren werden daher auch als **Gradientenanalysen** bezeichnet. In einem Ordinationsdiagramm sind Objekte mit ähnlicher Spezieszusammensetzung nah beieinander und Objekte mit unähnlicher Spezieszusammensetzung fern voneinander dargestellt. Der Abstand der Objektdarstellungen im Diagramm korrespondiert also direkt mit der Ähnlichkeit der Spezieszusammensetzung der Objekte. Wichtige Ordinationsverfahren sind die Korrespondenzanalyse (CA), die kanonische Korrespondenzanalyse (CCA), die Hauptkomponentenanalyse (PCA), die Redundanzanalyse (RDA) sowie metrische und nichtmetrische multidimensionale Skalierung ((N)MDS) (Übersicht in (Ramette, 2007)).

**Eigenvektor:** Ordinationsachse

**Eigenwert:** Ein Maß für die Auftrennung der Artwerte entlang einer Ordinationsachse (Eigenvektor). Jede Achse hat einen Eigenwert. Je wichtiger die Achse bzw. der zugrundeliegende Gradient für die Variation der Spezieszusammensetzung ist, desto größer ist der Eigenwert. In der CCA können höchstens so viele kanonische Achsen berechnet werden, wie Umweltvariablen in die Analyse eingehen. Zusätzlich können aber die nicht-kanonischen Residualachsen berechnet werden. Deren Eigenwerte sind ein Maß für den Anteil der Variation, die nach Entfernung der Effekte durch die Umweltvariablen übrigbleibt (ter Braak und Prentice, 1988).

**Summe aller Eigenwerte:** Ein Maß für die Gesamtvarianz der Artdaten.

**Summe aller kanonischen Eigenwerte:** Ein Maß für die Gesamtvarianz der im ersten

Schritt der CA von den Artdaten abgeleiteten Aufnahmewerte.

**Intraset-Korrelation:** Gibt Stärke und Richtung der Umweltvariablen (der Vektoren) im Diagramm an. Man kann daraus auf deren Bedeutung für die Eigenvektoren schließen.

**Interaset-Korrelation:** Erklärt die Beziehung zwischen den Ordinationen der Artdaten und den Umweltvariablen.

Die Werte für Intraset- und Interaset-Korrelation sind die Grundlage für die Berechnung der Ordinationsachsen.

**Varianzanteil:** Der Anteil der Varianz der Artdaten, der von den Achsen erklärt wird.

**Varianzanteil des Verhältnisses Spezies-Umwelt:** Der Anteil der Varianz der von den Artdaten abgeleiteten Aufnahmewerte, der von den Achsen erklärt wird.

### 2.8.2.2 Verwendete Ordinationsverfahren

Die **Korrespondenzanalyse** (CA = correspondence analysis) (Hill, 1973) ist ein univariates indirektes Ordinationsverfahren. Sie setzt voraus, dass sich die meisten Spezies unimodal entlang der wichtigsten Umweltgradienten verhalten. Die CA wird häufig angewendet, um herauszufinden ob Muster in der Speziesverteilung unterschiedliche Spezieszusammensetzungen wiedergeben, die durch den Einfluss von Umweltvariablen entstehen. Dazu wird eine theoretische Variable berechnet, die die Variation in den Speziesdaten optimal erklärt.

Die CA liefert unzutreffende Ergebnisse, wenn die Variation der Speziesdaten nur von einem Faktor beeinflusst wird. In diesem Fall beschreiben die Objekte im Diagramm einen

## 2. Material und Methoden

Bogen, was als Arch-Effekt bezeichnet wird. Weiterhin werden sie nicht im gleichen Abstand voneinander entlang der 1. Achse angeordnet. Diese Fehler können durch ein Entzerren (detrending) beseitigt werden. Dies erfolgt durch die DCA (detrended correspondence analysis), welche eine Weiterentwicklung der CA ist (Hill und Gauch, 1980). Die Algorithmen für das Entzerren nutzen z.B. Segmente oder Polynome (ter Braak und Prentice, 1988). Beim Entzerren durch Segmente (detrending by segments) findet eine Neuskalierung der Achsen statt. Diese stellen anschließend Vielfache der durchschnittlichen Standardabweichung (SD) des Artwechsels dar. Die Längen der Ordinationsachsen bekommen eine ökologische Bedeutung: Liegen zwei Objekte im Ordinationsdiagramm um mehr als vier SD-Einheiten voneinander entfernt, so haben diese normalerweise keine Spezies mehr gemeinsam.

Die **kanonische Korrespondenzanalyse** (CCA = canonical correspondence analysis) ist ein direktes Ordinationsverfahren (ter Braak, 1986). Sie berechnet keine theoretische Variable, sondern setzt die Variation der Spezieszusammensetzung in direkte Beziehung zu gemessenen Umweltvariablen. Dazu verbindet sie die Korrespondenzanalyse mit Regressionen der Umweltvariablen. Das daraus resultierende Diagramm enthält Punkte, die Spezies und Objekte sowie Vektoren, die Umweltvariablen darstellen. Die Orientierung eines Vektors gibt die Richtung, seine Länge die Stärke der Änderung einer Variablen in den Objekten wieder. Die Länge eines Vektors relativ zu einer Achse gibt die Stärke der Beziehung der Umweltvariablen zu dieser Achse (und der damit verbundenen Variation in der Spezieszusammensetzung) an. Kleine Winkel zwischen zwei Vektoren verweisen auf eine Korrelation der Umweltvariablen. Vektoren, die in entgegengesetzte Richtungen zeigen, bezeichnen negativ korrelierte Variablen.

Permutationstests sind Signifikanztests, die weder Normalverteilung noch homogene Varianzen voraussetzen. Permutationen generieren eine statistische Referenzverteilung

aus den Daten selbst. So entstehen robuste Schätzungen von Signifikanzniveaus. Monte-Carlo-Tests (Hope, 1968) werden verwendet, um die statistische Signifikanz der Beziehung zwischen den Spezies und den Umweltvariablen zu berechnen.

### 2.8.2.3 Multivariate Analysen in dieser Arbeit

Die Grundlage für die statistische Auswertung der Daten waren Matrizen. Diese enthielten Werte (Zellzahlen), Abundanzen (Isolate, Pyrosequenzierung) oder relative Werte (tRFs) für jeden Boden. Die Daten wurden logtransformiert ( $Y = \log(Y + 1)$ ), um den übermäßigen Einfluß einiger weniger Daten zu vermeiden. Für die kanonische Ordination wurden zehn Umweltvariablen (Bodeneigenschaften) verwendet: Vegetationstyp, Landnutzungsintensität, *in situ*-pH-Wert, Nitratgehalt, Wassergehalt, Ammoniumgehalt (Christa Lange), Stickstoffgehalt (Ingo Schöning) und Kohlenstoffgehalt (Ingo Schöning).

Zuerst wurde von jedem Datensatz eine DCA mit *detrending by segments* durchgeführt. Diese diente zur Ermittlung der Gradientenlänge und zur Kontrolle der CCA. Anschließend wurde eine CCA mit Monte-Carlo-Test für jede Umweltvariable durchgeführt. Mit allen Umweltvariablen, die einen signifikanten Einfluß auf die Speziesdaten zeigten, wurde dann eine CCA gerechnet. Diese Ergebnisse wurden in einem Biplot-Plot-Diagramm mit Objekten und Umweltvariablen wiedergegeben. Konnten keine Umweltvariablen mit signifikantem Einfluß auf die Artdaten ermittelt werden, so wurden die Ergebnisse der DCA zur Analyse der Ähnlichkeit der Böden bezüglich ihrer Speziesdaten verwendet.

Multivariate Analysen erfolgten in Canoco for Windows 4.5 (Microcomputer Power, Ithaca, USA). Folgende, von den Standardeinstellungen von CANOCO 4.5 (ter Braak und Šmilauer, 2002) abweichenden Bedingungen wurden für die Berechnungen multivariater Tests verwendet:

## 2. Material und Methoden

Bei CCAs lag der Fokus der Skalierung immer auf Objekt-Beziehungen. Da in der DCA in allen Fällen kurze Gradienten ermittelt wurden ( $< 4$  SD-Einheiten), wurde immer die Biplot-Skalierung angewandt (Lepš und Smilauer, 1999).

Monte-Carlo-Tests wurden für die erste Achse und für alle kanonischen Achsen zusammen erstellt. Es wurden jeweils 9999 Permutationen durchgeführt.  $p$ -Werte  $\leq 0,05$  wurden als signifikant angesehen.

## 2.9 Chemikalien und Enzyme

Die verwendeten Chemikalien stammten von den Firmen AppliChem GmbH (Darmstadt), Becton Dickinson (Heidelberg), Merck (Darmstadt), Fluka (Buchs SG, Schweiz), Riedel-de Haen (Buchs SG, Schweiz), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen). Gase wurden von der Firma Linde AG (Höllenberg) bezogen. Enzyme stammten von den Firmen New England Biolabs (Frankfurt am Main), Fermentas (St. Leon-Rot) und 5 Prime (Hamburg). Es wurde ausschließlich ultrafiltriertes Wasser (Seralpur 90 CN, Seral Erich Alhäuser, Ransbach-Baumbach) verwendet.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Biogeochemische Eigenschaften der Böden

Von allen Böden wurden pH-Wert, Wassergehalt und Nitratgehalt bestimmt. Dazu wurden die Proben der Aprilprobenahme verwendet. Von den Böden des Exploratoriums Hainich wurden außerdem auch Proben vom 01.12.2008 und vom 14.05.2009 eingesetzt. Zur Berechnung von Mittelwerten wurden zusätzlich von allen Böden auch Werte von Proben vom April 2008 (Zaatreh, 2008) verwendet. Die so berechneten Werte wurden für alle weiteren Versuche und Berechnungen verwendet.

#### 3.1.1 pH-Werte

Die pH-Werte der Böden wurden in wässrigen Extrakten und KCl-Extrakten bestimmt. Die in den wässrigen Extrakten ermittelten pH-Werte der Böden lagen zwischen 7,87 (AEG 7, April 2009) und 3,89 (SEW 5, April 2009) (s. Tabelle 13). Die in den KCl-Extrakten ermittelten pH-Werte der Böden lagen zwischen 7,47 (SEG 2, April 2009) und 3,23 (SEW 5, April 2009). Bei der Hälfte der Böden stieg der pH-Wert in den wässrigen Extrakten zwischen April 2008 und April 2009 um ca. 0,5 Einheiten an, während er bei fünf weiteren Böden etwa gleichblieb und in einem Boden (HEG 9) um ca. 0,5 Einheiten abfiel. Der pH-Wert in den KCl-Extrakten sank bei den meisten Böden zwischen April 2008 und April 2009 um mindestens 0,5 Einheiten, während er bei vier weiteren Böden etwa gleichblieb und in einem Boden (AEG 2) um ca. 0,5 Einheiten anstieg.

Die Mittelwerte der pH-Werte in den wässrigen Extrakten lagen zwischen 7,61 (AEG 7) und 4,01 (SEW 5), die der pH-Werte in den KCl-Extrakten lagen zwischen 7,45 (SEG 2)

### 3. Ergebnisse

und 3,34 (SEW 5). Die gemittelten Werte in den wässrigen Extrakten waren dabei höher als die gemittelten Werte in den KCl-Extrakten. Dies ist bedingt durch einen Kationenaustausch in den KCl-Extrakten, sodass der pH-Wert um etwa 0,5 Einheiten niedriger ist als der in wässrigen Extrakten gemessene Wert (Blume *et al.*, 2009).

**Tabelle 13: pH-Werte der Böden in wässrigen Extrakten (H<sub>2</sub>O) und KCl-Extrakten (KCl).**

Boden	pH-Wert									
	April 2008 <sup>a</sup>		Dezember 2008		April 2009		Mai 2009		Mittelwert <sup>b</sup>	
	H <sub>2</sub> O	KCl	H <sub>2</sub> O	KCl	H <sub>2</sub> O	KCl	H <sub>2</sub> O	KCl	H <sub>2</sub> O	KCl
AEG 2 <sup>c</sup>	6,6	5,7	n.g. <sup>e</sup>	n.g.	7,2	6,3	n.g.	n.g.	6,9 ± 0,1	6,0 ± 0,4
AEG 7 <sup>d</sup>	7,4	7,2	n.g.	n.g.	7,8	6,6	n.g.	n.g.	7,6 ± 0,4	6,9 ± 0,4
AEW 5	5,4	4,4	n.g.	n.g.	5,9	4,7	n.g.	n.g.	5,6 ± 0,4	4,5 ± 0,2
AEW 8	6,4	5,1	n.g.	n.g.	6,3	5,0	n.g.	n.g.	6,3 ± 0,1	5,0 ± 1,0
HEG 6	7,1	6,4	6,1	5,0	6,6	5,3	6,0	5,28	6,5 ± 0,5	5,5 ± 0,6
HEG 9	5,7	7,1	7,6	5,3	7,2	6,6	7,6	6,90	7,0 ± 0,9	6,5 ± 0,8
HEW 5	5,4	4,7	5,7	4,2	5,1	3,9	5,3	3,86	5,4 ± 0,2	4,2 ± 0,4
HEW 12	4,7	3,8	4,8	5,6	5,0	3,6	4,7	3,67	4,8 ± 0,1	3,7 ± 0,1
SEG 2	7,4	7,4	n.g.	n.g.	7,6	7,5	n.g.	n.g.	7,5 ± 0,1	7,5 ± 0,1
SEG 6	5,6	5,4	n.g.	n.g.	6,0	5,4	n.g.	n.g.	5,8 ± 0,3	5,4 ± 0,1
SEW 5	4,1	3,4	n.g.	n.g.	3,9	3,2	n.g.	n.g.	4,0 ± 0,2	3,3 ± 0,2
SEW 9	4,2	3,4	n.g.	n.g.	4,9	3,6	n.g.	n.g.	4,5 ± 0,5	3,5 ± 0,1

<sup>a</sup>Die Werte vom April 2008 stammen von Zaatreh (Zaatreh, 2008)

<sup>b</sup>Arithmetisches Mittel (± Standardabweichung) aller gemessenen Werte eines Bodens in wässrigen Extrakten bzw. KCl-Extrakten

<sup>c</sup>Grau: Böden unter intensiver Landnutzung

<sup>d</sup>Weiß: Böden unter weniger intensiver Landnutzung

<sup>e</sup>n.g.: nicht gemessen

Die Böden unterscheiden sich signifikant in ihren pH-Werten (in wässrigen Extrakten:  $p = 1,5 \times 10^{-7}$ ; in KCl-Extrakten:  $p = 5,6 \times 10^{-9}$ ), wie durch eine unifaktorielle Varianzanalyse gezeigt werden konnte. Die gemittelten pH-Werte der Waldböden waren um etwa 0,5 bis 3,5 pH-Einheiten niedriger als die der Grünlandböden des gleichen Exploratoriums. Die bifaktorielle Varianzanalyse zeigte, dass sich die pH-Werte der Waldböden signifikant von denen der Grünlandböden unterscheiden (in wässrigen Extrakten:  $p = 5,4 \times 10^{-7}$ ; in

KCl-Extrakten:  $p = 7,9 \times 10^{-9}$ ). Die pH-Werte der intensiv genutzten Böden unterscheiden sich jedoch nicht signifikant von denen der weniger intensiv genutzten Böden (in wässrigen Extrakten:  $p = 0,89$ ; in KCl-Extrakten:  $p = 0,8$ ). Es konnte also ein Einfluss des Vegetationstyps, nicht jedoch der Landnutzungsintensität auf den pH-Wert der Böden festgestellt werden.

Im Folgenden werden die Mittelwerte der Messungen in den wässrigen Extrakten als *in situ*-pH-Werte der Böden angenommen.

#### **3.1.2 Wassergehalt**

Der Wassergehalt der Böden lag zwischen 48,6 % (AEW 8, April 2009) und 7,2 % (SEW 5, April 2009). Bei den meisten Böden sank der Wassergehalt zwischen April 2008 und April 2009 um 15- 57 %, während er bei drei Böden (AEW 8, HEW 12 und SEG 6) etwa gleich blieb und in einem Boden (AEG 7) um ca. 25 % anstieg (s. Tabelle 14).

Die Mittelwerte des Wassergehalts lagen zwischen 60,4 % (SEG 2) und 12,9 % (SEW 9). Dabei konnte durch eine unifaktorielle Varianzanalyse gezeigt werden, dass sich die Böden signifikant in ihrem Wassergehalt unterscheiden ( $p = 4,28 \times 10^{-4}$ ). Die bifaktorielle Varianzanalyse ergab jedoch keinen signifikanten Unterschied im Wassergehalt der Waldböden von dem der Grünlandböden ( $p = 0,53$ ). Auch die intensiv genutzten Böden unterscheiden sich in ihrem Wassergehalt nicht signifikant von dem der weniger intensiv genutzten Böden ( $p = 0,77$ ). Ein Zusammenhang zwischen dem Vegetationstyp bzw. der Landnutzungsintensität und Wassergehalt konnte folglich nicht gefunden werden.

Im Folgenden werden die Mittelwerte der Messungen als Wassergehaltswerte der Böden angenommen.

### 3. Ergebnisse

**Tabelle 14: Wassergehalt der Böden.**

Boden	Wassergehalt [%]				
	April 2008 <sup>a</sup>	Dezember 2008	April 2009	Mai 2009	Mittelwert <sup>b</sup>
AEG 2 <sup>c</sup>	39	n.g. <sup>e</sup>	27,6	n.g.	33,2 ± 24,7
AEG 7 <sup>d</sup>	36,7	n.g.	45,7	n.g.	41,2 ± 15,5
AEW 5	44,4	n.g.	29,7	n.g.	37,0 ± 28,1
AEW 8	48,3	n.g.	48,7	n.g.	48,5 ± 0,5
HEG 6	28,0	20,8	19,3	17,1	21,3 ± 22,2
HEG 9	27,0	32,3	25,7	21,5	26,6 ± 16,8
HEW 5	44,1	67,6	25,1	29,1	21,5 ± 46,4
HEW 12	29,8	24,8	23,7	24,1	25,6 ± 11,1
SEG 2	46,9	n.g.	40,7	n.g.	43,8 ± 10,0
SEG 6	61,7	n.g.	59,1	n.g.	60,4 ± 3,0
SEW 5	20,7	n.g.	10,0	n.g.	15,4 ± 49,5
SEW 9	18,7	n.g.	7,2	n.g.	12,9 ± 26,7

<sup>a</sup>Die Werte vom April 2008 stammen von Zaatreh (Zaatreh, 2008)

<sup>b</sup>Arithmetisches Mittel (± Standardabweichung) aller gemessenen Werte eines Bodens in wässrigen Extrakten bzw. KCl-Extrakten

<sup>c</sup>Grau: Böden unter intensiver Landnutzung

<sup>d</sup>Weiß: Böden unter weniger intensiver Landnutzung

<sup>e</sup>n.g.: nicht gemessen

#### 3.1.3 Nitratgehalt

Der Nitratgehalt der Böden lag zwischen 4,1  $\mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1}$  (AEG 2, April 2009) und 0,4  $\mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1}$  (HEG 9, Dezember 2008). Bei zehn der zwölf Böden sank der Nitratgehalt zwischen April 2008 und April 2009 um 37 - 94 %, während er bei den Böden AEG 7 und AEW 5 um 300 % bzw. 164 % anstieg (s. Tabelle 15).

Der Mittelwert des Nitratgehalts lag zwischen 2,8  $\mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1}$  (AEG 2) und 0,4  $\mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1}$  (HEG 6 und SEW 9). Die Nitratkonzentration in den Böden schwankte sehr stark zwischen den einzelnen Messungen. Dies spiegelt sich auch in hohen Standardabweichungen von ca. 62 %- 195 % wieder. Dennoch wurden im folgenden die Mittelwerte verwendet, da die Werte der einzelnen Messungen die Verhältnisse in den Böden nur einseitig wiedergeben.

Tabelle 15: Nitratgehalt der Böden.

Boden	Nitratgehalt [ $\mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1}$ ]				Mittelwert <sup>b</sup>
	April 2008 <sup>a</sup>	Dezember 2008	April 2009	Mai 2009	
AEG 2 <sup>c</sup>	4,1	n.g. <sup>e</sup>	1,6	n.g.	2,8 ± 1,8
AEG 7 <sup>d</sup>	0,7	n.g.	2,8	n.g.	1,8 ± 1,5
AEW 5	0,7	n.g.	1,9	n.g.	1,3 ± 0,8
AEW 8	3,4	n.g.	1,0	n.g.	2,2 ± 1,7
HEG 6	0,7	0,1	n.g.	0,4	0,4 ± 0,3
HEG 9	0,7	0,1	0,1	1,2	0,5 ± 0,6
HEW 5	2,7	0,2	n.g.	0,3	1,0 ± 1,4
HEW 12	1,8	0,2	0,2	0,2	0,6 ± 1,1
SEG 2	3,1	n.g.	0,1	n.g.	1,6 ± 2,1
SEG 6	2,7	n.g.	0,5	n.g.	1,6 ± 1,5
SEW 5	0,8	n.g.	0,4	n.g.	0,6 ± 0,3
SEW 9	0,5	n.g.	0,3	n.g.	0,4 ± 0,2

<sup>a</sup>Die Werte vom April 2008 stammen von Zaatreh (Zaatreh, 2008)

<sup>b</sup>Arithmetisches Mittel ( $\pm$  Standardabweichung) aller gemessenen Werte eines Bodens in wässrigen Extrakten bzw. KCl-Extrakten

<sup>c</sup>Grau: Böden unter intensiver Landnutzung

<sup>d</sup>Weiß: Böden unter weniger intensiver Landnutzung

<sup>e</sup>n.g.: nicht gemessen

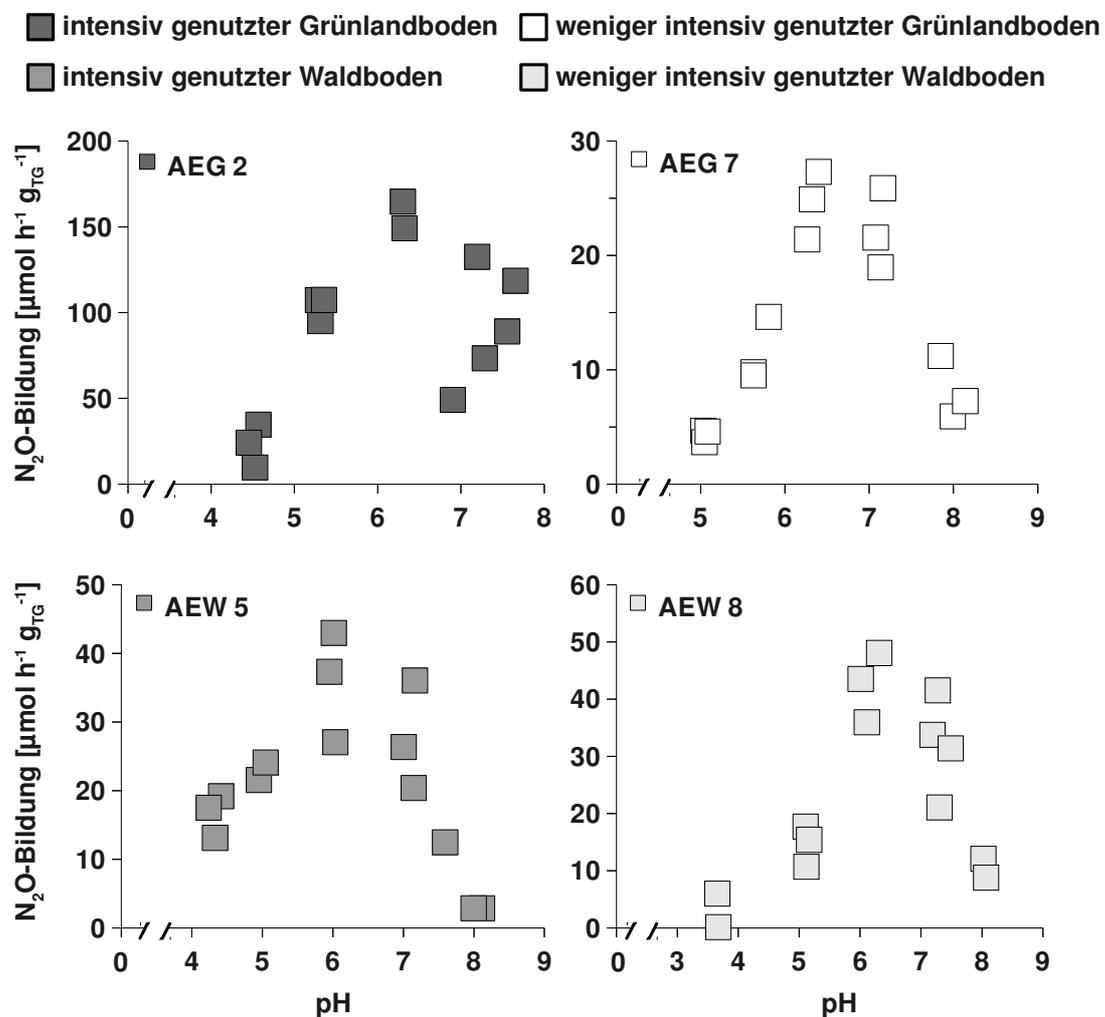
Die Böden unterscheiden sich nicht signifikant in ihrem Nitratgehalt (unifaktorielle Varianzanalyse;  $p = 0,39$ ). Ein Einfluss des Vegetationstyp bzw. der Landnutzungsintensität auf den Nitratgehalt kann daher in diesen Böden nicht bestehen.

## 3.2 Abhängigkeit der potentiellen Denitrifikationsraten vom pH-Wert

Um den Einfluß des pH-Wertes auf die potentielle Denitrifikationsaktivität der Böden zu ermitteln, wurden die Böden auf unterschiedliche pH-Werte eingestellt und anschließend die potentiellen Denitrifikationsraten ( $\text{N}_2\text{O}$ -Bildungsrate) bestimmt. Der gewünschte pH-Wert konnte aufgrund der hohen Eigenpufferkapazität der Böden nicht immer genau

### 3. Ergebnisse

eingestellt werden. Außerdem änderte sich der eingestellte pH-Wert in den Mikrokosmen während der Messung. Der Mittelwert der während der Messung ermittelten pH-Werte eines Mikrokosmos wurde daher als pH-Wert des Mikrokosmos angesehen (s. Abschnitt 2.5.6). Dies hatte zur Folge, dass nicht von jedem Boden drei Replikate mit dem gleichen pH-Wert vorlagen. Daher wurden keine Mittelwerte gebildet, sondern die Einzelwerte betrachtet. In einigen Mikrokosmen nahm die Menge gebildeten  $N_2O$ s im Laufe der Messung aus nicht geklärten Gründen ab, so dass keine potentiellen Denitrifikationsraten bestimmt werden konnten.



**Abbildung 5: Einfluss des pH-Werts auf die  $N_2O$ -Bildungsraten in den Böden des Exploratoriums Schwäbische Alb.**

In den Böden des Exploratoriums Schwäbische Alb wurden potentielle Denitrifikationsraten zwischen  $164,7 \mu\text{mol } (N_2O) \text{ h}^{-1} \text{ g}_{\text{TG}}^{-1}$  (AEG 2, pH 6,3) und  $0,1 \mu\text{mol } (N_2O) \text{ h}^{-1} \text{ g}_{\text{TG}}^{-1}$

### 3. Ergebnisse

(AEW 8, pH 3,7) gemessen (s. Abbildung 5). Die potentiellen Denitrifikationsraten des Bodens AEG 2 schwankten dabei sehr stark zwischen  $9,8 \mu\text{mol (N}_2\text{O) h}^{-1} \text{g}_{\text{TG}}^{-1}$  bei pH 4,5 und  $164,1 \mu\text{mol (N}_2\text{O) h}^{-1} \text{g}_{\text{TG}}^{-1}$  bei pH 6,3. Auffällig ist außerdem, dass der höchste gemessene Wert dieses Bodens drei- bis sechsmal so hoch ist wie die höchsten Werte der übrigen Böden des Exploratoriums Schwäbische Alb. In allen vier Böden waren die Werte im leicht sauren Bereich von pH 3,7 bis pH 5 und im leicht alkalischen Bereich von pH 7,6 bis pH 8,1 am niedrigsten. Die Böden AEG 2, AEW 5 und AEW 8 hatten ihr potentielles Denitrifikationsmaximum etwa im Bereich ihres *in situ* pH-Werts (s. Tabelle 16). Die höchste potentielle Denitrifikationsrate des Bodens AEG 7 wurde bei pH 6,4 gemessen, also im Vergleich zum *in situ* pH-Wert um 1 Einheit zum sauren Bereich hin verschoben

Die Böden des Exploratoriums Hainich hatten potentielle Denitrifikationsraten zwischen  $34,7 \mu\text{mol (N}_2\text{O) h}^{-1} \text{g}_{\text{TG}}^{-1}$  (HEG 9, pH 7,2) und  $0,2 \mu\text{mol (N}_2\text{O) h}^{-1} \text{g}_{\text{TG}}^{-1}$  (HEW 12, pH 8,0) (s. Abbildung 6). Die potentielle Denitrifikationsmaxima der Grünlandböden lagen bei  $26,2 \mu\text{mol (N}_2\text{O) h}^{-1} \text{g}_{\text{TG}}^{-1}$  (HEG 6) und  $34,7 \mu\text{mol (N}_2\text{O) h}^{-1} \text{g}_{\text{TG}}^{-1}$  (HEG 9), die der Waldböden bei  $9,5 \mu\text{mol (N}_2\text{O) h}^{-1} \text{g}_{\text{TG}}^{-1}$  (HEW 5) und  $1,7 \mu\text{mol (N}_2\text{O) h}^{-1} \text{g}_{\text{TG}}^{-1}$  (HEW 12). Somit waren die potentielle Denitrifikationsraten der Grünlandböden bis zu 20mal höher als die der Waldböden. In allen Böden waren sie bei ca. pH 4 am niedrigsten und in den Böden HEG 6, HEW 5 und HEW 12 wurde bei ca. pH 8 fast keine potentielle Denitrifikationsaktivität mehr gemessen. Der Boden HEG 9 jedoch hatte bei pH 8 fast so hohe potentielle Denitrifikationsraten wie bei pH 7,2- seinem potentiellen Denitrifikationsmaximum, das im Bereich seines *in situ* pH-Werts lag. Die höchste potentielle Denitrifikationsaktivität der anderen drei Böden wurde bei pH-Werten gemessen, die 0,4- 1,4 Einheiten höher lagen als ihre *in situ* pH-Werte.

### 3. Ergebnisse

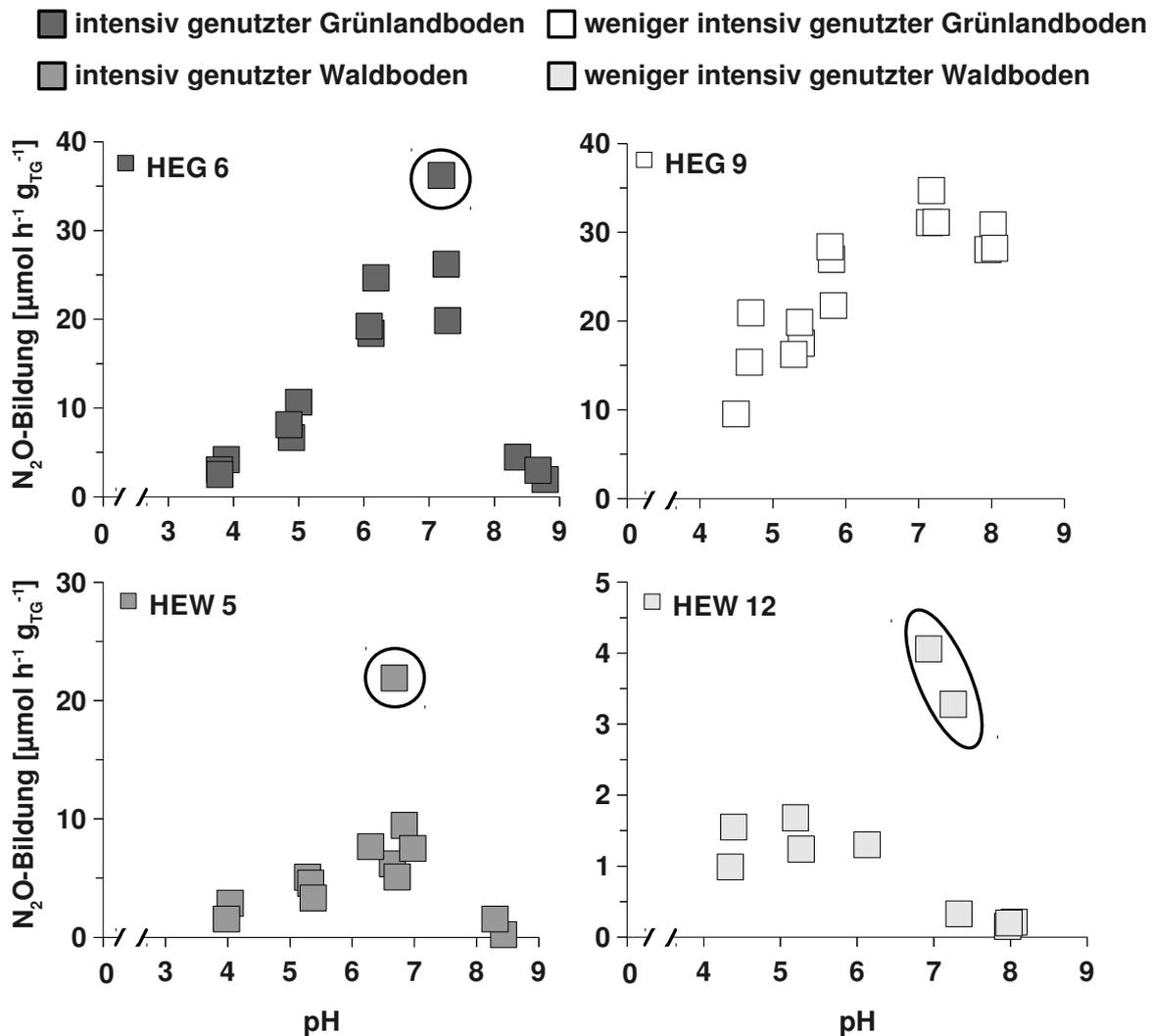
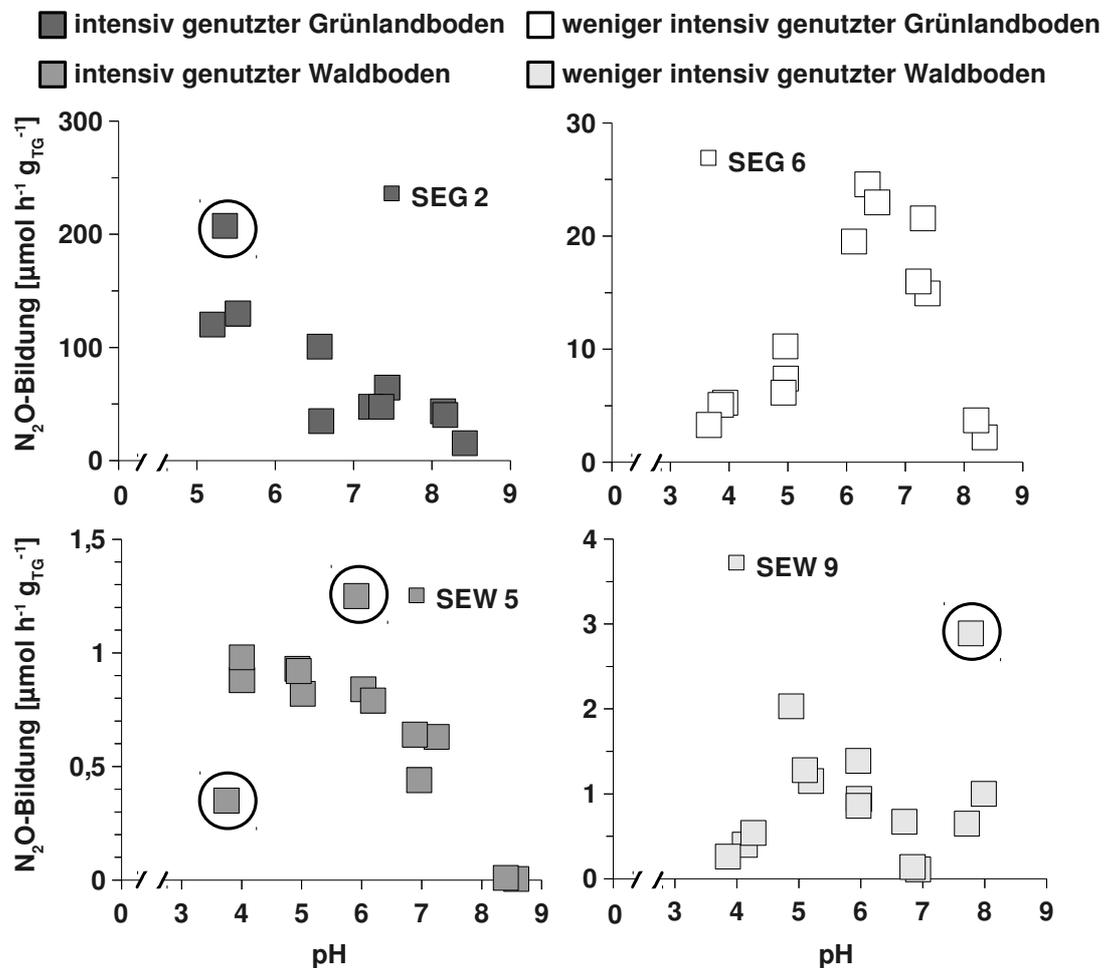


Abbildung 6: Einfluss des pH-Werts auf die N<sub>2</sub>O-Bildungsraten in den Böden des Exploratoriums Hainich.

Eingekreiste Datenpunkte stellen Ausreißer dar.

Die potentiellen Denitrifikationsraten der Böden des Exploratoriums Schorfheide Chorin lagen zwischen 207,5 µmol h<sup>-1</sup> g<sub>TG</sub><sup>-1</sup> (SEG 2, pH 5,4) und 0,01 µmol (N<sub>2</sub>O) h<sup>-1</sup> g<sub>TG</sub><sup>-1</sup> (SEW 5, pH 5,4) (s. Abbildung 7). Die potentiellen Denitrifikationsraten des Bodens SEG 2 schwankten sehr stark zwischen 15,2 µmol (N<sub>2</sub>O) h<sup>-1</sup> g<sub>TG</sub><sup>-1</sup> bei pH 4,5 und 129,9 µmol (N<sub>2</sub>O) h<sup>-1</sup> g<sub>TG</sub><sup>-1</sup> bei pH 5,5. In diesem Boden waren die potentiellen Denitrifikationsraten im leicht sauren pH-Bereich deutlich höher als im neutralen pH-Bereich seines *in situ* pH-Werts. Auch wurde die höchste potentielle Denitrifikationsrate dieses Bodens bei pH 5,5 gemessen, also im Vergleich zum *in situ* pH-Wert um 2 Einheit zum sauren Bereich hin verschoben. Die Böden SEW 5 und SEW 9 hatten potentielle

Denitrifikationsmaxima im leicht sauren Bereich ihres *in situ* pH-Werts. Die höchste potentielle Denitrifikationsaktivität des Bodens SEG 6 wurde bei einem im Vergleich zu seinem *in situ* pH-Wert leicht basischeren pH-Wert gemessen (s. Tabelle 16).



**Abbildung 7: Einfluss des pH-Werts auf die  $N_2O$ -Bildungsraten in den Böden des Exploratorium Schorfheide Chorin.**

Eingekreiste Datenpunkte stellen Ausreißer dar.

Die Böden unterscheiden sich sehr stark in ihren potentiellen Denitrifikationsraten. In den meisten Böden lagen die maximalen potentiellen Denitrifikationsraten bei 24- 48  $\mu\text{mol } (N_2O) \text{ h}^{-1} \text{ g}_{\text{TG}}^{-1}$ . Die maximalen potentiellen Denitrifikationsraten der Böden AEG 2 und SEG 2 lagen deutlich höher, nämlich bei 164,7 und 130,0  $\mu\text{mol } (N_2O) \text{ h}^{-1} \text{ g}_{\text{TG}}^{-1}$ . Die maximalen potentiellen Denitrifikationsraten der Böden HEW 5, HEW 12, SEW 5 sowie SEW 9 waren im Gegensatz dazu sehr niedrig; sie lagen zwischen

### 3. Ergebnisse

0,1  $\mu\text{mol (N}_2\text{O) h}^{-1} \text{g}_{\text{TG}}^{-1}$  und 9,5  $\mu\text{mol (N}_2\text{O) h}^{-1} \text{g}_{\text{TG}}^{-1}$ .

**Tabelle 16: *In situ*-pH-Werte und maximale potentielle Denitrifikationsrate (höchste N<sub>2</sub>O-Bildungsrate und pH-Wert bei dem sie gemessen wurde) der Böden.**

Boden	<i>in situ</i> -pH	maximale Denitrifikationsrate	
		bei pH	[ $\mu\text{mol (N}_2\text{O) h}^{-1} \text{g}_{\text{TG}}^{-1}$ ]
AEG 2 <sup>a</sup>	6,9	6,3	164,1
AEG 7 <sup>b</sup>	7,6	6,4	27,3
AEW 5	5,6	6,0	43,0
AEW 8	6,4	6,3	48,0
HEG 6	6,5	7,3	26,2
HEG 9	7,0	7,2	34,7
HEW 5	5,4	6,8	9,5
HEW 12	4,8	5,2	1,7
SEG 2	7,5	5,5	130,0
SEG 6	5,8	6,4	24,6
SEW 5	4,0	4,0	1,0
SEW 9	4,5	4,9	2,0

<sup>a</sup>Grau: Böden unter intensiver Landnutzung

<sup>b</sup>Weiß: Böden unter weniger intensiver Landnutzung

Eine Varianzanalyse der potentiellen Denitrifikationsraten mit den Faktoren Vegetationstyp und Landnutzungsintensität wurde durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die potentiellen Denitrifikationsraten durch die beiden interagierenden Faktoren signifikant beeinflusst werden ( $p = 3,9 \times 10^{-5}$ ). Das Zusammenwirken vom Vegetationstyp und der Landnutzungsintensität beeinflusst also die potentiellen Denitrifikationsraten der Böden. In diesem Fall kann jedoch nicht festgestellt werden, ob die beiden Faktoren auch unabhängig voneinander auf die potentiellen Denitrifikationsraten einwirken würden.

Eine Varianzanalyse der bei unterschiedlichem pH-Wert gemessenen potentiellen Denitrifikationsraten ergab, dass diese sich signifikant unterscheiden ( $p = 0,0005$ ). Ebenso konnte ein signifikanter Unterschied der potentiellen Denitrifikationsraten in Bezug auf ihren *in situ* pH-Wert festgestellt werden ( $p = 7,4 \times 10^{-20}$ ). Sowohl der (längerfristige) *in situ*

pH-Wert als auch der aktuelle pH-Wert in den Mikrokosmen beeinflussen also die potentiellen Denitrifikationsraten.

Die Hälfte der Böden erreichte ihre höchsten potentiellen Denitrifikationsraten im Bereich ihres *in situ* pH-Werts. Durch einen Wilcoxon-Test konnte gezeigt werden, dass sich die pH-Werte, bei denen die maximalen potentiellen Denitrifikationsraten gemessen wurden nicht signifikant von den *in situ* pH-Werten der Böden unterscheiden ( $p = 0,69$ ). Dies deutet darauf hin, dass die Denitrifikantengemeinschaften in den untersuchten Böden sehr gut an den pH-Wert ihrer Umgebung angepasst sind. Eine Varianzanalyse zeigte weiterhin, dass der Unterschied zwischen den pH-Werten, bei denen die maximalen potentiellen Denitrifikationsraten gemessen wurden und den *in situ* pH-Werten der Böden in Böden mit einem *in situ* pH-Wert unter 6 größer ist als in Böden mit einem *in situ* pH-Wert über 6 ( $p = 1,8 \times 10^{-15}$ ). Die Denitrifikantengemeinschaften in den Böden mit einem *in situ* pH-Wert unter 6 sind offenbar nicht so gut an den pH-Wert ihrer Umgebung angepasst wie die Denitrifikantengemeinschaften in den Böden mit einem *in situ* pH-Wert über 6.

## 3.3 Zellzahlen

### 3.3.1 Zellzahlen der Nitratreduzierer

Die Zellzahlen der Nitratreduzierer in den einzelnen Böden schwankten zwischen  $8,87 \times 10^7$  Zellen  $g_{TG}^{-1}$  (HEG 9) und  $6,68 \times 10^3$  Zellen  $g_{TG}^{-1}$  (SEW 9). Die meisten Böden enthielten zwischen  $10^5$  und  $10^6$  Nitratreduzierer  $g_{TG}^{-1}$  (s. Tabelle 17). Niedrigere Zellzahlen wurden nur in den weniger intensiv genutzten Waldböden (AEW 8, HEW 12 und SEW 9) und dem intensiv genutzten Waldboden SEW 5 gefunden. Durch eine bifaktorielle Varianzanalyse konnte jedoch gezeigt werden, dass sich die Zellzahlen der Grünlandböden nicht signifikant von denen der Waldböden unterscheiden ( $p = 0,29$ ).

### 3. Ergebnisse

Ebenso unterscheiden sich die Zellzahlen der intensiv genutzten Böden nicht signifikant von denen der weniger intensiv genutzten Böden ( $p = 0,35$ ). Die Zellzahlen der Nitratreduzierer werden also nicht von den Faktoren Vegetationstyp und Landnutzungsintensität beeinflusst.

**Tabelle 17: Zellzahlen der Nitratreduzierer in den Böden in  $g_{TG}^{-1}$ .**

Die Bestimmung der Zellzahlen erfolgte mit der MPN-Methode.

Boden	Zellzahlen [ $g_{TG}^{-1}$ ]
AEG 2 <sup>a</sup>	$3,3 \times 10^6$
AEG 7 <sup>b</sup>	$6 \times 10^6$
AEW 5	$3,2 \times 10^6$
AEW 8	$1,9 \times 10^4$
HEG 6	$8,9 \times 10^5$
HEG 9	$8,2 \times 10^7$
HEW 5	$1,1 \times 10^6$
HEW 12	$9,2 \times 10^4$
SEG 2	$8,9 \times 10^5$
SEG 6	$4,5 \times 10^5$
SEW 5	$5,5 \times 10^4$
SEW 9	$6,7 \times 10^3$

<sup>a</sup>Grau: Böden unter intensiver Landnutzung

<sup>b</sup>Weiß: Böden unter weniger intensiver Landnutzung

#### 3.3.2 Einfluß des pH-Werts auf die Denitrifikantenzellzahlen

Der Einfluss des pH-Werts auf die Zellzahlen der Denitrifikanten wurde untersucht. Dazu wurden die Denitrifikantenzellzahlen der Böden in Medium mit den pH-Werten 4, 6 und 8 bestimmt.

In Medium mit pH 4 wurden Denitrifikantenzellzahlen zwischen  $2,7 \times 10^3$  (SEW 5) und  $6 \times 10^4$  Zellen  $2 \times 10^5$  Zellen  $g_{TG}^{-1}$  (HEG 6) erreicht (s. Tabelle 18). Kulturen des Bodens SEW 9 zeigten kein Wachstum, obwohl der *in situ* pH-Wert dieses Bodens mit 4,54 sehr nah am pH-Wert des verwendeten Mediums liegt. Die Waldböden der Exploratorien

Hainich und Schorfheide Chorin wiesen geringere Zellzahlen auf als ihre jeweiligen Grünlandböden. Der weniger intensiv genutzte Waldboden des Exploratoriums Schwäbische Alb (AEW 8) hatte jedoch fast so hohe Zellzahlen wie der intensiv genutzte Grünlandboden (AEG 2) ( $2,36 \times 10^4$  bzw.  $3,36 \times 10^4$  Zellen  $2 \times 10^5$  Zellen  $g_{TG}^{-1}$ ). Die Zellzahlen der beiden anderen Böden des Exploratoriums waren ebenfalls in etwa gleich hoch (AEG 7:  $9,24 \times 10^3$  bzw. AEW 5:  $8,44 \times 10^3$  Zellen  $2 \times 10^5$  Zellen  $g_{TG}^{-1}$ ). Die Zellzahlen aus den intensiv genutzten Böden unterscheiden sich nicht signifikant von den Zellzahlen aus den weniger intensiv genutzten Böden. Selbiges gilt auch für den Vergleich von Grünland- und Waldböden. Bei Wachstum in Medium mit pH 4 konnte also kein Einfluss vom Vegetationstyp und der Landnutzungsintensität auf die Zellzahlen der Denitrifikanten gefunden werden.

**Tabelle 18: Zellzahlen der Denitrifikanten in  $g_{TG}^{-1}$  in Medien mit unterschiedlichem pH-Wert.**  
Die Bestimmung der Zellzahlen erfolgte mit der MPN-Methode.

Boden	Zellzahlen bei pH 4 [ $g_{TG}^{-1}$ ]	Zellzahlen bei pH 6 [ $g_{TG}^{-1}$ ]	Zellzahlen bei pH 8 [ $g_{TG}^{-1}$ ]
AEG 2 <sup>a</sup>	$3,3 \times 10^4$	$4,3 \times 10^4$	$3,5 \times 10^8$
AEG 7 <sup>b</sup>	$9,2 \times 10^3$	$1 \times 10^4$	$3,5 \times 10^9$
AEW 5	$8,4 \times 10^3$	$1,3 \times 10^4$	$4,4 \times 10^6$
AEW 8	$2,4 \times 10^4$	$3,1 \times 10^4$	$3,3 \times 10^8$
HEG 6	$6,1 \times 10^4$	$3,7 \times 10^4$	$3,9 \times 10^9$
HEG 9	$5,1 \times 10^4$	$6,3 \times 10^4$	$6,8 \times 10^9$
HEW 5	$3,5 \times 10^4$	$1,7 \times 10^4$	$2,6 \times 10^5$
HEW 12	$5 \times 10^3$	$3,5 \times 10^4$	$4,6 \times 10^8$
SEG 2	$3,5 \times 10^4$	$2 \times 10^5$	$5,5 \times 10^8$
SEG 6	$1,7 \times 10^4$	$4,5 \times 10^6$	$1,5 \times 10^{10}$
SEW 5	$2,7 \times 10^3$	0	$1,8 \times 10^4$
SEW 9	0	0	$1,1 \times 10^4$

<sup>a</sup>Grau: Böden unter intensiver Landnutzung

<sup>b</sup>Weiß: Böden unter weniger intensiver Landnutzung

In Medium mit pH 6 wurden Denitrifikantenzellzahlen zwischen  $1 \times 10^4$  (AEG 7) und  $4,5 \times 10^6$  Zellen  $g_{TG}^{-1}$  (SEG 6) ermittelt (s. Tabelle 18). Die meisten Böden, die Böden aus

### 3. Ergebnisse

den Exploratorien Schwäbische Alb und Hainich, hatten Zellzahlen zwischen  $1 \times 10^4$  und  $7 \times 10^4$  Zellen  $g_{TG}^{-1}$ . Ausnahmen sind die Böden des Exploratoriums Schorfheide Chorin. Die Grünlandböden erreichten die höchsten Zellzahlen von allen Böden, nämlich  $2 \times 10^5$  (SEW 5) und  $4,5 \times 10^6$  Zellen  $g_{TG}^{-1}$  (SEG 6). Die Kulturen der Waldböden (SEW 5 und SEW 9) jedoch zeigten in Medium mit pH 6 kein Wachstum. Die Zellzahlen in den intensiv genutzten Böden unterscheiden sich nicht signifikant von den Zellzahlen in den weniger intensiv genutzten Böden. Ebenso unterschieden sich die Zellzahlen aus den Grünlandböden nicht signifikant von denen aus den Waldböden. Der Vegetationstyp bzw. die Landnutzungsintensität haben demzufolge keinen Einfluss auf die Zellzahlen der Denitrifikanten bei Wachstum in Medium mit pH 6.

Bei Wachstum in Medium mit pH 8 wurden Zellzahlen zwischen  $1,1 \times 10^4$  (SEW 9) und  $1,47 \times 10^{10}$  Zellen  $g_{TG}^{-1}$  (SEG 6) ermittelt (s. Tabelle 18). Dabei wiesen die Grünlandböden immer höhere Zellzahlen auf als die Waldböden des jeweiligen Exploratoriums. Weiterhin hatten die Böden unter weniger intensiver Landnutzung höhere Zellzahlen als die Böden des gleichen Exploratoriums, die unter intensiver Landnutzung standen. Ausnahmen hiervon waren die Waldböden des Exploratoriums Schorfheide Chorin, die etwa gleich hohe Zellzahlen hatten (SEW 5:  $1,8 \times 10^4$  Zellen  $g_{TG}^{-1}$  bzw. SEW 9:  $1,1 \times 10^4$  Zellen  $g_{TG}^{-1}$ ). Bei Wachstum in Medium mit pH 8 unterscheiden sich die Zellzahlen der Denitrifikanten aus den Waldböden signifikant von denen aus den Grünlandböden. Die Zellzahlen aus den intensiv genutzten Böden unterscheiden sich jedoch nicht signifikant von den Zellzahlen aus den weniger intensiv genutzten Böden.

In allen drei Versuchen hatten die Waldböden des Exploratoriums Schorfheide Chorin die geringsten Zellzahlen. Die höchsten Zellzahlen bei neutralem und leicht alkalischem pH-Wert hatte der Boden SEG 6, ein weniger intensiv genutzter Grünlandboden. Bei Wachstum in Medium mit pH 4 erreichte der Boden HEG 6, ein intensiv genutzter

Grünlandböden, die höchsten Zellzahlen. Die niedrigsten Zellzahlen wurden in Medium mit pH 4, die höchsten in Medium mit pH 8 erhalten.

### 3.3.3 Statistische Analyse

Die Zellzahlen von Nitratreduzieren und Denitrifikanten eines Bodens sind Ausdruck seiner spezifischen Eigenschaften. Daher wurden die Böden auf der Grundlage der oben bestimmten Zellzahlen mit Mitteln der multivariaten Statistik verglichen. Zusätzlich wurden Zellzahlen von Nitratreduzieren in Medium mit pH 5, die in einer anderen Arbeit bestimmt worden waren (Haedicke, 2008), mit einbezogen.

Die DCA (detrended correspondence analysis) ergab einen Eigenwert für die 1. Achse von 0,333 und Eigenwerte unter 0,05 für die übrigen Achsen (s. Tabelle 19). Der 1. Achse kommt beinahe die alleinige Bedeutung für die Erklärung der Variation in den Zellzahldaten zu, da die Eigenwerte der übrigen drei Achsen extrem niedrig sind. Die 1. Achse erklärt 48 % der Varianz in den Zellzahldaten. Die Länge des Gradienten lag zwischen 1,823 SD-Einheiten für die 1. Achse und 0,702 SD-Einheiten für die 2. Achse. Der Gradient ist also sehr kurz, was auf einen homogenen Datensatz schließen lässt.

**Tabelle 19: Variation und Varianz der Zusammensetzung der Nitratreduzierer- und Denitrifikantenzellzahlen der Böden.**

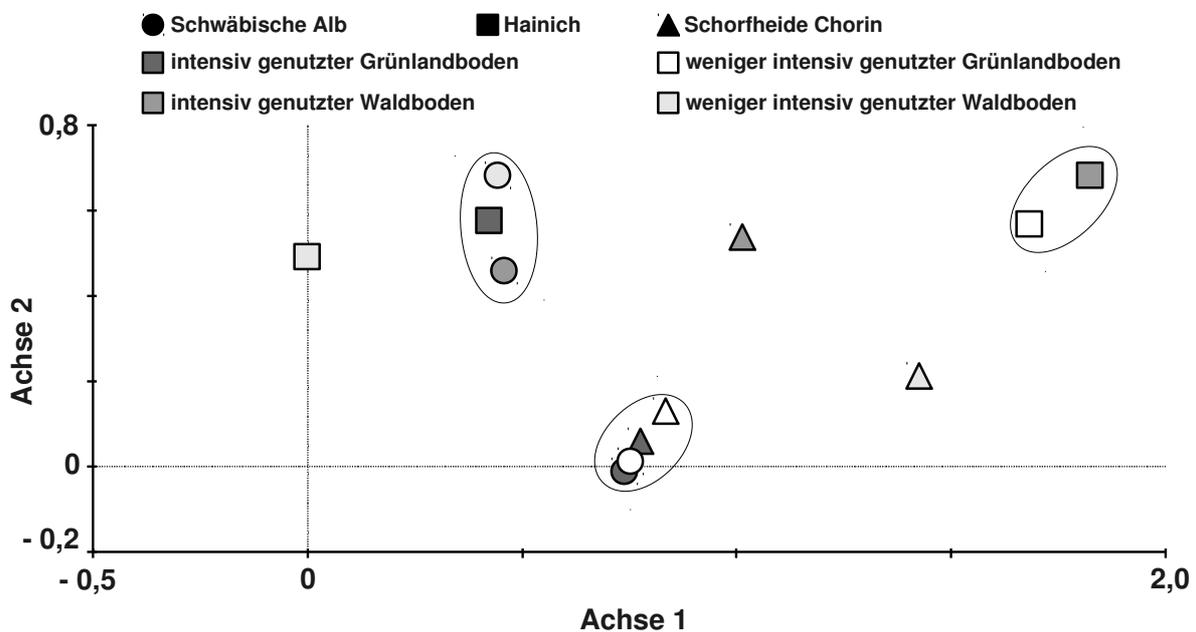
	Achse 1	Achse 2	Achse 3	Achse 4
Eigenwerte	0,333	0,004	0,001	0,000
Länge des Gradienten	1,823	0,689	0,712	0,702
Varianzanteil der Zellzahldaten [%]	48,0	48,6	48,8	48,9

Kanonische Ordinationen ergaben Eigenwerte der ersten kanonischen Achse zwischen 0,035 und 0,101 (s. Tabelle 20). Monte-Carlo-Tests konnten keinen signifikanten Einfluss der Bodeneigenschaften auf die Verteilung der Zellzahldaten aufzeigen (s. Tabelle 20).

### 3. Ergebnisse

**Tabelle 20: Korrelation der Bakteriengemeinschaften und der Bodeneigenschaften.**

Bodeneigenschaften	Eigenwert 1. kanonische Achse	F-Wert	p-Wert
Vegetationstyp	0,097	1,628	0,1327
Landnutzungsintensität	0,035	0,530	0,7449
<i>in situ</i> pH-Wert	0,101	1,699	0,1609
Stickstoffgehalt	0,072	1,150	0,2463
Kohlenstoffgehalt	0,059	0,935	0,3167
Nitratgehalt	0,110	1,877	0,1350
Ammoniumgehalt	0,090	1,489	0,2460
Wassergehalt	0,079	1,277	0,3046



**Abbildung 8: DCA der Zellzahlen von Nitratreduzierern und Denitrifikanten der verschiedenen Böden.** Böden, die sich bezüglich der Zellzahlen ähneln, sind eingekreist.

- AEG 2   ○ AEG 7   ● AEW 5   ○ AEW 8
- HEG 6   □ HEG 9   ■ HEW 5   □ HEW 12
- ▲ SEG 2   △ SEG 6   ▲ SEW 5   △ SEW 9

Keine der untersuchten Bodeneigenschaften kann also die Variation der Spezieszusammensetzung erklären. Daher können die Unterschiede der Böden auf der Grundlage von Nitratreduzierer- und Denitrifikantenzellzahlen nur durch das Streudiagramm der DCA analysiert werden (s. Abbildung 8). Dieses zeigt eine sehr große Ähnlichkeit der Grünland-

böden der Exploratorien Schwäbische Alb und Schorfheide Chorin in Bezug auf die Zellzahlen. Weiterhin weisen die Waldböden des Exploratoriums Schwäbische Alb und der intensiv genutzte Grünlandboden des Exploratoriums Hainich (HEG 6) deutliche Ähnlichkeiten bezüglich der Zellzahlen auf. Auch der weniger intensiv genutzte Grünlandboden (HEG 9) und der intensiv genutzte Waldboden des Exploratoriums Hainich (HEW 5) haben ähnliche Zellzahlen von Nitratreduzieren und Denitrifikanten. Alle anderen Böden zeigen diesbezüglich keine große Ähnlichkeit zu den anderen Böden.

## **3.4 Isolierung von Nitratreduzieren, Denitrifikanten und DNRA**

In dieser Arbeit wurden fünf verschiedene Ansätze zur Isolierung von Nitratreduzieren, Denitrifikanten und DNRA verwendet. Dabei wurden die Kultivierungsbedingungen so gewählt, dass nur Nitratreduzierer, DNRA bzw. Denitrifikanten wachsen konnten (Braker *et al.*, 2010; Gamble *et al.*, 1977): Kultivierung unter anoxischen Bedingungen und Nitrat bzw. Nitrit als alleinigem Elektronenakzeptor. Alle weiteren Mediumparameter waren gewählt, um optimales Wachstum von Nitratreduzieren, Denitrifikanten und DNRA zu fördern (Heylen *et al.*, 2006). Bei den unter anoxischen Bedingungen erhaltenen Isolat handelt es sich also mit hoher Wahrscheinlichkeit um Nitratreduzierer, Denitrifikanten und DNRA.

### **3.4.1 Ansatz 1: Ansatz zur Isolierung von Denitrifikanten und DNRA aus CFU-Anreicherungen**

Aus CFU-Anreicherungen (Haedicke, 2008) konnten 97 Isolate erhalten werden, die 19 OTUs auf Speziesebene zugeordnet wurden (s. Tabelle 21).

### 3. Ergebnisse

**Tabelle 21: Mit dem Ansatz zur Isolierung von Nitratreduzierern, Denitrifikanten und DNRA aus CFU-Anreicherungen erhaltene Isolate.**

Taxonomische Zuordnung der OTUs auf Speziesebene.

OTU #	Seq.	Spezies (Accession Number)	Ähnlichkeit <sup>a</sup>	Familie	Klasse/Phylum
1	15	<i>Sinorhizobium americanum</i> <sup>b</sup> (JQ342897.1)	100 %	Rhizobiaceae	Alphaproteobacteria Proteobacteria
2	12	<i>Bacillus drentensis</i> (FJ009411.1)	99 %	Bacillaceae	Bacilli Firmicutes
3	10	<i>Janthinobacterium lividum</i> (HQ824864.1)	100 %	Oxalobacteraceae	Betaproteobacteria Proteobacteria
4	10	<i>Paenibacillus macquariensis</i> (JX469411.1)	99 %	Paenibacillaceae	Bacilli Firmicutes
5	8	<i>Afipia bromeae</i> (HF558416.1)	99 %	Bradyrhizobiaceae	Alphaproteobacteria Proteobacteria
6	8	<i>Pelosinus fermentans</i> (NR_043577.1)	99 %	Veillonellaceae	Negativicutes Firmicutes
7	7	<i>Oerskovia paurometabola</i> (KC128886.1)	99 %	Cellulomonadaceae	Actinobacteria Actinobacteria
8	6	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (HQ606463.1)	100 %	Pseudomonadaceae	Gammaproteobacteria Proteobacteria
9	6	<i>Bacillus circulans</i> (Y13062.1)	100 %	Bacillaceae	Bacilli Firmicutes
10	3	<i>Cellulomonas soli</i> (AB602498.1)	99 %	Cellulomonadaceae	Actinobacteria Actinobacteria
11	3	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (KF475870.1)	100 %	Bacillaceae	Bacilli Firmicutes
12	2	<i>Buttiauxella agrestis</i> (DQ223869.1)	99 %	Enterobacteriaceae	Gammaproteobacteria Proteobacteria
13	1	<i>Aminobacter aminovorans</i> <sup>c</sup> (AF329835.1)	99 %	Phyllobacteriaceae	Alphaproteobacteria Proteobacteria
14	1	<i>Cellulomonas composti</i> (NR_041020.1)	96 %	Cellulomonadaceae	Actinobacteria Actinobacteria
15	1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (JF700442.1)	99 %	Xanthomonadaceae	Gammaproteobacteria Proteobacteria
16	1	<i>Serratia fonticola</i> (JN596121.1)	100 %	Enterobacteriaceae	Gammaproteobacteria Proteobacteria
17	1	<i>Paenibacillus terrigena</i> (FJ174658.1)	99 %	Paenibacillaceae	Bacilli Firmicutes
18	1	<i>Bacillus pumilus</i> (KF463141.1)	100 %	Bacillaceae	Bacilli Firmicutes
19	1	<i>Streptococcus thermophilus</i> (CP003499.1)	100 %	Streptococcaceae	Bacilli Firmicutes

<sup>a</sup>Ähnlichkeit der Referenzsequenz zur 16S rRNA-Gen-Sequenz der nächstverwandten kultivierten Spezies.

<sup>b</sup>Grau: Die Zugehörigkeit zu einer Spezies konnte nicht eindeutig bestimmt werden.

<sup>c</sup>Dunkelgrau: Die Zugehörigkeit zu einer Gattung konnte nicht eindeutig bestimmt werden.

Die Zuordnung der Isolate zu Spezies war nicht immer möglich. Dies war z.B. auch der Fall bei den Bakterien, die zur größten OTU gehören. Diese enthält 15 Isolate der Gattung *Sinorhizobium*. Die drei OTUs, die ebenfalls jeweils zehn und mehr Isolate enthalten, repräsentieren die Spezies *Bacillus drentensis*, *Janthinobacterium lividum* und *Paenibacillus macquariensis*. Drei weitere OTUs repräsentieren zur Gattung *Bacillus* und zwei OTUs zur Gattung *Paenibacillus* gehörende Spezies. Das zu OTU 13 gehörende Isolat konnte keiner Gattung eindeutig zugeordnet werden, da die Sequenz gleichgroße Ähnlichkeit zur 16S rRNA-Gen-Sequenz der Spezies *Aminobacter aminovorans* wie zu der der Spezies *Carbophilus carboxidus* (Accession Number: JN175336.1) aufweist.

Die Isolate gehören zu 14 Gattungen und 12 Familien. Die meisten gehören zu den Gattungen *Bacillus* (22 Isolate), *Sinorhizobium* (15 Isolate), *Paenibacillus* (11 Isolate) und *Janthinobacterium* (10 Isolate). Etwa 55 % der Isolate gehören zu den grampositiven Bakterien.

#### **3.4.2 Ansatz 2: Ansatz zur Isolierung von Denitrifikanten bei unterschiedlichen pH-Werten**

Die Anreicherungen zur Bestimmung des pH-Wert-Einflusses auf die Denitrifikantenzellzahl (s. Abschnitt 3.3.2) wurden außerdem zur Isolierung von Denitrifikanten verwendet. Von den DN4-Anreicherungen (pH 4) wurden nur zwei Kolonien, von den DN6-Anreicherungen (pH 6) nur eine erhalten. Diese drei Kolonien konnten jedoch nicht weiter aufgereinigt werden. Alle Isolate aus diesem Kultivierungsansatz entstammen also den Anreicherungen bei pH 8. Aus den Anreicherungen der Böden SEW 5 und SEW 9 wuchsen nach dem Ausplattieren keine Kolonien, selbst bei verdoppelter Inkubationszeit. Die 43 bei pH 8 erhaltenen Isolate wurden fünf OTUs auf Speziesebene zugeordnet (s. Tabelle 22). Die Zuordnung der Isolate zu Spezies war nicht immer möglich.

### 3. Ergebnisse

**Tabelle 22: Mit dem Ansatz zur Isolierung von Denitrifikanten bei unterschiedlichen pH-Werten erhaltene Isolate.**

Taxonomische Zuordnung der OTUs auf Speziesebene.

OTU	# Seq.	Spezies (Accession Number)	Ähnlichkeit <sup>a</sup>	Familie	Klasse/Phylum
1	20	<i>Pseudomonas brenneri</i> <sup>b</sup> (KC293836.1)	100 %	Pseudomonadaceae	Gammaproteobacteria Proteobacteria
2	17	<i>Aeromonas media</i> (JN644062.1)	100 %	Aeromonadaceae	Gammaproteobacteria Proteobacteria
3	3	<i>Serratia plymuthica</i> (JF756168.1)	99 %	Enterobacteriaceae	Gammaproteobacteria Proteobacteria
4	2	<i>Ensifer adhaerens</i> (AB681162.1)	100 %	Rhizobiaceae	Alphaproteobacteria Proteobacteria
5	1	<i>Achromobacter piechaudii</i> (HQ831383.1)	99 %	Alcaligenaceae	Betaproteobacteria Proteobacteria

<sup>a</sup>Ähnlichkeit der Referenzsequenz zur 16S rRNA-Gen-Sequenz der nächstverwandten kultivierten Spezies.

<sup>b</sup>Grau: Die Zugehörigkeit zu einer Spezies konnte nicht eindeutig bestimmt werden.

Die größte OTU enthält 20 Isolate der Gattung *Pseudomonas*, die zweitgrößte 17 der Spezies *Aeromonas media*. Die übrigen drei OTUs enthalten ein bis drei Isolate der Spezies *Serratia plymuthica* und *Achromobacter piechaudii* sowie der Gattung *Ensifer*. Jede OTU repräsentiert sowohl eine eigene Gattung als auch eine eigene Familie der Proteobacteria.

#### 3.4.3 Ansatz 3: Isolierung unter selektiven Bedingungen für oligophile Denitrifikanten und DNRA

Unter oligotrophen (nährstoffarmen) Bedingungen konnten 146 Denitrifikanten und DNRA isoliert werden, die 23 OTUs auf Speziesebene zugeordnet wurden (s. Tabelle 23). Die Zuordnung der OTUs zu bestimmten Spezies konnte auch hier nicht immer erfolgen. Fast 40 % der Isolate gehören zur Gattung *Pseudomonas*, da die größte OTU 37 und die drittgrößte 15 Isolate der Gattung *Pseudomonas* enthält. Außerdem besteht die OTU 7 aus sechs Isolaten der Spezies *Pseudomonas vranovensis*. Die zweitgrößte OTU enthält 30 Isolate der Spezies *Bacillus niacini*. Die nächstgrößeren OTUs enthalten 13 Bakterien

der Spezies *Aeromonas encheleia* und 12 der Spezies *Paenibacillus wynnii*. Weiterhin wurden 17 OTUs mit ein bis sechs Isolaten erhalten, von denen drei zur Gattung *Paenibacillus* gehören.

**Tabelle 23: Mit dem Ansatz zur Isolierung unter selektiven Bedingungen für oligophile Denitrifikanten und DNRA erhaltene Isolate.**

Taxonomische Zuordnung der OTUs auf Speziesebene.

OTU #	Seq.	Spezies (Accession Number)	Ähnlichkeit <sup>a</sup>	Familie	Klasse/Phylum
1	37	<i>Pseudomonas extremaustralis</i> <sup>b</sup> (KC790323.1)	100 %	Pseudomonadaceae	Gammaproteobacteria Proteobacteria
2	30	<i>Bacillus niacini</i> (HF585248.1)	99 %	Bacillaceae	Bacilli Firmicutes
3	15	<i>Pseudomonas brenneri</i> (HQ825004.1)	100 %	Pseudomonadaceae	Gammaproteobacteria Proteobacteria
4	13	<i>Aeromonas encheleia</i> (HQ832414.1)	99 %	Aeromonadaceae	Gammaproteobacteria Proteobacteria
5	12	<i>Paenibacillus borealis</i> (JQ897429.1)	98 %	Paenibacillaceae	Bacilli Firmicutes
6	6	<i>Bradyrhizobium liaoningense</i> (JX424776.1)	100 %	Bradyrhizobaceae	Alphaproteobacteria Proteobacteria
7	6	<i>Pseudomonas vranovensis</i> (KC699536.1)	99 %	Pseudomonadaceae	Gammaproteobacteria Proteobacteria
8	4	<i>Phyllobacterium brassicacearum</i> (JQ692179.1)	100 %	Phyllobacteriaceae	Alphaproteobacteria Proteobacteria
9	3	<i>Serratia plymuthica</i> (FJ711594.1)	100 %	Enterobacteriaceae	Gammaproteobacteria Proteobacteria
10	3	<i>Flavobacterium resistens</i> (NR_044292.1)	99 %	Flavobacteriaceae	Flavobacteriia Bacteroidetes
11	3	<i>Rhodanobacter terrae</i> (AB682420.1)	99 %	Xanthomonadaceae	Gammaproteobacteria Proteobacteria
12	2	<i>Ensifer adhaerens</i> (AB681162.1)	99 %	Rhizobiaceae	Alphaproteobacteria Proteobacteria
13	2	<i>Ochrobactrum anthropi</i> (KC153003.1)	100 %	Brucellaceae	Alphaproteobacteria Proteobacteria
14	2	<i>Dechloromonas hortensis</i> (NR_042819.1)	100 %	Rhodocyclaceae	Betaproteobacteria Proteobacteria
15	2	<i>Psychrobacillus psychrodurans</i> (KC354598.1)	99 %	Bacillaceae	Bacilli Firmicutes
16	2	<i>Bacillus circulans</i> (Y13061.1)	99 %	Bacillaceae	Bacilli Firmicutes
17	1	<i>Aeromonas eucrenophila</i> (JF920496.1)	100 %	Aeromonadaceae	Gammaproteobacteria Proteobacteria

### 3. Ergebnisse

18	1	<i>Curvibacter delicatus</i> (AB680705.1)	97 %	Comamonadaceae	Betaproteobacteria Proteobacteria
19	1	<i>Delftia acidovorans</i> (KF054931.1)	100 %	Comamonadaceae	Betaproteobacteria Proteobacteria
20	1	<i>Paenibacillus anaericanus</i> (AM745262.1)	99 %	Paenibacillaceae	Bacilli Firmicutes
21	1	<i>Paenibacillus xylanexedens</i> (KC355299.1)	100 %	Paenibacillaceae	Bacilli Firmicutes
22	1	<i>Paenibacillus terrae</i> (JN411464.1)	100 %	Paenibacillaceae	Bacilli Firmicutes
23	1	<i>Propionimonas paludicola</i> (FR733712.1)	97 %	Propionibacteriaceae	Actinobacteria Actinobacteria

<sup>a</sup>Ähnlichkeit der Referenzsequenz zur 16S rRNA-Gen-Sequenz der nächstverwandten kultivierten Spezies.

<sup>b</sup>Grau: Die Zugehörigkeit zu einer Spezies konnte nicht eindeutig bestimmt werden.

Die 23 OTUs auf Speziesebene gehören zu 16 Gattungen und 13 Familien. Die Gattung *Pseudomonas* ist mit 58 Isolaten am häufigsten und die Gattung *Bacillus* mit 32 am zweithäufigsten vertreten. Zur Gattung *Paenibacillus* gehören 15 und zur Gattung *Aeromonas* 14 Isolate. Die Familien Pseudomonadaceae (58 Isolate), Bacillaceae (34 Isolate), Paenibacillaceae (15 Isolate) und Aeromonadaceae (14 Isolate) sind am häufigsten vertreten. Dabei gehören etwa 35 % der Isolate zu den grampositiven Bakterien.

#### 3.4.4 Ansatz 4: Isolierung unter selektiven Bedingungen für ammonifizierende und denitrifizierenden Archaeen

Von den Isolaten aus dem Versuch zur Isolierung ammonifizierender und denitrifizierender Archaeen wurden 16S rRNA-Gen-Sequenzen von 131 Isolaten erhalten, die in zehn OTUs auf Speziesebene eingeordnet wurden (s. Tabelle 24). Auch hier konnte die Zuordnung der OTUs zu bestimmten Spezies nicht immer erfolgen. Die am häufigsten vorkommende Spezies gehört zur Gattung *Sinorhizobium* und von der Spezies *Silvimonas iriomotensis* konnten 30 Isolate erhalten werden. Weitere häufige Spezies gehören zu den Gattungen

*Pseudomonas* und *Afipia*. Von der Spezies *Paenibacillus ginsengisoli* wurden zwei, von den Spezies *Rhizobium miluonense*, *Bosea thiooxidans*, *Enterobacter ludwigii* und *Dechloromonas hortensis* jeweils ein Isolat erhalten. Bei diesem Kultivierungsansatz konnten keine Archaeen, sondern nur Bakterien isoliert werden.

Die Isolate gehören fünf verschiedenen Familien an. Etwa 36 % der Isolate gehören zur Familie Rhizobiaceae. Außerdem wurden Bakterien der Familien Neisseriaceae, Pseudomonadaceae, Enterobacteriaceae und Paenibacillaceae isoliert. Bis auf zwei Isolate die zu den Firmicutes gehören, wurden nur gramnegative Bakterien aus dem Phylum der Proteobacteria isoliert.

**Tabelle 24: Mit dem Ansatz zur Isolierung unter selektiven Bedingungen für ammonifizierende und denitrifizierende Archaeen erhaltene Isolate.**

Taxonomische Zuordnung der OTUs auf Speziesebene.

OTU	# Seq.	Spezies (Accession Number)	Ähnlichkeit <sup>a</sup>	Familie	Klasse/Phylum
1	46	<i>Sinorhizobium americanum</i> <sup>b</sup> (JQ342897.1)	100 %	Rhizobiaceae	Alphaproteobacteria Proteobacteria
2	30	<i>Silvimonas iriomotensis</i> (AB326110.1)	98 %	Neisseriaceae	Betaproteobacteria Proteobacteria
3	25	<i>Pseudomonas brenneri</i> (KC293836.1)	100 %	Pseudomonadaceae	Gammaproteobacteria Proteobacteria
4	20	<i>Afipia bromaeae</i> (HF558416.1)	99 %	Bradyrhizobaceae	Alphaproteobacteria Proteobacteria
5	4	<i>Rahnella aquatis</i> (JX867757.1)	99 %	Enterobacteriaceae	Gammaproteobacteria Proteobacteria
6	2	<i>Paenibacillus ginsengisoli</i> (EU888522.1)	99 %	Paenibacillaceae	Bacilli Firmicutes
7	1	<i>Rhizobium miluonense</i> (JX122134.1)	99 %	Rhizobiaceae	Alphaproteobacteria Proteobacteria
8	1	<i>Bosea thiooxidans</i> (JN627995.1)	99 %	Bradyrhizobaceae	Alphaproteobacteria Proteobacteria
9	1	<i>Enterobacter ludwigii</i> (JF505955.1)	99 %	Enterobacteriaceae	Gammaproteobacteria Proteobacteria
10	1	<i>Dechloromonas hortensis</i> (NR_042819.1)	97 %	Rhodocyclaceae	Betaproteobacteria Proteobacteria

<sup>a</sup>Ähnlichkeit der Referenzsequenz zur 16S rRNA-Gen-Sequenz der nächstverwandten kultivierten Spezies.

<sup>b</sup>Grau: Die Zugehörigkeit zu einer Spezies konnte nicht eindeutig bestimmt werden.

### 3. Ergebnisse

#### **3.4.5 Ansatz 5: Isolierung unter selektiven Bedingungen für grampositive Denitrifikanten und DNRA**

Der Ansatz zur Isolierung grampositiver Denitrifikanten und DNRA ergab 154 Isolate von denen verwertbare 16S rRNA-Gen-Sequenzen gewonnen werden konnten. Diese wurden in 15 OTUs (operational taxonomic unit) auf Speziesebene eingeordnet (s. Tabelle 25). Die Zuordnung der OTUs zu bestimmten Spezies konnte nicht immer erfolgen, da die Unterscheidung einiger Spezies längere Sequenzen erfordert. In diesem Fall ist ein Ergebnis beispielhaft angegeben. Am häufigsten wurden Bakterien der Gattungen *Ochrobactrum* und *Oerskovia* isoliert. Die restlichen 13 OTUs beinhalten nur ein bis acht Isolate. Vier dem Boden SEW 5 entstammende Isolate bilden eine OTU, die der Spezies *Clostridium algidixylanolyticum* zugeordnet wurde.

Die Isolate gehören zu 14 verschiedenen Gattungen und 12 verschiedenen Familien. Davon gehören 44 % zur Familie Brucellaceae und 28 % zur Familie Cellulomonadaceae. Die meisten Isolate gehören somit zu den Proteobacteria oder den Actinobacteria. Sechzehn können dem Phylum Bacteroidetes zugeordnet werden und nur neun den Firmicutes. Mit diesem Isolierungsansatz wurden insgesamt 51 grampositive und 103 gramnegative Bakterien isoliert.

Die sechs Isolate enthaltende OTU 6 repräsentiert eine neue Spezies, da die 16S rRNA-Gen-Sequenz des nächstverwandten Organismus, *Dysgonomonas capnocytophagoideis*, nur eine Ähnlichkeit von 94 % zur Referenzsequenz der OTU aufweist. Die Charakterisierung dieser Spezies war leider nicht möglich, da die Bakterien nach zwei Übertragungen auf neues Medium nicht mehr anwuchsen.

**Tabelle 25: Mit dem Ansatz zur Isolierung unter selektiven Bedingungen für grampositive Denitrifikanten und DNRA erhaltene Isolate.**

Taxonomische Zuordnung der OTUs auf Speziesebene.

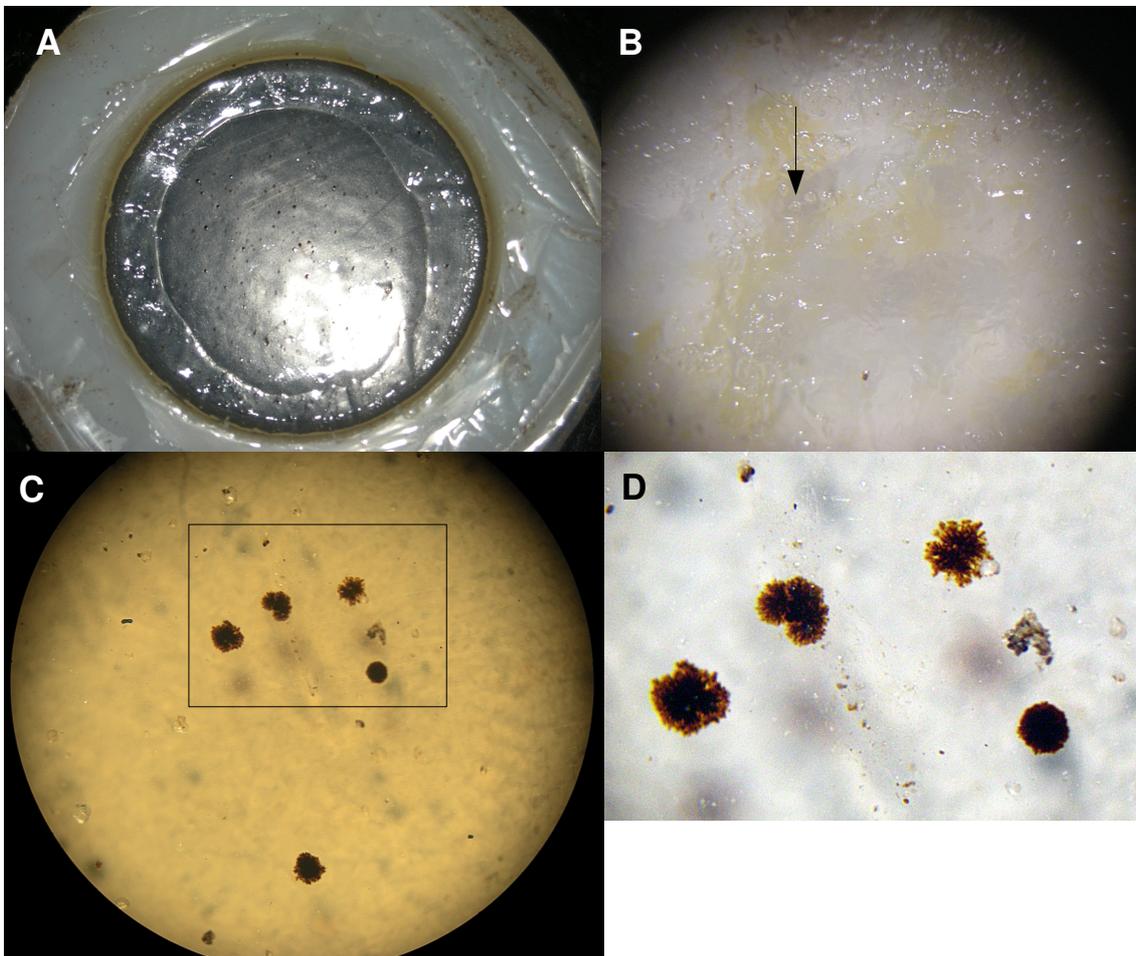
OTU #	Seq.	Spezies (Accession Number)	Ähnlichkeit <sup>a</sup>	Familie	Klasse/Phylum
1	67	<i>Ochrobactrum intermedium</i> <sup>b</sup> (AM490633.1)	100 %	Brucellaceae	Alphaproteobacteria Proteobacteria
2	41	<i>Oerskovia enterophila</i> (KF318379.1)	99 %	Cellulomonadaceae	Actinobacteria Actinobacteria
3	8	<i>Chryseobacterium koreense</i> (EU523664.2)	99 %	Flavobacteriaceae	Flavobacteriia Bacteroidetes
4	7	<i>Dechloromonas denitrificans</i> (NR_042090.1)	98 %	Rhodocyclaceae	Betaproteobacteria Proteobacteria
5	6	<i>Serratia fonticola</i> (EF204295.1)	100 %	Enterobacteriaceae	Gammaproteobacteria Proteobacteria
6	6	<i>Dysgonomonas capnocytophagoides</i> (AB548674.1)	94 %	Porphyromonadaceae	Bacteroidia Bacteroidetes
7	5	<i>Aminobacter aminovorans</i> (AB167232.1)	97 %	Phyllobacteriaceae	Alphaproteobacteria Proteobacteria
8	4	<i>Bacillus circulans</i> (FJ155345.1)	99 %	Bacillaceae	Bacilli Firmicutes
9	4	<i>Clostridium algidixylanolyticum</i> (AB601087.1)	99 %	Clostridiaceae	Clostridia Firmicutes
10	1	<i>Cellulosimicrobium cellulans</i> (AJ298927.1)	95 %	Promicromonosporaceae	Actinobacteria Actinobacteria
11	1	<i>Propionivibrio limicola</i> (NR_025455.1)	97 %	Rhodocyclaceae	Betaproteobacteria Proteobacteria
12	1	<i>Acidovorax soli</i> (KC920935.1)	99 %	Comamonadaceae	Betaproteobacteria Proteobacteria
13	1	<i>Acidovorax defluvii</i> (EU434521.1)	95 %	Comamonadaceae	Betaproteobacteria Proteobacteria
14	1	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i> (KF263652.1)	100 %	Carnobacteriaceae	Bacilli Firmicutes
15	1	<i>Solitalea canadensis</i> (CP003349.1)	99 %	Sphingobacteriaceae	Sphingobacteriia Bacteroidetes

<sup>a</sup>Ähnlichkeit der Referenzsequenz zur 16S rRNA-Gen-Sequenz der nächstverwandten kultivierten Spezies.<sup>b</sup>Grau: Die Zugehörigkeit zu einer Spezies konnte nicht eindeutig bestimmt werden.

### 3. Ergebnisse

#### 3.4.6 Ansatz 6: Ansatz zur Isolierung von Denitrifikanten und DNRA aus Diffusionskammern

Die Diffusionskammern wurden 12 Wochen nach dem Ansetzen geöffnet. Dabei zeigten sich zwei verschiedene Arten von Kolonien. Zum einen waren kleine, braune, runde, oft auch filamentöse Kolonien vorhanden (s. Abbildung 9A, 9C und 9D), die als Kolonief orm 1 bezeichnet werden. Zum anderen gab es sehr kleine, runde, durchsichtige, glänzende Kolonien (s. Abbildung 9B), die als Kolonief orm 2 bezeichnet werden.



**Abbildung 9: Diffusionskammern nach zwölfwöchiger Inkubation.**

A: Diffusionskammer mit Kolonien der Form 1 bewachsen. B: Diffusionskammer mit Kolonien der Form 2 bewachsen. Der Pfeil deutet auf eine solche Kolonie. (30-fache Vergrößerung). C: Diffusionskammer mit Kolonien der Form 1 bei 20-facher Vergrößerung. D: 30-fache Vergrößerung des gerahmten Ausschnitts von C.

### 3. Ergebnisse

Die Kolonien der Form 1 waren unterschiedlich groß und hatten verschieden geformte Ränder (s. Abbildung 9C und D). Ihre Größe variierte zwischen 0,2 mm und 1 mm, so dass sie gerade noch als Einzelkolonien entnommen werden konnten. Alle waren in unterschiedlichen dunklen Brauntönen gefärbt. Die Kolonien der Form 2 waren alle durchsichtig, rund, gewölbt und glänzend. Sie wuchsen sehr dicht und waren kleiner als 0,1 mm, weshalb keine Einzelkolonien abgenommen werden konnten. In einer Diffusionskammer kamen meist beide Kolonieförmungen vor.

**Tabelle 26: Aus den Diffusionskammern bei anoxischer Inkubation erhaltene Isolate.**

Taxonomische Zuordnung der OTUs auf Speziesebene.

Isolat	Spezies (Accession Number)	Ähnlichkeit <sup>a</sup>	Familie	Klasse/Phylum	Sequenzlänge
DK1	<i>Bacillus niacini</i> Stamm Pm1 (GU391532.1)	100 %	Bacillaceae	Bacilli Firmicutes	650 b
DK2	<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i> Stamm Y4-6 (KF676728.1)	99 %	Xanthomonadaceae	Gammaproteobacteria Proteobacteria	1347 b
DK3	<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i> Stamm OVC21 (JQ660737.1)	100 %	Xanthomonadaceae	Gammaproteobacteria Proteobacteria	1342 b
DK4	<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i> Stamm CH21 (JN571056.1)	100 %	Xanthomonadaceae	Gammaproteobacteria Proteobacteria	1346 b
DK5	<i>Bacillus psychrodurans</i> (FR877666.1)	99 %	Bacillaceae	Bacilli Firmicutes	480 b
DK6	<i>Acidovorax temperans</i> <sup>b</sup> (JF496561.1)	99 %	Comamonadaceae	Betaproteobacteria Proteobacteria	1337 b
DK7	<i>Acidovorax radialis</i> (HM027578.2)	100 %	Comamonadaceae	Betaproteobacteria Proteobacteria	700 b
DK8	<i>Bacillus niacini</i> Stamm 14L4 (HQ284973.1)	99 %	Bacillaceae	Bacilli Firmicutes	580 b
DK9	<i>Bacillus niacini</i> Stamm BGB13 (KC778378.1)	99 %	Bacillaceae	Bacilli Firmicutes	1354 b
DK10	<i>Paenibacillus pabuli</i> (JX401570.1)	99 %	Paenibacillaceae	Bacilli Firmicutes	650 b

<sup>a</sup>Ähnlichkeit der Referenzsequenz zur 16S rRNA-Gen-Sequenz der nächstverwandten kultivierten Spezies.

<sup>b</sup>Grau: Die Zugehörigkeit zu einer Spezies konnte nicht eindeutig bestimmt werden.

### 3. Ergebnisse

Vier Kolonien von jedem Boden wurden auf Zwei-Schicht-Agarplatten ausgestrichen und dann zweimal auf TS3-Agar aufgereinigt. Nicht alle Kolonien wuchsen nach der letzten Übertragung wieder an. Andererseits konnten den Diffusionskammern nicht immer Einzelkolonien entnommen werden. Letztendlich wurden auf diese Weise 50 Reinkulturen von neun Böden gewonnen. Von zehn dieser Kulturen konnte das 16S rRNA-Gen sequenziert werden (s. Tabelle 26).

Vier der Isolate gehören der Gattung *Bacillus* an. Drei davon, die Isolate DK1, DK8 und DK9 stimmen in ihrer 16S rRNA-Gen-Sequenz zu 100 % überein und gehören zur Spezies *Bacillus niacini*. Die 16S rRNA-Gen-Sequenzen der Isolate DK2, DK3 und DK4 zeigen eine Übereinstimmung von 99 %. Die Isolate gehören zur Spezies *Pseudoxanthomonas mexicana*. Ein weiteres Isolat wurde der Spezies *Paenibacillus pabuli* zugeordnet und zwei der Gattung *Acidovorax*. Fünf der Isolate gehören zu den Firmicutes und die übrigen fünf zu den Proteobacteria.

Nach dem Öffnen der Diffusionskammern wurden weiterhin 18 Kolonien (auch hier nicht immer Einzelkolonien) auf TS1- und TS2-Agar überimpft und oxisch inkubiert. Von diesen Kulturen wurden 60 Kolonien erneut auf TS1- und TS2-Agar übertragen. So wurden 28 Isolate erhalten. Auf Speziesebene konnten diese in 12 OTUs eingeordnet werden (s. Tabelle 27). Die OTUs konnten jedoch nicht immer bestimmten Spezies zugeordnet werden.

Die größte OTU enthält sechs Isolate der Spezies *Burkholderia phenazinium*. Fünf weitere Isolate gehören der Gattung *Pseudomonas* an und drei der Gattung *Streptomyces*. Außerdem wurden drei Bakterien der Spezies *Microbacterium oxydans* isoliert. Die übrigen OTUs enthalten nur eine bzw. zwei Sequenzen. Zwei OTUs, die OTUs 6 und 7, bestehen aus jeweils zwei Isolaten deren 16S rRNA-Gene 94 % Ähnlichkeit zu ihrer am

nächsten verwandten Spezies aufweisen. Sie stellen somit bisher nicht kultivierte Spezies der Gattungen *Arthrobacter* bzw. *Chitinophaga* dar. Acht Isolate (44 %) gehören zu den grampositiven Bakterien.

**Tabelle 27: Aus den Diffusionskammern durch oxische Inkubation erhaltene Isolate.**

Taxonomische Zuordnung der OTUs auf Speziesebene.

OTU	# Seq.	Spezies (Accession Number)	Ähnlichkeit <sup>a</sup>	Familie	Klasse/Phylum
1	6	<i>Burkholderia phenazinium</i> (KC241901.1)	99 %	Burkholderiaceae	Betaproteobacteria Proteobacteria
2	5	<i>Pseudomonas jessenii</i> <sup>b</sup> (JX122147.1)	99 %	Pseudomonadaceae	Gammaproteobacteria Proteobacteria
3	3	<i>Microbacterium oxydans</i> (JF915348.1)	99 %	Microbacteriaceae	Actinobacteria Actinobacteria
4	3	<i>Streptomyces atratus</i> (JN862838.1)	100 %	Streptomycetaceae	Actinobacteria Actinobacteria
5	2	<i>Variovorax paradoxus</i> (KF318408.1)	100 %	Comamonadaceae	Betaproteobacteria Proteobacteria
6	2	<i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i> (KC934762.1)	94 %	Micrococcaceae	Actinobacteria Actinobacteria
7	2	<i>Chitinophaga niabensis</i> (AB682428.1)	94 %	Chitinophagaceae	Sphingobacteriia Bacteroidetes
8	1	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (KF279042.1)	97 %	Pseudomonadaceae	Gammaproteobacteria Proteobacteria
9	1	<i>Duganella violaceinigra</i> (NR_025770.1)	99 %	Oxalobacteraceae	Betaproteobacteria Proteobacteria
10	1	<i>Ensifer adhaerens</i> (AB681162.1)	99 %	Rhizobiaceae	Alphaproteobacteria Proteobacteria
11	1	<i>Flavobacterium pectinovorum</i> (AM230490.1)	99 %	Flavobacteriaceae	Flavobacteriia Bacteroidetes
12	1	<i>Pedobacter panaciterrae</i> (AB365796.1)	99 %	Sphingobacteriaceae	Sphingobacteriia Bacteroidetes

<sup>a</sup>Ähnlichkeit der Referenzsequenz zur 16S rRNA-Gen-Sequenz der nächstverwandten kultivierten Spezies.

<sup>b</sup>Grau: Die Zugehörigkeit zu einer Spezies konnte nicht eindeutig bestimmt werden.

### 3. Ergebnisse

## 3.5 Gemeinschaften von Nitratreduzierern, Denitrifikanten und DNRA

### 3.5.1 Analyse der isolierten Nitratreduzierer, Denitrifikanten und DNRA

#### Phylogenetische Analyse

Aus den anoxischen Isolierungsversuchen wurden 539 Bakterienisolate gewonnen. Bei diesen handelt es sich höchstwahrscheinlich um Nitratreduzierer, Denitrifikanten und DNRA, da die gewählten Isolierungsbedingungen das Wachstum anderer Organismen nicht zulassen (s. Abschnitt 3.4). Aus jedem der Böden stammen 40- 60 Isolate (s. Tabelle 28). Nur aus den Böden AEG 2, SEG 2 und SEW 9 wurden weniger Bakterien isoliert (28, 33 bzw. 26). Die Isolate wurden aufgrund der Ähnlichkeit ihrer 16S-rRNA-Gene auf Speziesebene in 44 OTUs eingeordnet. Die Zuordnung der Isolate zu Spezies war nicht immer möglich. Die verwendeten 600 b der 16S-rRNA-Sequenzen sind hier also nicht für eine Unterscheidung ausreichend.

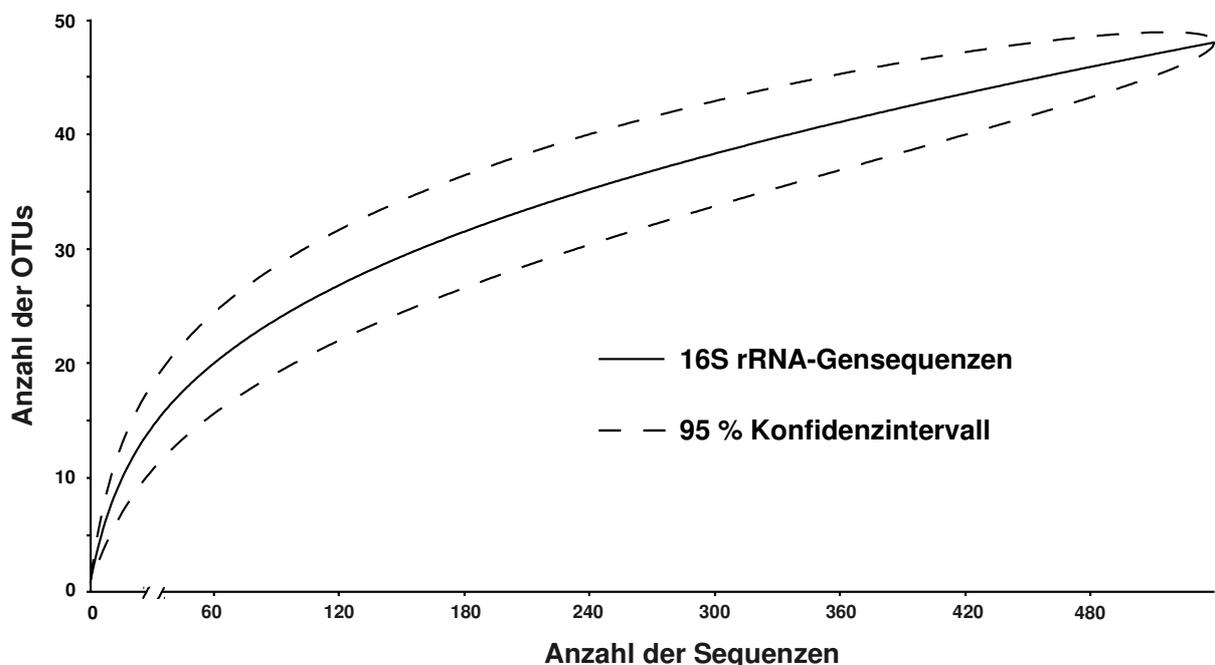


Abbildung 10: Rarefaction-Kurve (durchgehende Linie) und 95 % Konfidenzbereiche (gestrichelte Linie) der OTUs der 16S-rRNA-Gensequenzen auf Speziesebene bei 5 % genetischer Distanz.

Die Rarefaction-Kurven (s. Abbildung 10) zeigen, dass die 539 Isolate nicht ausreichen, um die Diversität der Spezies komplett zu erfassen. Dies wird auch durch die geschätzte Artenzahl von 70,56 (Chao1) bestätigt (s. Tabelle 28).

**Tabelle 28: Diversitätsindices der Böden basierend auf 16S-rRNA-Gensequenzen der Isolate.**

Boden	Anzahl der Isolate	Anzahl der OTUs	Chao 1	Shannon-Index (H')	Äquität (J)	Testabdeckung (C)
AEG 2 <sup>a</sup>	28	13	73,5	1,83	0,71	52,17
AEG 7 <sup>b</sup>	49	10	31	1,43	0,62	85,17
AEW 5	56	12	14,67	1,97	0,79	92,86
AEW 8	45	13	18,25	2,2	0,86	88,89
HEG 6	54	9	24	1,6	0,73	88,89
HEG 9	60	10	11	1,76	0,77	96,67
HEW 5	45	11	27	2,07	0,86	91,11
HEW 12	51	7	7	1,63	0,84	1
SEG 2	33	12	48	1,96	0,79	72,73
SEG 6	51	18	102,5	2,28	0,79	74,51
SEW 5	41	11	27	2,16	0,9	90,24
SEW 9	26	7	8,5	1,68	0,85	92,31
gesamt	539	48	70,56	2,91	0,75	96,47

<sup>a</sup>Grau: Böden unter intensiver Landnutzung

<sup>b</sup>Weiß: Böden unter weniger intensiver Landnutzung

Die Testabdeckung der meisten Böden war zu gering (< 90 %, s. Tabelle 28), um eine vergleichende Analyse zu erlauben. Eine vergleichende Diskussion der Diversitätsindices sowie eine statistische Analyse der Daten ist daher nicht möglich.

Die größte OTU enthält 113 Isolate der Gattung *Sinorhizobium* (s. Tabelle 29). Die beiden nächstgrößeren OTUs wurden den Gattungen *Pseudomonas* (59 Isolate) und *Oerskovia* (47 Isolate) zugeordnet. Drei OTUs enthalten zusammen 103 Isolate der Gattung *Pseudomonas*, sechs OTUs 68 Isolate der Gattung *Bacillus* und sechs weitere OTUs 19 Isolate der Gattung *Paenibacillus*. Elf OTUs enthalten jeweils mehr als zehn Isolate, während 14 OTUs nur jeweils ein Isolat enthalten. Die Referenzsequenzen der OTUs 16,

### 3. Ergebnisse

19 und 37 zeigen weniger als 97 % Ähnlichkeit zu den 16S rRNA-Gen-Sequenzen der nächstverwandten isolierten Bakterien. Dabei repräsentiert OTU 19 eine neue Spezies, da ihre Referenzsequenz nur 96 % Ähnlichkeit zur 16S rRNA-Gen-Sequenz des nächstverwandten bisher nicht isolierten Bakteriums aufweist.

**Tabelle 29: Zuordnung aller erhaltener Isolate in OTUs und Taxonomische Zuordnung der OTUs auf Speziesebene.**

OTU	# Seq.	Spezies (Accession Number)	Ähnlichkeit <sup>a</sup>	Familie	Klasse/Phylum
1	113	<i>Sinorhizobium americanum</i> <sup>b</sup> (JQ342897.1)	100 %	Rhizobiaceae	Alphaproteobacteria Proteobacteria
2	59	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (JN637318.1)	99 %	Pseudomonadaceae	Gammaproteobacteria Proteobacteria
3	47	<i>Oerskovia enterophila</i> (KF318379.1)	98%	Cellulomonadaceae	Actinobacteria Actinobacteria
4	40	<i>Bacillus drementensis</i> (EU379279.1)	99 %	Bacillaceae	Bacilli Firmicutes
5	37	<i>Pseudomonas extremaustralis</i> (KC790323.1)	100 %	Pseudomonadaceae	Gammaproteobacteria Proteobacteria
6	32	<i>Bradyrhizobium liaoningense</i> (JX424776.1)	99 %	Bradyrhizobiaceae	Alphaproteobacteria Proteobacteria
7	30	<i>Aeromonas eucrenophila</i> (JF920496.1)	100 %	Aeromonadaceae	Gammaproteobacteria Proteobacteria
8	26	<i>Silvimonas iriomotensis</i> (AB326110.1)	98 %	Neisseriaceae	Betaproteobacteria Proteobacteria
9	20	<i>Bacillus circulans</i> (Y13062.1)	99 %	Bacillaceae	Bacilli Firmicutes
10	17	<i>Serratia plymuthica</i> (JF756168.1)	98%	Enterobacteriaceae	Gammaproteobacteria Proteobacteria
11	11	<i>Paenibacillus anaericanus</i> (AM745262.1)	99 %	Paenibacillaceae	Bacilli Firmicutes
12	10	<i>Aminobacter aminovorans</i> (AM285009.1)	98%	Phyllobacteriaceae	Alphaproteobacteria Proteobacteria
13	10	<i>Janthinobacterium lividum</i> (KF583727.1)	100 %	Oxalobacteraceae	Betaproteobacteria Proteobacteria
14	9	<i>Dechloromonas hortensis</i> (NR_042819.1)	100 %	Rhodocyclaceae	Betaproteobacteria Proteobacteria
15	8	<i>Chryseobacterium koreense</i> (JN700156.1)	99 %	Flavobacteriaceae	Flavobacteriia Bacteroidetes
16	7	<i>Dysgonomonas capnocytophagoidea</i> (AB548674.1)	93 %	Porphyromonadaceae	Bacteroidia Bacteroidetes

### 3. Ergebnisse

17	7	<i>Pseudomonas vranovensis</i> (KC246041.1)	99 %	Pseudomonadaceae	Gammaproteobacteria Proteobacteria
18	6	<i>Pelosinus fermentans</i> (JF750001.1)	98 %	Veillonellaceae	Negativicutes Firmicutes
19	6	<i>Cellulosimicrobium cellulans</i> (AB098580.1)	95 %	Promicromonosporaceae	Actinobacteria Actinobacteria
20	4	<i>Aeromonas encheleia</i> (HQ832414.1)	99 %	Aeromonadaceae	Gammaproteobacteria Proteobacteria
21	3	<i>Paenibacillus graminis</i> (KF010806.1)	99 %	Paenibacillaceae	Bacilli Firmicutes
22	3	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (KF475870.1)	100 %	Bacillaceae	Bacilli Firmicutes
23	3	<i>Cellulomonas soli</i> (AB602498.1)	99 %	Cellulomonadaceae	Actinobacteria Actinobacteria
24	3	<i>Rhodanobacter terrae</i> (AB682420.1)	99 %	Xanthomonadaceae	Gammaproteobacteria Proteobacteria
25	3	<i>Flavobacterium resistens</i> (NR_044292.1)	99 %	Flavobacteriaceae	Flavobacteriia Bacteroidetes
26	2	<i>Paenibacillus borealis</i> (JQ897429.1)	100 %	Paenibacillaceae	Bacilli Firmicutes
27	2	<i>Bacillus psychrodurans</i> (FR877666.1)	99 %	Bacillaceae	Bacilli Firmicutes
28	2	<i>Bacillus soli</i> (AJ542515.1)	99 %	Bacillaceae	Bacilli Firmicutes
29	2	<i>Ensifer adhaerens</i> (AB681162.1)	100 %	Rhizobiaceae	Alphaproteobacteria Proteobacteria
30	1	<i>Paenibacillus tundrae</i> (JF683621.1)	100 %	Paenibacillaceae	Bacilli Firmicutes
31	1	<i>Paenibacillus terrae</i> (KF312277.1)	99 %	Paenibacillaceae	Bacilli Firmicutes
32	1	<i>Paenibacillus terrigena</i> (FJ174658.1)	99 %	Paenibacillaceae	Bacilli Firmicutes
33	1	<i>Bacillus pumilis</i> (KF463141.1)	100 %	Bacillaceae	Bacilli Firmicutes
34	1	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i> (KF263652.1)	100 %	Carnobacteriaceae	Bacilli Firmicutes
35	1	<i>Streptococcus thermophilus</i> (KF286609.1)	100 %	Streptococcaceae	Bacilli Firmicutes
36	1	<i>Ochrobactrum pseudogrignonense</i> (FJ859687.2)	97 %	Brucellaceae	Alphaproteobacteria Proteobacteria
37	1	<i>Cellulomonas composti</i> (NR_041020.1)	96 %	Cellulomonadaceae	Actinobacteria Actinobacteria

### 3. Ergebnisse

38	1	<i>Propionicimonas paludicola</i> (FR733712.1)	97 %	Propionibacteriaceae	Actinobacteria Actinobacteria
39	1	<i>Clostridium algidixylanolyticum</i> (JQ897426.1)	100 %	Clostridiaceae	Clostridia Firmicutes
40	1	<i>Achromobacter piechaudii</i> (HQ831383.1)	99 %	Alcaligenaceae	Betaproteobacteria Proteobacteria
41	1	<i>Delftia acidovorans</i> (KF054931.1)	100 %	Comamonadaceae	Betaproteobacteria Proteobacter
42	1	<i>Acidovorax defluvii</i> (EU434521.1)	99 %	Comamonadaceae	Betaproteobacteria Proteobacteria
43	1	<i>Curvibacter delicatus</i> (AB680705.1)	97 %	Comamonadaceae	Betaproteobacteria Proteobacteria
44	1	<i>Stenotrophomonas maltophila</i> (JF700442.1)	99 %	Xanthomonadaceae	Gammaproteobacteria Proteobacteria

<sup>a</sup>Ähnlichkeit der Referenzsequenz zur 16S rRNA-Gen-Sequenz der nächstverwandten kultivierten Spezies.

<sup>b</sup>Grau: Die Zugehörigkeit zu einer Spezies konnte nicht eindeutig bestimmt werden.

Die Isolate wurden in 30 Gattungen und 25 Familien eingeordnet. Die meisten Isolate gehören zu den Alpha- oder Gammaproteobacteria (je etwa 30 %). 68 % der Isolate gehören zu den Proteobacteria; 27 % sind grampositive Bakterien.

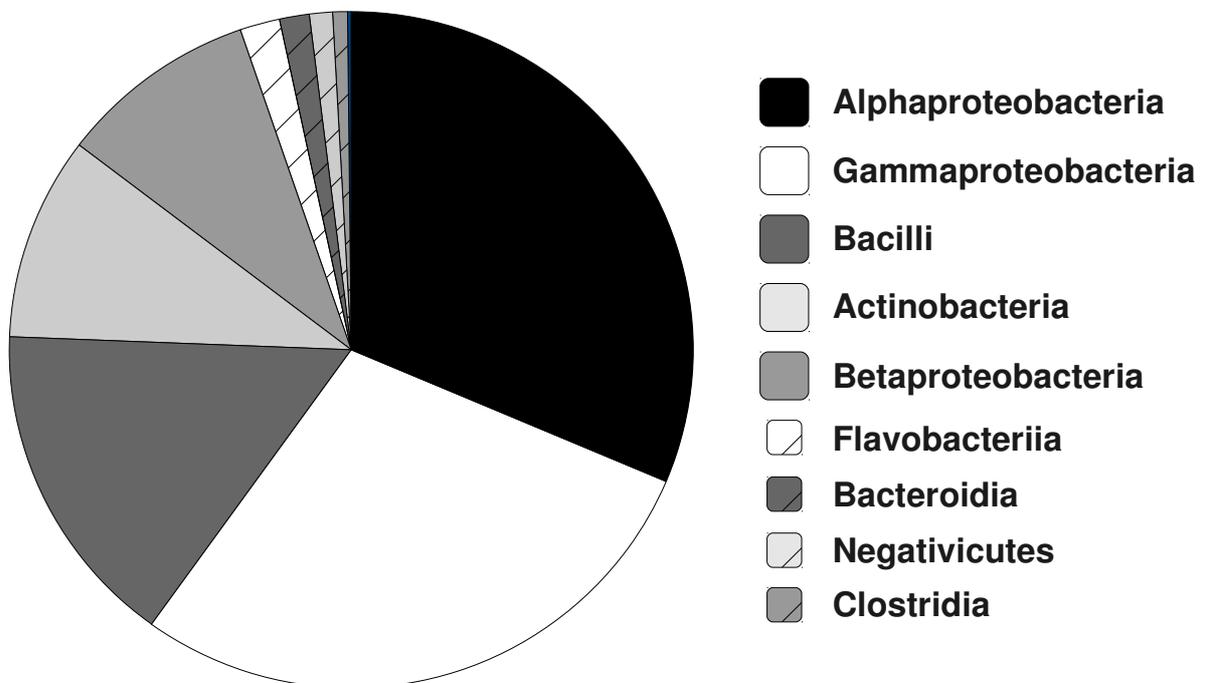
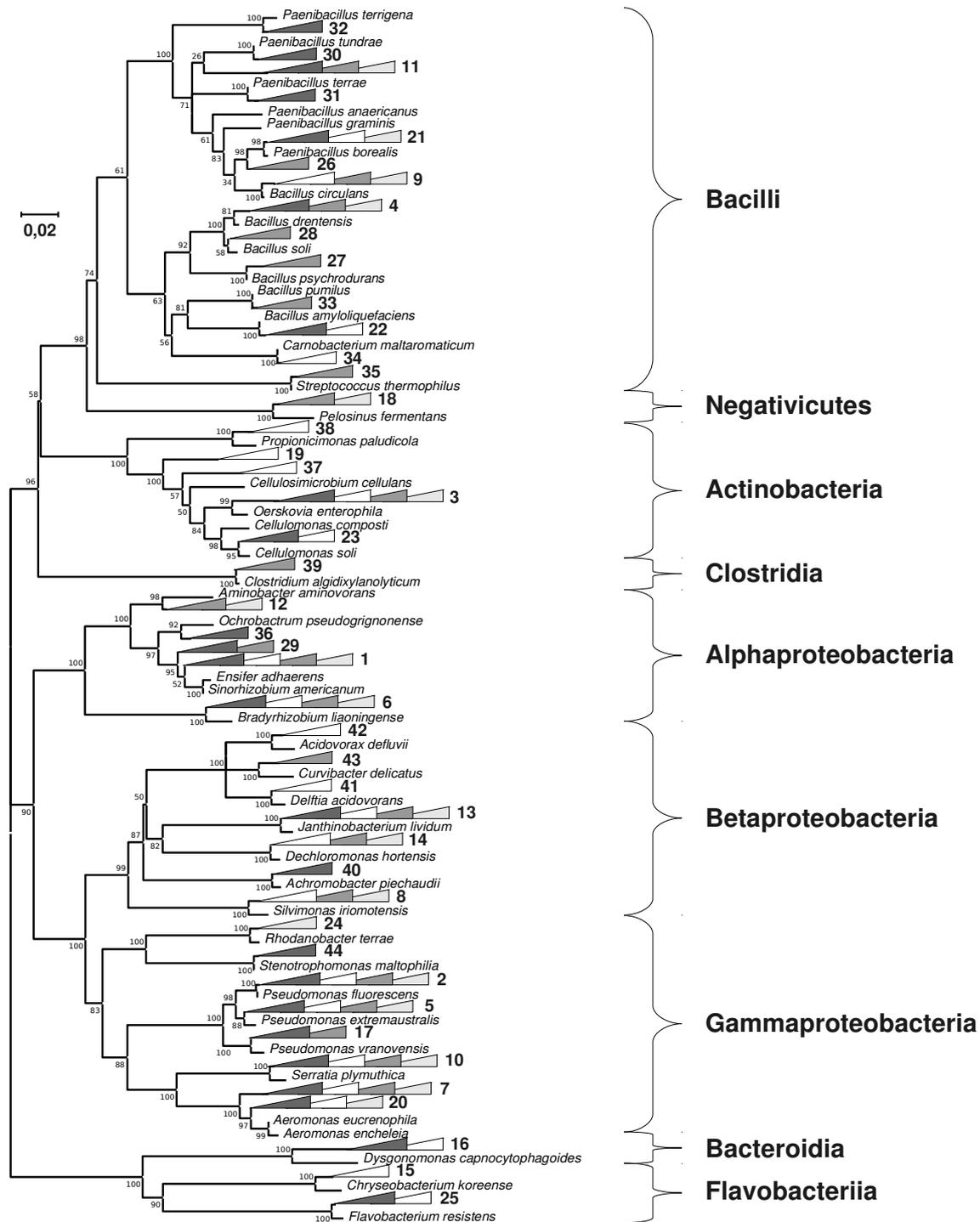


Abbildung 11: Übersicht über die prozentuale Zugehörigkeit der isolierten Bakterien zu Klassen.



intensiv genutzter Grünlandboden     
  intensiv genutzter Waldboden  
 weniger intensiv genutzter Grünlandboden     
  weniger intensiv genutzter Waldboden

**Abbildung 12: Phylogenetischer Stammbaum der 16S-rRNA-Gen-Sequenzen der Isolate.**

Es handelt sich um einen Neighbor-Joining-Baum (Bootstrap-Konsensusbaum) basierend auf den Referenzsequenzen der OTUs auf Gattungsebene sowie den 16S-rRNA-Sequenzen der nächstverwandten kultivierten Organismen. Die Zahlen an den Verzweigungen geben den Prozentsatz der Übereinstimmungen aller Bäume an. Die Dreiecke geben die Herkunft der Isolate, aber nicht die Größe der OTUs an. Die Zahlen hinter den Dreiecken geben die Nummer der OTU an (s. Tabelle 29). Der Balken zeigt einen Sequenzunterschied von 2 an.

### 3. Ergebnisse

Etwa 32 % der Isolate zählen zu den Alpha-, etwa 28 % zu den Gamma- und etwa 9,5% zu den Betaproteobacteria (s. Abbildung 11). Somit zählen 70 % der Isolate zu den Proteobacteria. Die Klassen Flavobacteria, Negativicutes, Bacteroidia, Clostridia und Sphingobacteria sind mit jeweils weniger als 2 % der Isolate am seltensten vertreten. Fünfzehn Spezies (etwa 15 % der Isolate) zählen zu den Bacilli und vier (etwa 9,5 % der Isolate) zu den Actinobacteria. Zu den grampositiven Bakterien zählen 22 Spezies und etwa 25 % der Isolate.

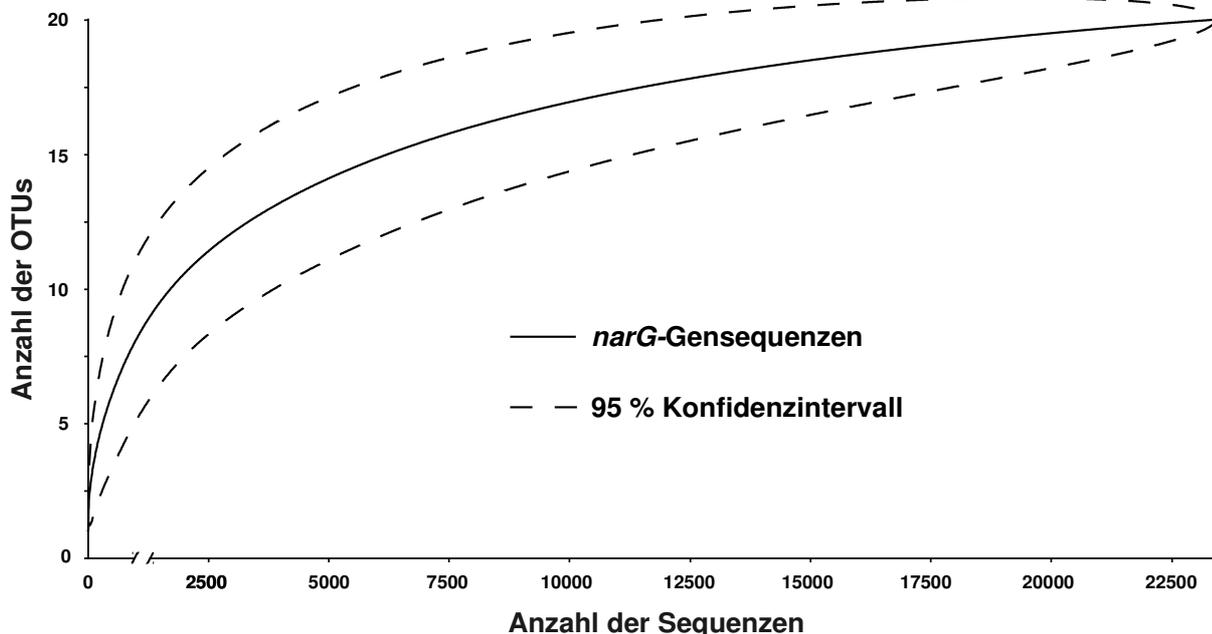
Aus den Referenzsequenzen der Cluster auf Gattungsebene und den Sequenzen der 16S rRNA-Gene ihrer nächsten kultivierten Verwandten wurde ein phylogenetischer Stammbaum berechnet (s. Abbildung 12). Die isolierten Bakterien gehören sieben verschiedenen Klassen und vier verschiedenen Phyla an. Die meisten Gattungen gehören zu den Betaproteobacteria und den Bacilli (jeweils sechs), obwohl die meisten Isolate zu den Alpha- und den Gammaproteobacteria gehören. Proteobacteria wurden aus allen Böden isoliert, während Bacteroidia nur in Grünland- und Negativicutes nur in Waldböden gefunden wurden. Clostridien wurden nur aus einem einzigen Boden, einem intensiv genutzten Waldboden isoliert.

#### **3.5.2 Analyse von *narG*-Genen**

##### **Phylogenetische Analyse**

Um die Gemeinschaft der Nitratreduzierer in den Böden zu untersuchen, wurden die *narG*-Gene der in den Böden lebenden Bakterien mittels Pyrosequenzierung analysiert. Dabei wurden 23400 *narG*-Sequenzen erhalten, die in 20 OTUs auf Speziesebene einsortiert wurden. Die Rarefaction-Kurve zeigt, dass die Menge der untersuchten Sequenzen ausreicht, um nahezu die gesamte Diversität der *narG*-Spezies zu erfassen (s. Abbildung 13). Die geschätzte Artenzahl von 20,75 (Chao1) erscheint in diesem Zusammenhang

jedoch als zu gering. Es handelt sich dabei jedoch um eine Mindestabschätzung der Arten.



**Abbildung 13: Rarefaction-Kurve (durchgehende Linie) und 95 % Konfidenzbereiche (gestrichelte Linie) der OTUs der *narG*-Gensequenzen bei 33 % genetischer Distanz.**

Die Anzahl der Sequenzen pro Boden lag zwischen 450 (AEG 2) und 5972 (HEW 5), die Anzahl der OTUs pro Boden zwischen 2 (HEW 12) und 13 (SEG 6) (s. Tabelle 30). Die Testabdeckung war in allen Böden  $> 99\%$ . In allen Böden stimmte die geschätzte Artenzahl gut mit der Anzahl der erhaltenen OTUs überein. Der Shannon-Index der meisten Böden lag zwischen 0,322 und 0,847. Für AEG 2 wurde ein sehr niedriger Shannon-Index (0,096) berechnet. Dies deutet darauf hin, dass fast alle Sequenzen aus diesem Boden zu einer Spezies gehören und die anderen beiden Spezies sehr selten sind. Auch der Boden HEW 5 hatte einen recht geringen Shannon-Index. Die Äquität, der geeignetste Index um die Diversität der Böden trotz unterschiedlicher Sequenzzahl zu vergleichen, war für die Böden HEW 12 (0,84), AEW 5 (0,66) und SEW 9 (0,64) am höchsten. Die geringste Äquität wiesen die Böden SEG 6 (0,17) und AEW 8 (0,19) auf.

### 3. Ergebnisse

**Tabelle 30: Diversitätsindices der Böden basierend auf den *narG*-Gensequenzen.**

Boden	Anzahl der Sequenzen	Anzahl der OTUs	Chao 1	Shannon-Index (H')	Äquität (J)	Testabdeckung (C)
AEG 2 <sup>a</sup>	450	3	3	0,096	0,367	99,77
AEG 7 <sup>b</sup>	2086	8	9	0,815	0,283	99,9
AEW 5	672	3	4	0,686	0,662	99,85
AEW 8	4060	9	11,25	0,546	0,192	99,93
HEG 6	1331	5	5	0,568	0,353	1
HEG 9	2141	7	7	0,593	0,259	1
HEW 5	5972	6	7	0,322	0,230	99,97
HEW 12	782	2	2	0,522	0,843	1
SEG 2	1250	9	9	0,819	0,252	1
SEG 6	676	13	14,13	0,847	0,179	99,56
SEW 5	2872	6	6	0,517	0,279	1
SEW 9	1108	3	3	0,650	0,639	99,91
gesamt	23400	20	20,75	0,745	0,105	99,99

<sup>a</sup>Grau: Böden unter intensiver Landnutzung

<sup>b</sup>Weiß: Böden unter weniger intensiver Landnutzung

Für alle Böden zusammengenommen war der Shannon-Index 0,75. Dies deutet auf eine hohe Diversität der Nitratreduzierer hin. Die Äquität (der standardisierte Shannon-Index) betrug 0,105. Die Äquität ist ein auf die Sequenzzahl bezogener Wert, der sich somit für Vergleiche von Datensätzen mit unterschiedlich vielen Sequenzen eignet. Dieser niedrige relative Wert zeigt eine große Ungleichverteilung der *narG*-Sequenzen auf die OTUs an.

**Tabelle 31: Ähnlichkeit der translatierten Referenzsequenzen der OTUs auf Speziesebene zu translatierten *narG*-Gensequenzen kultivierter Organismen.**

Der Ähnlichkeits-Grenzwert für die Zuordnung zu Spezies beträgt 59 %.

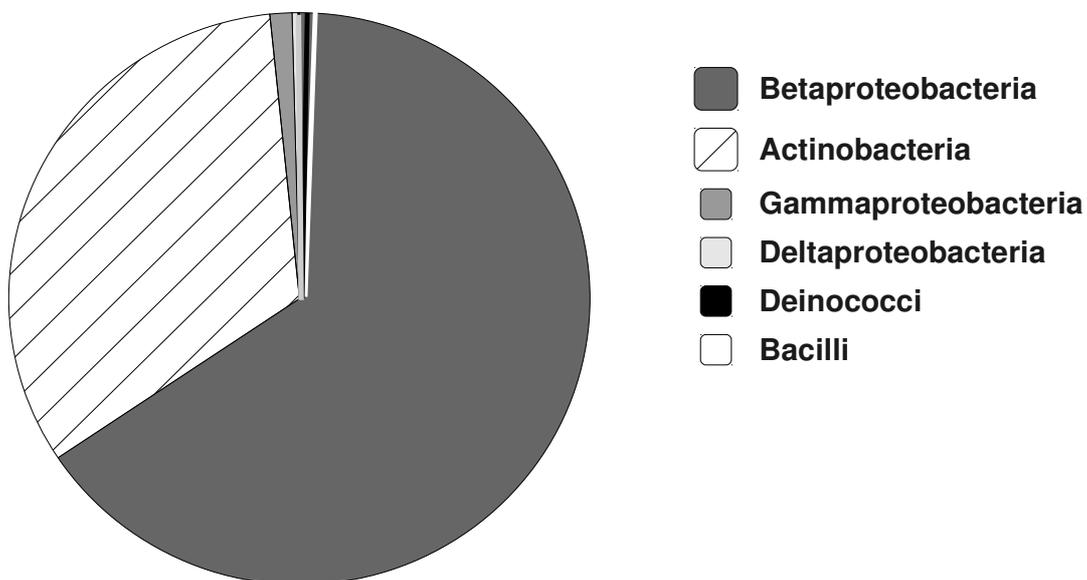
OTU #	Seq.	Spezies (Accession Number)	Ähnlichkeit <sup>a</sup>	Familie	Klasse/Phylum
1	15353	<i>Castellaniella defragrans</i> (CAL91915.1)	67 %	Alcaligenaceae	Betaproteobacteria Proteobacteria
2	7622	<i>Mycobacterium xenopi</i> (EUA33751.1)	82 %	Mycobacteriaceae	Actinobacteria Actinobacteria
3	240	<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i> (YP_004783934.1)	65 %	Acidithiobacillaceae	Gammaproteobacteria Proteobacteria
4	39	<i>Kribbella flavida</i> (YP_003381996.1)	74 %	Nocardioidaceae	Actinobacteria Actinobacteria
5	37	<i>Nitrococcus mobilis</i> (ZP_01125872.1)	58 %	Ectothiorhodospiraceae	Gammaproteobacteria Proteobacteria
6	27	<i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i> (YP_465377.1)	56 %	Cystobacteraceae	Deltaproteobacteria Proteobacteria
7	20	<i>Desulfuromusa kysingii</i> (CAL91917.1)	54 %	Desulfuromonadaceae	Deltaproteobacteria Proteobacteria
8	19	<i>Geobacter lovleyi</i> (YP_004199186.1)	84 %	Geobacteraceae	Deltaproteobacteria Proteobacteria
9	9	<i>Nitrococcus mobilis</i> (ZP_01125872.1)	49 %	Ectothiorhodospiraceae	Gammaproteobacteria Proteobacteria
10	6	<i>Actinosynnema mirum</i> (YP_003099832.1)	66 %	Rubrobacteraceae	Actinobacteria Actinobacteria
11	6	<i>Marinithermus hydrothermalis</i> (YP_004368689.1)	54 %	Thermaceae	Deinococci Deinococcus-Thermus
12	5	<i>Thermus thermophilus</i> <sup>b</sup> (YP_006059939.1)	56 %	Thermaceae	Deinococci Deinococcus-Thermus
13	4	<i>Marinithermus hydrothermalis</i> (YP_004368689.1)	57 %	Thermaceae	Deinococci Deinococcus-Thermus
14	4	<i>Geobacter metallireducens</i> (YP_383987.1)	64 %	Geobacteraceae	Deltaproteobacteria Proteobacteria
15	2	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (AAB50620.1)	100 %	Pseudomonadaceae	Gammaproteobacteria Proteobacteria
16	2	<i>Geobacter metallireducens</i> (YP_383987.1)	67 %	Geobacteraceae	Deltaproteobacteria Proteobacteria
17	2	<i>Paenibacillus polymyxa</i> (YP_003948045.1)	88 %	Paenibacillaceae	Bacilli Firmicutes
18	1	<i>Nocardia brasiliensis</i> (ZP_09844453.1)	67 %	Nocardiaceae	Actinobacteria Actinobacteria
19	1	<i>Bacillus coagulans</i> (YP_004859818.1)	76 %	Bacillaceae	Bacilli Firmicutes
20	1	<i>Paenibacillus larvae</i> (ZP_02328652.1)	74 %	Paenibacillaceae	Bacilli Firmicutes

<sup>a</sup>Ähnlichkeit der Referenzsequenz zur *narG*-Gen-Sequenz der nächstverwandten kultivierten Spezies.<sup>b</sup>Grau: Die Zugehörigkeit zu einer Spezies konnte nicht eindeutig bestimmt werden.

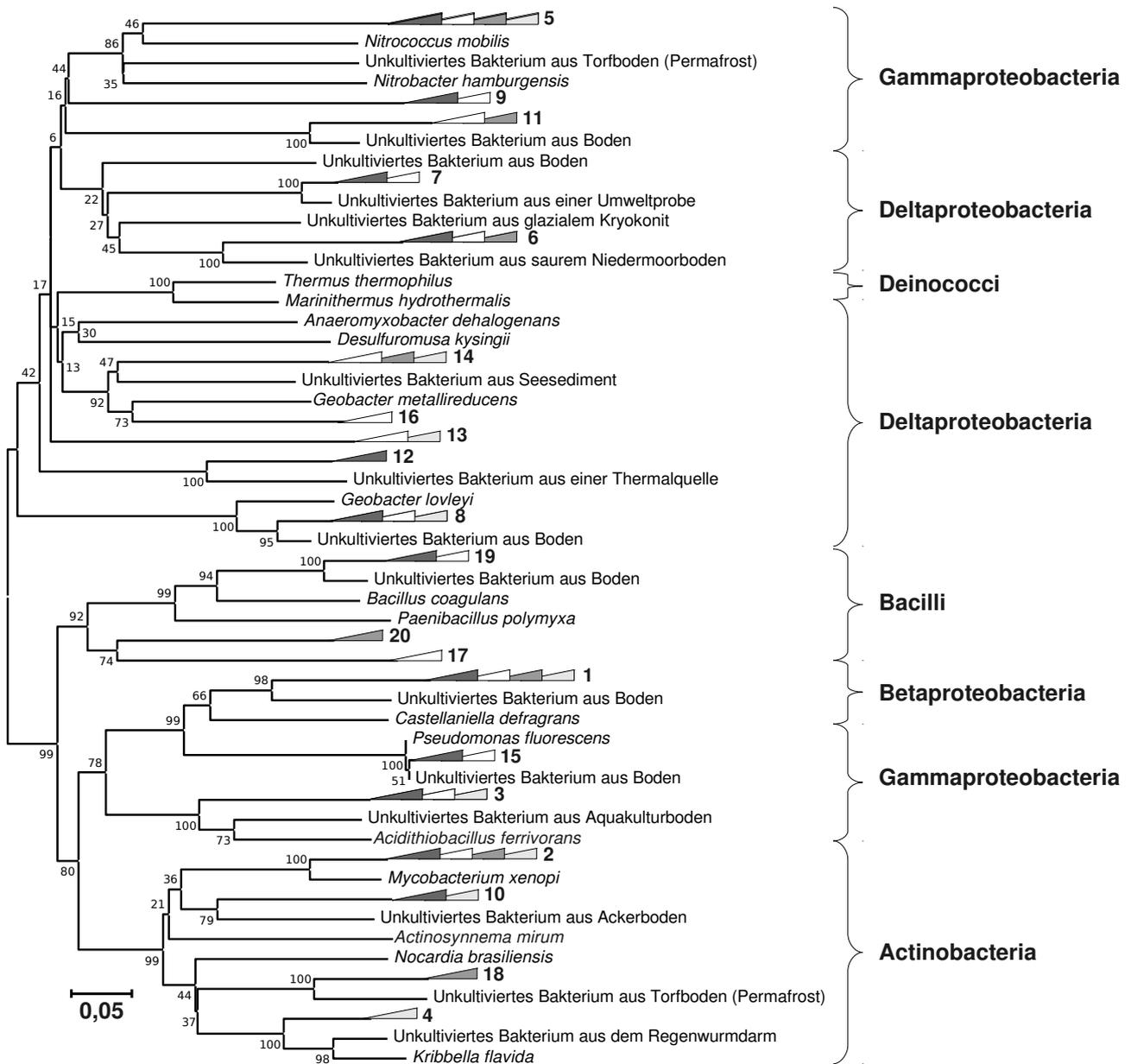
### 3. Ergebnisse

Von den 20 OTUs, in die die *narG*-Gensequenzen einsortiert wurden, enthalten 17 weniger als 1 % der Sequenzen. Über 65 % der Sequenzen wurden in eine OTU einsortiert, die die Spezies *Castellaniella defragrans* repräsentiert und mehr als 32 % der Sequenzen wurden der Spezies *Mycobacterium xenopi* zugeordnet. Sieben OTUs gehören nicht zur gleichen Spezies wie ihre nächsten kultivierten Verwandten (Ähnlichkeit unter 59 %). Zwei dieser OTUs, OTU 5 und OTU 9, gehören auch nicht zur gleichen Spezies wie ihre nächsten unkultivierten Verwandten und repräsentieren daher bisher unbekannte Spezies.

Etwa 66 % der Sequenzen stammen von Betaproteobacteria und etwa 33 % von Actinobacteria (s. Abbildung 14). Jeweils unter 1,5 % der Sequenzen stammen von Gamma- und Deltaproteobacteria sowie von Deinococci und Bacilli.



**Abbildung 14:** Übersicht über die Zuordnung der *narG*-besitzenden Bakterien zu taxonomischen Klassen (in Prozent).



**Abbildung 15: Phylogenetischer Stammbaum der narG-Sequenzen.**

Es handelt sich um einen Neighbor-Joining-Baum (Bootstrap-Konsensusbaum) basierend auf den translatierten Referenzsequenzen der OTUs auf Speziesebene sowie den Proteinsequenzen der nächstverwandten Organismen. Die Zahlen an den Verzweigungen geben den Prozentsatz der Übereinstimmungen aller Bäume an. Die Dreiecke geben die Herkunft der Sequenzen, aber nicht die Größe der OTUs an. Die Zahlen hinter den Dreiecken geben die Nummer der OTU an (s. Tabelle 31). Der Balken zeigt einen Sequenzunterschied von 5 % an.

### 3. Ergebnisse

Die meisten Sequenzen stammen also von Proteobacteria und Actinobacteria. Es wurden jedoch auch vier *narG*-Gensequenzen von Bacilli und 15 von Deinococci gefunden. Diese 15 Sequenzen gehören zu keiner bisher kultivierten Spezies. Dies zeigt sich auch deutlich im phylogenetischen Stammbaum (s. Abbildung 15). Die OTUs 11 und 12 gruppierten mit den Sequenzen ihrer nächsten unkultivierten Verwandten und verschiedenen Proteobacteria, während die Sequenzen kultivierter Deinococci eine eigene Gruppe bildeten. Die Referenzsequenz der OTU 13 gruppierte nicht mit der Sequenz ihres nächsten unkultivierten Verwandten. Diese beiden Sequenzen weisen eine Ähnlichkeit von 59 % auf Proteinebene auf und müssten somit zur gleichen Spezies gehören. Ihre Gruppierung im Stammbaum deutet jedoch an, dass es sich bei OTU 13 um eine bisher unbekannte Spezies handelt.

#### Statistische Analyse

Der Einfluss der Bodeneigenschaften auf die *narG*-Bakteriengemeinschaften wurde mittels multivariater Gradientenanalyse untersucht. Die zuerst durchgeführte DCA ergab Eigenwerte von 0,26 für die 1. Achse und 0,16 für die 2. Achse (s. Tabelle 32). Die Speziesdaten wurden also nicht sehr gut entlang dieser Achsen aufgetrennt. Die 3. und 4. Achse sind mit Eigenwerten unter 0,07 nicht relevant für die Erklärung der Variation in den Daten. Die ersten beiden Achsen erklären etwa 34 % der Varianz in den Speziesdaten. Die Länge des Gradienten lag zwischen 1,834 und 0,848 SD-Einheiten. Der Datensatz ist also sehr homogen.

**Tabelle 32: Variation und Varianz der Spezieszusammensetzung der *narG*-Gensequenzen aus den Böden.**

	Achse 1	Achse 2	Achse 3	Achse 4
Eigenwerte	0,256	0,159	0,069	0,014
Länge des Gradienten	1,834	1,204	0,827	0,848
Varianzanteil der Speziesdaten [%]	20,9	33,8	39,4	40,6

Kanonische Gradientenanalysen ergaben Eigenwerte für die 1. Achse zwischen 0,09 und 0,185 (s. Tabelle 33). Ein signifikanter Einfluss auf die Bakteriengemeinschaften konnte nur für die Eigenschaften Vegetationstyp ( $p = 0,0028$ ) und pH-Wert ( $p = 0,021$ ) gezeigt werden.

Eine CCA mit Vegetationstyp und pH-Wert als erklärenden Variablen ergab zwei kanonische Achsen mit den Eigenwerten 0,186 und 0,146 (s. Tabelle 34). Die beiden Achsen erklären etwa 27 % der Varianz der Bakteriengemeinschaften. Der Eigenwert der 1. Residualachse (3. Achse) ist höher als der der 1. kanonischen Achse, der seinerseits viel kleiner ist als der Eigenwert der 1. DCA-Achse. Diese beiden Fakten bedeuten, dass nicht alle wichtigen Variablen in die CCA eingegangen sind. Eine oder mehrere Variablen, die die Bakteriengemeinschaften beeinflussen, wurden in dieser Arbeit also nicht untersucht.

**Tabelle 33: Korrelation der *narG*-Bakteriengemeinschaften und der Bodeneigenschaften.**

Bodeneigenschaften	Eigenwert 1. kanonische Achse	F-Wert	p-Wert
Vegetationstyp	0,185	1,782	0,0028
Landnutzungsintensität	0,117	1,06	0,344
pH-Wert	0,174	1,66	0,021
Stickstoffgehalt	0,153	1,424	0,237
Kohlenstoffgehalt	0,14	1,292	0,327
Nitratgehalt	0,137	1,265	0,154
Ammoniumgehalt	0,094	0,835	0,686
Wassergehalt	0,127	1,159	0,285

**Tabelle 34: Korrelation der *narG*-Bakteriengemeinschaften mit den Umweltvariablen pH-Wert und Vegetationstyp.**

	Achse 1	Achse 2	Achse 3	Achse 4
Eigenwerte	0,186	0,146	0,239	0,166
Varianzanteil der Speziesdaten [%]	15,2	27,1	46,6	60,1
Varianzanteil des Verhältnisses Spezies-Umwelt [%]	56	100	0	0

### 3. Ergebnisse

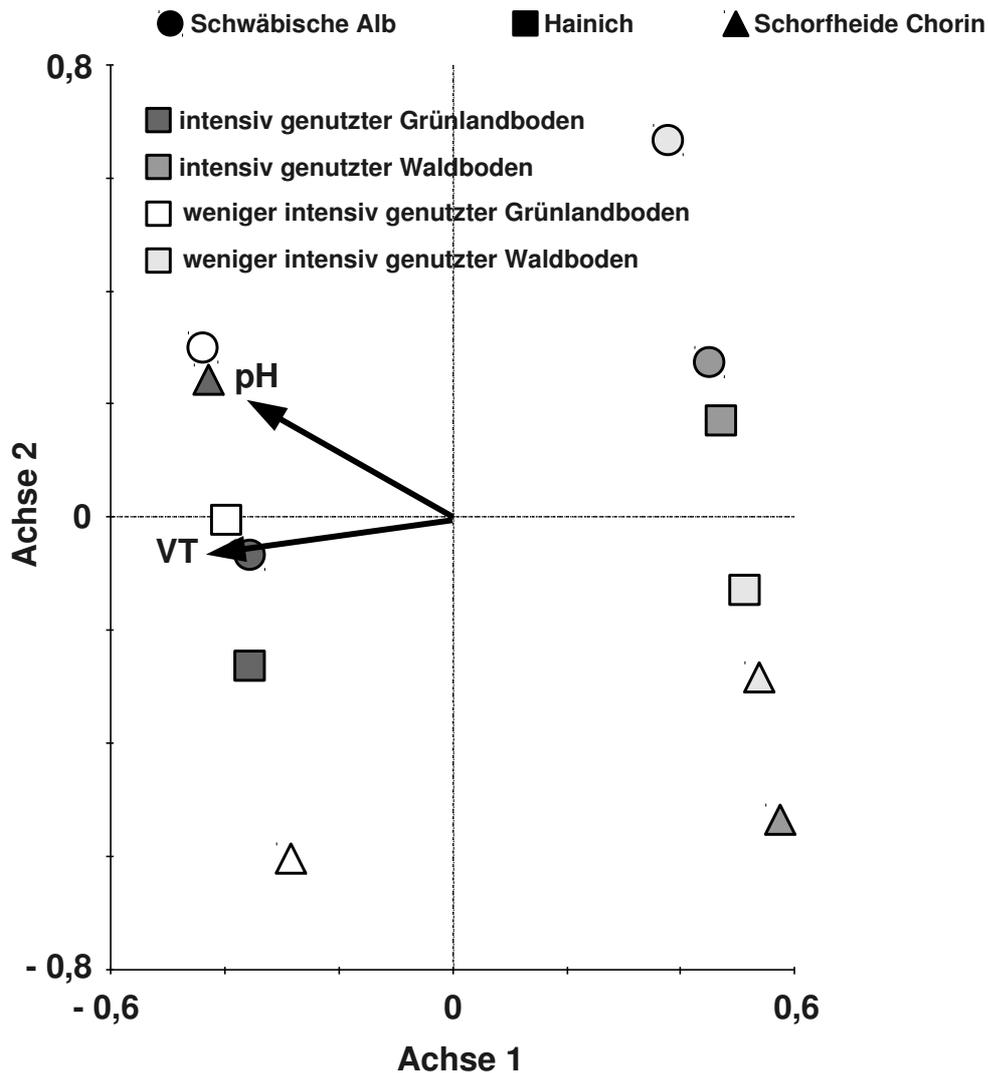


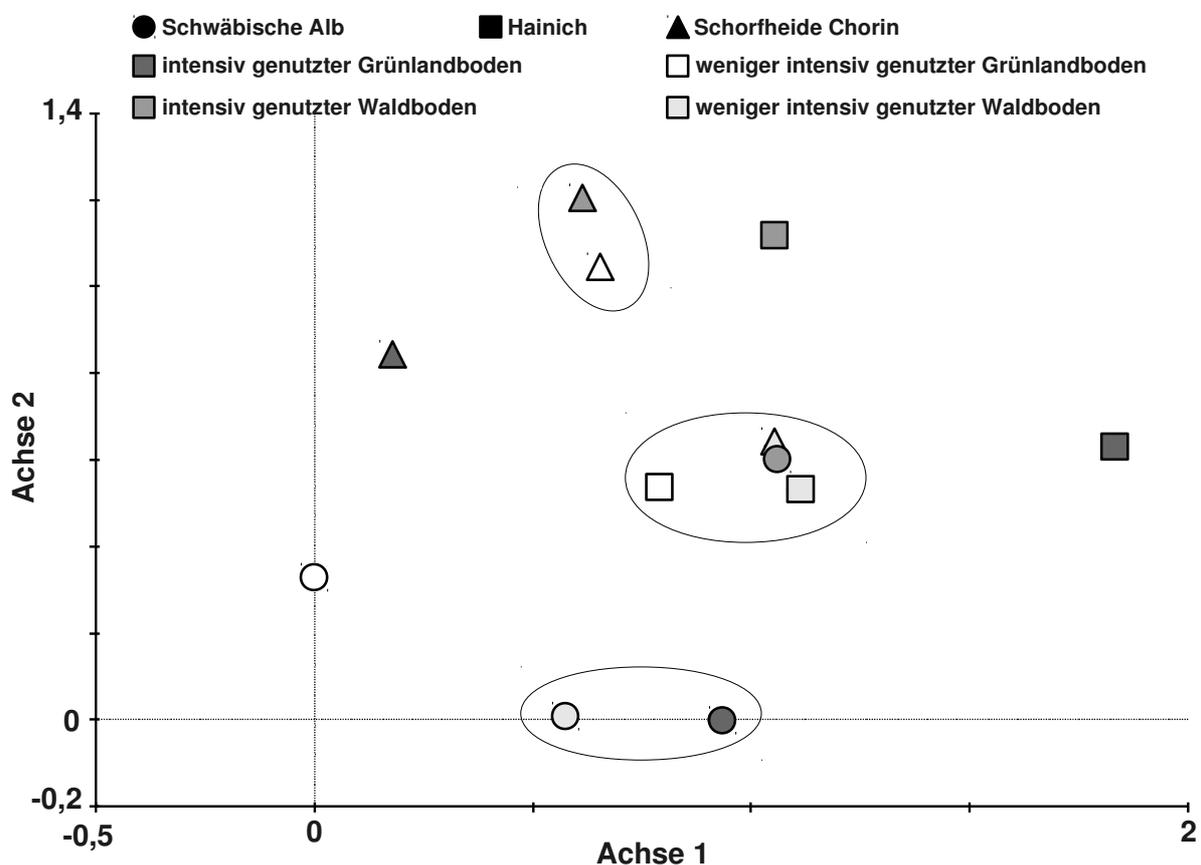
Abbildung 16: CCA der *narG*-Speziesdaten mit Vegetationstyp (VT) und pH-Wert als erklärenden Variablen.

- AEG 2    ○ AEG 7    ● AEW 5    ○ AEW 8
- HEG 6    □ HEG 9    ■ HEW 5    □ HEW 12
- ▲ SEG 2    △ SEG 6    ▲ SEW 5    △ SEW 9

Das Biplot-Diagramm der CCA zeigt, dass der Einfluss des Vegetationstyps auf die *narG*-Bakteriengemeinschaften größer ist als der des pH-Werts (s. Abbildung 16). Beide Parameter korrelieren miteinander, was aus dem kleinen Winkel der Vektoren geschlossen werden kann. Der Vegetationstyp ist fast nur mit der 1. Achse korreliert. Der pH-Wert jedoch steht in fast ebenso großem Zusammenhang mit der 1. wie mit der 2.

Achse. Die Böden sind deutlich entlang der 2. Achse, jedoch fast nicht entlang der 1. Achse angeordnet. Dies ist ein weiterer Hinweis auf das Fehlen einer wichtigen erklärenden Variablen.

Im Streudiagramm der DCA (s. Abbildung 17) finden sich die Böden nicht in gleicher Position zu den Achsen wie im CCA-Diagramm. Auch dies bedeutet, dass in der CCA wesentliche Umweltvariablen nicht berücksichtigt wurden. Die Ähnlichkeit der Böden bezüglich ihrer *narG*-Bakteriengemeinschaften lässt sich daher am besten aus dem Diagramm der DCA ersehen.



**Abbildung 17: DCA der *narG*-Speziesdaten.**

Böden mit ähnlichen *narG*-Bakteriengemeinschaften sind eingekreist.

- AEG 2 ○ AEG 7 ● AEW 5 ○ AEW 8
- HEG 6 □ HEG 9 ■ HEW 5 □ HEW 12
- ▲ SEG 2 △ SEG 6 ▲ SEW 5 △ SEW 9

### 3. Ergebnisse

Ein intensiv genutzter (AEW 5) und zwei weniger intensiv genutzte Waldböden (HEW 12 und SEW 9) zeigen eine sehr große Ähnlichkeit ihrer *narG*-Bakteriengemeinschaften. Eine hohe Ähnlichkeit zu diesen weist auch ein weniger intensiv genutzter Grünlandboden (HEG 9) auf. In zwei Exploratorien finden sich jeweils zwei Böden, deren *narG*-Bakteriengemeinschaften sich ähneln: Der weniger intensiv genutzte Grünlandboden (SEG 6) und der intensiv genutzte Waldboden (SEW 5) aus der Schorfheide Chorin sowie der intensiv genutzter Grünlandboden (AEG 2) und der weniger intensiv genutzte Waldboden (AEW 8) aus der Schwäbischen Alb. Drei Grünlandböden, zwei unter intensiver (HEG 6 und SEG 2) und einer unter weniger intensiver Landnutzung (AEG 7) beinhalten *narG*-Bakteriengemeinschaften, die sich von denen aus den anderen Böden stark unterscheiden. Die Böden AEG 7 und HEG 6 sind im Diagramm fast 2 SD-Einheiten voneinander entfernt dargestellt. Diese Böden haben also nur etwa die Hälfte aller Arten gemeinsam.

Die *narG*-Bakteriengemeinschaften werden vom Vegetationstyp und vom pH-Wert beeinflusst. Sie werden außerdem von weiteren Faktoren, die in dieser Arbeit nicht untersucht wurden, beeinflusst. Bezüglich der *narG*-Bakteriengemeinschaften zeigen die Böden AEW 5, HEG 9, HEW 12 und SEW 9; AEG 2 und AEW 8 sowie SEG 6 und SEW 5 große Ähnlichkeiten. Die Böden AEG 7 und HEG 6 unterscheiden sich stark voneinander.

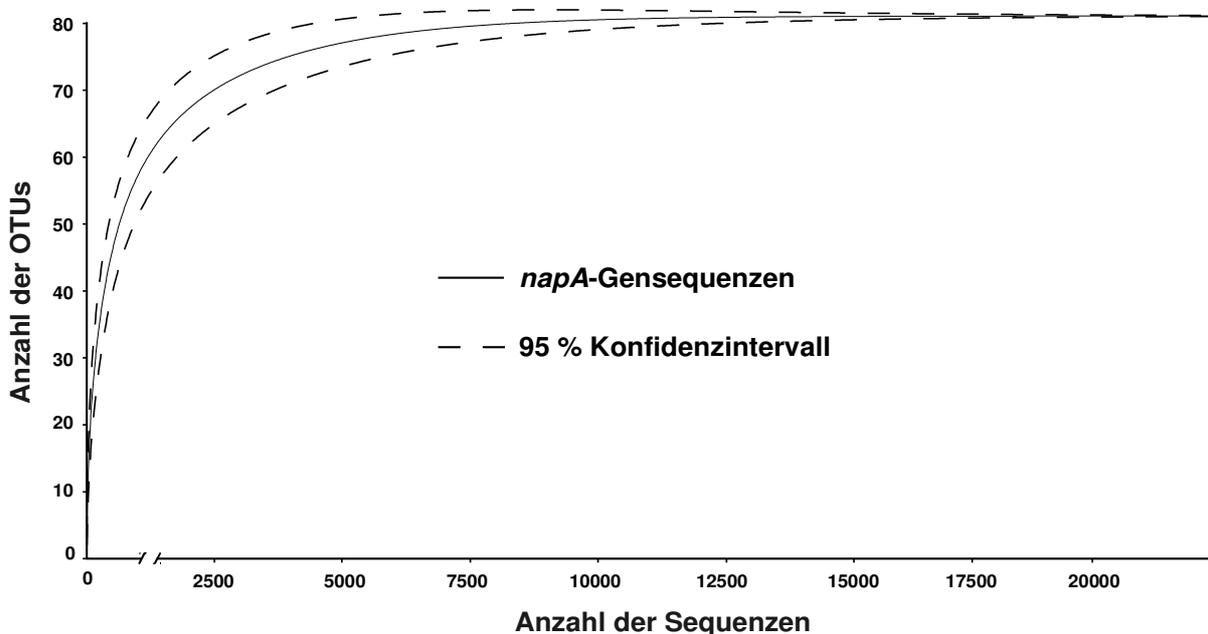
#### **3.5.3 Analyse von *napA*-Genen**

##### **Phylogenetische Analyse**

Die *napA*-Gene der Bodenbakterien wurden sequenziert, um die Gemeinschaft der Nitratreduzierer in den Böden zu untersuchen. Durch Pyrosequenzierung wurden 39676 *napA*-Sequenzen erhalten, die in 205 OTUs auf Speziesebene einsortiert wurden. Von diesen enthielten 14 mehr als jeweils 1 % der Sequenzen und 31 mehr als 100

Sequenzen. 124 OTUs enthielten weniger als zehn Sequenzen und wurden bei den weiteren Analysen nicht berücksichtigt. So wurden also 39300 Sequenzen und 81 OTUs erhalten. Die Diversität der *napA*-beinhaltenden Spezies wurde dabei vollständig erfasst, wie anhand der Rarefaction-Kurve zu sehen ist (s. Abbildung 18). Dies wird auch durch die Schätzung der Artenzahl (Chao1 = 81) bestätigt.

Die Anzahl der aus den Böden gewonnenen Sequenzen variierte sehr stark (s. Tabelle 35). Aus dem Boden SEG 2 konnten nur drei Sequenzen erhalten werden, aus dem Boden HEW 5 dagegen 13274. Aus den Böden AEG 2, HEG 6 und SEG 6 wurden nur wenige Sequenzen gewonnen, während die Anzahl der Sequenzen aus den übrigen Böden im mittleren bis hohen Bereich lag. Die Anzahl der OTUs pro Boden schwankte zwischen 12 und 50. Eine Ausnahme war der Boden SEG 2, dessen drei Sequenzen zu zwei OTUs gehören. Die Testabdeckung dieses Bodens lag bei 66 %, während in allen anderen Böden eine Testabdeckung von mindestens 95 % erreicht wurde.



**Abbildung 18: Rarefaction-Kurve (durchgehende Linie) und 95 % Konfidenzbereiche (gestrichelte Linie) der OTUs der *napA*-Gensequenzen bei 15 % genetischer Distanz.**

Die Shannon-Indices lagen zwischen 0,637 (SEG 2) und 2,748 (HEG 9). Nur zwei Böden

### 3. Ergebnisse

wiesen einen Shannon-Index unter 1 auf. Die Diversität der *napA*-beinhaltenden Bakterien ist in allen Böden also sehr hoch. Die Äquität der Böden lag zwischen 0,157 (HEW 12) und 0,945 (SEG 2). Fünf Böden (AEG 2, AEG 7, HEG 6, HEG 9 und SEW 5) hatten eine Äquität zwischen 0,29 und 0,34 und fünf weitere (AEW 5, AEW 8, HEW 5, HEW 12 und SEW 9) eine Äquität zwischen 0,15 und 0,19. Relativ zur Anzahl der Sequenzen gesehen war die Diversität demnach in der Mehrzahl der Böden sehr gering. Insgesamt war die Äquität in den Böden mit einem Wert von 0,22 sehr gering. Der Shannon-Index jedoch war sehr hoch, nämlich 2,86. Ebenso wie in den meisten einzelnen Böden war die relative Diversität niedrig, während die von der Anzahl der Sequenzen unabhängige Diversität sehr hoch war.

**Tabelle 35: Diversitätsindices der Böden basierend auf *napA*-Gensequenzen.**

Boden	Anzahl der Sequenzen	Anzahl der OTUs	Chao 1	Shannon-Index (H')	Äquität (J)	Testabdeckung (C)
AEG 2 <sup>a</sup>	294	21	21,33	1,916	0,323	99,31
AEG 7 <sup>b</sup>	1639	39	43,9	2,460	0,300	99,57
AEW 5	8511	46	47,6	2,325	0,190	99,95
AEW 8	7240	48	60,5	2,213	0,190	99,93
HEG 6	303	31	43,5	2,338	0,334	96,7
HEG 9	2067	50	53,13	2,748	0,312	99,76
HEW 5	13274	50	51	2,223	0,185	99,98
HEW 12	2502	20	22	1,144	0,157	99,92
SEG 2	3	2	2,5	0,637	0,945	66,67
SEG 6	129	18	49	2,099	0,453	95,35
SEW 5	1013	13	13,5	1,358	0,299	99,8
SEW 9	2352	12	12,67	0,699	0,168	99,91
gesamt	39327	81	81	2,856	0,215	100

<sup>a</sup>Grau: Böden unter intensiver Landnutzung

<sup>b</sup>Weiß: Böden unter weniger intensiver Landnutzung

**Tabelle 36: Ähnlichkeit der translatierten Referenzsequenzen der OTUs auf Speziesebene, die mehr als 200 Sequenzen enthalten, zu translatierten *napA*-Gensequenzen kultivierter Organismen.**

Der Ähnlichkeits-Grenzwert für die Zuordnung zu Spezies beträgt 94 %.

OTU	# Seq.	Spezies (Accession Number)	Ähnlichkeit <sup>a</sup>	Familie	Klasse/Phylum
1	7221	<i>Kaistia granuli</i> (WP_018185443.1)	93 %	Rhizobiaceae	Alphaproteobacteria Proteobacteria
2	6880	<i>Shinella zoogloeides</i> (WP_023514112.1)	93 %	Rhizobiaceae	Alphaproteobacteria Proteobacteria
3	4239	<i>Afipia felis</i> (WP_002718551.1)	93%	Bradyrhizobiaceae	Alphaproteobacteria Proteobacteria
4	4018	<i>Terriglobus roseus</i> (YP_006420856.1)	77 %	Acidobacteriaceae	Acidobacteria Acidobacteria
5	2449	<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> (NP_773678.1)	94 %	Bradyrhizobiaceae	Alphaproteobacteria Proteobacteria
6	1746	<i>Sinorhizobium fredii</i> (YP_002825545.1)	85 %	Rhizobiaceae	Alphaproteobacteria Proteobacteria
7	1549	<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> (NP_773678.1)	98 %	Bradyrhizobiaceae	Alphaproteobacteria Proteobacteria
8	1406	<i>Mesorhizobium alhagi</i> (WP_008839851.1)	80%	Phyllobacteriaceae	Alphaproteobacteria Proteobacteria
9	1158	<i>Cupriavidus necator</i> (YP_004680984.1)	92 %	Burkholderiaceae	Bataproteobacteria Proteobacteria
10	1133	<i>Ralstonia pickettii</i> (YP_008598722.1)	93 %	Burkholderiaceae	Bataproteobacteria Proteobacteria
11	910	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> (YP_530841.1)	91 %	Bradyrhizobiaceae	Alphaproteobacteria Proteobacteria
12	647	<i>Azospirillum lipoferum</i> (YP_005037818.1)	83 %	Rhodospirillaceae	Alphaproteobacteria Proteobacteria
13	487	<i>Hyphomicrobium zavarzinii</i> (WP_020086795.1)	93 %	Hyphomicrobiaceae	Alphaproteobacteria Proteobacteria
14	445	<i>Kaistia granuli</i> (WP_018185443.1)	92 %	Rhizobiaceae	Alphaproteobacteria Proteobacteria
15	386	<i>Granulicella mallensis</i> (YP_005056274.1)	76 %	Acidobacteriaceae	Acidobacteria Acidobacteria
16	333	<i>Bradyrhizobium oligotrophicum</i> (YP_007515652.1)	85 %	Bradyrhizobiaceae	Alphaproteobacteria Proteobacteria
17	300	<i>Hyphomicrobium zavarzinii</i> (WP_020086795.1)	92 %	Hyphomicrobiaceae	Alphaproteobacteria Proteobacteria
18	216	<i>Granulicella mallensis</i> (YP_005056274.1)	75 %	Acidobacteriaceae	Acidobacteria Acidobacteria
19	211	<i>Afipia felis</i> (WP_002718551.1)	91 %	Bradyrhizobiaceae	Alphaproteobacteria Proteobacteria

<sup>a</sup>Ähnlichkeit der Referenzsequenz zur *napA*-Gen-Sequenz der nächstverwandten kultivierten Spezies.

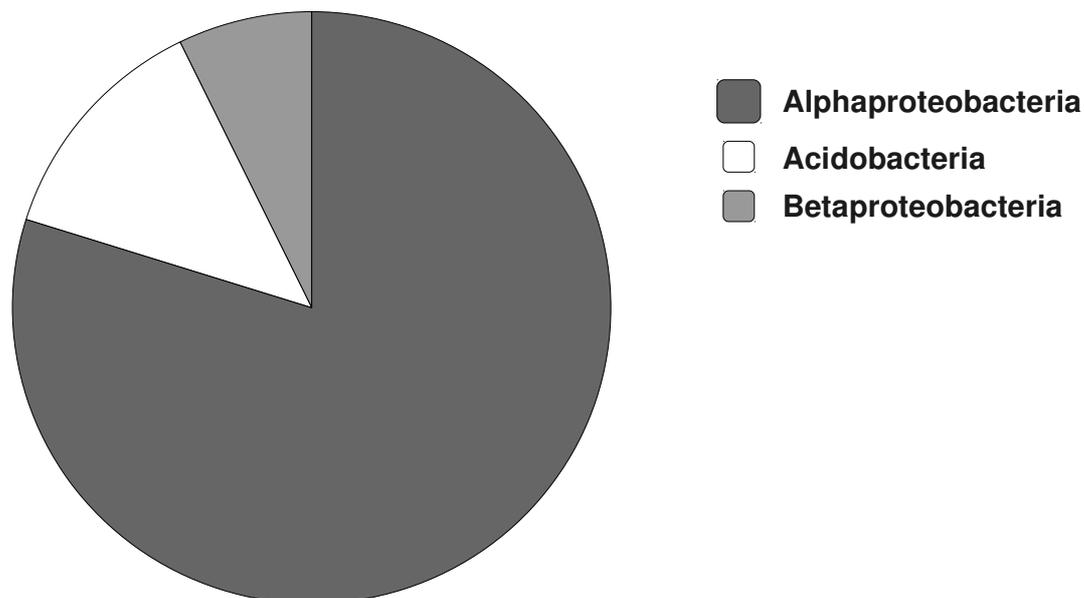
### 3. Ergebnisse

Für die 19 OTUs, die mehr als 200 Sequenzen beinhalten, wurden die nächstverwandten unkultivierten und kultivierten Organismen ermittelt (s. Tabelle 36). Die größte OTU enthält etwa 20 % der Sequenzen und wurde der Gattung *Kaistia* zugeordnet, zu der auch die Sequenzen der OTU 14 gehören. Die OTUs 5, 7 und 16 enthalten insgesamt 4331 Sequenzen der Gattung *Bradyrhizobium*.

Insgesamt enthalten neun OTUs Sequenzen, die zu den Familien Bradyrhizobiaceae und Rhizobiaceae gehören. Drei OTUs, die zusammen etwa 6,6 % aller Sequenzen beinhalten, gehören zu den Burkholderiaceae und damit zu den Betaproteobacteria. Drei weitere OTUs gehören zu den Acidobacteria und enthalten zusammen etwa 12 % der *napA*-Sequenzen.

Die Sequenzen aus OTU 8 zeigen nur 81 % Ähnlichkeit zu ihrem nächsten unkultivierten und 80 % Ähnlichkeit zu ihrem nächsten kultivierten Verwandten *Mesorhizobium alhagi*. Sie gehören also zu einer bisher unbekanntem Gattung der Familie Phyllobacteriaceae. 4018 Sequenzen (OTU 4) zeigen 77 % Ähnlichkeit zu Sequenzen von ihrem nächsten unkultivierten Verwandten und zu Sequenzen der Spezies *Terriglobus roseus*. Diese OTU repräsentiert daher eine völlig neue Gattung der Familie Acidobacteriaceae. Dies gilt auch für die OTUs 15 und 18, deren Sequenzen 76 % bzw. 75 % Ähnlichkeit zu *Granulicella mallensis* und 78 % bzw. 81 % Ähnlichkeit zu einem unkultivierten Bakterium aufweisen. Die Referenzsequenzen der OTUs 15 und 18 weisen auf Nukleinsäureebene 84 % Ähnlichkeit zueinander auf und gehören somit wahrscheinlich zur gleichen Gattung.

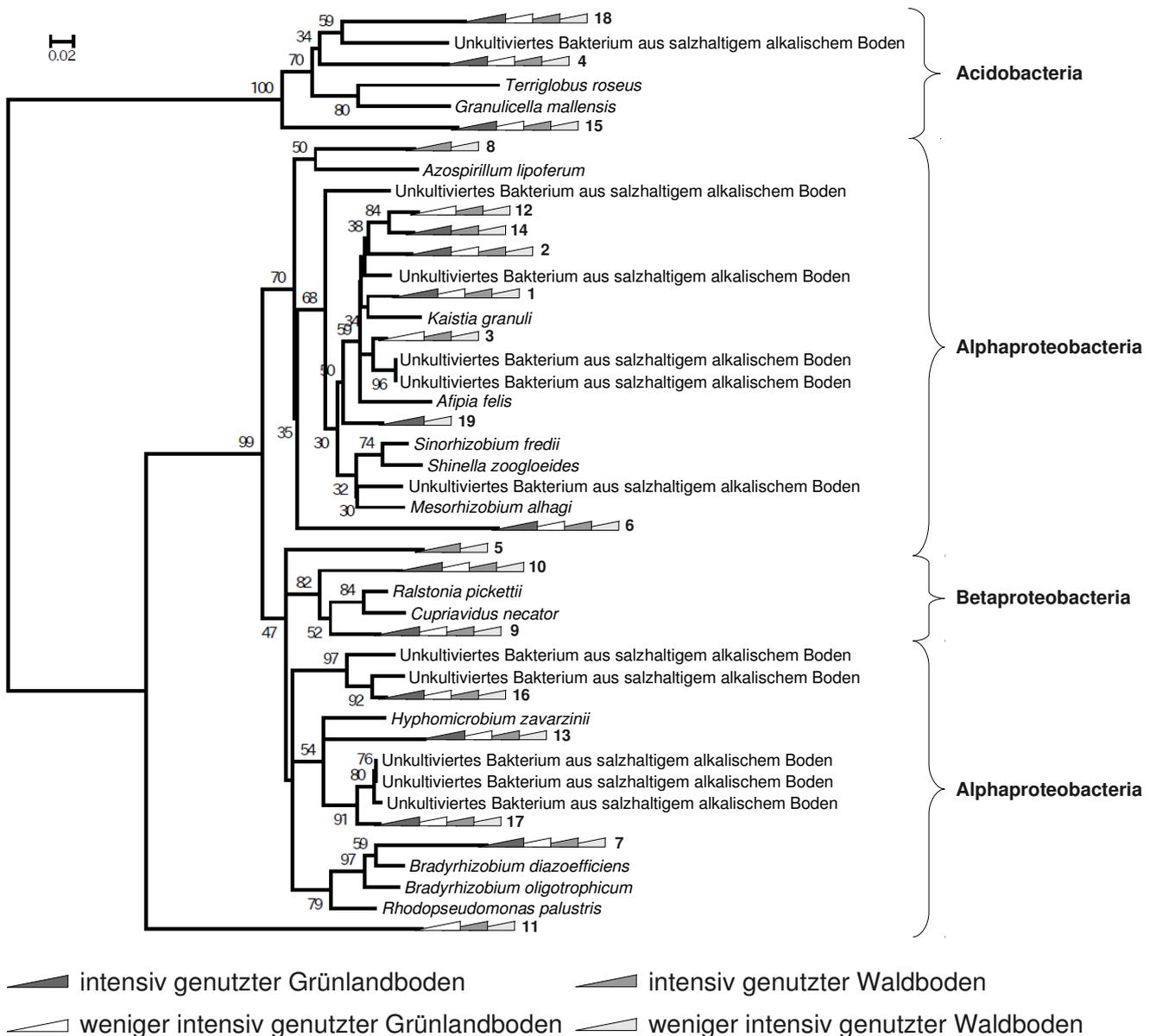
Fast 80 % der Sequenzen stammen von Alphaproteobacteria (s. Abbildung 19). Nur etwa 13 % stammen von Acidobacteria und 7 % von Betaproteobacteria. Es wurden also fast nur Sequenzen von Proteobacteria erhalten. Betrachtet man die Zugehörigkeit zu taxonomischen Klassen, so ist der Datensatz sehr einheitlich.



**Abbildung 19: Übersicht über die Zugehörigkeit der *napA*-besitzenden Bakterien zu taxonomischen Klassen (in Prozent).**

Die geringe Ähnlichkeit der in dieser Arbeit sequenzierten Acidobacteria zu bisher kultivierten Acidobacteria ist auch im phylogenetischen Stammbaum deutlich zu erkennen (s. Abbildung 20). Die *napA*-Sequenzen der OTUs 15 und 18 sind ähnlicher zueinander als zu ihren nächsten kultivierten Verwandten. Auch viele der zu den Alphaproteobacteria gehörenden OTUs gruppieren näher zu bisher unkultivierten Bakterien als zu kultivierten. OTU 17 findet sich zwischen Alphaproteobacteria gruppiert, obwohl der Datenbankabgleich ergab, dass es sich um Betaproteobacteria der Gattung Burkholderia handelt. Insgesamt zeigt der Stammbaum dass in dieser Arbeit viele neue Arten entdeckt wurden.

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 20: Phylogenetischer Stammbaum der *napA*-Sequenzen.**

Es handelt sich um einen Neighbor-Joining-Baum (Bootstrap-Konsensusbaum) basierend auf den translatierten Referenzsequenzen der OTUs auf Speziesebene sowie den Proteinsequenzen der nächstverwandten Organismen. Die Zahlen an den Verzweigungen geben den Prozentsatz der Übereinstimmungen aller Bäume an. Die Dreiecke geben die Herkunft der Sequenzen, aber nicht die Größe der OTUs an. Die Zahlen hinter den Dreiecken geben die Nummer der OTU an (s. Tabelle 36). Der Balken zeigt einen Sequenzunterschied von 2 % an.

### Statistische Analyse

Um den Einfluss der Bodeneigenschaften auf die *napA*-Bakteriengemeinschaften zu untersuchen, wurden multivariate Gradientenanalysen durchgeführt. Da die Testabdeckung des

Bodens SEG 2 unter 90 % lag (s. Tabelle 35), konnten die Daten dieses Bodens nicht in die vergleichende Analyse einbezogen werden.

Die DCA ergab Eigenwerte von 0,46 und 0,14 für die 1. und 2. Achse (s. Tabelle 37). Diese hohen Werte zeigen, dass die Speziesdaten gut entlang dieser beiden Achsen aufgetrennt wurden. Besonders die 1. Achse ist sehr wichtig für die Variation in den Bakteriengemeinschaften. Etwa 35 % dieser Variation werden von den beiden Achsen erklärt. Der Gradient lag zwischen 3,4 und 1,75 SD-Einheiten. Dieser relativ große Gradient verweist auf einen vergleichsweise heterogenen Datensatz.

**Tabelle 37: Variation und Varianz der Spezieszusammensetzung der *napA*-Gensequenzen aus den Böden.**

	Achse 1	Achse 2	Achse 3	Achse 4
Eigenwerte	0,458	0,137	0,036	0,009
Länge des Gradienten	3,403	1,749	1,434	1,122
Varianzanteil der Speziesdaten [%]	27	35	37,1	37,7

**Tabelle 38: Korrelation der *napA*-Bakteriengemeinschaften und der Bodeneigenschaften.**

Bodeneigenschaften	Eigenwert 1. kanonische Achse	F-Wert	p-Wert
Vegetationstyp	0,357	2,398	0,002
Landnutzungsintensität	0,129	0,741	0,792
pH-Wert	0,419	2,946	0,002
Stickstoffgehalt	0,132	0,76	0,67
Kohlenstoffgehalt	0,12	0,684	0,67
Nitratgehalt	0,192	1,149	0,262
Ammoniumgehalt	0,283	1,802	0,026
Wassergehalt	0,214	1,298	0,166

### 3. Ergebnisse

Anschließende kanonische Gradientenanalysen mit Permutationstests ergaben für die 1. Achse Eigenwerte zwischen 0,42 und 0,12 (s. Tabelle 38). Die höchsten Eigenwerte hatten die CCAs mit den erklärenden Variablen pH Wert (0,42) und Vegetationstyp (0,36). Der signifikante Einfluss dieser beiden Bodenparameter konnte durch Monte-Carlo-Tests bestätigt werden. Auch für den Ammoniumgehalt konnte ein signifikanter Einfluss auf die Verteilung der Bakteriengemeinschaften ermittelt werden.

**Tabelle 39: Korrelation der *napA*-Bakteriengemeinschaften mit den Umweltvariablen Vegetationstyp, pH-Wert und Ammoniumgehalt.**

	Achse 1	Achse 2	Achse 3	Achse 4
Eigenwerte	0,435	0,270	0,111	0,281
Varianzanteil der Speziesdaten [%]	25,6	41,5	48,1	64,6
Varianzanteil des Verhältnisses Spezies-Umwelt [%]	53,3	86,4	100	0

Eine CCA mit Vegetationstyp, pH-Wert und Ammoniumgehalt als erklärenden Variablen wurde durchgeführt. Die Eigenwerte für die ersten beiden kanonischen Achsen waren 0,435 und 0,27 (s. Tabelle 39). Beide Achsen sind also sehr wichtig für die Variation der Bakteriengemeinschaften. Sie erklären zusammen etwa 42 % der Varianz in den Speziesdaten. Der hohe Eigenwert der Residualachse zeigt an, dass ein die Variation in den *napA*-Speziesdaten nicht allein durch die variablen pH-Wert, Vegetationstyp und Ammoniumgehalt erklärt werden kann. Eine wichtige erklärende Variable wurde in der Analyse nicht berücksichtigt.

Dem Biplot-Diagramm der CCA lässt sich entnehmen, dass der Einfluss aller drei Parameter auf die Bakteriengemeinschaften in etwa gleich groß ist (s. Abbildung 21). Vegetationstyp und pH-Wert stehen in enger Beziehung zur 1. Achse und sind deutlich miteinander korreliert, wie aus dem spitzen Winkel zwischen den beiden Vektoren ersehen werden kann. Die erste Achse erklärt etwa 53 % der Varianz des Verhältnisses Spezies-Umwelt. Die zweite Achse korreliert mit der Variable Ammoniumgehalt. Beide Achsen

zusammen erklären etwa 86 % der Varianz des Verhältnisses Spezies-Umwelt.

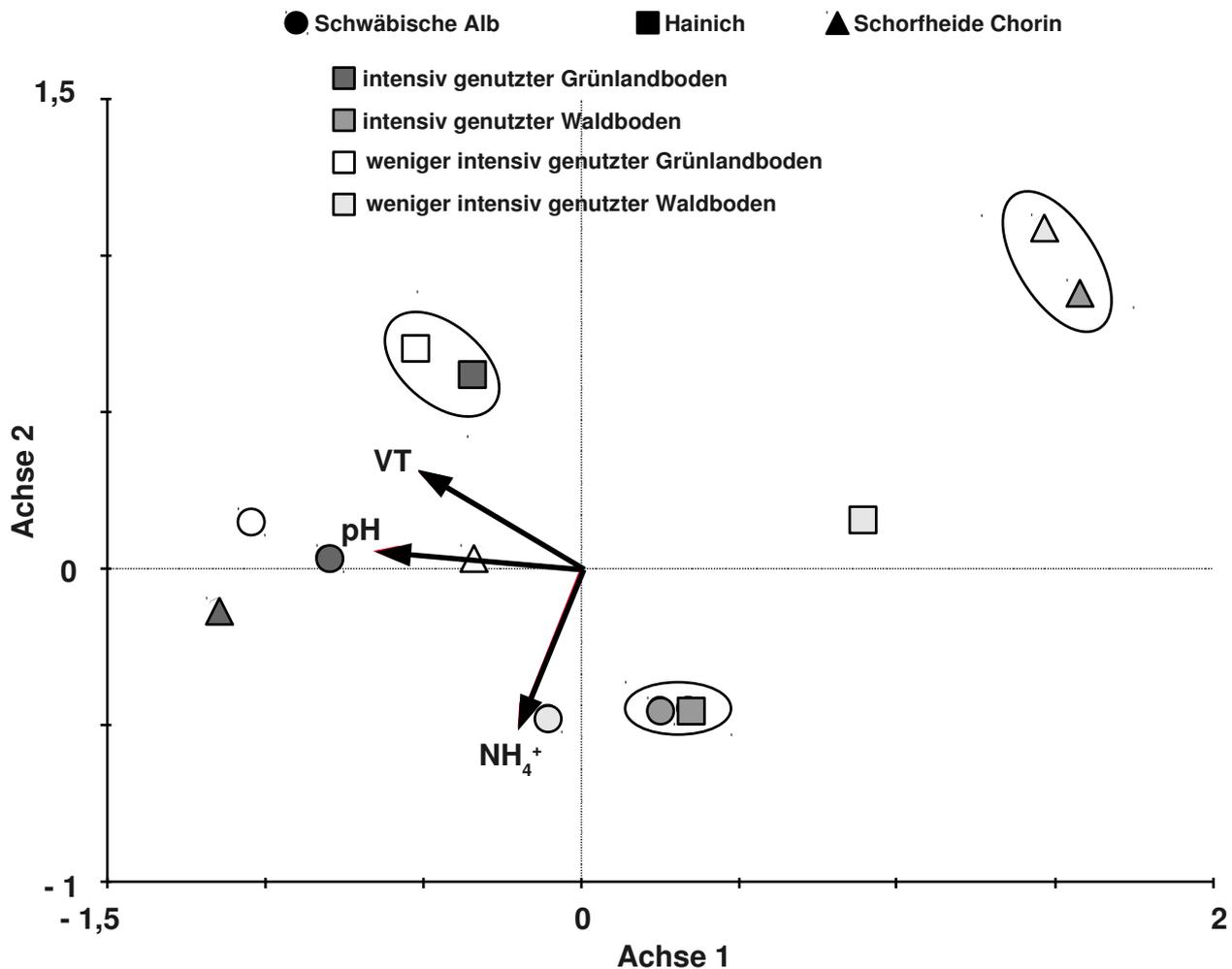


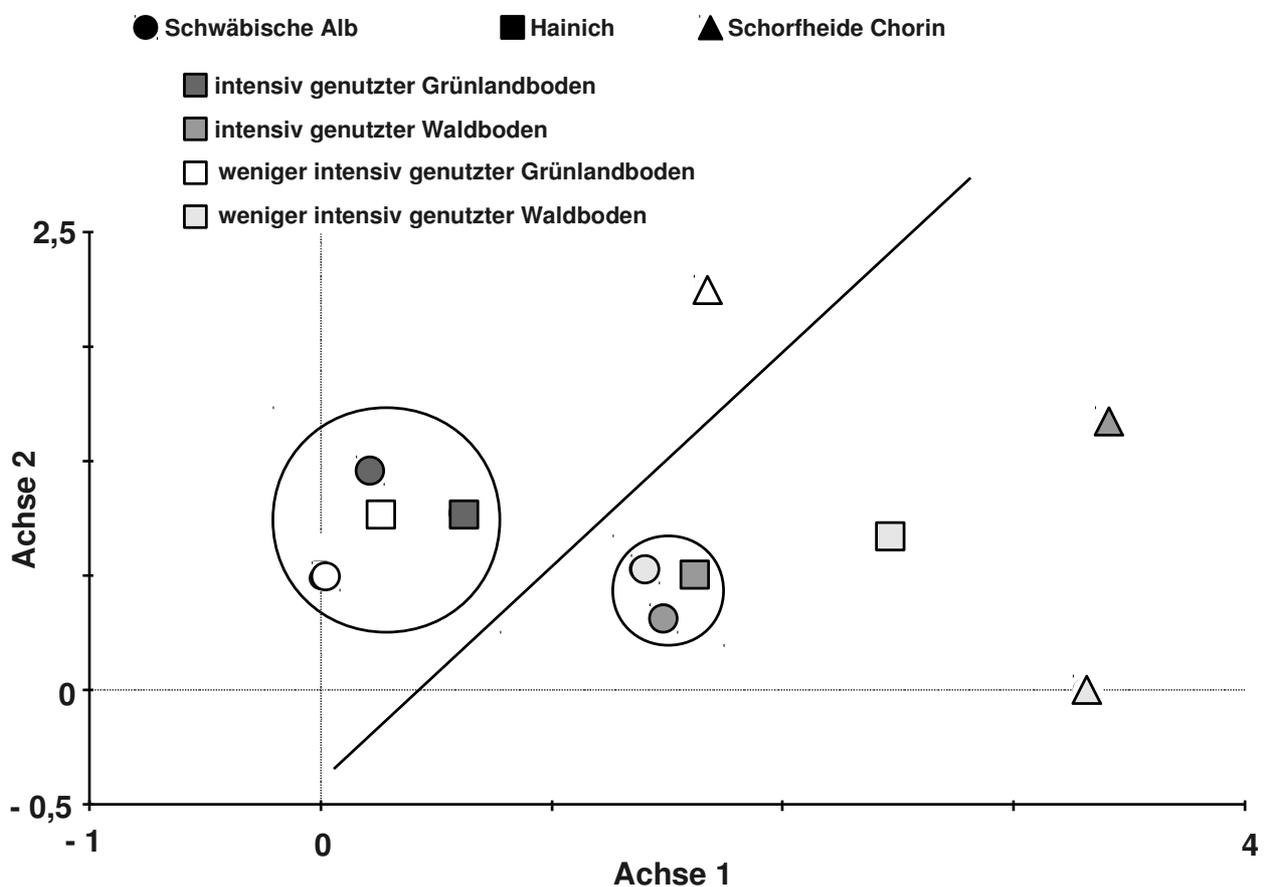
Abbildung 21: CCA der *napA*-Speziesdaten mit Vegetationstyp (VT), pH-Wert und Ammoniumgehalt als erklärenden Variablen.

- AEG 2   ○ AEG 7   ● AEW 5   ○ AEW 8
- HEG 6   □ HEG 9   ■ HEW 5   □ HEW 12
- ▲ SEG 2   △ SEG 6   ▲ SEW 5   △ SEW 9

Im Streudiagramm der DCA sind die Grünlandböden deutlich von den Waldböden getrennt abgebildet (s. Abbildung 22). Dies gibt den großen Einfluss des Vegetationstyps auf die Zusammensetzung der *napA*-Bakteriengemeinschaften wieder. Die Grünlandböden der Exploratorien Schwäbische Alb und Hainich sind im Diagramm nah beieinander dargestellt und haben daher ähnliche Gemeinschaften von *napA*-beinhaltenden Bakterien. Dies gilt

### 3. Ergebnisse

auch für die Waldböden des Exploratorium Schwäbische Alb und den intensiv genutzten Waldboden des Exploratorium Hainich (HEW 5). Der weniger intensiv genutzte Waldboden des Exploratorium Hainich (HEW 12) und die Böden des Exploratorium Schorfheide Chorin stehen einzeln im Diagramm und zeigen daher keine große Ähnlichkeit ihrer *napA*-Bakteriengemeinschaften mit denen aller anderen Böden. Der Boden AEG 7 ist von den Böden SEW 5 und SEW 9 beinahe 4 SD-Einheiten entfernt dargestellt. Das bedeutet, dass er mit diesen Waldböden nur wenige *napA*-besitzende Spezies gemeinsam hat.



**Abbildung 22: DCA der *napA*-Speziesdaten.**

Böden mit ähnlichen *napA*-Gemeinschaften sind eingekreist. Die Linie zeigt die Trennung von Grünland- und Waldböden an.

- AEG 2    ○ AEG 7    ● AEW 5    ○ AEW 8
- HEG 6    □ HEG 9    ■ HEW 5    □ HEW 12
- ▲ SEG 2    △ SEG 6    ▲ SEW 5    △ SEW 9

Die Bodenparameter Vegetationstyp, pH-Wert und Ammoniumgehalt wurden als wichtige Faktoren identifiziert, die die Verteilung der *napA*-Bakteriengemeinschaften beeinflussen. In Bezug auf die *napA*-Bakteriengemeinschaften ähneln sich jeweils die Böden AEG 2, AEG 7, HEG 6 und HEG 9 sowie AEW 5, AEW 8 und HEW 5 stark. Der Boden AEG 7 dagegen unterscheidet sich stark von den Böden SEW 5 und SEW 9.

### 3.5.4 Analyse von *nrfA*-Genen

#### Phylogenetische Analyse

Die Untersuchung der *nrfA*-Bakteriengemeinschaften erfolgte mittels Pyrosequenzierung der *nrfA*-Gene. Dabei wurden jedoch nur Sequenzen aus 10 Böden erhalten, da aus den Böden AEW 5 und SEW 5 keine *nrfA*-Gene amplifiziert werden konnten.

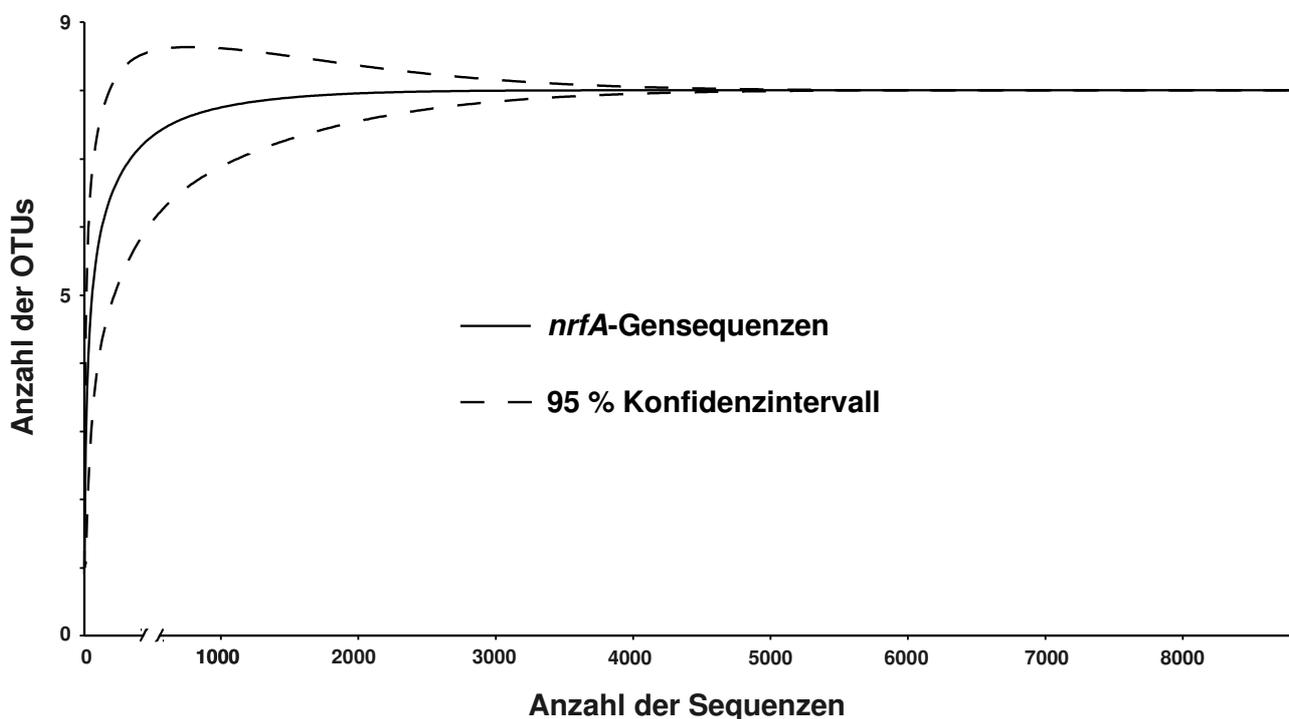


Abbildung 23: Rarefaction-Kurve (durchgehende Linie) und 95 % Konfidenzbereiche (gestrichelte Linie) der OTUs der *nrfA*-Gensequenzen bei 17 % genetischer Distanz.

Die Sequenzierung ergab 9361 Sequenzen, die in 528 OTUs auf Speziesebene einsortiert

### 3. Ergebnisse

wurden. Von diesen enthielten 520 OTUs weniger als zehn Sequenzen und wurden bei den weiteren Analysen nicht berücksichtigt. So verblieben 8785 Sequenzen in 8 OTUs. Damit ist die Diversität der *nrfA*-Bakteriengemeinschaften voll erfasst, wie man aus der Rarefaction-Kurve ablesen kann (s. Abbildung 23) und wie auch die konservative Schätzung der Artenzahl mit 8 (Chao1) bestätigt.

**Tabelle 40: Diversitätsindices der Böden basierend auf *nrfA*-Gensequenzen.**

Boden	Anzahl der Sequenzen	Anzahl der OTUs	Chao 1	Shannon-Index (H')	Äquität (J)	Testabdeckung (C)
AEG 2 <sup>a</sup>	58	3	3	0,379	0,487	98,29
AEG 7 <sup>b</sup>	858	3	3	0,285	0,443	100
AEW 8	47	4	4	1,301	0,978	100
HEG 6	1800	6	6	0,948	0,430	100
HEG 9	1397	5	5	0,651	0,384	100
HEW 5	4437	5	4	0,594	0,453	100
HEW 12	135	3	3	0,421	0,508	99,23
SEG 2	17	2	2	0,691	0,998	100
SEG 6	33	5	5	1,401	0,812	96,97
SEW 9	3	1	1	0	1	100
gesamt	8785	8	8	0,854	0,294	100

<sup>a</sup>Grau: Böden unter intensiver Landnutzung

<sup>b</sup>Weiß: Böden unter weniger intensiver Landnutzung

Die Verteilung der Sequenzen auf die Böden war sehr ungleich (s. Tabelle 40). Die Testabdeckung in allen Böden war dennoch > 96 %, was eine vergleichende Analyse der Böden trotz stark unterschiedlicher Sequenzzahlen erlaubt. Aus den Böden des Exploratoriums Schorfheide Chorin stammten nur wenige Sequenzen: 3 aus SEW 9, 17 aus SEG 2 und 33 aus SEG 6. Die Böden HEG 6, HEG 9 und HEW 5 enthielten die meisten Sequenzen und die meisten OTUs. Die wenigsten OTUs fanden sich in den Böden mit den wenigsten Sequenzen (zwei in SEG 2 und eine in SEW 9). Da alle drei Sequenzen zu einer OTU gehören, hatte der Boden SEW 9 einen Shannon-Index von Null, während die Äquität bei 1 lag. Den höchste Shannon-Index hatten die Böden AEW 8,

HEG 6 und SEG 6, die geringste der Boden HEG 9. Zusammengenommen war die Diversität der *nrfA*-Bakteriengemeinschaften mit einer Äquität von 0,294 nicht sehr hoch.

**Tabelle 41: Ähnlichkeit der translatierten Referenzsequenzen der OTUs auf Speziesebene zu translatierten *nrfA*-Gensequenzen kultivierter Organismen.**

Der Ähnlichkeits-Grenzwert für die Zuordnung zu Spezies beträgt 90 %.

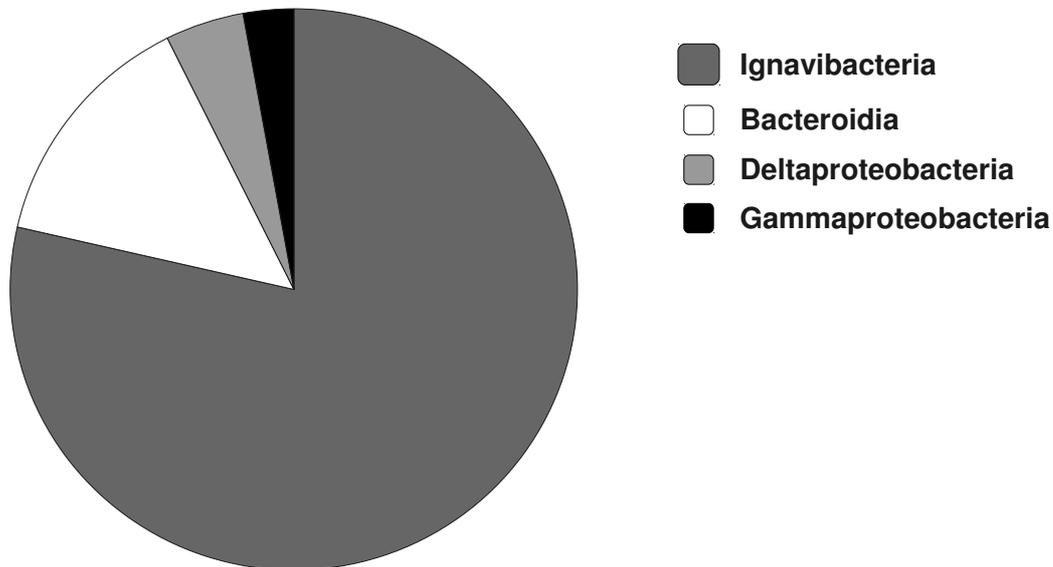
OTU	# Seq.	Spezies (Accession Number)	Ähnlichkeit <sup>a</sup>	Familie	Klasse/Phylum
1	6689	<i>Ignavibacterium album</i> (YP_005845841.1)	71 %	Ignavibacteriaceae	Ignavibacteria Chlorobi
2	1190	<i>Bacteroides fragilis</i> (EXY81832.1)	65 %	Bacteroidiaceae	Bacteroidia Bacteroidetes
3	394	<i>Desulfuromonas acetoxidans</i> (WP_006001382.1)	80 %	Desulfuromonadaceae	Deltaproteobacteria Proteobacteria
4	252	<i>Aeromonas hydrophila</i> (WP_017785463.1)	92 %	Aeromonadaceae	Gammaproteobacteria Proteobacteria
5	160	<i>Ignavibacterium album</i> (YP_005845841.1)	65 %	Ignavibacteriaceae	Ignavibacteria Chlorobi
6	53	<i>Ignavibacterium album</i> (YP_005845841.1)	82 %	Ignavibacteriaceae	Ignavibacteria Chlorobi
7	35	<i>Bacteroides nordii</i> (WP_007483563.1)	58 %	Bacteroidaceae	Bacteroidia Bacteroidetes
8	12	<i>Bacteroides nordii</i> (WP_007483563.1)	67 %	Bacteroidaceae	Bacteroidia Bacteroidetes

<sup>a</sup>Ähnlichkeit der Referenzsequenz zur *nrfA*-Gen-Sequenz der nächstverwandten kultivierten Spezies.

Die größte OTU umfasst über 76 % der Sequenzen, die zweitgrößte etwa 13 % und alle anderen OTUs zusammengenommen etwa 10 % (s. Tabelle 41). Der nächstverwandte kultivierte Organismus der OTUs 1, 5 und 6 ist *Ignavibacterium album*. Mit einer NrfA-Ähnlichkeit < 75 % gehören die OTUs 1 und 5 jedoch zu einer neuen Gattung der Familie Ignavibacteriaceae. Die OTU 6 repräsentiert eine Spezies der Gattung *Ignavibacteria*. Die Sequenzen aus OTU 2 hatten eine Ähnlichkeit von 65 % zu der NrfA-Sequenz von *Desulfuromonas acetoxidans* und von 62 % zur Sequenz des nächsten unkultivierten verwandten Organismus. Damit gehören sie zu einer neuartigen Gattung der Familie Desulfuromonadaceae. Die OTUs 2, 7 und 8 repräsentieren neue Gattungen der Familie Bacteroidaceae. Als einzige OTU konnte OTU 4 einer Spezies zugeordnet werden: sie repräsentiert *Aeromonas hydrophila* und gehört damit zu den Gammaproteobacteria.

### 3. Ergebnisse

Sieben von acht OTUs repräsentieren neuartige Gattungen, da sie nur geringe Verwandtschaft zu bisher bekannten, sowohl kultivierten als auch unkultivierten, Bakterien aufweisen.

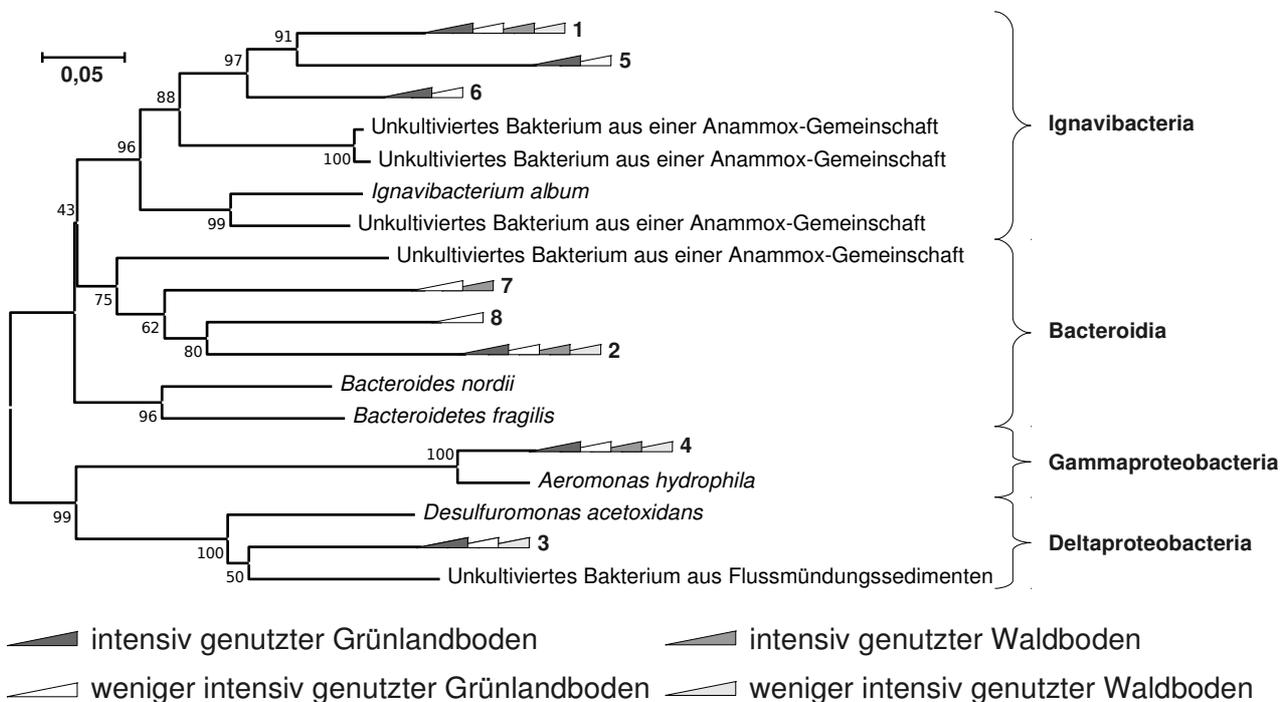


**Abbildung 24: Übersicht über die Zugehörigkeit der *nrfA*-besitzenden Bakterien zu taxonomischen Klassen (in Prozent).**

Die meisten Sequenzen (fast 80 %) stammen also von Ignavibacteria oder (mit etwa 14 % an zweiter Stelle) Bacteroidia (s. Abbildung 24). Nur etwa 6 % der Sequenzen stammen von Proteobacteria, darunter etwa 4 % von Deltaproteobacteria und etwa 2 % von Gammaproteobacteria. Auffallenderweise wurden nur wenige zu den Proteobacteria gehörenden *nrfA*-Sequenzen nachgewiesen, sondern hauptsächlich zur neuen Klasse Ignavibacteria gehörende Bakterien.

Der große Grad an Neuartigkeit der *nrfA*-Sequenzen ist im phylogenetischen Stammbaum deutlich zu erkennen (s. Abbildung 25). Die zu den Ignavibacteria gehörenden OTUs bildeten eine eigene, von den bisher bekannten Ignavibacteria auffallend getrennte Gruppe. Auch die OTUs 2, 7 und 8 bildeten eine Gruppe, die klar von den bisher bekannten Bacteroida abgetrennt ist. Die zu den Proteobacteria zählenden OTUs

hingegen sind nicht so weit von den nächstverwandten Bakterien abgesetzt. Die Zuordnung der OTUs zu Taxa durch Datenbankabgleich wird durch den Stammbaum voll und ganz bestätigt.



**Abbildung 25: Phylogenetischer Stammbaum der *nrfA*-Sequenzen.**

Es handelt sich um einen Neighbor-Joining-Baum (Bootstrap-Konsensusbaum) basierend auf den translatierten Referenzsequenzen der OTUs auf Speziesebene sowie den Proteinsequenzen der nächstverwandten Organismen. Die Zahlen an den Verzweigungen geben den Prozentsatz der Übereinstimmungen aller Bäume an. Die Dreiecke geben die Herkunft der Sequenzen, aber nicht die Größe der OTUs an. Die Zahlen hinter den Dreiecken geben die Nummer der OTU an (s. Tabelle 41). Der Balken zeigt einen Sequenzunterschied von 5 % an.

## Statistische Analyse

Durch multivariate Gradientenanalyse wurde der Einfluss der Bodenparameter auf die *nrfA*-Bakteriengemeinschaften untersucht. Die zuerst durchgeführte DCA ergab Eigenwerte von 0,44 und 0,16 für die 1. und 2. Achse (s. Tabelle 42). Die Eigenwerte der 3. und 4. Achse lagen unter 0,05. Der ersten Achse kommt also große, der 2. weniger große Bedeutung zu. Die letzten beiden Achsen sind nicht relevant für die Variation in den *nrfA*-Bakteriengemeinschaften. Die ersten beiden Achsen erklären zusammen 60 % der

### 3. Ergebnisse

Varianz der Speziesdaten. Die Länge des Gradient lag zwischen 1,47 und 2,28 SD-Einheiten und weist somit auf einen ziemlich homogenen Datensatz hin.

**Tabelle 42: Variation und Varianz der Spezieszusammensetzung der *nrfA*-Gensequenzen aus den Böden.**

	Achse 1	Achse 2	Achse 3	Achse 4
Eigenwerte	0,435	0,162	0,04	0,026
Länge des Gradienten	2,276	1,471	1,683	1,483
Varianzanteil der Speziesdaten [%]	43,8	60	64,1	66,7

Durch kanonische Gradientenanalysen und Permutationstests wurden Eigenwerte zwischen 0,36 und 0,05 erhalten (s. Tabelle 43). Hier wurden die Speziesdaten besser aufgetrennt als durch die DCA. Die Eigenschaften pH-Wert (0,36) und Vegetationstyp (0,32) hatten die höchsten Eigenwerte für die 1. Achse. Für diese Eigenschaften wurde auch ein signifikanter Einfluss auf die Bakteriengemeinschaften ermittelt. Auch der Kohlenstoffgehalt hatte einen signifikanten Einfluss auf die *nrfA*-Bakteriengemeinschaften.

**Tabelle 43: Korrelation der *nrfA*-Bakteriengemeinschaften und der Bodeneigenschaften.**

Bodeneigenschaften	Eigenwert 1. kanonische Achse	F-Wert	p-Wert
Vegetationstyp	0,323	3,857	0,0047
Landnutzungsintensität	0,046	0,389	0,9333
pH-Wert	0,363	4,609	0,0004
Stickstoffgehalt	0,237	2,504	0,0799
Kohlenstoffgehalt	0,271	3,003	0,0432
Nitratgehalt	0,083	0,725	0,6227
Ammoniumgehalt	0,146	1,379	0,1995
Wassergehalt	0,194	1,936	0,0913

Eine CCA mit Vegetationstyp, pH-Wert und Kohlenstoffgehalt als erklärenden Variablen ergab vier kanonische Achsen mit den Eigenwerten 0,42, 0,24, 0,04 und 0,11 (s. Tabelle 44). Auch hier zeigt der geringe Eigenwert der 3. Achse an, dass diese nicht wichtig für die Variation in den Speziesgemeinschaften ist. Die ersten beiden Achsen erklären

zusammen etwa 95 % der Varianz in den Artdaten.

**Tabelle 44: Korrelation der *nrfA*-Bakteriengemeinschaften mit den Umweltvariablen Vegetationstyp, pH-Wert und Kohlenstoffgehalt.**

	Achse 1	Achse 2	Achse 3	Achse 4
Eigenwerte	0,418	0,244	0,036	0,107
Varianzanteil der Speziesdaten [%]	42,1	66,6	70,2	81
Varianzanteil des Verhältnisses Spezies-Umwelt [%]	59,9	94,9	100	0

Das Biplot-Diagramm der CCA zeigt, dass die zwei erklärenden Variablen Vegetationstyp und pH-Wert sehr stark mit der 1. Achse in Beziehung stehen und miteinander korreliert sind (s. Abbildung 26). Der Kohlenstoffgehalt jedoch steht deutlich im Zusammenhang mit der 2. Achse. Den größten Einfluss auf die *nrfA*-besitzenden Spezies in den Böden haben der pH-Wert und der Vegetationstyp. Der Vergleich mit dem Streudiagramm der DCA (Abbildung bla) ergab deutliche Unterschiede im Muster der Böden in den Diagrammen. Eine wichtige Umweltvariable wurde also in der CCA-Analyse nicht berücksichtigt. Darauf weist auch der hohe Eigenwert der Residualachse hin. Die Ähnlichkeit der Böden lässt sich daher am besten aus dem DCA-Diagramm ersehen (s. Abbildung 27).

Die beiden Waldböden des Exploratoriums Hainich (HEW 5 und HEW 12) ähneln sich in ihren *nrfA*-Bakteriengemeinschaften. Auch die Grünlandböden des Exploratoriums Hainich (HEG 6 und HEG 9) beinhalten ähnliche Gemeinschaften von *nrfA*-besitzenden Spezies. Dies gilt auch für einen intensiv genutzten (SEG 2) und einen weniger intensiv genutzten Grünlandboden (AEG 7), sowie für beide intensiv genutzten Böden des Exploratoriums Schwäbische Alb (AEG 2 und AEW 5).

Die *nrfA*-Bakteriengemeinschaften der übrigen Böden weisen keine großen Ähnlichkeiten zu anderen Böden auf. Besonders der Boden SEG 6, ein weniger intensiv genutzter Grünlandboden, unterscheidet sich sehr stark von allen anderen Böden. Der Boden SEW 9 ist im Streudiagramm der DCA von den Grünlandböden AEG 7 und HEG 6 mehr

### 3. Ergebnisse

als 2 SD-Einheiten entfernt dargestellt. Mit diesen Böden hat er also nur etwa 50 % der *nrfA*-besitzenden Spezies gemeinsam.

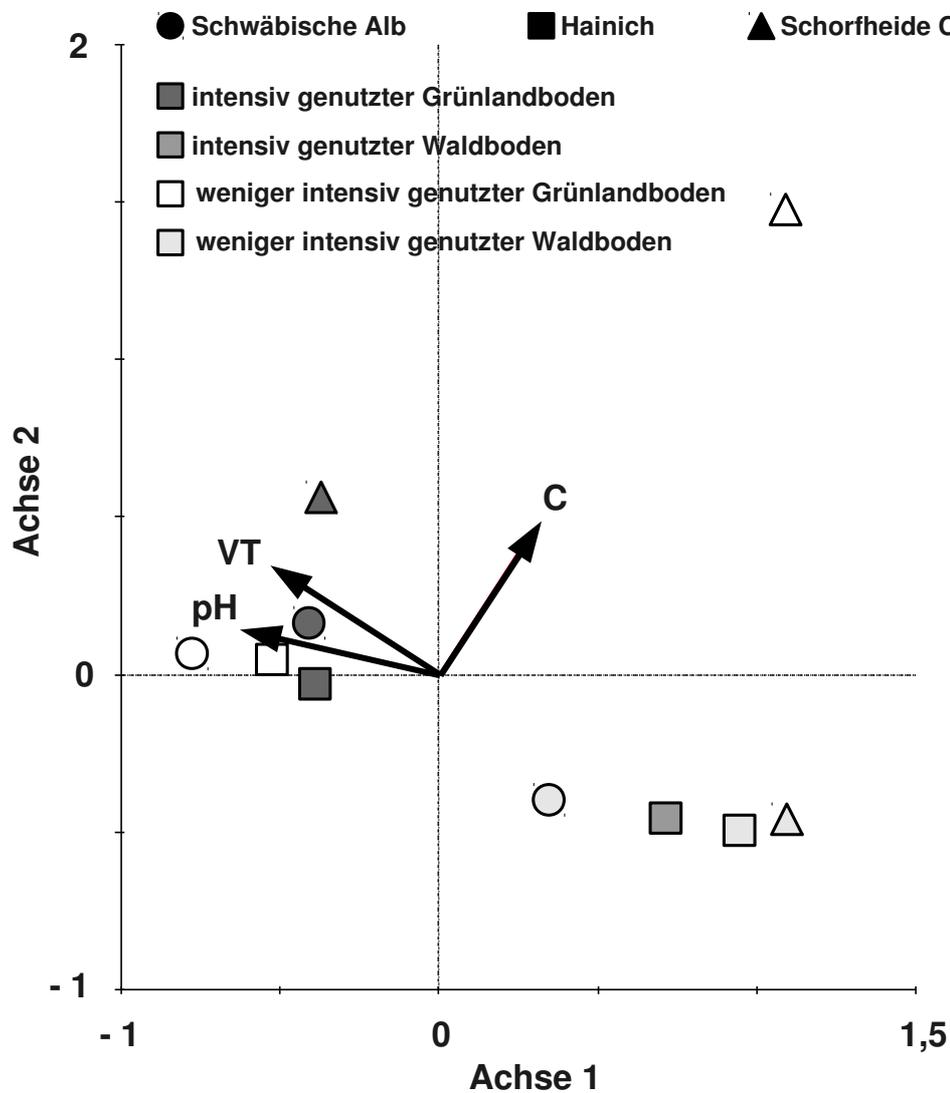
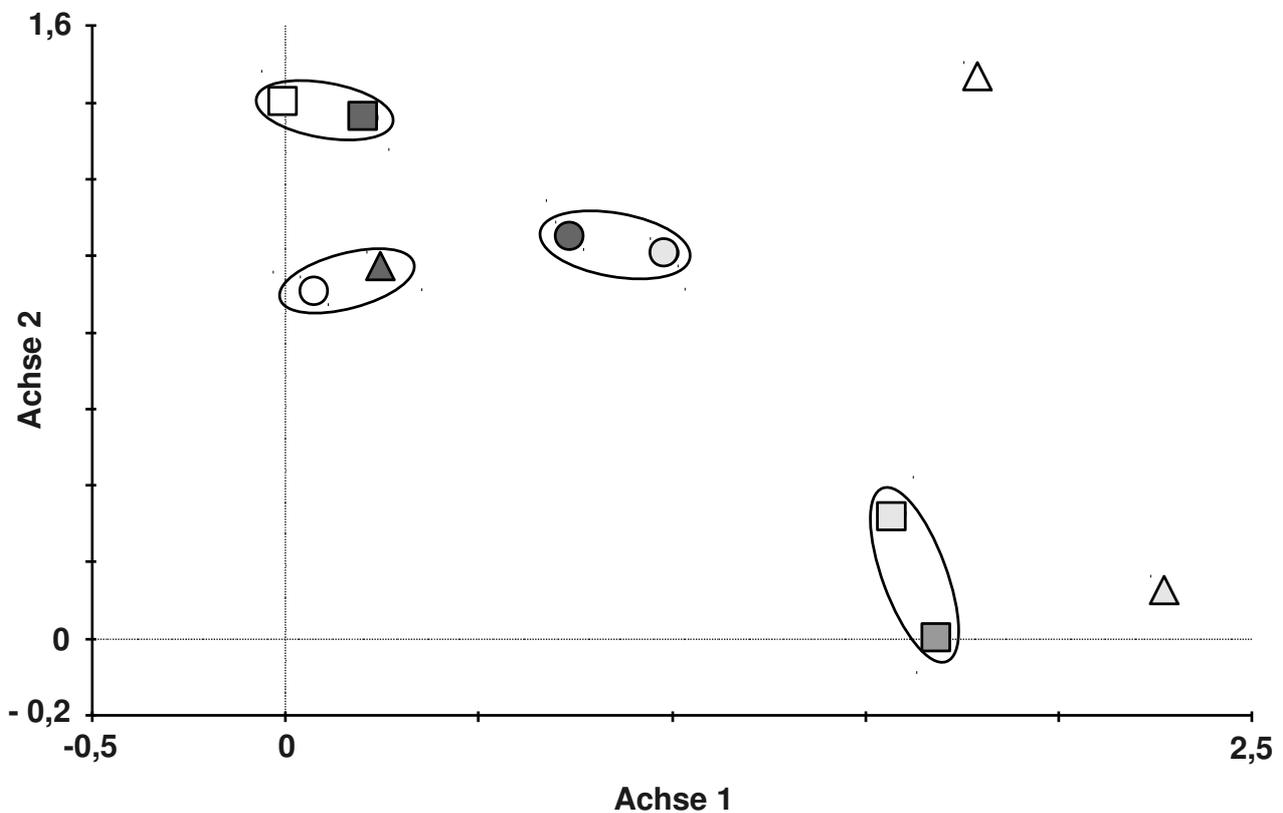


Abbildung 26: CCA der *nrfA*-Speziesdaten mit Vegetationstyp (VT), pH-Wert und Kohlenstoffgehalt als erklärenden Variablen.

- AEG 2   ○ AEG 7   ● AEW 5   ○ AEW 8
- HEG 6   □ HEG 9   ■ HEW 5   □ HEW 12
- ▲ SEG 2   △ SEG 6   ▲ SEW 5   △ SEW 9

Durch multivariate Gradientenanalysen wurden die Bodenparameter pH-Wert, Vegetationstyp und Kohlenstoffgehalt als die wichtigsten Faktoren identifiziert, die die Verteilung der *nrfA*-Bakteriengemeinschaften beeinflussen. Die Böden HEW 5 und HEW

12, HEG 6 und HEG 9, AEG 2 und AEW 8 sowie AEG 7 und SEG 2 beinhalten jeweils sehr ähnliche Bakteriengemeinschaften von *nrfA*-besitzenden Bakterien. Die Böden SEG 6 und SEW 9 unterscheiden sich diesbezüglich stark von allen anderen Böden.



**Abbildung 27: DCA der *nrfA*-Speziesdaten.**

Böden mit ähnlichen *nrfA*-Gemeinschaften sind eingekreist.

- AEG 2   ○ AEG 7   ● AEW 5   ○ AEW 8
- HEG 6   □ HEG 9   ■ HEW 5   □ HEW 12
- ▲ SEG 2   △ SEG 6   ▲ SEW 5   △ SEW 9

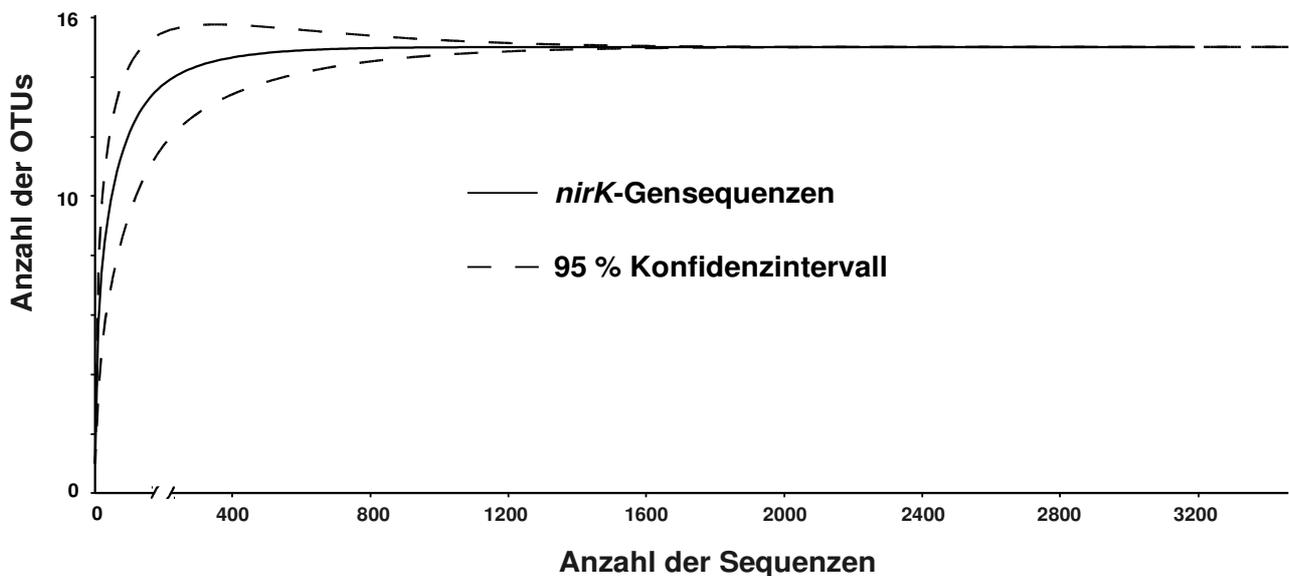
### 3.5.5 Analyse von *nirK*-Genen

#### Phylogenetische Analyse

Zur Untersuchung der *nirK*-Bakteriengemeinschaften wurde eine Pyrosequenzierung der *nirK*-Gene der Bodenbakterien durchgeführt. Dabei wurden 3599 Sequenzen aus fünf Böden erhalten, die in 50 OTUs auf Speziesebene einsortiert wurden. Von diesen

### 3. Ergebnisse

enthielten 35 jeweils weniger als zehn Sequenzen und wurden bei den nachfolgenden Analysen nicht berücksichtigt. Somit wurden also 3510 Sequenzen in 15 OTUs analysiert. Die Rarefaction-Kurve zeigt, dass damit die Diversität der *nirK*-Bakteriengemeinschaften vollständig erfasst wurde (s. Abbildung 28). Dies wird auch durch die Schätzung der Artenzahl (Chao1 = 15) bestätigt.



**Abbildung 28: Rarefaction-Kurve (durchgehende Linie) und 95 % Konfidenzbereiche (gestrichelte Linie) der OTUs der *nirK*-Gensequenzen bei 17 % genetischer Distanz.**

**Tabelle 45: Diversitätsindices der Böden basierend auf den *nirK*-Gensequenzen.**

Boden	Anzahl der Sequenzen	Anzahl der OTUs	Chao 1	Shannon-Index (H')	Äquität (J)	Testabdeckung (C)
AEG 2 <sup>a</sup>	396	5	5	1,349	0,771	100
AEG 7 <sup>b</sup>	591	9	9	1,981	0,806	100
AEW 5	1667	11	11	1,729	0,512	99,94
HEG 6	518	9	9,5	1,493	0,494	99,81
HEG 9	338	9	9	1,434	0,466	100
gesamt	3510	15	15	2,036	0,511	100

<sup>a</sup>Grau: Böden unter intensiver Landnutzung

<sup>b</sup>Weiß: Böden unter weniger intensiver Landnutzung

Die meisten Sequenzen (1667) stammten aus dem Boden AEW 5, der auch die meisten

OTUs (11) enthielt (s. Tabelle 45). Die übrigen Böden enthielten zwischen 338 und 591 Sequenzen.

**Tabelle 46: Ähnlichkeit der translatierten Referenzsequenzen der OTUs auf Speziesebene zu translatierten *nirK*-Gensequenzen kultivierter Organismen.**

Der Ähnlichkeits-Grenzwert für die Zuordnung zu Spezies beträgt 91 %.

OTU	# Seq.	Spezies (Accession Number)	Ähnlichkeit <sup>a</sup>	Familie	Klasse/Phylum
1	1128	<i>Bradyrhizobium denitrificans</i> (CAA12209.1)	85 %	Bradyrhizobiaceae	Alphaproteobacteria Proteobacteria
2	512	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> (YP_001993589.1)	86 %	Bradyrhizobiaceae	Alphaproteobacteria Proteobacteria
3	498	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> (YP_001993589.1)	82 %	Bradyrhizobiaceae	Alphaproteobacteria Proteobacteria
4	468	<i>Bradyrhizobium denitrificans</i> (CAA12209.1)	85 %	Rhizobiaceae	Alphaproteobacteria Proteobacteria
5	331	<i>Mesorhizobium ciceri</i> (YP_004134222.1)	86 %	Phyllobacteriaceae	Alphaproteobacteria Proteobacteria
6	199	<i>Chelatococcus daeguensis</i> (AFS34847.1)	82 %	Beijerinckiaceae	Alphaproteobacteria Proteobacteria
7	76	<i>Chelatococcus daeguensis</i> (AFS34847.1)	68 %	Beijerinckiaceae	Alphaproteobacteria Proteobacteria
8	61	<i>Mesorhizobium amorphae</i> (WP_006206745.1)	77 %	Phyllobacteriaceae	Alphaproteobacteria Proteobacteria
9	52	<i>Nitratireductor aquibiodomus</i> (WP_007010017.1)	89 %	Phyllobacteriaceae	Alphaproteobacteria Proteobacteria
10	47	<i>Ensifer adhaerens</i> (AHK46757.1)	99 %	Rhizobiaceae	Alphaproteobacteria Proteobacteria
11	47	<i>Rhizobium giardinii</i> (WP_018327459.1)	97 %	Rhizobiaceae	Alphaproteobacteria Proteobacteria
12	39	<i>Bradyrhizobium denitrificans</i> (CAA12209.1)	82 %	Bradyrhizobiaceae	Alphaproteobacteria Proteobacteria
13	23	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (AHY54213.1)	73 %	Bradyrhizobiaceae	Alphaproteobacteria Proteobacteria
14	16	<i>Mesorhizobium amorphae</i> (WP_006206745.1)	90 %	Phyllobacteriaceae	Alphaproteobacteria Proteobacteria
15	13	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (AHY54213.1)	79 %	Bradyrhizobiaceae	Alphaproteobacteria Proteobacteria

<sup>a</sup>Ähnlichkeit der Referenzsequenz zur *nirK*-Gen-Sequenz der nächstverwandten kultivierten Spezies.

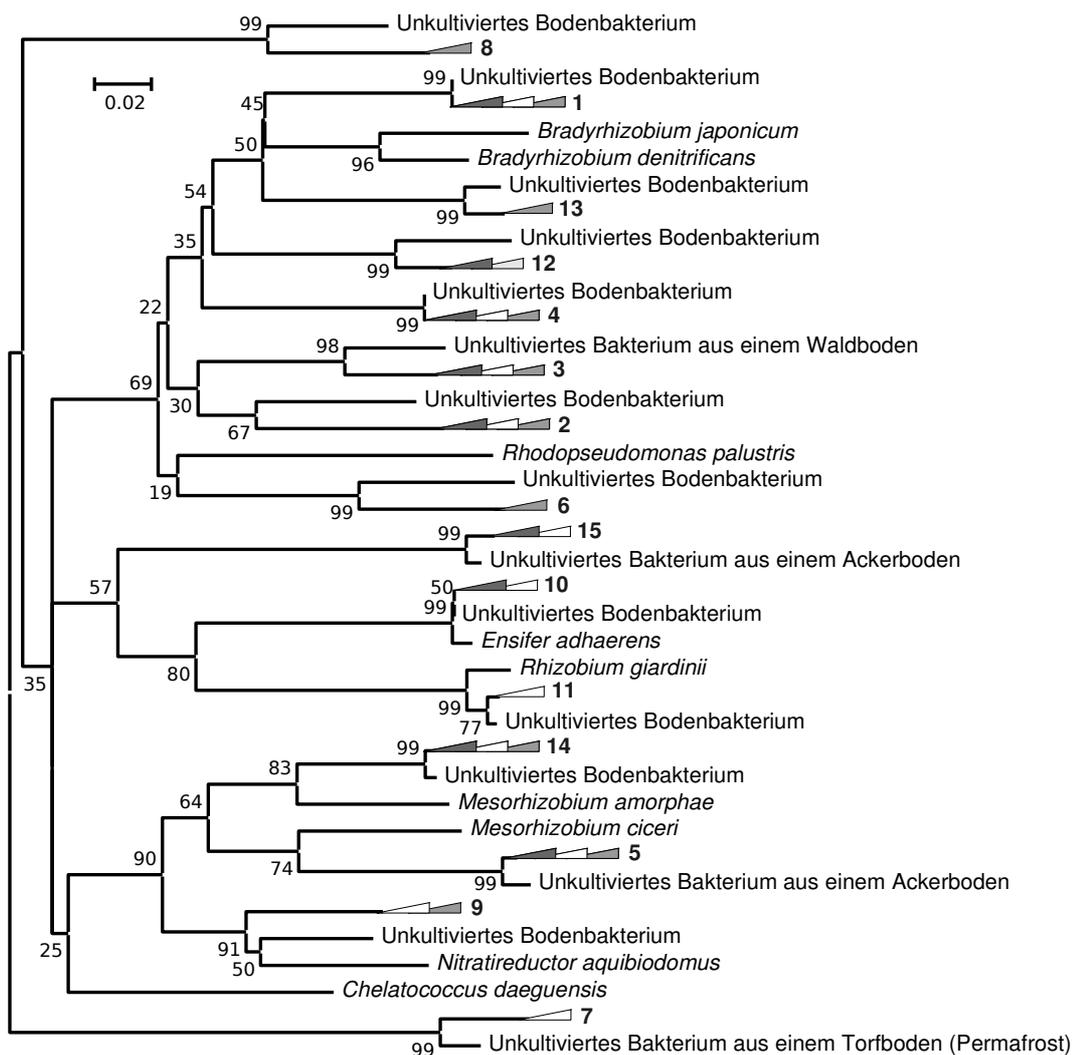
Der Boden AEG 2 hatte mit 5 die wenigsten OTUs, während die übrigen Böden jeweils 9 OTUs aufwiesen. Diese durchgängig recht hohe Anzahl an OTUs bei vergleichsweise

### 3. Ergebnisse

geringen Sequenzzahlen deutet auf eine große Diversität hin. Dies bestätigt sich in recht hohen Shannon-Indices (1,35 bis 1,98) aller Böden. Die Äquität jedoch zeigt, dass die Diversität in den Grünlandböden des Exploratoriums Schwäbische Alb am höchsten und in den Grünlandböden des Exploratoriums Hainich am niedrigsten ist. Für alle Böden zusammengenommen war der Shannon-Index 2,036. Dies deutet- ebenso wie die vergleichsweise hohe Äquität von 0,51 auf eine hohe Diversität der *nirK*-Gensequenzen hin.

Die größte OTU enthält etwa 32 % der Sequenzen und zeigt auf Proteinebene 85 % Ähnlichkeit zu *Bradyrhizobium denitrificans* (s. Tabelle 46). Damit gehört sie nicht zur gleichen Spezies wie dieses Bakterium, kann aber der Gattung *Bradyrhizobium* zugeordnet werden. Dies gilt auch für die den OTUs 4 und 12 zugeordneten Sequenzen. Zwei weitere OTUs enthalten Sequenzen, die ebenfalls zur Gattung *Bradyrhizobium* zugeordnet werden. Die Sequenzen aus den OTUs 5, 8 und 14 werden der Gattung *Mesorhizobium* zugeordnet. Zwei OTUs gehören zur Gattung *Chelatococcus* und zwei zur Gattung *Rhodopseudomonas*. Alle Sequenzen gehören zu Spezies der Ordnung Rhizobiales und damit zu den Alphaproteobacteria. Bis auf drei (OTUs 10, 11 und 14) gehören alle OTUs zu anderen Spezies als ihre nächsten kultivierten Verwandten. Die OTUs 6, 8 und 13 stellen jedoch komplett neuartige Spezies dar, da auch ihre nächsten bisher unkultivierten Verwandten zu anderen Spezies als sie gehören.

Dies spiegelt sich auch im phylogenetischen Stammbaum wieder (s. Abbildung 29). Die meisten OTUs zeigen dort größere Verwandtschaft zu ihren nächsten unkultivierten als zu ihren nächsten kultivierten Verwandten. Besonders die OTUs 7 und 8 sind nur mit ihren nächsten unkultivierten Verwandten gruppiert und von allen anderen Bakterien getrennt. Die Familien Bradyrhizobiaceae, Phyllobacteriaceae und Rhizobiaceae bilden dabei deutlich voneinander abgesetzte Gruppen.



**Abbildung 29: Phylogenetischer Stammbaum der *nirK*-Sequenzen.**

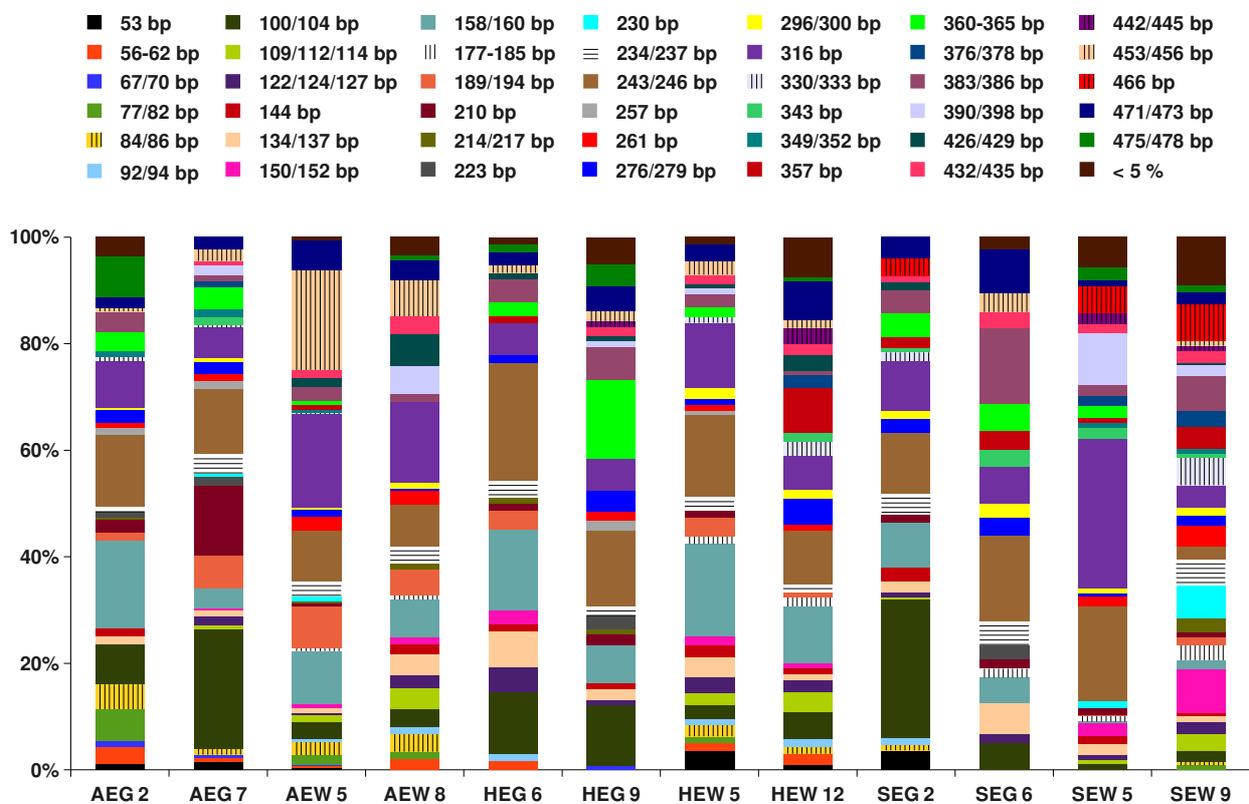
Es handelt sich um einen Neighbor-Joining-Baum (Bootstrap-Konsensusbaum) basierend auf den translatierten Referenzsequenzen der OTUs auf Speziesebene sowie den Proteinsequenzen der nächstverwandten Organismen. Die Zahlen an den Verzweigungen geben den Prozentsatz der Übereinstimmungen aller Bäume an. Die Dreiecke geben die Herkunft der Sequenzen, aber nicht die Größe der OTUs an. Die Zahlen hinter den Dreiecken geben die Nummer der OTU an (s. Tabelle 46). Der Balken zeigt einen Sequenzunterschied von 2 % an.

### Statistische Analyse

Eine statistische Analyse der *nirK*-Gensequenzen ist nicht sinnvoll, da die Sequenzen ja nur fünf Böden entstammen. Aus der t-RFLP-Analyse jedoch liegen Diversitätsdaten aus

### 3. Ergebnisse

allen Böden vor. Dabei wurden insgesamt 54 t-RFs detektiert, von denen 13 stets eine relative Fluoreszenz unter 5 % zeigten (s. Abbildung 30). Die 471/473 bp und die 475/478 bp langen Fragmente, die in allen Böden detektiert wurden, stellen die ungeschnittenen *nirK*-Genfragmente dar. Ebenso wurden Fragmente in sieben verschiedenen Längen in allen Böden gefunden. In den Böden wurden 20 (SEG 6) bis 40 (SEW 9) Fragmente gefunden. Die Böden unterscheiden sich also deutlich in der Anzahl und Verteilung der *nirK*-Gensequenzen.



**Abbildung 30: Relative Fluoreszenzen der t-RFs amplifizierter, mit *Bsa*JI geschnittener *nirK*-Genfragmente.**

t-RFs mit ähnlicher Länge, sowie t-RFs, deren relative Fluoreszenzen stets geringer als 5 % waren, wurden für die Abbildung zusammengefasst.

Der Einfluss der Bodenparameter auf die Nitritreduzierer wurde durch multivariate Gradientenanalyse auf der Grundlage der *nirK*-t-RFLP-Daten ermittelt. Die Eigenwerte der DCA lagen dabei zwischen 0,2 und 0,01 (s. Tabelle 47). Die Speziesdaten konnten also nicht sehr gut entlang der Achsen aufgetrennt werden. Nur die ersten beiden Achsen sind

wichtig für die Erklärung der Variation in den Speziesdaten, wobei der 2. Achse eine deutlich geringere Bedeutung zukommt als der 1. Achse. Die DCA erklärt jedoch etwa 40 % der Varianz in den *nirK*-Bakteriengemeinschaften. Der Gradient hatte eine Länge zwischen 1,4 und 0,9 SD-Einheiten und verweist somit auf einen sehr homogenen Datensatz bei dem sich die Bakteriengemeinschaften in allen Böden ziemlich ähnlich sind.

Durch kanonische Gradientenanalysen und Permutationstests wurden Eigenwerte zwischen 0,146 und 0,06 erhalten (s. Tabelle 48). Hier wurden die Speziesdaten besser aufgetrennt als durch die DCA. Die Eigenschaften Vegetationstyp (0,14), pH-Wert (0,15) und Ammoniumgehalt (0,15) hatten die höchsten Eigenwerte für die 1. Achse. Für diese Eigenschaften wurde auch ein signifikanter Einfluss auf die Bakteriengemeinschaften ermittelt. Auch der Wassergehalt hatte einen signifikanten Einfluss auf die Bakteriengemeinschaften.

**Tabelle 47: Variation und Varianz der Spezieszusammensetzung der *nirK*-Gensequenzen aus den Böden.**

	Achse 1	Achse 2	Achse 3	Achse 4
Eigenwerte	0,197	0,087	0,031	0,012
Länge des Gradienten	1,43	1,203	0,878	1,032
Varianzanteil der Speziesdaten [%]	24,5	35,4	39,2	40,7

**Tabelle 48: Korrelation der *nirK*-Bakteriengemeinschaften und der Bodeneigenschaften.**

Bodeneigenschaften	Eigenwert 1. kanonische Achse	F-Wert	p-Wert
Vegetationstyp	0,144	2,187	0,0002
Landnutzungsintensität	0,046	0,601	0,9573
pH-Wert	0,146	2,219	0,0021
Stickstoffgehalt	0,087	1,219	0,2349
Kohlenstoffgehalt	0,086	1,202	0,2778
Nitratgehalt	0,091	1,278	0,1655
Ammoniumgehalt	0,146	2,217	0,0052
Wassergehalt	0,118	1,715	0,0274

### 3. Ergebnisse

Die CCA mit Vegetationstyp, pH-Wert, Wasser- und Ammoniumgehalt als erklärenden Variablen ergab Eigenwerte von 0,18 und 0,1 für die 1. und 2. Achse (s. Tabelle 49). Beide Achsen zusammen erklären etwa 34 % der Varianz in den Speziesdaten und 85 % der Varianz des Verhältnisses Spezies-Umwelt. Die dritte kanonische Achse ist mit einem Eigenwert von etwa 0,05 nicht relevant für die Erklärung der Variation in den Speziesdaten.

**Tabelle 49: Korrelation der *nirK*-Bakteriengemeinschaften mit den Umweltvariablen Vegetationstyp, pH-Wert, Wasser- und Ammoniumgehalt.**

	Achse 1	Achse 2	Achse 3	Achse 4
Eigenwerte	0,175	0,097	0,048	0,104
Varianzanteil der Speziesdaten [%]	21,8	33,9	39,9	52,9
Varianzanteil des Verhältnisses Spezies-Umwelt [%]	54,7	85	100	0

Das Biplot-Diagramm der CCA zeigt, dass der pH-Wert, der Vegetationstyp und der Ammoniumgehalt in etwa den gleichen Einfluss auf die *nirK*-besitzenden Bakterien ausüben, während der Einfluss des Wassergehalts deutlich geringer ist (s. Abbildung 31). Sie sind außerdem stark mit der 1. Achse korreliert. Der Vegetationstyp und der Ammoniumgehalt zeigen zusätzlich einen nicht unwesentlichen Zusammenhang mit der 2. Achse.

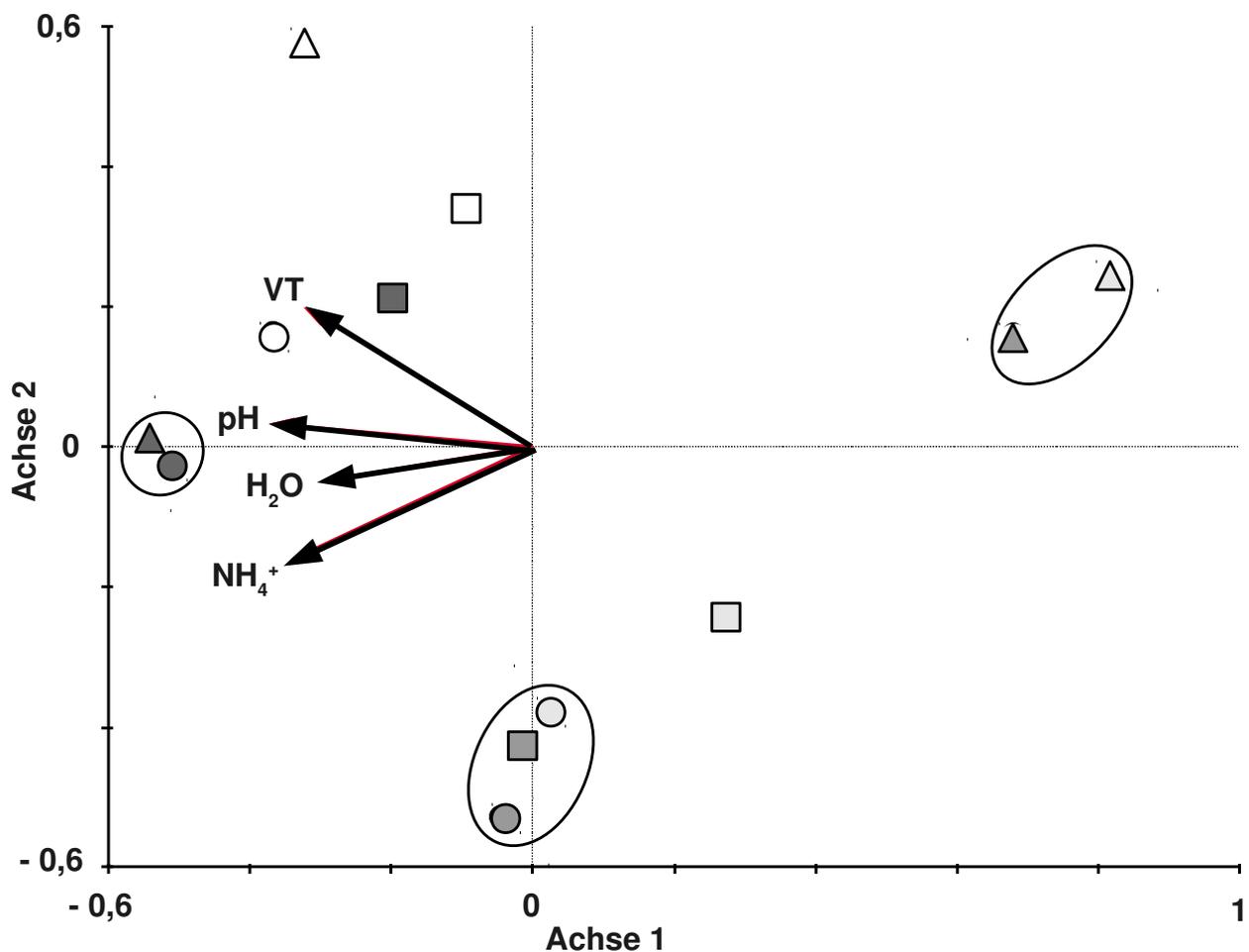


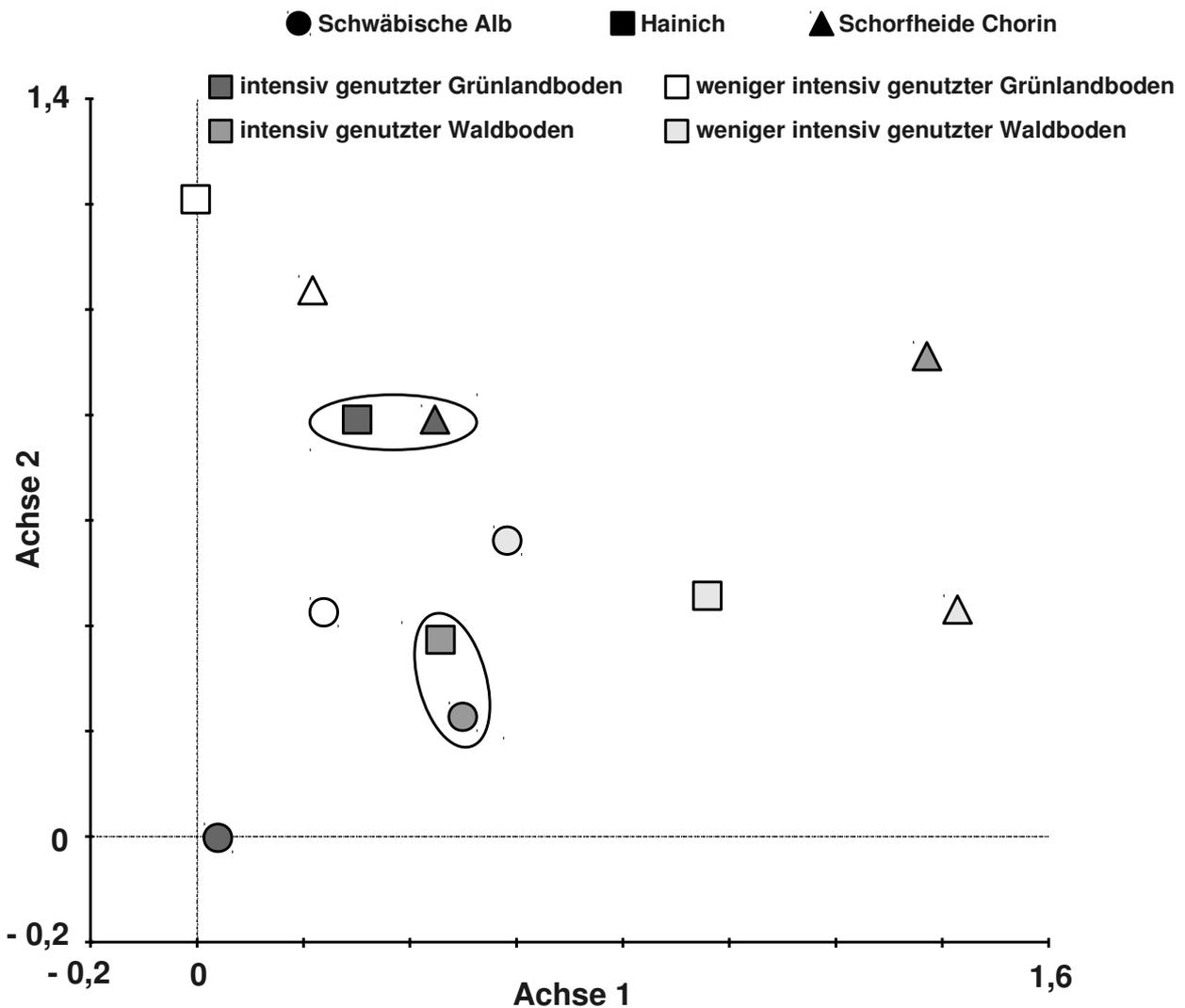
Abbildung 31: CCA der *nirK*-Speziesdaten mit Vegetationstyp (VT), pH-Wert (pH), Ammoniumgehalt (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) und Wassergehalt (H<sub>2</sub>O) als erklärenden Variablen.

- AEG 2   ○ AEG 7   ● AEW 5   ○ AEW 8
- HEG 6   □ HEG 9   ■ HEW 5   □ HEW 12
- ▲ SEG 2   △ SEG 6   ▲ SEW 5   △ SEW 9

Der hohe Eigenwert der Residualachse (s. Tabelle 49) weist darauf hin, dass die Variation in den *nirK*-Speziesdaten nicht allein durch pH-Wert, Vegetationstyp, Wasser- und Ammoniumgehalt bewirkt wird. Eine wichtige Umweltvariable wurde in der CCA-Analyse nicht berücksichtigt. Dies wird auch durch die Unterschiede im Verteilungsmuster der Böden in DCA-Streudiagramm (s. Abbildung 32) und CCA-Diagramm bestätigt. Die Ähnlichkeit der Böden bezüglich ihrer *nirK*-Bakteriengemeinschaften lässt sich daher am besten aus dem Diagramm der DCA ersehen. Zwei Grünlandböden unter intensiver

### 3. Ergebnisse

Landnutzung (HEG 6 und SEG 2) beinhalten sehr ähnliche *nirK*-Bakteriengemeinschaften. Auch zwei intensiv genutzte Waldböden (AEW 5 und HEW 5) ähneln sich sehr in ihren *nirK*-besitzenden Bakteriengemeinschaften. Die Böden AEG 2, SEW 5 und SEW 9 dagegen unterscheiden sich diesbezüglich sehr von allen anderen Böden.



**Abbildung 32: DCA der *nirK*-Speziesdaten.**

Böden mit ähnlichen *nirK*-Gemeinschaften sind eingekreist.

- AEG 2   ○ AEG 7   ● AEW 5   ○ AEW 8
- HEG 6   □ HEG 9   ■ HEW 5   □ HEW 12
- ▲ SEG 2   △ SEG 6   ▲ SEW 5   △ SEW 9

Die Bodenparameter Vegetationstyp, pH-Wert, Wasser- und Ammoniumgehalt beeinflussen die Variation in den *nirK*-Bakteriengemeinschaften. Jedoch üben zusätzlich

nicht in dieser Arbeit untersuchte Parameter erheblichen Einfluss aus. Die Böden HEG 6 und SEG 2 sowie AEW 5 und HEW 5 beinhalten jeweils ähnliche Gemeinschaften *nirK*-besitzender Bakterien. Die Böden AEG 2, SEW 5 und SEW 9 unterscheiden sich diesbezüglich am meisten von allen anderen Böden.

### 3.5.6 Analyse von *nirS*-Genen

#### Phylogenetische Analyse

Durch Pyrosequenzierung wurde die *nirS*-Bakteriengemeinschaft in den Böden untersucht. Dabei wurden 1438 Sequenzen aus fünf Böden erhalten, die in 18 OTUs einsortiert wurden. Damit ist die Diversität der *nirS*-beinhaltenen Bakterien nur knapp abgedeckt, wie die Rarefaction-Kurve zeigt (s. Abbildung 33). Der Artenzahlschätzer (Chao1) betrug 20.

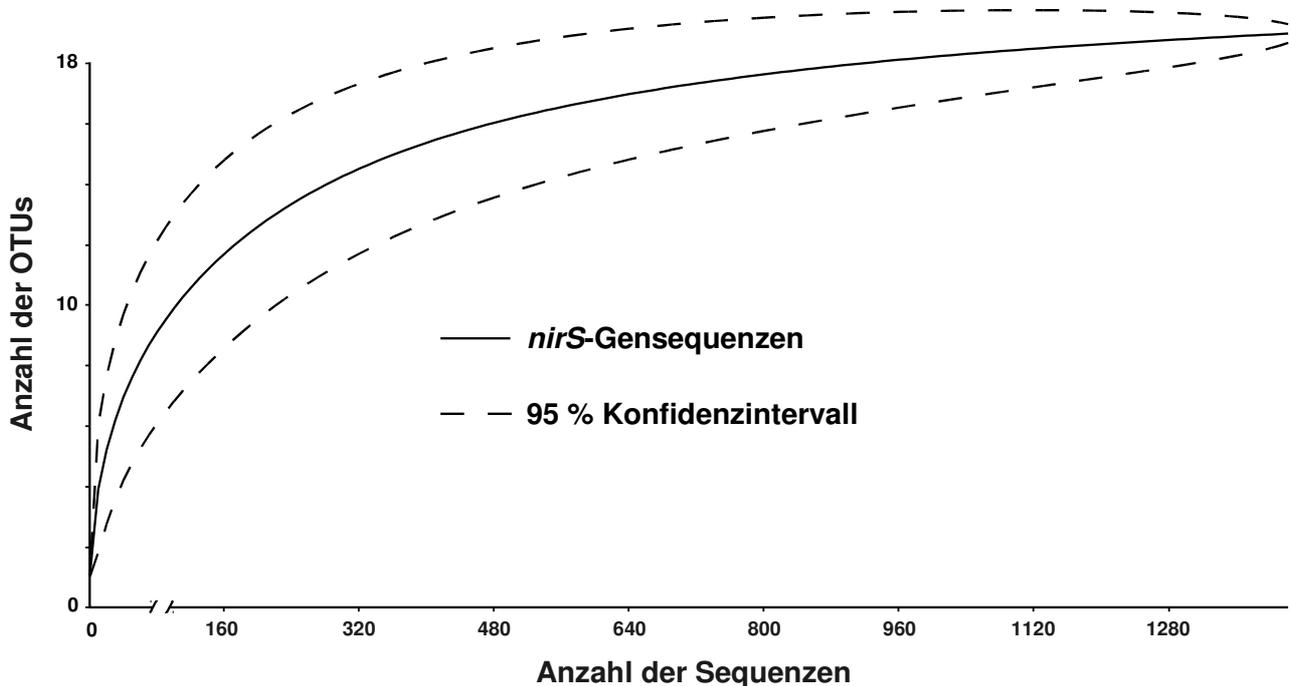


Abbildung 33: Rarefaction-Kurve (durchgehende Linie) und 95 % Konfidenzbereiche (gestrichelte Linie) der OTUs der *nirS*-Gensequenzen bei 18 % genetischer Distanz.

### 3. Ergebnisse

Die Anzahl der Sequenzen pro Boden war sehr heterogen, die Testabdeckung der Böden betrug jedoch immer mehr als 99 % (s. Tabelle 50). Aus dem Boden HEW 5 wurden 904 Sequenzen erhalten, die in 13 OTUs eingeordnet wurden. Dem Boden HEW 12 entstammten 19 Sequenzen aus drei OTUs. Aus dem Boden AEW 8 stammten 148 Sequenzen aus nur zwei OTUs. Diese geringe Diversität spiegelte sich auch in einem sehr niedrigen Shannon-Index (0,042) wieder. Den höchsten Shannon-Index (1,34) hatte der Boden SEG 6. Bei der Betrachtung der Äquität jedoch zeigt sich, dass der Boden HEW 12 die höchste Diversität an *nirS*-beinhaltenden Bakterien besitzt, der Boden HEW 5 die niedrigste. Nimmt man alle Böden zusammen, so ergibt sich eine Äquität von 0,224. Die Diversität der *nirS*-beinhaltenden Bakterien in diesen fünf Böden ist also nicht sehr hoch.

**Tabelle 50: Diversitätsindices der Böden basierend auf den *nirS*-Gensequenzen.**

Boden	Anzahl der Sequenzen	Anzahl der OTUs	Chao 1	Shannon-Index (H')	Äquität (J)	Testabdeckung (C)
AEW 8 <sup>a</sup>	142	2	2	0,042	0,521	99,3
HEW 5 <sup>b</sup>	904	13	18,5	0,927	0,181	99,78
HEW 12	19	3	3	1,020	0,924	100
SEG 2	80	4	4	0,892	0,610	100
SEG 6	293	9	9,25	1,395	0,448	99,66
gesamt	1438	18	20	1,450	0,224	99,93

<sup>a</sup>Weiß: Böden unter weniger intensiver Landnutzung

<sup>b</sup>Grau: Böden unter intensiver Landnutzung

Von den 18 OTUs, in die die *nirS*-Gensequenzen einsortiert wurden, enthalten 12 jeweils weniger als 1 % der Sequenzen und neun jeweils weniger als zehn Sequenzen (s. Tabelle 51). Die beiden größten OTUs enthalten 774 bzw. 363 Sequenzen, die 79 % bzw. 76 % Ähnlichkeit zur Spezies *Thiothrix lacustris* aufweisen und somit zur Gattung *Thiothrix* zugeordnet werden. Die OTUs 3 und 8 enthalten Sequenzen, die der Gattung *Sulfuritalea* zugeordnet wurden und die OTUs 11, 13 und 17 repräsentieren die Gattung *Cupriavidus*. Vier weitere OTUs wurden der Gattung *Bradyrhizobium* zugeordnet.

**Tabelle 51: Ähnlichkeit der translatierten Referenzsequenzen der OTUs auf Speziesebene zu translatierten *nirS*-Gensequenzen kultivierter Organismen.**

Der Ähnlichkeits-Grenzwert für die Zuordnung zu Spezies beträgt 86 %.

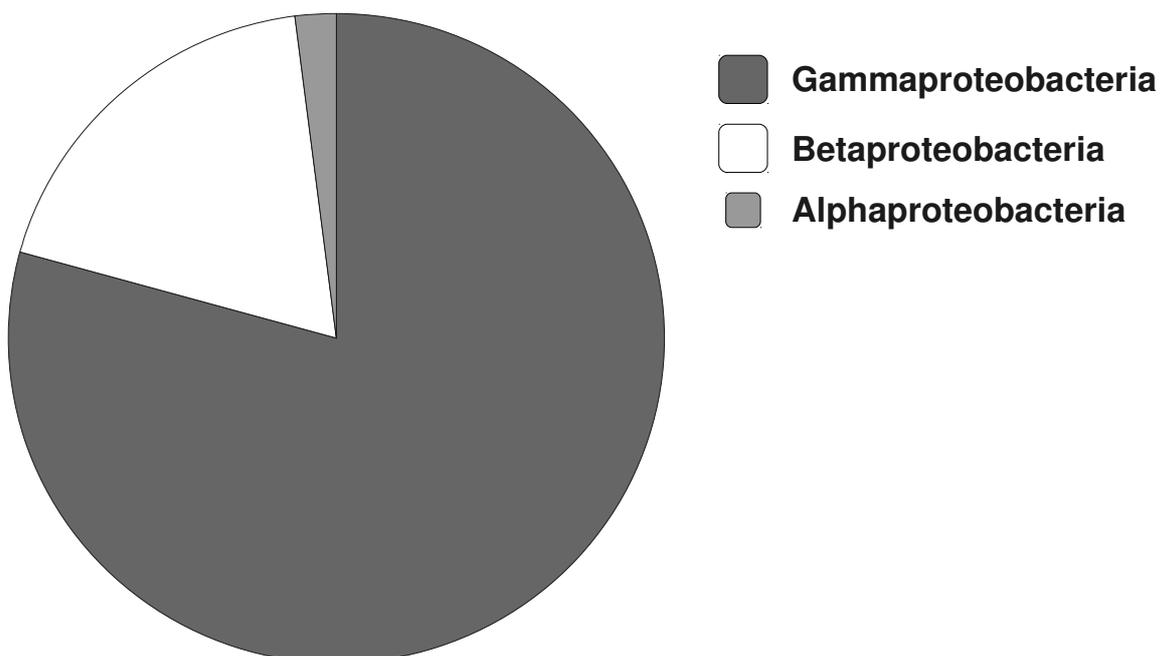
OTU	# Seq.	Spezies (Accession Number)	Ähnlichkeit <sup>a</sup>	Familie	Klasse/Phylum
1	774	<i>Thiotrix lacustris</i> (AGO45492.1)	79 %	Thiotrichaceae	Gammaproteobacteria Proteobacteria
2	363	<i>Thiotrix lacustris</i> (AGO45492.1)	76 %	Thiotrichaceae	Gammaproteobacteria Proteobacteria
3	89	<i>Sulfuritalea hydrogenivorans</i> (BAO30669.1)	82 %	Rhodocyclaceae	Betaproteobacteria Proteobacteria
4	71	<i>Aromatoleum aromaticum</i> (YP_157499.1)	78 %	Rhodocyclaceae	Betaproteobacteria Proteobacteria
5	44	<i>Acidovorax delafieldii</i> (WP_005793436.1)	77 %	Comamonadaceae	Betaproteobacteria Proteobacteria
6	23	<i>Thauera terpenica</i> (AAL86936.1)	86 %	Rhodocyclaceae	Betaproteobacteria Proteobacteria
7	13	<i>Rubrivivax gelatinosus</i> (YP_005435502.1)	73 %	unklassifizierte Burkholderiales	Betaproteobacteria Proteobacteria
8	12	<i>Sulfuritalea hydrogenivorans</i> (BAO30669.1)	81 %	Rhodocyclaceae	Betaproteobacteria Proteobacteria
9	10	<i>Bradyrhizobium oligotrophicum</i> (YP_007516375.1)	73 %	Bradyrhizobiaceae	Alphaproteobacteria Proteobacteria
10	8	<i>Bradyrhizobium oligotrophicum</i> (YP_007516375.1)	75 %	Bradyrhizobiaceae	Alphaproteobacteria Proteobacteria
11	7	<i>Cupriavidus necator</i> (CAJ76740.1)	74 %	Burkholderiaceae	Betaproteobacteria Proteobacteria
12	7	<i>Bradyrhizobium oligotrophicum</i> (YP_007516375.1)	88 %	Bradyrhizobiaceae	Alphaproteobacteria Proteobacteria
13	5	<i>Cupriavidus necator</i> (CAJ76740.1)	75 %	Burkholderiaceae	Betaproteobacteria Proteobacteria
14	3	<i>Azidovorax delafieldii</i> (WP_005793436.1)	89 %	Comamonadaceae	Betaproteobacteria Proteobacteria
15	3	<i>Pseudomonas caeni</i> (WP_022966960.1)	77 %	Pseudomonadaceae	Gammaproteobacteria Proteobacteria
16	3	<i>Dinoroseobacter shibae</i> (YP_001534514.1)	85 %	Rhodobacteraceae	Alphaproteobacteria Proteobacteria
17	2	<i>Cupriavidus necator</i> (CAJ76740.1)	69 %	Burkholderiaceae	Betaproteobacteria Proteobacteria
18	1	<i>Bradyrhizobium oligotrophicum</i> (YP_007516375.1)	70 %	Bradyrhizobiaceae	Alphaproteobacteria Proteobacteria

<sup>a</sup>Ähnlichkeit der Referenzsequenz zur *nirS*-Gen-Sequenz der nächstverwandten kultivierten Spezies.

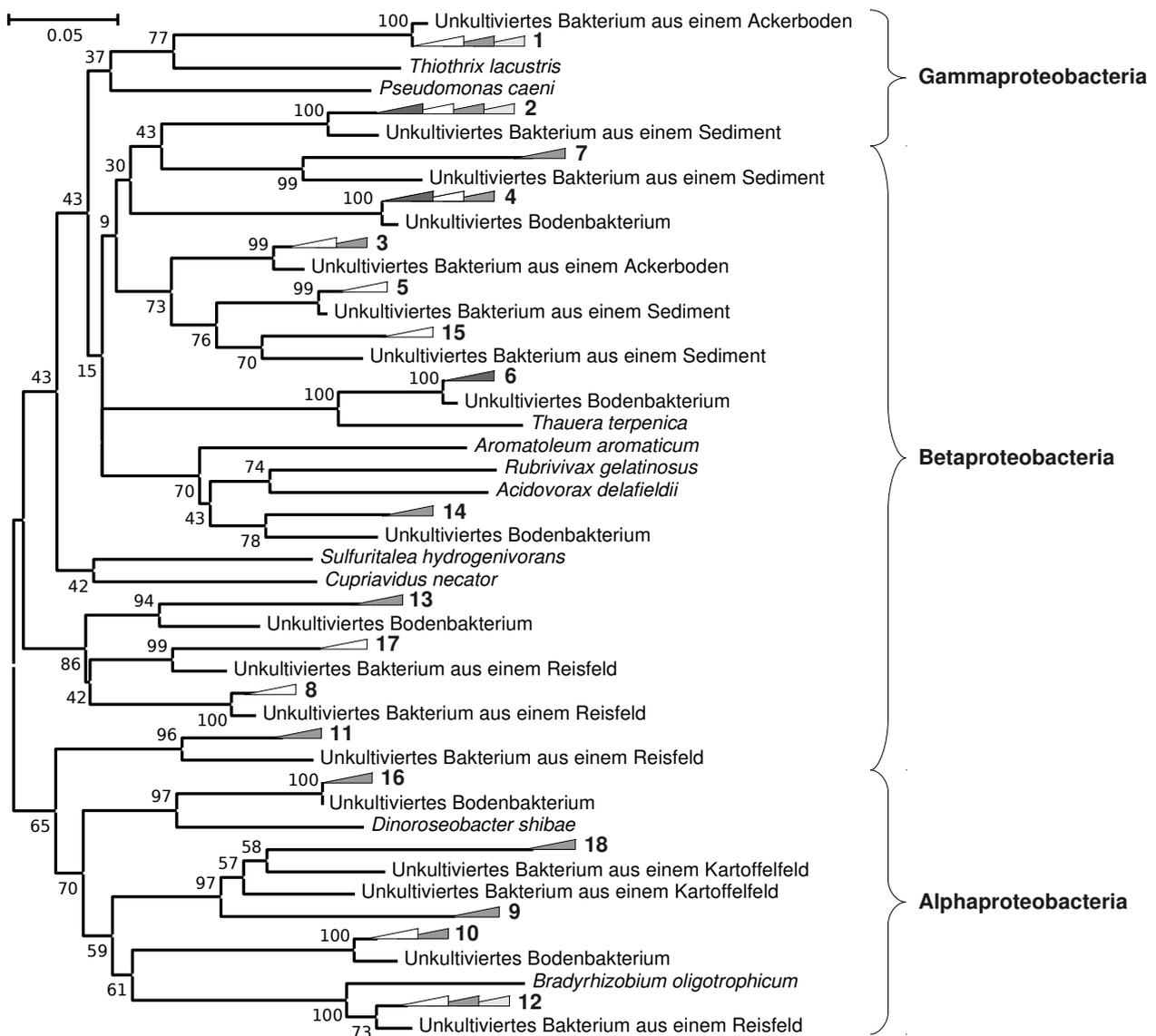
### 3. Ergebnisse

Nur drei OTUs, die OTUs 6, 12 und 14, gehören der gleichen Spezies an wie ihre nächsten kultivierten Verwandten. Drei andere OTUs, die OTUs 7, 9 und 18, gehören nicht zur gleichen Spezies wie ihre nächsten bisher unkultivierten Verwandten und stellen damit neuartige Spezies dar. OTU 7 repräsentiert eine neuartige *Rubrivivax*-Spezies, und OTU 9 und 18 je eine neuartige *Bradyrhizobium*-Spezies.

Alle OTUs gehören zu den Proteobacteria, die meisten (10 OTUs) zu den Betaproteobacteria. Fast 80 % der Sequenzen jedoch gehören zu den Gammaproteobacteria (s. Abbildung 34), der bisher artenreichsten Klasse der Proteobacteria. Von den Betaproteobacteria stammen etwa 19 % der Sequenzen, und etwa 2 % der Sequenzen von den Alphaproteobacteria.



**Abbildung 34: Übersicht über die Zugehörigkeit der *nirS*-besitzenden Bakterien zu taxonomischen Klassen (in Prozent).**



**Abbildung 35: Phylogenetischer Stammbaum der *nirS*-Sequenzen.**

Es handelt sich um einen Neighbor-Joining-Baum (Bootstrap-Konsensusbaum) basierend auf den translatierten Referenzsequenzen der OTUs auf Speziesebene sowie den Proteinsequenzen der nächstverwandten Organismen. Die Zahlen an den Verzweigungen geben den Prozentsatz der Übereinstimmungen aller Bäume an. Die Dreiecke geben die Herkunft der Sequenzen, aber nicht die Größe der OTUs an. Die Zahlen hinter den Dreiecken geben die Nummer der OTU an (s. Tabelle 51). Der Balken zeigt einen Sequenzunterschied von 5 % an.

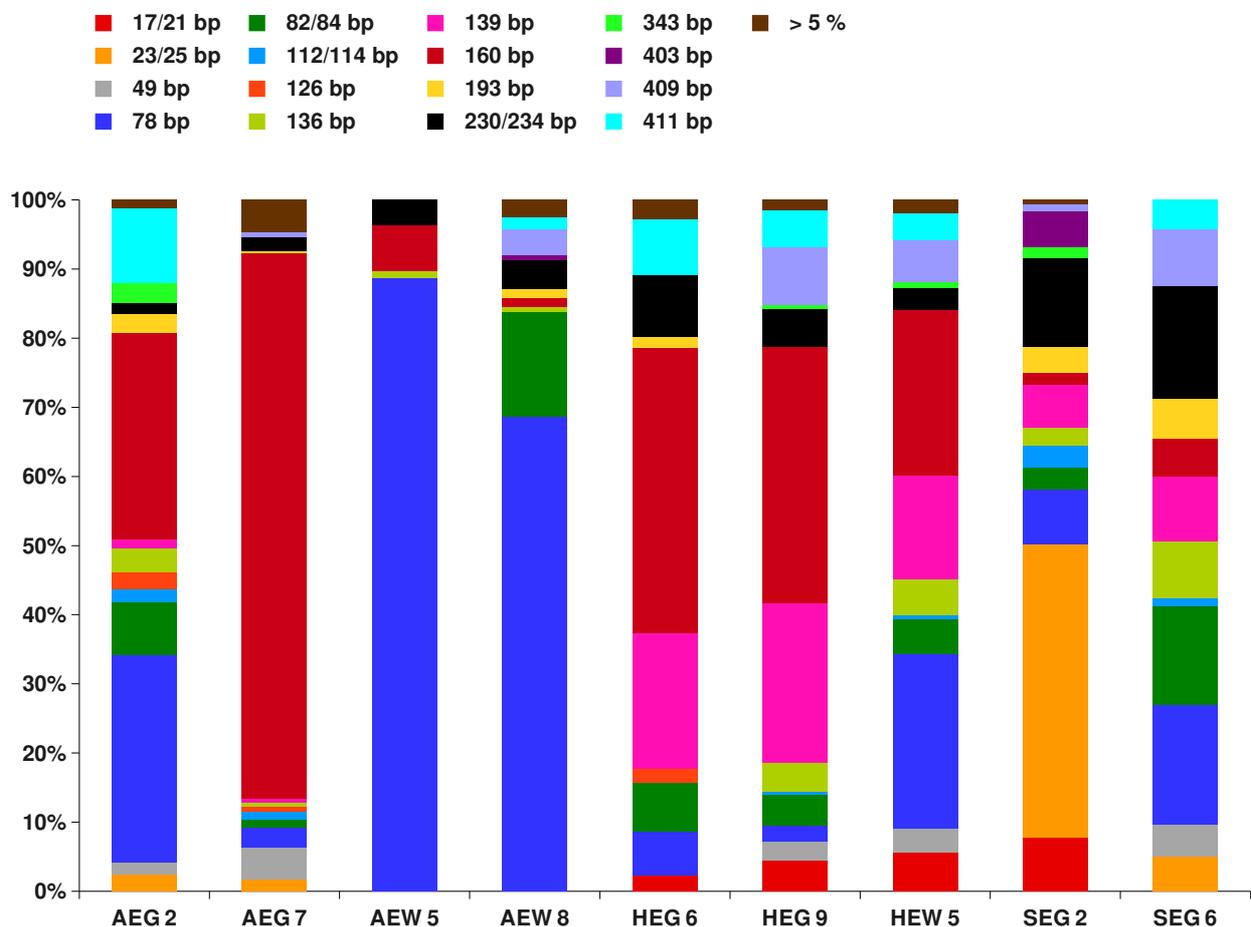
Die deutlich nähere Verwandtschaft der meisten OTUs zu ihren nächsten unkultivierten als zu ihren nächsten kultivierten Verwandten ist auch im phylogenetischen Stammbaum offensichtlich (s. Abbildung 35). Auch der Status der OTUs 7, 9 und 18 als neuartige

### 3. Ergebnisse

Spezies ist dort deutlich zu erkennen. Die OTUs 9 und 18 zeigen zueinander eine größere Verwandtschaft als zur ihrem nächsten kultivierten Verwandten *Bradyrhizobium oligotrophicum*.

#### Statistische Analyse

Die *nirS*-Gensequenzen stammen aus nur fünf Böden, weshalb eine statistische Analyse dieser Daten nicht sinnvoll ist. Es liegen jedoch *nirS*-t-RFLP-Daten aus neun Böden vor (s. Abbildung 36).



**Abbildung 36: Relative Fluoreszenzen der t-RFs amplifizierter, mit *Bst*UI geschnittener *nirS*-Genfragmente.**

t-RFs mit ähnlicher Länge, sowie t-RFs, deren relative Fluoreszenzen stets geringer als 5 % waren, wurden für die Abbildung zusammengefasst.

Dabei wurden insgesamt 23 t-RFs detektiert, von denen sieben stets eine relative Fluoreszenz unter 5 % zeigten. Die 17/21 bp langen t-RFs, die 78 bp langen und die

230/234 bp langen t-RFs kamen in allen Böden vor. Im Boden AEW 5 konnten nur vier verschiedene t-RFs detektiert werden. Die Anzahl der verschiedenen t-RFs in allen anderen Böden war jedoch deutlich höher und viele t-RFs kamen in den meisten Böden vor. In den Grünlandböden der Exploratorien Schwäbische Alb (AEG 2 und AEG 7) und Hainich (HEG 6 und HEG 9) waren die 17/21 bp langen t-RFs stark vertreten. Die Waldböden des Exploratoriums Schwäbische Alb (AEW 5 und AEW 8) wurden von den 78 bp langen Fragmenten dominiert. Im intensiv genutzten Grünlandboden der Schwäbischen Alb (AEG 2) und im intensiv genutzten Waldboden des Hainich (HEW 5) waren beide Fragmente etwa gleich stark vertreten. Auffällig ist auch, dass die 17/21 bp langen Fragmente nicht in den Böden des Exploratoriums Schwäbische Alb und dem intensiv genutzten Grünlandboden der Schorfheide Chorin (SEG 6) vorkamen, während die 23/25 bp langen Fragmente nur in den Böden AEG 2, AEG 7 und SEG 6 zu finden waren. Die unterschiedliche Diversität der Böden ist also durch die unterschiedliche Häufigkeit der t-RFs deutlich zu erkennen.

Die t-RFLP-Daten wurden als Grundlage für eine multivariate Gradientenanalyse zur Untersuchung des Einflusses der Landnutzung auf die *nirS*-Bakteriengemeinschaften verwendet. Die DCA ergab einen Eigenwert von 0,19 für die 1. und 0,09 für die 2. Achse (s. Tabelle 52). Die übrigen Achsen hatten Eigenwerte unter 0,03 und sind damit nicht relevant für die Erklärung der Verteilung der *nirS*-Bakteriengemeinschaften. Dies zeigt sich auch daran, dass der Varianzanteil der ersten beiden Achsen nicht viel geringer ist als der aller Achsen zusammen. Die Gradienten waren mit einer Länge von 1,6 bis 1,3 SD-Einheiten sehr kurz, was auf einen homogenen Datensatz hindeutet.

### 3. Ergebnisse

**Tabelle 52: Variation und Varianz der Spezieszusammensetzung der *nirS*-Gensequenzen aus den Böden.**

	Achse 1	Achse 2	Achse 3	Achse 4
Eigenwerte	0,193	0,092	0,027	0,001
Länge des Gradienten	1,611	1,28	1,378	1,384
Varianzanteil der Speziesdaten [%]	24,5	36,2	39,6	39,8

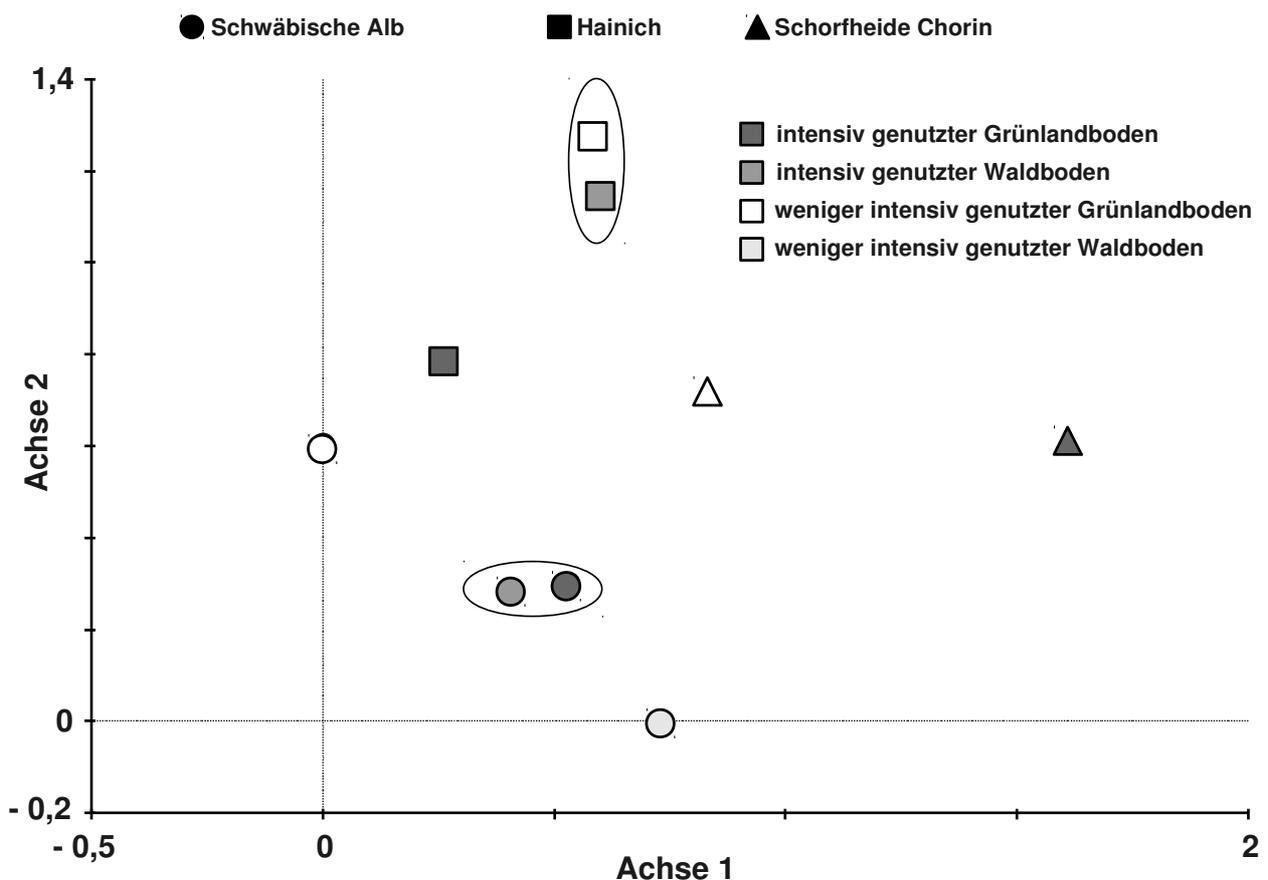
Kanonische Gradientenanalysen mit Permutationstests wurden durchgeführt und ergaben Eigenwerte für die 1. Achse zwischen 0,11 und 0,07 (s. Tabelle 53). Diese sehr niedrigen Werte zeigen, dass die Speziesdaten sehr schlecht entlang der Achsen aufgetrennt wurden, die Achsen also nicht sehr wichtig für die Variation der Bakteriengemeinschaften sind. Auch konnte die Signifikanz des Einflusses auf die Bakteriengemeinschaften für keinen Parameter gezeigt werden. Die Variation der Artzusammensetzung kann also durch keine der untersuchten Bodeneigenschaften erklärt werden. Daher können die Unterschiede der Böden bezüglich der *nirS*-Bakteriengemeinschaften nur durch ein DCA-Streudiagramm analysiert werden (s. Abbildung 37).

**Tabelle 53: Korrelation der *nirS*-Bakteriengemeinschaften und der Bodeneigenschaften.**

Bodeneigenschaften	Eigenwert 1. kanonische Achse	F-Wert	p-Wert
Vegetationstyp	0,099	1,008	0,4616
Landnutzungsintensität	0,073	0,721	0,8448
pH-Wert	0,093	0,934	0,5894
Stickstoffgehalt	0,077	0,765	0,6958
Kohlenstoffgehalt	0,073	0,721	0,7149
Nitratgehalt	0,113	1,174	0,2893
Ammoniumgehalt	0,099	1,0664	0,4579
Wassergehalt	0,089	0,896	0,6167

Das Ordinationsdiagramm der DCA (s. Abbildung 37) zeigt, dass die beiden intensiv genutzten Böden des Exploratoriums Schwäbische Alb (AEG 2 und AEW 5) sich bezüglich ihrer *nirS*-Bakteriengemeinschaften stark ähneln. Dies gilt auch für den weniger intensiv genutzten Grünlandboden (HEG 9) und den intensiv genutzten Waldboden (HEW 5) des

Exploratoriums Hainich. Die übrigen Böden weisen keine große Ähnlichkeit zu anderen Böden bezüglich ihrer *nirS*-Bakteriengemeinschaften auf. Fast alle Böden sind deutlich entlang der 1. und 2. Achse angeordnet. Dies deutet darauf hin, dass auf die Speziesdaten mindestens zwei Gradienten einwirken. Mindestens zwei in dieser Arbeit nicht untersuchte Variablen beeinflussen also die Gemeinschaften der *nirS*-beinhaltenden Bakterien in den Böden.



**Abbildung 37: DCA der *nirS*-Speziesdaten.**

Böden mit ähnlichen *nirS*-Bakteriengemeinschaften sind eingekreist.

- AEG 2   ○ AEG 7   ● AEW 5   ○ AEW 8
- HEG 6   □ HEG 9   ■ HEW 5   □ HEW 12
- ▲ SEG 2   △ SEG 6   ▲ SEW 5   △ SEW 9

Keiner der in dieser Arbeit untersuchten Parameter sondern mindestens zwei bisher unbekannte Faktoren haben einen Einfluss auf die Variation der *nirS*-Speziesdaten. Die

### 3. Ergebnisse

Böden AEG 2 und AEW 5 sowie HEG 9 und HEW 5 enthalten jeweils ähnliche Gemeinschaften *nirS*-beinhaltenender Bakterien.

#### 3.5.7 Analyse von *nosZ*-Genen

##### Phylogenetische Analyse

Die Gemeinschaft der Denitrifikanten in den Böden wurde durch Pyrosequenzierung der *nosZ*-Gene untersucht. Dabei wurden 18010 *nosZ*-Gensequenzen erhalten und in 22 OTUs auf Speziesebene eingeteilt. Mit dieser Anzahl an Sequenzen wurde die Diversität der *nosZ*-besitzenden Denitrifikanten vollständig erfasst, wie die Rarefaction-Kurve deutlich zeigt (s. Abbildung 38). Dies wird durch die geschätzte Artenzahl (Chao1) von 22,25 bestätigt.

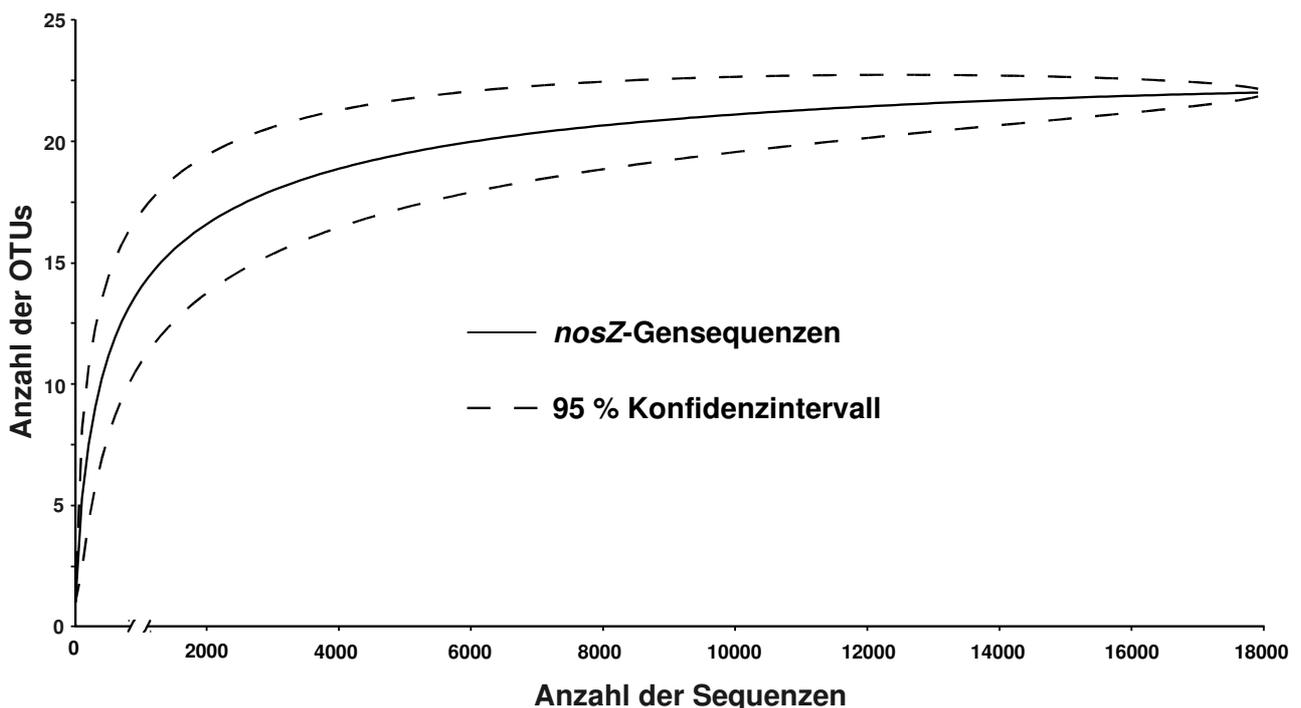


Abbildung 38: Rarefaction-Kurve (durchgehende Linie) und 95 % Konfidenzbereiche (gestrichelte Linie) der OTUs der *nosZ*-Gensequenzen bei 20 % genetischer Distanz.

Die Anzahl der Sequenzen pro Boden lag zwischen 86 (SEG 6) und 4937 (HEW 5) (s. Tabelle 54). Die Testabdeckung in allen Böden war jedoch größer als 99%, weshalb eine vergleichende Analyse dennoch erlaubt ist. Die wenigsten OTUs hatten zwei Waldböden

unter weniger intensiver Landnutzung, AEW 8 und HEW 12. Die beiden intensiv genutzten Böden des Exploratoriums Hainich (HEG 6 und HEW 5) hatten die meisten OTUs, nämlich jeweils 13. Die Shannon-Indices der Böden aus den Exploratorien Schwäbische Alb und Hainich waren sehr klein, zwischen 0,086 (AEW 8) und 0,37 (HEG 9). Die Böden des Exploratoriums Schorfheide Chorin hatten hohe Shannon-Indices, zwischen 0,69 (SEG 6) und 1,02 (SEG 2). Diese Böden beherbergen eine große Diversität an Denitrifikanten. Die Diversität der Böden kann anhand der Äquität verglichen werden. Die Böden HEG 6 und HEW 5 hatten mit 0,097 und 0,095 die geringste, der Boden HEW 12 mit 0,466 die höchste Äquität. Die Äquität der übrigen Böden aus den Exploratorien Schwäbische Alb und Hainich lag im Bereich um 0,2 und die der Böden aus der Schorfheide Chorin im Bereich um 0,3. Auch hier zeigen die relativ geringen Äquitätswerte eine niedrige Diversität von Denitrifikanten an. Für alle Böden zusammengenommen war der Shannon-Index 0,122. Die Diversität der Denitrifikanten in den untersuchten Böden ist also nicht sehr groß. Dies wird auch durch die sehr niedrige Äquität von 0,07 bestätigt.

**Tabelle 54: Diversitätsindices der Böden basierend auf den *nosZ*-Gensequenzen.**

Boden	Anzahl der Sequenzen	Anzahl der OTUs	Chao 1	Shannon-Index (H')	Äquität (J)	Testabdeckung (C)
AEW 2 <sup>a</sup>	2428	7	7	0,268	0,187	99,96
AEW 7 <sup>b</sup>	714	6	6,5	0,217	0,207	99,85
AEW 5	3755	5	5	0,101	0,221	99,9
AEW 8	451	3	5,25	0,086	0,363	99,97
HEG 6	1846	13	15,25	0,231	0,097	99,83
HEG 9	1898	6	6	0,370	0,241	100
HEW 5	4937	13	13,66	0,215	0,095	99,95
HEW 12	183	3	3	0,336	0,466	100
SEG 2	402	9	13,5	1,020	0,308	99,25
SEG 6	86	7	15	0,689	0,285	99,35
SEW 5	820	6	6	0,737	0,348	100
SEW 9	490	8	8,66	0,909	0,310	99,59
gesamt	18010	22	22,25	0,378	0,066	99,99

<sup>a</sup>Grau: Böden unter intensiver Landnutzung

<sup>b</sup>Weiß: Böden unter weniger intensiver Landnutzung

### 3. Ergebnisse

**Tabelle 55: Ähnlichkeit der translatierten Referenzsequenzen der OTUs auf Speziesebene zu translatierten *nosZ*-Gensequenzen kultivierter Organismen.**

Der Ähnlichkeits-Grenzwert für die Zuordnung zu Spezies beträgt 86 %.

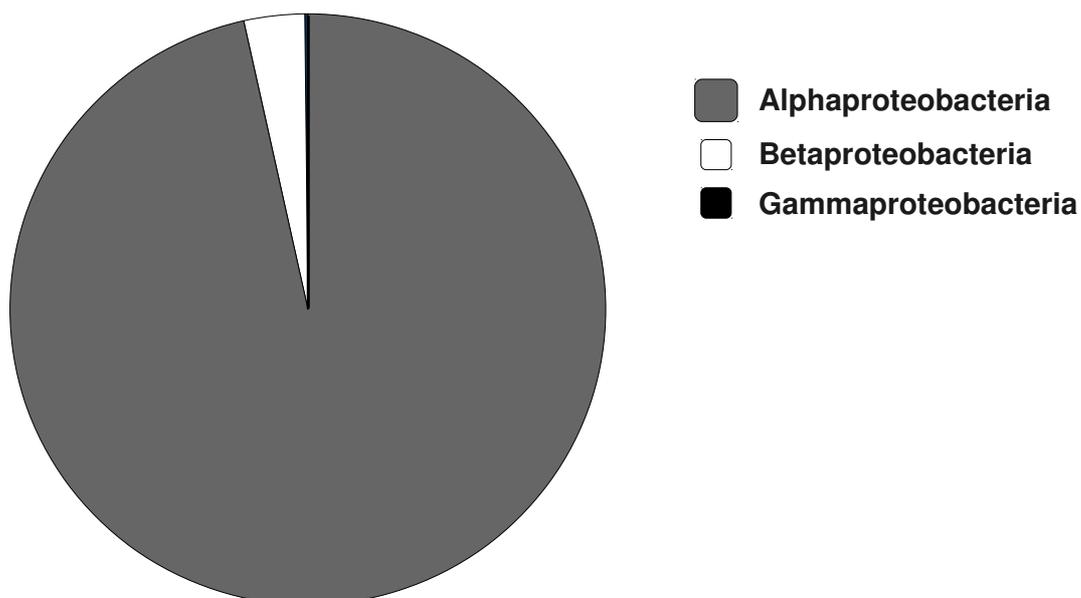
OTU	# Seq.	Spezies (Accession Number)	Ähnlichkeit <sup>a</sup>	Familie	Klasse/Phylum
1	16866	<i>Hyphomicrobium nitrativorans</i> (YP_008866355.1)	87 %	Hyphomicrobiaceae	Alphaproteobacteria Proteobacteria
2	329	<i>Pseudogulbenkiania ferrooxidans</i> (WP_008952358.1)	70 %	Neisseriaceae	Betaproteobacteria Proteobacteria
3	271	<i>Azospirillum lipoferum</i> (AAK51078.1)	97 %	Rhodospirillaceae	Alphaproteobacteria Proteobacteria
4	98	<i>Bradyrhizobium oligotrophicum</i> (YP_007516046.1)	87 %	Bradyrhizobiaceae	Alphaproteobacteria Proteobacteria
5	78	<i>Oligotropha carboxidovorans</i> (YP_002288030.1)	93 %	Bradyrhizobiaceae	Alphaproteobacteria Proteobacteria
6	67	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> (YP_003980578.1)	86 %	Alcaligenaceae	Betaproteobacteria Proteobacteria
7	60	<i>Janthinobacterium lividum</i> (EZP40642.1)	97 %	Oxalobacteraceae	Betaproteobacteria Proteobacteria
8	50	<i>Thiobacillus denitrificans</i> (WP_018077125.1)	88 %	Hydrogenophilaceae	Betaproteobacteria Proteobacteria
9	48	<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> (NP_766955.1)	82 %	Bradyrhizobiaceae	Alphaproteobacteria Proteobacteria
10	35	<i>Sinorhizobium fredii</i> (YP_006399208.1)	92 %	Rhizobiaceae	Alphaproteobacteria Proteobacteria
11	20	<i>Achromobacter arsenitoxidans</i> (WP_008166018.1)	78 %	Alcaligenaceae	Betaproteobacteria Proteobacteria
12	20	<i>Pseudomonas mandelii</i> (KDD69024.1)	98 %	Pseudomonadaceae	Gammaproteobacteria Proteobacteria
13	16	<i>Mesorhizobium loti</i> (WP_010461606.1)	98 %	Phyllobacteriaceae	Alphaproteobacteria Proteobacteria
14	15	<i>Acidovorax radidis</i> (WP_019898632.1)	82 %	Comamonadaceae	Betaproteobacteria Proteobacteria
15	8	<i>Methylothermobacter mobilis</i> (WP_019898632.1)	82 %	Methylophilaceae	Betaproteobacteria Proteobacteria
16	8	<i>Rubrivivax gelatinosus</i> (ACX46124.1)	49 %	unklassifizierte Burkholderiales	Betaproteobacteria Proteobacteria
17	7	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> (YP_002524339.1)	83 %	Rhodobacteraceae	Alphaproteobacteria Proteobacteria
18	5	<i>Methylothermobacter mobilis</i> (WP_019898632.1)	78 %	Methylophilaceae	Betaproteobacteria Proteobacteria
19	4	<i>Achromobacter arsenitoxidans</i> <sup>b</sup> (WP_008166018.1)	81 %	Alcaligenaceae	Betaproteobacteria Proteobacteria
20	2	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> (YP_003980578.1)	81 %	Alcaligenaceae	Betaproteobacteria Proteobacteria
21	2	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> (YP_001991341.1)	75 %	Bradyrhizobiaceae	Alphaproteobacteria Proteobacteria
22	1	<i>Hyphomicrobium denitrificans</i> (YP_007914007.1)	91 %	Hyphomicrobiaceae	Alphaproteobacteria Proteobacteria

<sup>a</sup>Ähnlichkeit der Referenzsequenz zur *nosZ*-Gen-Sequenz der nächstverwandten kultivierten Spezies.

<sup>b</sup>Grau: Die Zugehörigkeit zu einer Spezies konnte nicht eindeutig bestimmt werden.

Die größte OTU enthält etwa 94 % aller Sequenzen und wurde der Spezies *Hyphomicrobium nitrativorans* zugeordnet (s. Tabelle 55). Die Sequenzen der OTU 6 konnten nicht eindeutig einer Spezies zugeordnet werden. Die gehören entweder zur Spezies *Achromobacter xylosoxidans* oder zur Spezies *Achromobacter arsenitoxidans*. Drei weitere OTUs, die OTUs 11, 19 und 20, gehören ebenfalls zur Gattung *Achromobacter*. Die Sequenzen der OTUs 15 und 18 wurden der Spezies *Methylothermobacter mobilis* zugeordnet, gehören jedoch aufgrund der geringen Ähnlichkeit zu deren *NosZ*-Proteinsequenz zu einer anderen Spezies.

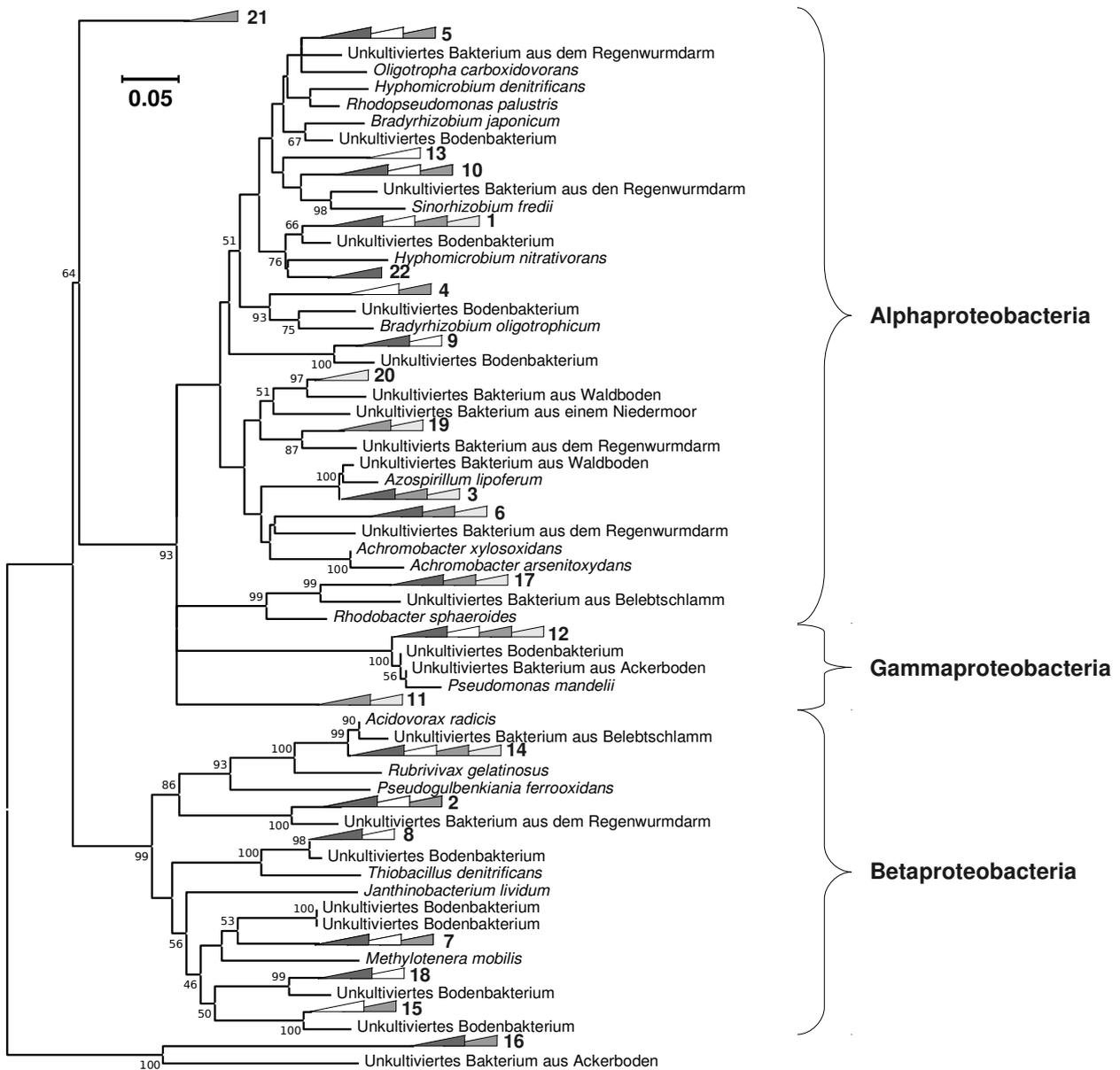
Die Sequenzen aus OTU 16 weisen nur 49 % Ähnlichkeit zu den Sequenzen ihres nächsten kultivierten Verwandten *Rubrivivax gelatinosus* auf und gehören damit auch zu einer anderen Gattung. Die OTUs 22 und 21 weisen nur 83 % bzw. 78 % Ähnlichkeit zu ihrem nächsten Verwandten, einem bisher unkultivierten Bakterium, auf. Sie stellen also bisher unbekannte Spezies der Gattungen *Achromobacter* bzw. *Rhodopseudomonas* dar.



**Abbildung 39: Übersicht über die Zugehörigkeit der *nosZ*-besitzenden Bakterien zu taxonomischen Klassen (in Prozent).**

### 3. Ergebnisse

Die Sequenzen stammen fast ausnahmslos von Alphaproteobacteria (s. Abbildung 39). Nur etwa 1,5 % der Sequenzen stammen von Beta- und 0,16 % von Gamma-proteobacteria.



**Abbildung 40: Phylogenetischer Stammbaum der *nosZ*-Sequenzen.**

Es handelt sich um einen Neighbor-Joining-Baum (Bootstrap-Konsensusbaum) basierend auf den translatierten Referenzsequenzen der OTUs auf Speziesebene sowie den Proteinsequenzen der nächstverwandten Organismen. Die Zahlen an den Verzweigungen geben den Prozentsatz der Übereinstimmungen aller Bäume an. Die Dreiecke geben die Herkunft der Sequenzen, aber nicht die Größe der OTUs an. Die Zahlen hinter den Dreiecken geben die Nummer der OTU an (s. Tabelle 55). Der Balken zeigt einen Sequenzunterschied von 5 % an.

Im phylogenetischen Stammbaum sind drei OTUs deutlich von den anderen Sequenzen abgesetzt (s. Abbildung 40). Die Sequenzen aus OTU 11 zeigen hier keine große Verwandtschaft zu den übrigen Sequenzen. OTU 21 hat keine Verzweigung mit Alpha- oder Betaproteobacteria gemeinsam. Sie scheint in eine andere Klasse zu gehören, obwohl sie durch Datenbankabgleich den Alphaproteobacteria zugeordnet wurde. OTU 16 bildet zusammen mit ihrem nächsten verwandten Bakterium eine Gruppe, die sich deutlich von den Proteobacteria absetzt. Diese Bakterien können also auch nicht mithilfe des Stammbaums einer Klasse zugeordnet werden. Dies gilt nicht für OTU 2, die im Baum deutlich bei den Betaproteobacteria gruppiert ist. Hier kann der Stammbaum also Auskunft über die Zugehörigkeit der OTU zu einer Klasse geben.

### Statistische Analyse

Der Einfluss der Bodenparameter auf die *nosZ*-besitzenden Denitrifikantengemeinschaften in den Böden wurde durch multivariate Gradientenanalyse bestimmt. Die DCA ergab Eigenwerte von 0,43 für die 1. Achse und 0,16 für die 2. Achse (s. Tabelle 56). Die Speziesdaten wurden also sehr gut aufgetrennt und die 1. Achse ist deutlich wichtiger als die 2. für die Variation in den *nosZ*-besitzenden Denitrifikantengemeinschaften. Beide Achsen erklären zusammen etwa 39 % der Varianz in den Speziesdaten. Die 3. und 4. Achse sind für die Erklärung der Variation in den *nosZ*-besitzenden Denitrifikantengemeinschaften nicht relevant. Die Länge des Gradienten lag zwischen 2,2 und 1,2. Dieser relativ kurze Gradient zeigt einen homogenen Datensatz an.

**Tabelle 56: Variation und Varianz der Spezieszusammensetzung der *nosZ*-Gensequenzen aus den Böden.**

	Achse 1	Achse 2	Achse 3	Achse 4
Eigenwerte	0,428	0,157	0,015	0,006
Länge des Gradienten	2,198	1,314	1,202	1,566
Varianzanteil der Speziesdaten [%]	28,4	38,8	39,8	40,3

### 3. Ergebnisse

Kanonische Gradientenanalysen mit Permutationstests ergaben Eigenwerte zwischen 0,1 und 0,37 (s. Tabelle 57). Ammonium-, Nitrat- und Wassergehalt korrelierten stark miteinander, ebenso Stickstoff-, Kohlenstoff- und Wassergehalt sowie Vegetationstyp und pH-Wert (Daten nicht gezeigt). Den höchsten Eigenwert für die 1. Achse hatten die Eigenschaften Vegetationstyp (0,37) und pH-Wert (0,37), für die auch ein signifikanter Einfluss auf die Bakteriengemeinschaften ermittelt wurde. Eine CCA mit diesen beiden Eigenschaften als erklärenden Variablen ergab zwei kanonische Achsen mit den Eigenwerten 0,39 und 0,17 (s. Tabelle 58). Auch hier konnte eine gute Auftrennung der Daten erreicht werden. Ebenso wie in der DCA hat die 1. Achse hat mehr Gewicht als die 2. Beide Achsen zusammen erklären etwa 37 % der Varianz in den Speziesdaten.

**Tabelle 57: Korrelation der *nosZ*-Bakteriengemeinschaften und der Bodeneigenschaften.**

Bodeneigenschaften	Eigenwert 1. kanonische Achse	F-Wert	p-Wert
Vegetationstyp	0,371	3,273	0,0005
Landnutzungsintensität	0,098	0,698	0,7849
pH-Wert	0,372	3,281	0,0002
Stickstoffgehalt	0,228	1,783	0,0544
Kohlenstoffgehalt	0,215	1,67	0,1021
Nitratgehalt	0,121	0,877	0,5811
Ammoniumgehalt	0,266	2,146	0,0146
Wassergehalt	0,256	2,048	0,0195

**Tabelle 58: Korrelation der *nosZ*-Bakteriengemeinschaften mit den Umweltvariablen Vegetationstyp und pH-Wert.**

	Achse 1	Achse 2	Achse 3	Achse 4
Eigenwerte	0,39	0,165	0,274	0,216
Varianzanteil der Speziesdaten [%]	25,9	36,9	55,1	69,4
Varianzanteil des Verhältnisses Spezies-Umwelt [%]	70,3	100	0	0

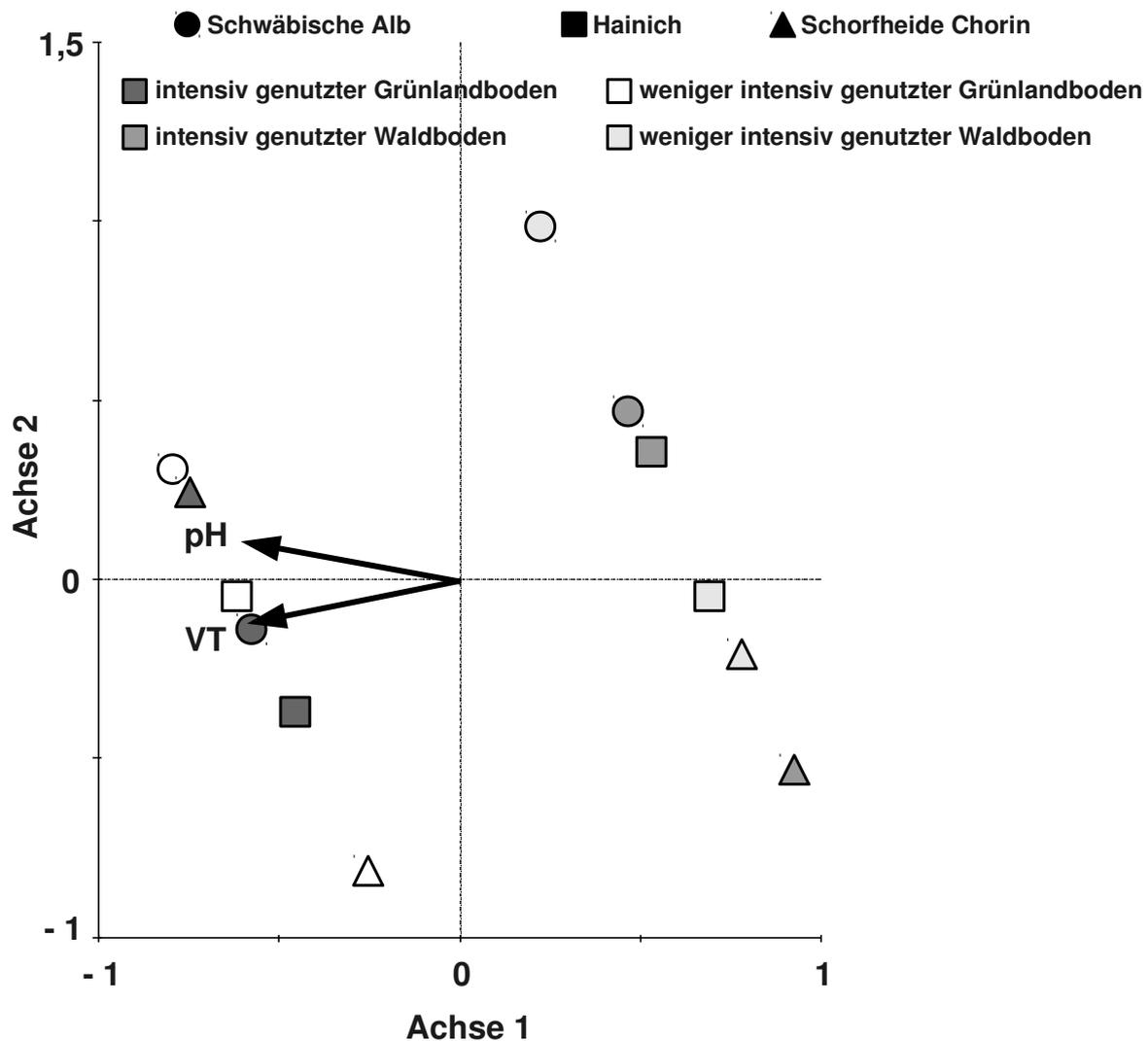


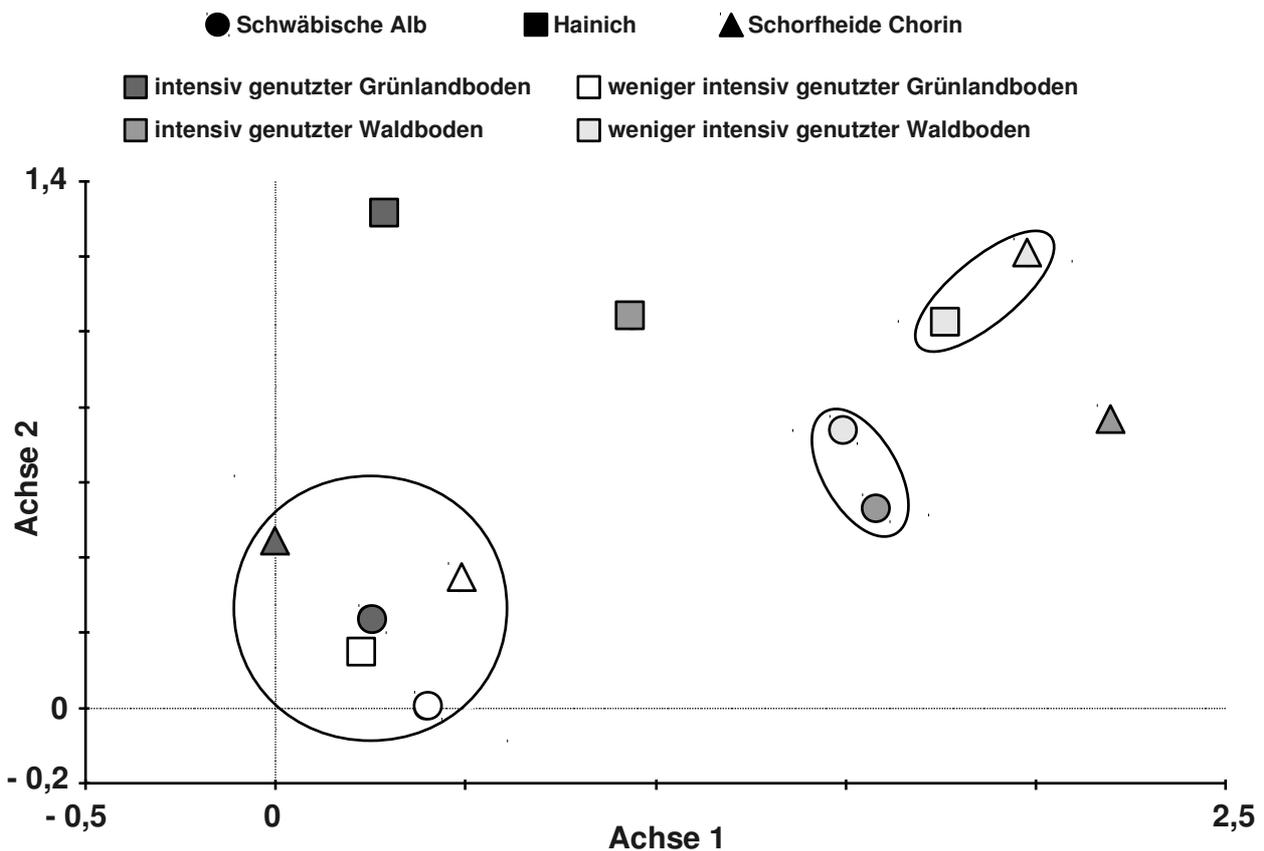
Abbildung 41: CCA der *nosZ*-Speziesdaten mit Vegetationstyp (VT) und pH-Wert als erklärenden Variablen.

- AEG 2   ○ AEG 7   ● AEW 5   ○ AEW 8
- HEG 6   □ HEG 9   ■ HEW 5   □ HEW 12
- ▲ SEG 2   △ SEG 6   ▲ SEW 5   △ SEW 9

Aus dem Biplot-Diagramm der CCA lässt sich entnehmen, dass der Einfluss von Vegetationstyp und pH-Wert auf die Verteilung der *nosZ*-besitzenden Spezies etwa gleich groß ist (s. Abbildung 41). Die große Korrelation von Vegetationstyp und pH-Wert ist ebenfalls klar ersichtlich. Beide Eigenschaften stehen in enger Beziehung zur 1. Achse, während zur 2. Achse fast kein Zusammenhang besteht. Dennoch zeigt sich eine

### 3. Ergebnisse

deutliche Auftrennung der Böden entlang der 2. Achse. Daher muss davon ausgegangen werden, dass eine wichtige Umweltvariable nicht in der Analyse berücksichtigt wurde. Darauf deuten auch die vergleichsweise hohen Eigenwerte der beiden Residualachsen hin (s. Tabelle 58).



**Abbildung 42: DCA der *nosZ*-Speziesdaten.**

Böden mit ähnlichen *nosZ*-Gemeinschaften sind eingekreist.

Ein Vergleich des CCA-Diagramms mit dem Streudiagramm der DCA (s. Abbildung 42) bestätigt diese Vermutung: Es sind auffallende Unterschiede im Verteilungsmuster der Böden zu erkennen. Die durchgeführte CCA ist also nur begrenzt aussagekräftig. Die Ähnlichkeit der Böden bezüglich ihrer *nosZ*-besitzenden Denitrifikantengemeinschaften lässt sich daher am besten aus dem Diagramm der DCA ersehen.

Zwei intensiv genutzte (AEG 2 und SEG 2) und drei weniger intensiv genutzte Grünlandböden (AEG 7, HEG 9 und SEG 6) beinhalten ähnliche *nosZ*-besitzende Denitrifikantengemeinschaften. Fast alle Grünlandböden sind sich darin also ähnlich. Besonders große Übereinstimmung zeigen die Böden AEG 2 und HEG 9. Zwei Waldböden unter weniger intensiver Landnutzung (HEW 12 und SEW 9) beinhalten ähnliche Bakteriengemeinschaften. Diese Böden ähneln sich außerdem in ihren leicht sauren pH-Werten. Auch die beiden Waldböden des Exploratoriums Schwäbische Alb liegen im Diagramm nah beieinander, was ähnliche Spezieszusammensetzungen der Böden anzeigt. Die Denitrifikantengemeinschaften der übrigen Böden weisen keine großen Ähnlichkeiten zu denen anderer Böden auf. Besonders der Boden HEG 6 unterscheidet sich in dieser Beziehung stark von allen anderen Böden. Die Böden SEG 2 und SEW 5 sind im Diagramm mehr als 2 SD-Einheiten voneinander entfernt aufgetragen. Diese Böden haben also höchstens die Hälfte ihrer *nosZ*-beinhaltenen Spezies gemeinsam.

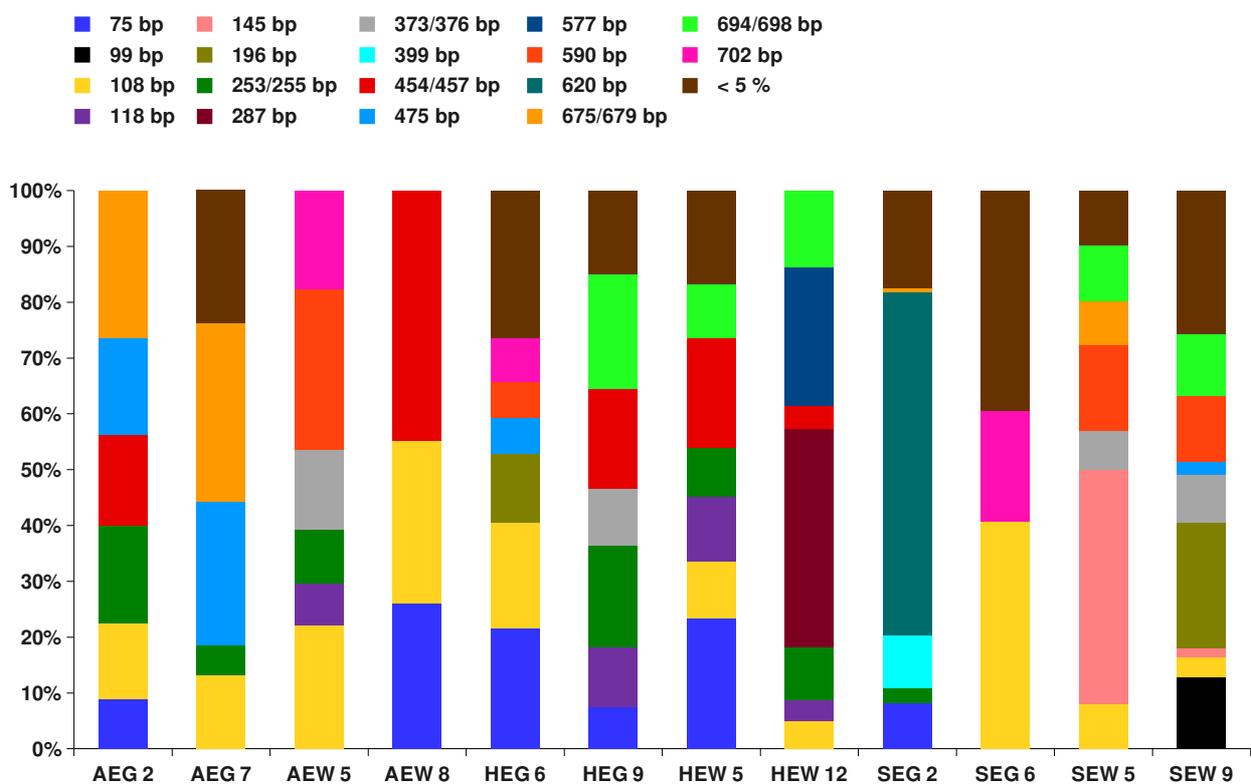
Die Denitrifikantengemeinschaften werden vom Vegetationstyp, dem pH-Wert und weiteren Faktoren, die in dieser Arbeit nicht untersucht wurden, beeinflusst. Alle Grünlandböden bis auf den Boden HEG 6 beinhalten ähnliche *nosZ*-besitzende Denitrifikantengemeinschaften. Dies gilt auch für die Böden AEW 5 und AEW 8 sowie HEW 12 und SEW 9. Die Böden SEG 2 und SEW 5 unterscheiden sich sehr in ihren *nosZ*-Bakteriengemeinschaften. Der Boden HEG 6 unterscheidet sich diesbezüglich deutlich von allen anderen Böden.

#### **Statistische Analyse der *nosZ*-t-RFs**

Die t-RFLP-Analyse der *nosZ*-Bakteriengemeinschaften ergab insgesamt 29 t-RFs, von denen 11 stets eine relative Fluoreszenz unter 5 % zeigten. Die unterschiedliche Häufigkeit der t-RFs deutet auf die verschiedene Diversität der Böden hin. Auch konnten nicht alle

### 3. Ergebnisse

t-RFs in allen Böden detektiert werden. Im Gegenteil: In fünf der Böden wurden nur drei bis sechs der t-RFs gefunden. Fünf der Böden wurden jedoch von einem t-RF dominiert. Außerdem kam keines der t-RFs in allen Böden vor. Am häufigsten waren die 108 bp langen und die 75 bp langen t-RFs, die in neun bzw. sechs Böden vorkamen. Die 702 bp langen Fragmente stellen ungeschnittene *nosZ*-Genfragmente dar, welche nur in drei Böden detektiert wurden. Die höchste Anzahl unterschiedlicher t-RFs wurde im Boden SEW 9 gefunden, die geringste im Boden AEW 8.



**Abbildung 43: Relative Fluoreszenzen der T-RFs amplifizierter, mit *Bsa*HI geschnittener *nosZ*-Genfragmente.**  
t-RFs mit ähnlicher Länge, sowie t-RFs, deren relative Fluoreszenzen stets geringer als 5 % waren, wurden für die Abbildung zusammengefasst.

Auch die *nosZ*-t-RFLP-Daten wurden durch multivariate Gradientenanalyse untersucht. Die DCA ergab einen Eigenwert von 0,5 für die 1. und einen von 0,19 für die 2. Achse (s. Tabelle 59). Die Speziesdaten konnten also sehr gut entlang der 1. Achse aufgetrennt werden. Die 3. und 4. Achse waren mit Eigenwerten unter 0,06 unwichtig für die Erklärung

der Variation in den Speziesdaten. Die ersten beiden Achsen erklären zusammen etwa 33 % der Varianz dieser Daten. Der Gradient mit einer Länge zwischen 3 und 1,3 deutet auf einen verhältnismäßig heterogenen Datensatz hin.

**Tabelle 59: Variation und Varianz der Spezieszusammensetzung der *nosZ*-Gensequenzen aus den Böden.**

	Achse 1	Achse 2	Achse 3	Achse 4
Eigenwerte	0,497	0,191	0,059	0,029
Länge des Gradienten	2,994	2,223	1,35	1,303
Varianzanteil der Speziesdaten [%]	24	33,2	36,1	37,5

Die Durchführung von kanonischen Gradientenanalysen mit Permutationstests ergab Eigenwerte für die 1. Achse zwischen 0,39 und 0,13 (s. Tabelle 60). Für die Eigenschaften Vegetationstyp ( $p = 0,046$ ), pH-Wert ( $p = 0,0006$ ), Ammoniumgehalt (0,009) und Wassergehalt (0,026) wurde ein signifikanter Einfluss auf die Bakteriengemeinschaften aufgezeigt.

**Tabelle 60: Korrelation der *nosZ*-Bakteriengemeinschaften und der Bodeneigenschaften.**

Bodeneigenschaften	Eigenwert 1. kanonische Achse	F-Wert	p-Wert
Vegetationstyp	0,226	1,47	0,0461
Landnutzungsintensität	0,159	0,828	0,7322
pH-Wert	0,393	2,336	0,0006
Stickstoffgehalt	0,145	0,753	0,6168
Kohlenstoffgehalt	0,143	0,742	0,6011
Nitratgehalt	0,264	1,462	0,0976
Ammoniumgehalt	0,374	2,202	0,0087
Wassergehalt	0,304	1,717	0,026

Eine CCA mit diesen Parametern als erklärenden Variablen ergab vier kanonische Achsen mit Eigenwerten von 0,44 und 0,16 für die 1. und 2. Achse (s. Tabelle 61). Die Speziesdaten wurden also, besonders entlang der 1. Achse, sehr gut aufgetrennt. Auch hier sind die 3. und 4. Achse unwichtig für die Erklärung der Variation in den Speziesdaten. Dies zeigt sich auch an dem geringen Varianzanteil, den diese beiden

### 3. Ergebnisse

Achsen erklären. Die ersten beiden Achsen jedoch erklären zusammen etwa 29 % des Varianzanteils der Speziesdaten und 81 % des Varianzanteils des Verhältnisses Spezies-Umwelt. Für die Parameter Ammonium- und Wassergehalt wurde eine perfekte Korrelation ermittelt. Auch die Parameter Vegetationstyp und pH-Wert sowie pH-Wert und Ammoniumgehalt zeigten jeweils eine hohe Korrelation.

**Tabelle 61: Korrelation der *nosZ*-Bakteriengemeinschaften mit den Umweltvariablen Vegetationstyp, pH-Wert, Ammoniumgehalt und Wassergehalt.**

	Achse 1	Achse 2	Achse 3	Achse 4
Eigenwerte	0,441	0,158	0,072	0,065
Varianzanteil der Speziesdaten [%]	21,2	28,9	32,4	35,5
Varianzanteil des Verhältnisses Spezies-Umwelt [%]	59,9	81,4	91,2	100

Dies ist auch im Biplot-Diagramm der CCA deutlich zu erkennen (s. Abbildung 44). Das Diagramm zeigt weiterhin, dass der Einfluss des pH-Werts und des Ammoniumgehalts auf die Verteilung der *nosZ*-besitzenden Denitrifikantengemeinschaften etwa gleich groß ist. Diese beiden Eigenschaften üben den größten Einfluss aus, gefolgt vom Wassergehalt und zuletzt dem Vegetationstyp. Alle erklärenden Variablen stehen hauptsächlich in Zusammenhang mit der 1. Achse. Dennoch besteht auch bei allen Variablen ein mäßiger Bezug zur 2. Achse.

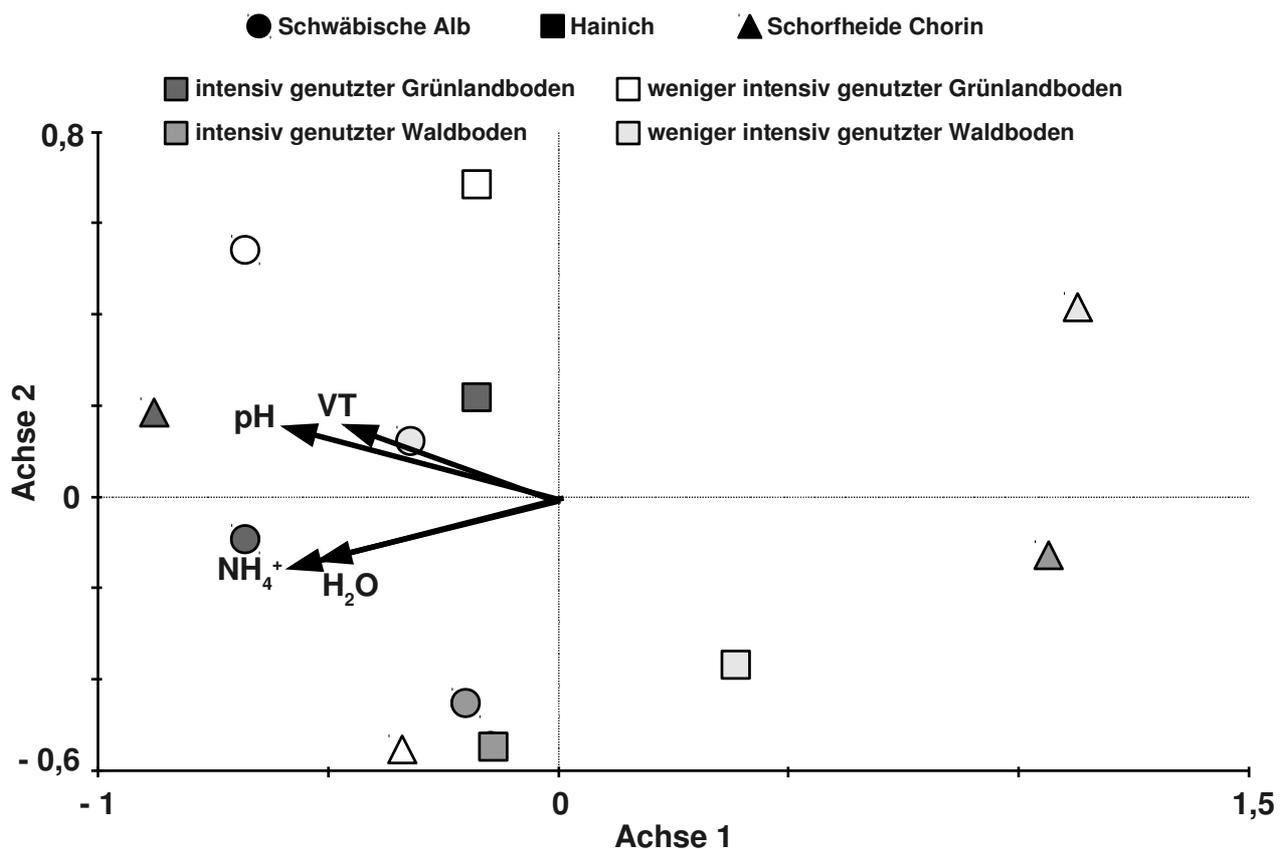
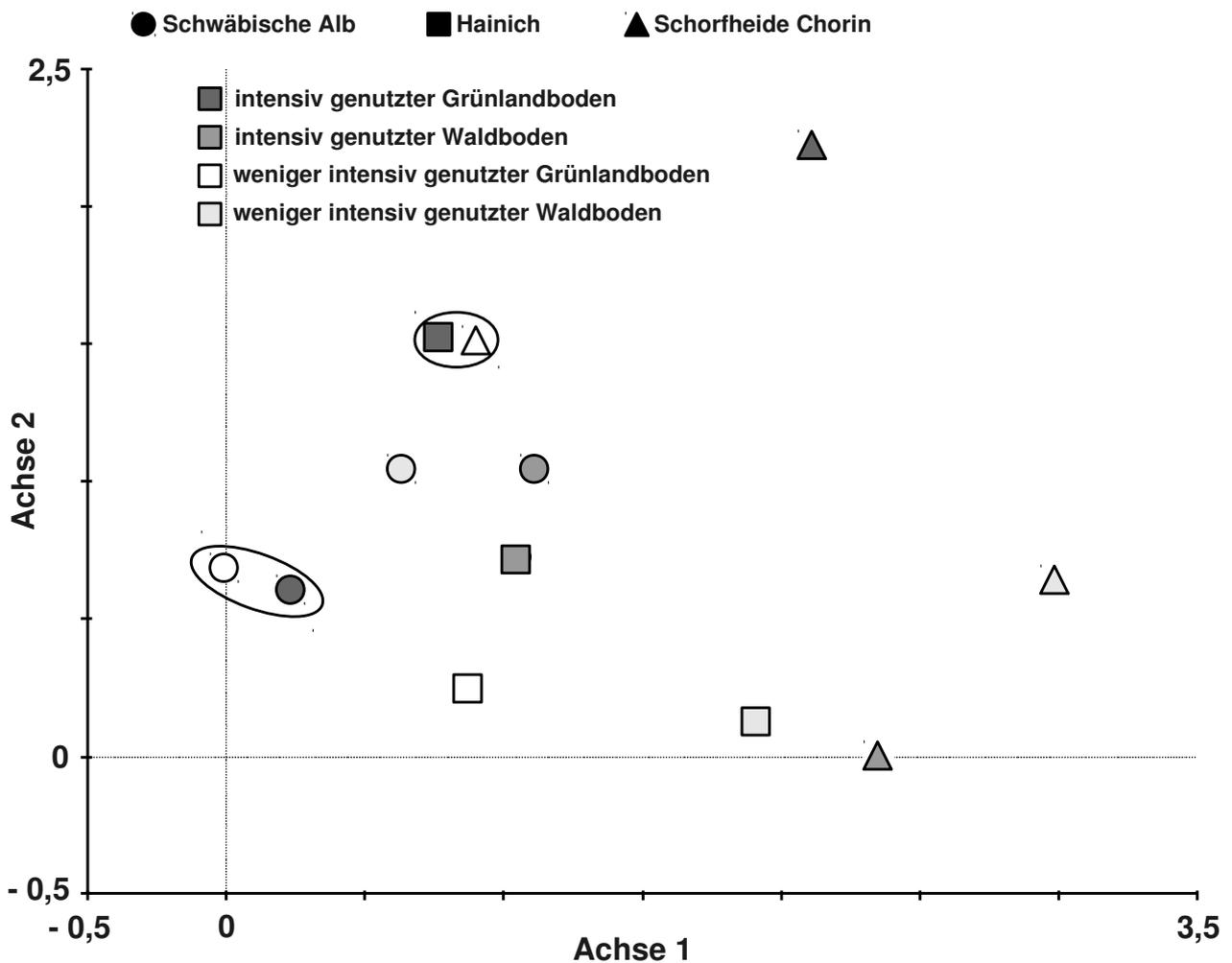


Abbildung 44: CCA der *nosZ*-Speziesdaten mit Vegetationstyp (VT), pH-Wert, Ammoniumgehalt ( $\text{NH}_4^+$ ) und Wassergehalt ( $\text{H}_2\text{O}$ ) als erklärenden Variablen.

- AEG 2   ○ AEG 7   ● AEW 5   ○ AEW 8
- HEG 6   □ HEG 9   ■ HEW 5   □ HEW 12
- ▲ SEG 2   △ SEG 6   ▲ SEW 5   △ SEW 9

Der Vergleich des Streudiagramms der DCA (s. Abbildung 45) mit dem CCA-Diagramm zeigt auffallende Unterschiede in der Verteilung der Böden. Es ist also offensichtlich, dass wichtige Variablen in die CCA-Analyse nicht einbezogen wurden und diese somit nur bedingt aussagekräftig ist. Die Ähnlichkeit der Böden bezüglich ihrer *nosZ*-besitzenden Denitrifikantengemeinschaften wird daher am besten aus dem Diagramm der DCA abgelesen.

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 45: DCA der *nosZ*-Speziesdaten.**

Böden mit ähnlichen *nosZ*-Gemeinschaften sind eingekreist.

- AEG 2   ○ AEG 7   ● AEW 5   ○ AEW 8
- HEG 6   □ HEG 9   ■ HEW 5   □ HEW 12
- ▲ SEG 2   △ SEG 6   ▲ SEW 5   △ SEW 9

Die *nosZ*-Bakteriengemeinschaften der Grünlandböden des Exploratoriums Schwäbische Alb ähneln sich sehr stark. Dies gilt auch für die Gemeinschaften eines Grünlandbodens unter intensiver (HEG 6) und eines unter weniger intensiver Landnutzung (SEG 6). Auch zwei intensiv genutzte Waldböden (AEW 5 und HEW 5) und ein weniger intensiv genutzter Waldboden (AEW 8) sowie ein weniger intensiv genutzter Grünlandboden (HEG 9) beherbergen relativ ähnliche *nosZ*-besitzende Denitrifikantengemeinschaften wie die vier vorgenannten Böden. Von diesen acht Böden unterscheiden sich die übrigen vier sehr

deutlich. Besonders der Boden SEG 2 ist deutlich von allen anderen Böden abgesetzt. Mit drei Böden unterschiedlicher Landnutzung (HEG 9, HEW 12 und SEW 5) hat er nur etwa die Hälfte seiner *nosZ*-besitzenden Denitrifikantenspezies gemeinsam und unterscheidet sich auch von den übrigen Böden in dieser Hinsicht beträchtlich.

Ausgehend von den t-RFLP-Daten wurden für die *nosZ*-Bakteriengemeinschaften pH-Wert, Ammoniumgehalt, Wassergehalt, Vegetationstyp und weitere in dieser Arbeit nicht untersuchte Parameter als Einflussfaktoren ermittelt. Die Böden AEG 2 und AEG 7 sowie HEG 6 und SEG 6 enthalten jeweils sehr ähnliche *nosZ*-besitzende Denitrifikantengemeinschaften. Der Boden SEG 2 unterscheidet sich stark bezüglich seiner *nosZ*-Bakteriengemeinschaften von allen anderen Böden.

## 4. Diskussion

### 4.1 Abhängigkeit der potentiellen Denitrifikationsraten vom pH-Wert

Die maximalen potentiellen Denitrifikationsraten lagen zwischen  $0,1 \mu\text{mol} (\text{N}_2\text{O}) \text{ h}^{-1} \text{ g}_{\text{TG}}^{-1}$  und  $164,7 \mu\text{mol} (\text{N}_2\text{O}) \text{ h}^{-1} \text{ g}_{\text{TG}}^{-1}$ , das entspricht  $0,44 \mu\text{g}$  bis  $7,2 \text{ mg} (\text{N}_2\text{O}) \text{ h}^{-1} \text{ g}_{\text{TG}}^{-1}$ . In argentinischen Böden wurden  $0,14$  bis  $113,36 \mu\text{g} (\text{N}_2\text{O}-\text{N}_2) \text{ h}^{-1} \text{ g}_{\text{TG}}^{-1}$  (Rosa *et al.*, 2014) und in neuseeländischen Böden  $2,9$  bis  $21,8 \mu\text{g} (\text{N}_2\text{O}-\text{N}) \text{ g}_{\text{FG}}^{-1} \text{ h}^{-1}$  gemessen (Morales *et al.*, 2015). Die hier gemessenen geringeren Werte erklären sich aus unterschiedlicher Methodik. So wurden die potentiellen Denitrifikationsraten über unterschiedliche Zeiträume aufgenommen und die Mikrokosmen auch unterschiedlich vorbehandelt und supplementiert. Weiterhin erfolgten die Probenahmen der vorliegenden Arbeit im Frühling, die der beiden anderen Studien jedoch im Winter bzw. von August bis Dezember. Die potentiellen Denitrifikationsraten variieren jedoch im Laufe eines Jahres (Barton *et al.*, 1999). Andererseits ist es auch möglich, dass sich die Denitrifikationsaktivitäten der in dieser Arbeit untersuchten Böden stark von denen anderer Böden unterscheiden. So ist es z.B. bekannt, dass auch innerhalb eines Bodenbohrkernes Zonen hoher und geringer Denitrifikationsaktivität vorkommen (Murray *et al.*, 1995). Eine große Heterogenität der Denitrifikationsaktivität in Böden unterschiedlicher Regionen ist daher wahrscheinlich.

Der Einfluss des pH-Wertes auf die Denitrifikation ist schon lange bekannt (Knowles, 1982) und wurde immer wieder nachgewiesen (Simek und Cooper, 2002). Auch in dieser Arbeit konnte ein deutlicher Zusammenhang zwischen dem pH-Wert und der potentiellen Denitrifikationsaktivität gezeigt werden. Die potentiellen Denitrifikationsraten der hier unter-

suchten Böden unterscheiden sich in Bezug auf ihre *in situ* pH-Werte (s. Abschnitt 3.2). Der pH-Wert dieser Böden beeinflusst also die potentielle Denitrifikationsaktivität. Die potentiellen Denitrifikationsraten der Böden unterscheiden sich weiterhin in Bezug auf die bei den Messungen vorherrschenden pH-Werte. Der Einfluss des pH-Wertes auf die Denitrifikation ist also so groß, dass seine Änderung sich sofort auf die potentielle Denitrifikationsaktivität auswirkt. In dieser Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass sich der pH-Wert, bei dem die höchste potentielle Denitrifikationsrate eines Bodens erreicht wurde, nicht signifikant vom *in situ* pH-Wert des Bodens unterscheidet. Dies zeigt eine deutliche Anpassung der Denitrifikantengemeinschaften an den pH-Wert ihrer Umgebung, welche auch schon in anderen Studien gefunden wurde (Firestone *et al.*, 1980; Palmer *et al.*, 2010; Simek und Cooper, 2002).

In dieser Arbeit wurde außerdem gezeigt, dass sich der Vegetationstyp und die Landnutzungstintensität interagierend auf die potentiellen Denitrifikationsraten der Böden auswirken. Es ist bekannt, dass die Denitrifikationsraten durch Düngung bzw. Stickstoffzugabe (z.B. auch durch Beweidung) erhöht werden (Barton *et al.*, 1999; Wallenstein *et al.*, 2006). Auch werden in landwirtschaftlich genutzten Böden höhere jährliche Denitrifikationsraten erwartet als in Waldböden (Barton *et al.*, 1999). Die potentielle Denitrifikationsaktivität steht auch in einem starken Zusammenhang mit der strukturellen Bodenstabilität (Rosa *et al.*, 2014). Diese Faktoren sind Teilaspekte der Landnutzung. Es konnte daher in dieser Arbeit gezeigt werden, dass diese ebenso wie weitere bisher nicht untersuchte Aspekte menschlicher Eingriffe in die Bodenökologie einen starken Einfluss auf die potentielle Denitrifikationsaktivität ausüben.

## 4.2 Zellzahlen der Nitratreduzierer und Denitrifikanten

In Grünlandböden der gemäßigten Klimazonen wird die Anzahl der Prokaryoten auf  $2 \times 10^9$  Zellen  $g^{-1}$  Boden und in Laubwaldböden auf  $4 \times 10^7$  Zellen  $g^{-1}$  Boden veranschlagt (Whitman *et al.*, 1998). In dieser Arbeit wurden durchschnittlich  $1,6 \times 10^7$  Nitratreduzierer  $g^{-1}$  Trockengewicht in den Grünwaldböden und  $7,5 \times 10^5$  Nitratreduzierer  $g^{-1}$  Trockengewicht in den Waldböden ermittelt. Zwischen der gemessenen Zahl der Nitratreduzierer und der zu erwartenden Gesamtzahl der Bakterien liegen also zwei Größenordnungen. Ein Unterschied von bis zu zwei Größenordnungen zwischen *narG*-Genkopienzahl und der Zahl der 16S rRNA-Genkopien wird häufig beobachtet (Philippot, 2005) und entspricht somit den Erwartungen.

Von den in dieser Arbeit untersuchten Bodenproben wurden in einer Bachelorarbeit auch die *narG* und *nosZ*-Genkopien in den Böden quantifiziert (Hink, 2011). Durchschnittlich wurden  $4 \times 10^9$  *narG*-Genkopien  $g^{-1}$  Trockengewicht in den Grünlandböden und  $3,8 \times 10^9$  *narG*-Genkopien  $g^{-1}$  Trockengewicht in den Waldböden gemessen. In einer Studie französischer Kulturböden wurden  $2 \times 10^8$  *narG*-Genkopien  $g^{-1}$  Trockengewicht detektiert (Henry *et al.*, 2006). Die Reduktion von Nitrat zu Nitrit wird von einer von zwei Nitratreduktasen katalysiert, welche durch das *narG*- bzw. das *napA*-Gen kodiert werden (Zumft, 1997). Die alleinige Quantifizierung der *narG*-Gene kann daher nicht die Zahl aller DNRA erfassen. Dennoch ist die Zahl der *narG*-Genkopien um zwei bis vier Zehnerpotenzen höher als die in dieser Arbeit ermittelten Nitratreduzierer-Zellzahlen. Hier zeigt sich deutlich der Unterschied zwischen kultivierungsbasierten (MPN) und kultivierungsunabhängigen Methoden (qPCR). Da bisher nicht alle Bakterien kultiviert werden können, können mit kultivierungsbasierten Methoden nicht alle im Boden vorhandenen Bakterien erfasst werden. Außerdem können Bakterien mehrere, bis zu drei, *narG*-Kopien besitzen

(Philippot, 2002), wodurch mit kultivierungsunabhängigen Methoden bestimmte Zellzahlen die wahre Anzahl der *narG*-besitzenden Bakterien überschätzen können.

Die Abundanz der Nitratreduzierer in den untersuchten Böden wird weder vom Vegetationstyp noch von der Landnutzungsintensität beeinflusst. Dies deckt sich mit Studien der *narG*-Abundanz, die in den gleichen Böden durchgeführt wurden (Hink, 2011; Keil *et al.*, 2011). Die Abundanz des *napA*-Gens ist jedoch in Grünlandböden mit höherer Landnutzungsintensität geringer als in Grünlandböden mit geringerer Landnutzungsintensität (Keil *et al.*, 2011). Die Quantifizierung der Nitratreduzierer mit der MPN-Methode erfasst jedoch alle nitratreduzierenden Organismen und kann diesen Unterschied daher nicht aufzeigen. Dagegen werden mit dieser Methode die Abundanzen der Nitratreduzierer unabhängig von der Art und der Anzahl ihrer Nitratreduktasegene ermittelt.

Bei pH 4 wurden durchschnittlich  $3,4 \times 10^4$  Denitrifikanten  $\text{g}^{-1}$  Trockengewicht in Grünlandböden und  $1,5 \times 10^4$  Denitrifikanten  $\text{g}^{-1}$  Trockengewicht in Waldböden gemessen. Bei pH 6 waren es durchschnittlich  $3,3 \times 10^4$  Denitrifikanten  $\text{g}^{-1}$  Trockengewicht in Grünlandböden und  $2,4 \times 10^4$  Denitrifikanten  $\text{g}^{-1}$  Trockengewicht in Waldböden und bei pH 6  $5 \times 10^9$  Denitrifikanten  $\text{g}^{-1}$  Trockengewicht in Grünlandböden und  $1,3 \times 10^8$  Denitrifikanten  $\text{g}^{-1}$  Trockengewicht in Waldböden. Der Vergleich mit den Nitratreduzierer-Zellzahlen ist nicht sehr einfach möglich, da diese in einem Medium mit pH 6,5 ermittelt wurden und der pH-Wert des Kulturmediums einen deutlichen Einfluss auf die Zellzahlen hat (Both *et al.*, 1990).

Auffällig ist, dass die Zellzahlen in den Medien mit pH 4 und 6 sehr gering waren, während bei pH 8 die Zellzahlen durchschnittlich sogar höher waren als die Nitratreduzierer-Zellzahlen. Aus vielen anderen Studien ist bekannt, dass die mit der MPN-Methode ermittelten Nitratreduzierer-Zellzahlen meist etwas höher sind als die Zellzahlen von Denitrifikanten (Tiedje, 1988). Dies gilt auch für mit kultivierungsunabhängigen Methoden bestimmte

#### 4. Diskussion

Abundanzen. So wurden in der oben genannten Bachelorarbeit durchschnittlich  $5,4 \times 10^6$  *nosZ*-Genkopien  $g^{-1}$  Trockengewicht in Grünlandböden und  $2,8 \times 10^6$  *nosZ*-Genkopien  $g^{-1}$  Trockengewicht in Waldböden detektiert (Hink, 2011) und in der Studie französischer Kulturböden  $10^7$  *nosZ*-Genkopien  $g^{-1}$  Trockengewicht gemessen (Henry *et al.*, 2006). Bei den kultivierungsunabhängigen Quantifizierungsmethoden kann dies durch die mögliche höhere Anzahl der *narG*-Gene pro Zelle erklärt werden, während bisher keine Bakterien bekannt sind, die mehr als eine *nosZ*-Genkopie enthalten (Philipot, 2002). Außerdem unterscheiden sich die verwendeten Primer möglicherweise in ihrer Universalität. Man geht jedoch davon aus, dass sich in Böden mehr Denitrifikanten als DNRA befinden (Tiedje *et al.*, 1982). Es werden dennoch mehr Bakterien auf Nitrat als auf Nitrit bzw. mehr *narG*- als *nosZ*-Genkopien detektiert, da sowohl DNRA als auch viele Denitrifikanten Nitrat reduzieren können und somit auch diese zu den Nitratreduzieren gezählt werden.

Bei Wachstum auf Medium mit pH 4 bzw. 6 wurde kein signifikanter Einfluss des Vegetationstyps und der Landnutzungsintensität auf die Denitrifikantenzellzahlen gefunden. Bei Wachstum auf Medium mit pH 8 konnte jedoch ein signifikanter Einfluss des Vegetationstyps festgestellt werden. Dies kann damit erklärt werden, dass Waldböden generell niedrigere pH-Werte haben als Grünlandböden (Tiedje *et al.*, 1982). Wenn die in diesen Böden lebenden Denitrifikanten an die *in situ* pH-Werte ihrer natürlichen Umgebung angepasst sind, kann erwartet werden, dass sie in Medium mit relativ niedrigen pH-Werten wie pH 4 und 6 ebenso gut wachsen wie Denitrifikanten aus Grünlandböden. In Medium mit einem vergleichsweise hohen pH-Wert wie pH 8 würden sie schlechter wachsen, als Denitrifikanten aus Böden mit höherem *in situ* pH-Wert.

Die vorliegende Arbeit zeigte einen Zusammenhang zwischen den Zellzahlen der Denitrifikanten und des Vegetationstyps, jedoch nicht zwischen den Nitratreduzierer-Zellzahlen und des Vegetationstyps. Es wurden zwei verschiedene Vegetationsarten

untersucht: Grünland- und Waldböden. Ein wichtiger Unterschied zwischen den beiden Bodenarten ist der pH-Wert. Dieser ist in Waldböden tendenziell geringer als in Grünlandböden (Tiedje *et al.*, 1982). Auch die hier untersuchten Waldböden hatten geringere pH-Werte als die Grünlandböden des gleichen Exploratoriums (s. Abschnitt bla). Der pH-Wert gilt als der Haupteinflussfaktor im Boden (Brady und Weil, 1999). Es ist daher möglich, dass der große Einfluss des Vegetationstyps mit dem Boden-pH-Wert zusammenhängt. Im Gegensatz zu DNRA werden Denitrifikanten besonders durch den pH-Wert ihrer Umgebung beeinflusst, da bei niedrigen pH-Werten weniger funktionstüchtige Moleküle der N<sub>2</sub>O-Reduktase gebildet werden (Bergaust *et al.*, 2010).

Die DCA der Zellzahldaten von Nitratreduzierer und Denitrifikanten ergab für die 1. Achse einen Eigenwert von 0,333 und für die übrigen Achsen Eigenwerte unter 0,005 (s. Abschnitt 3.3.2). Die 1. Achse ist also ausreichend für die Erklärung der Zellzahldaten. Sie erklärt 48 % der Varianz der Zellzahldaten. Der Datensatz ist sehr homogen, was aus der geringen Länge des Gradienten (1,823 SD-Einheiten für die 1. Achse) hervorgeht. Dies bedeutet, dass sich die Böden in Bezug auf ihre Zellzahlen nur sehr wenig unterscheiden. Dies zeigt sich auch deutlich im DCA-Streudiagramm (s. Abbildung 8). Dabei gibt es drei Gruppen von Böden, die sich besonders ähnlich sind. Für die untersuchten Bodeneigenschaften konnte jedoch keine signifikante Korrelation mit den Nitratreduzierer- und Denitrifikantenzellzahlen ermittelt werden. Die Faktoren durch die sich die Böden in Bezug auf ihre Zellzahlen ähneln bzw. unterscheiden wurden in dieser Analyse also nicht gefunden.

In vielen Studien wurde eine positive Korrelation von Bakterien zum Boden-pH-Wert gefunden (Lauber *et al.*, 2009; Nacke *et al.*, 2011). Dies gilt besonders auch für Denitrifikanten. In einer Studie südböhmischer Böden waren die Genkopienzahlen von *narG*, *napA*, *nirK*, *nirS* und *nosZ* in einem neutralen Boden immer höher als in einem

#### 4. Diskussion

sauren Boden (Cuhel *et al.*, 2010). Auch in nordschwedischen Böden waren die *nirK*, *nirS* und *nosZ*-Genkopienzahlen positiv mit dem Boden-pH-Wert korreliert (Liu *et al.*, 2010). In einem Langzeitexperiment über einen Boden-pH-Gradienten konnte jedoch nur ein mäßiger Effekt des *in situ* pH-Wertes auf die Bakterienabundanz festgestellt werden (Rousk *et al.*, 2010). In 20 Grünlandböden in Australien war die Abundanz der *narG*-Genkopien positiv mit dem Stickstoff-, Nitrat- und Phosphatgehalt des Bodens und die *nirK*-Genkopienzahl mit dem Stickstoffgehalt und dem pH-Wert des Bodens korreliert (Lindsay *et al.*, 2010). Andere Studien legen jedoch nahe, dass die Abundanz von Denitrifikanten nicht vom Nitratgehalt des Bodens kontrolliert wird (Mergel *et al.*, 2001; Wallenstein *et al.*, 2006). In einer Untersuchung der Zusammenhänge zwischen Bodeneigenschaften und Denitrifikanten stand die *nirS*-Genkopienzahl mit Sand- und Tongehalt, Kationenaustauschkapazität, Aggregatdichte, Aggregatvolumen und Gehalt an austauschbaren Natrium- und Kalziumionen in Zusammenhang, während für die *nirK*-Genkopienzahl ein Zusammenhang mit dem Sandgehalt und dem Gehalt an austauschbaren Kalziumionen gezeigt wurde (Rosa *et al.*, 2014).

Im Unterschied zu den oben genannten Studien wurde in der vorliegenden Arbeit kein Zusammenhang zwischen den untersuchten Bodeneigenschaften und der Anzahl der Nitratreduzierer und Denitrifikanten im Boden gefunden. Dies ist möglicherweise bedingt durch die Verwendung einer kultivierungsbasierten Methode im Gegensatz zur in den obigen Beispielen verwendeten kultivierungsunabhängigen Methode. Die Bedingungen im Kulturmedium haben einen großen Einfluss auf die ermittelten Zellzahlen (Both *et al.*, 1990). Dies könnte dazu führen, dass mögliche Einflüsse der Bodeneigenschaften nicht mehr erkannt werden können. Um dieses Problem zu umgehen wurden für die multivariate Analyse Zellzahldaten, die mit fünf verschiedenen Medien ermittelt worden waren, eingesetzt. Die Medien variierten im pH-Wert und in der Stickstoffquelle (Nitrat bzw. Nitrit), so dass die Analyse nicht von diesen beiden Parametern beeinflusst ist. Jedoch umfasst

die Analyse sowohl die Zellzahlen der Nitratreduzierer als auch der Denitrifikanten. Die univariaten Analysen der Zellzahldaten ergaben einen Zusammenhang des Vegetationstyps mit den Denitrifikantenzellzahlen, jedoch nicht mit den Nitratreduzierer-Zellzahlen (s. oben). Dies deutet darauf hin, dass es Faktoren gibt, welche nur mit einer der beiden Gruppen in Zusammenhang stehen. Die gemeinsame Analyse der Zellzahldaten beider Gruppen könnte also zur Folge haben, dass mögliche Einflussfaktoren auf eine der beiden Gruppen nicht erkannt werden können. Die Zellzahlen von Nitratreduzierer und Denitrifikanten sollten daher eher getrennt untersucht werden.

### **4.3 Isolierung von Nitratreduzierer, Denitrifikanten und DNRA**

Die Kultivierung neuartiger Bakterien ist schwierig. Mit den gängigen Methoden werden nur leicht zu kultivierende Organismen erhalten, welche meist schon lange bekannt sind. Diese machen wahrscheinlich nur 1 % der existierenden Bakterienarten aus (Amann *et al.*, 1995). Der Großteil der Bakterienarten bleibt unkultiviert (Amann *et al.*, 1995). Dennoch kann auf die Kultivierung von Mikroorganismen nicht verzichtet werden. Zur Untersuchung von deren Stoffwechsel und Funktion im Ökosystem werden Reinkulturen benötigt (Nichols *et al.*, 2008). Daher wird immer weiter an Verbesserungen der Kultivierungstechniken gearbeitet. Die Kultivierungsbedingungen werden dabei möglichst an die Bedingungen in den natürlichen Habitaten der Bakterien angepasst. Häufig angewandte Techniken sind z.B. die Verwendung nährstoffarmer Nährmedien (Hashimoto *et al.*, 2009; Janssen *et al.*, 2002; Watve *et al.*, 2000), verlängerte Inkubationszeiten (Davis *et al.*, 2005; Stevenson *et al.*, 2004), Anpassungen an die Temperatur (Braker *et al.*, 2010; Heylen *et al.*, 2006) und den pH-Wert des Habitats (Heylen *et al.*, 2006; Sait *et al.*, 2006), die Zugabe von Wachstumsfaktoren (Bruns *et al.*, 2002; Stevenson *et al.*, 2004)((Nichols *et*

## 4. Diskussion

*al.*, 2008) und die Cokultur mehrerer Spezies (Kaeberlein *et al.*, 2002; Nichols *et al.*, 2008). Für die Kultivierung von Bodenbakterien hat sich besonders die Verwendung von Erdextrakt im Kultivierungsmedium bewährt (Balestra und Misaghi, 1997; Hamaki *et al.*, 2005).

Kim Haylen und Kollegen erforschten die Kultivierungsbedingungen zur Untersuchung der Diversität von Denitrifikanten (Heylen *et al.*, 2006). Die in dieser Studie ermittelten optimalen Kultivierungsbedingungen für Denitrifikanten bildeten die Grundlage für die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Kultivierungsansätze. Abweichend davon betrug die Inkubationszeit jedoch immer zehn anstatt nur zwei Wochen.

### **4.3.1 Isolierung von Nitratreduzieren, Denitrifikanten und DNRA aus CFU-Anreicherungen**

In einer vorausgegangenen Arbeit waren die Keimzahlen der hier untersuchten Böden mittels CFU auf DM-Medium bestimmt worden (Haedicke, 2008). Die so erhaltenen Kolonien wurden auf DM-Medium aufgereinigt und 97 Isolate aus 19 OTUs erhalten, die zu 12 Familien gehören (s. Abschnitt 3.4.1).

Bei diesem Ansatz handelt es sich um den einfachsten in dieser Arbeit angewandten Kultivierungsansatz. Dennoch wurden Isolate aus 12 Familien erhalten und so sehr leicht ein Einblick in die Diversität der Böden erlangt werden. Dies zeigt die Eignung der gewählten Kultivierungsbedingungen zur Untersuchung der Diversität von Nitratreduzieren, Denitrifikanten und DNRA in Böden.

### 4.3.2 Isolierung von Denitrifikanten bei unterschiedlichen pH-Werten

Der pH-Wert ist ein kritischer Faktor für die Kultivierung von Bakterien (Janssen, 2008). Für die Kultivierung von Denitrifikanten beträgt der optimale pH-Wert 7 (Heylen *et al.*, 2006). Dabei handelt es sich jedoch um einen mit Proben von Belebtschlamm statistisch ermittelten Wert, der möglicherweise nicht für alle Denitrifikanten gilt. Bisher nicht kultivierte Bakterien lassen sich oft in Medien mit einem pH-Wert, der ihrem *in situ* pH-Wert entspricht, isolieren (Sait *et al.*, 2006). Daher wurden in der vorliegenden Arbeit Denitrifikanten auch bei verschiedenen pH-Werten isoliert. Dazu wurden Medien mit den pH-Werten 4, 6 oder 8 verwendet. Außerdem wurde Nitrit anstelle von Nitrat als Elektronenakzeptor und Gellan anstelle von Agar als Geliermittel verwendet. Gellan wurde verwendet, da Agar bei einem pH-Wert unter 5 nicht mehr vollständig aushärtet. Außerdem konnten in einer Vergleichsstudie von Agar und Gellan auf Gellan mehr Bakterien kultiviert werden als auf Agar (Davis *et al.*, 2005).

Die *in situ* pH-Werte der untersuchten Böden lagen zwischen 4,0 und 7,6 (s. Abschnitt 3.1.1). Dennoch wurden nur bei pH 8 Isolate erhalten (s. Abschnitt 3.4.2). Die 43 erhaltenen Isolate wurden fünf OTUs zugeordnet. Dies ist sehr wenig im Vergleich zu den bei den verschiedenen pH-Werten bestimmten Zellzahlen (s. Abschnitt 3.3.2). Dies kann daran liegen, dass in den Anreicherungen vorhandene Wachstumsfaktoren beim Ausplattieren auf Festmedium verloren gingen (s. oben). Beim ersten Ausplattieren werden möglicherweise auch in den Böden vorhandene Verbindungen aufgebracht, die als Wachstumsfaktoren für manche Bakterien dienen. Bei jeder Übertragung auf neues Medium würden immer mehr dieser Wachstumsfaktoren verloren gehen. Auf diese Verbindungen angewiesene Bakterien können dann nicht mehr wachsen. Der Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Kultivierbarkeit von Bakterien wurde schon oft gezeigt (Bruns *et al.*, 2002; Kaeberlein *et al.*, 2002; Nichols *et al.*, 2008) und scheint auch hier eine große

#### 4. Diskussion

Rolle zu spielen. Weiterhin ist es auch möglich, dass mikrobielle Konsortien durch das Ausplattieren getrennt wurden und die zellen nun alleine nicht mehr wachsen können.

Die hier verwendeten Medien hatten pH-Werte im Bereich der *in situ* pH-Werte der untersuchten Böden. So sollten Bakterien, die gut an ihren Umgebungs-pH-Wert angepasst sind, isoliert werden. Dennoch konnten mit den Medien DN4 (pH-Wert 4) und DN6 (pH-Wert 6) keine Isolate erhalten werden. Offensichtlich waren andere der hier verwendeten Kultivierungsbedingungen nicht geeignet, um Bakterien die an pH-Werte unter 7 angepasst sind aus den untersuchten Böden zu isolieren. Solche Bakterien benötigen vielleicht eine noch längere Inkubationszeit (Sait *et al.*, 2006) oder eine andere Mediumszusammensetzung.

#### **4.3.3 Isolierung unter selektiven Bedingungen für oligophile**

##### **Denitrifikanten und DNRA**

Die 'Unkultivierbarkeit' vieler Bakterien liegt möglicherweise auch darin begründet, dass sich klassische Kultivierungsbedingungen stark von den Bedingungen in den natürlichen Habitaten der Bakterien unterscheiden. Man geht davon aus, dass sich nur ein geringer Prozentsatz der Mikroorganismen an diese veränderten Bedingungen anpassen und dadurch kultiviert werden kann (Keller und Zengler, 2004). Die meisten Habitate sind viel nährstoffärmer als die klassischen Nährmedien (Vartoukian *et al.*, 2010). Hohe Nährstoffkonzentrationen hemmen daher wahrscheinlich das Wachstum vieler Bakterien (Watve *et al.*, 2000). Ein aussichtsreicher Kultivierungsansatz ist daher die Verwendung nährstoffarmer (oligotropher) Medien (Connon und Giovannoni, 2002; Davis *et al.*, 2005; Zengler *et al.*, 2002).

Die Isolierung unter oligotrophen Bedingungen erfolgte mit 1:10-verdünntem DN-Medium,

dem Erdextrakt oder 1:10-verdünnter Erdextrakt zugegeben wurde. Mit diesem Ansatz wurden 146 Isolate erhalten, welche in 23 OTUs eingeordnet wurden. Der Ansatz eignet sich offenbar zur Isolierung einer Vielzahl verschiedener Spezies an Bodenbakterien. Die meisten Isolate gehörten zu den Proteobacteria und den Firmicutes, zwei Phyla aus denen bisher die meisten Denitrifikanten und DNRA isoliert wurden (Gamble *et al.*, 1977; Heylen *et al.*, 2006). Auch konnten keine neuartigen, bisher unkultivierten Isolate erhalten werden. In anderen Studien konnten mit verdünntem Medium bisher unkultivierte Bakterien isoliert werden (Davis *et al.*, 2005; Janssen *et al.*, 2002). In diesen Studien wurden Bodenbakterien unter oxischen Bedingungen kultiviert. Mit dem vorliegenden Ansatz sollten jedoch selektiv Denitrifikanten und DNRA aus Böden isoliert werden. Deshalb wurde unter anoxischen Bedingungen und mit Nitrit als alleinigem Elektronenakzeptor kultiviert. Unter diesen Bedingungen können Bakterien sehr viel weniger Energie gewinnen (Stouthamer *et al.*, 1982) und wachsen daher auch langsamer als unter oxischen Bedingungen. Möglicherweise ist unter anoxischen Bedingungen eine weitaus längere Inkubationszeit erforderlich, um bisher unkultivierte Spezies zu isolieren.

Mit der Kultivierung unter oligotrophen Bedingungen konnte ein guter Einblick in die Diversität der Denitrifikanten und DNRA in den untersuchten Böden erhalten werden.

### **4.3.4 Isolierung unter selektiven Bedingungen für ammonifizierende und denitrifizierende Archaeen**

Archaeen sind, obwohl oft vernachlässigt, in allen Ökosystemen zu finden (Übersicht in (Olsen, 1994). Gene für respiratorische Nitrat- und Nitrit- NO- und N<sub>2</sub>O-Reduktasen (*narG*, *nirK*, *nirS*, *nor* und *nos*) sind sowohl aus Euryarchaeota als auch aus Crenarchaeota bekannt (Cabello *et al.*, 2004) und mit *Pyrococcus fumarii* existiert auch ein crenarchaeeller Nitratreduzierer (Blöchl *et al.*, 1997). Bisher sind jedoch nur halophile und extrem thermo-

#### 4. Diskussion

phile archaeelle Nitratreduzierer, Denitrifikanten und DNRA bekannt (Cabello *et al.*, 2004). Archaeen in mesophilen Böden sind immer noch nicht gut untersucht (Schleper *et al.*, 2005). Die Möglichkeit, dass in mesophilen Böden bisher unbekannte archaeelle Denitrifikanten und DNRA vorkommen, sollte daher nicht außer Acht gelassen werden.

Zur selektiven Anreicherung von Archaeen wurden die Bodenaufschlämmungen mit Lysozym und EDTA behandelt. Diese Mischung greift die Zellwand von Bakterien an (Wolin, 1966), sodass ein Großteil der Bodenbakterien abgetötet wird. Die anschließende Kultivierung erfolgte auf Medium mit Nitrit als Elektronenakzeptor und mit den Antibiotika Clindamycin und Carbenicillin. Diese hemmen die bakterielle Proteinsynthese bzw. den bakteriellen Zellwandaufbau, während viele Archaeen dagegen resistent sind (Hilpert *et al.*, 1981; Simon *et al.*, 2005). Außerdem wurde auch ein Medium mit Erdextrakt verwendet, da Bodenbakterien sehr gut mit Erdextrakt kultiviert werden können (Davis *et al.*, 2005; Janssen *et al.*, 2002; Taylor, 1951).

Mit diesem Ansatz zur Isolierung ammonifizierender und denitrifizierender Archaeen wurden 131 Isolate erhalten, von denen alle zu den Bakterien gehören (s. Abschnitt 3.4.4). Die Isolierung von Archaeen wurde nicht erreicht. Bisher konnten nur wenige Archaeen isoliert werden, die meisten davon aus extremen Habitaten (Bintrim *et al.*, 1997; Schleper *et al.*, 2005). Kultivierungsunabhängige Methoden zeigen, dass die archaeelle Diversität in Böden vergleichsweise gering ist und Archaeen in Böden weniger dominant sind als in extremen Habitaten (Auguet *et al.*, 2010). Die meisten in mesophilen Böden vorkommenden Archaeen gehören zu den Crenarchaeota (Auguet *et al.*, 2010; Schleper *et al.*, 2005). Die wenigen bisher kultivierten Crenarchaeota sind jedoch thermophil (Bintrim *et al.*, 1997; Übersicht in Hugenholtz, 2002). Die gestellte Aufgabe der Isolierung mesophiler denitrifizierender oder ammonifizierender Crenarchaeota ist daher möglicherweise nicht zu lösen. In mesophilen Ökosystemen nehmen Archaeen möglicherweise

andere Funktionen ein als in extremophilen Ökosystemen. Dennoch erscheint es verwunderlich, dass derart weitverbreitete Stoffwechselwege wie die Denitrifikation und die DNRA in einer ganzen großen Gruppe von Organismen, den mesophilen Bodenarchaeen, nicht vorkommen soll. Unsere Vorstellung von Archaeen ist einem beständigen Wandel unterzogen, je mehr wir sie erforschen und je mehr wir über sie in Erfahrung bringen (DeLong, 1998; Woese, 2004). Es ist daher möglich, dass die archaeellen Denitrifikanten und DNRA in Böden vergleichsweise selten und andersartig sind, sodass sie sich unseren bisherigen Untersuchungsmethoden entziehen.

In dieser Studie wurden, wie auch in einer anderen, zur Kultivierung mesophiler Archaeen dieselben Medien eingesetzt, die auch zur Isolierung von Bakterien verwendet werden, zusammen mit Antibiotika und einer Lysozym-Vorbehandlung (Simon *et al.*, 2005). Die Ergebnisse zeigen, dass die alleinige Reduktion der bakteriellen Konkurrenz nicht ausreicht, um das Wachstum von Archaeen in der Petrischale zu fördern. Es ist wahrscheinlich, dass zusätzlich die verwendeten Medien besser an die Erfordernisse der Bodenarchaeen angepasst werden müssen.

#### **4.3.5 Isolierung unter selektiven Bedingungen für grampositive**

##### **Denitrifikanten und DNRA**

Die meisten der bisher beschriebenen Denitrifikanten und DNRA gehören zu den Proteobacteria (Gamble *et al.*, 1977; Heylen *et al.*, 2006). Andere Phyla enthalten daher möglicherweise mehr bisher unbeschriebene Denitrifikanten und DNRA. Diese nehmen vielleicht auch andere Funktionen im Boden wahr als die Proteobacteria. Unter den grampositiven Bakterien sind schon seit über 30 Jahren Denitrifikanten bekannt (Pichinoty *et al.*, 1979). Die Isolierung neuartiger grampositiver Denitrifikanten- und DNRA-Spezies kann daher neue Einblicke in die Struktur und Funktion von denitrifizierenden und

#### 4. Diskussion

amminifizierenden Gemeinschaften geben.

Die Selektion grampositiver Bakterien erfolgte mit Polymyxin B, einem Antibiotikum welches nur gegen gramnegative Bakterien wirkt (Storm *et al.*, 1977). Zuerst erfolgten Inkubationen unter oxischen Bedingungen, um Anreicherungen ohne strikte Anaerobier zu erhalten. Anschließend wurden die Anreicherungen gasdicht verschlossen, sodass sie anoxisch wurden. So wurde gegen strikte Aerobier selektiert. Dies erfolgte, um die Kultivierung von Denitrifikanten und DNRA zu fördern, da die meisten Organismen dieser Gruppen fakultative Aerobier sind (Zumft, 1997). Die anschließende Kultivierung erfolgte auf Medium mit Polymyxin B und Nitrit als Elektronenakzeptor. Außerdem wurde auch ein Medium mit Erdextrakt verwendet, da Bodenbakterien sehr gut mit Erdextrakt kultiviert werden können (Davis *et al.*, 2005; Janssen *et al.*, 2002; Taylor, 1951).

Mit diesem Kultivierungsansatz wurden 154 Isolate erhalten, davon waren 51 grampositive Denitrifikanten und DNRA (ca. 33 %, s. Abschnitt 3.4.5). Mit dem Ansatz 1 (Isolierung von Denitrifikanten und DNRA aus CFU-Anreicherungen, s. Abschnitt 3.4.1), der sehr viel weniger Aufwand erforderte, wurden 55 % grampositive Denitrifikanten und DNRA erhalten. Ansatz 5 (Isolierung unter selektiven Bedingungen für grampositive Denitrifikanten und DNRA) ist offenbar nicht optimal für die Kultivierung von grampositiven Bakterien. Der Großteil der mit Ansatz 1 isolierten grampositiven Bakterien waren Bacilli, während mit Ansatz 5 mehr Actinobacteria als Bacilli erhalten wurden. Mit dem Ansatz 5 konnten außerdem 15 Isolate, welche zu drei Spezies des Phylums Bacteroidetes gehören, isoliert werden. Alle mit dem Ansatz 1 erhaltenen gramnegativen Bakterien gehören zu den sehr gut untersuchten Proteobacteria. Ansatz 5 bietet also im Gegensatz zu Ansatz 1 verbesserte Bedingungen zur Untersuchung der Diversität der Denitrifikanten und DNRA in Böden.

Die verwendeten Bedingungen beinhalteten auch eine zweitägige oxische Kultivierung. Dennoch wurden vier Isolate der Spezies *Clostridium algidixylanolyticum* erhalten. *C. algidixylanolyticum* ist ein strikter Anaerobier (Broda *et al.*, 2000). Dennoch konnten die Isolate unter oxischen Bedingungen überleben und anschließend noch wachsen. Dies wurde auch schon für *Clostridium aerotolerans* beobachtet (van Gylswyk und van der Toorn, 1987), ist in der Gattung *Clostridium* dennoch selten (Al-Qadiri *et al.*, 2015).

Eine sechs Isolate enthaltende OTUs repräsentiert eine bisher unkultivierte Spezies der Gattung *Dysgonomonas*. Die Isolate konnten jedoch nicht weiter charakterisiert werden, da die Bakterien nach zwei weiteren Übertragungen auf DG-Medium nicht mehr anwuchsen. Dies wurde sehr oft auch bei anderen Isolaten beobachtet und auch in anderen Studie beschrieben (Janssen *et al.*, 2002; Sait *et al.*, 2006). Auch hier spielen möglicherweise mit dem ersten Ausplattieren aufgebrauchte Wachstumsfaktoren eine Rolle. Diese werden bei nachfolgenden Übertragungen auf neues Medium wahrscheinlich so weit verdünnt, dass auf sie angewiesene Bakterien nicht mehr wachsen können (s. oben).

Die Kultivierungsbedingungen von Ansatz 5 eignen sich also für die Isolierung von Actinobacteria und Bacteroidetes, welche mit den einfacheren Bedingungen von Ansatz 1 nicht so häufig bzw. nicht isoliert wurden. Außerdem konnte ein gegenüber klassischen Ansätzen verbesserter Einblick in die kultivierbare Diversität der Böden erhalten und erfolgreich eine bisher unkultivierte Spezies kultiviert werden.

### **4.3.6 Ansatz zur Isolierung von Denitrifikanten und DNRA aus Diffusionskammern**

Klassische Kultivierungsmethoden verwenden Bedingungen, welche sehr weit von denen der natürlichen Habitate der Bakterien entfernt sind (Gamble *et al.*, 1977; Koch, 1884).

#### 4. Diskussion

Dies könnte ein wichtiger Grund sein, warum viele Bakterien nicht im Labor kultiviert werden können (Vartoukian *et al.*, 2010). Moderne Kultivierungsansätze sind daher bemüht, die Bedingungen immer besser an die natürlichen Bedingungen anzupassen (Keller und Zengler, 2004). Ein innovativer Ansatz verwendet Diffusionskammern, die in einer Nachahmung des natürlichen Habitats inkubiert werden und den Austausch von Chemikalien zwischen den inokulierten Organismen in der Kammer und der Umgebung erlauben (Kaeberlein *et al.*, 2002). Im vorliegenden Versuch wurden Diffusionskammern mit Verdünnungen eines Bodens inokuliert und im selben Boden inkubiert. Nitrit wurde zugegeben, um verstärkt nach Denitrifikanten und DNRA zu selektieren.

Die in den Diffusionskammern gewachsenen Kolonien unterschieden sich sehr von denen, die meist bei Kultivierungen in Petrischalen erhalten werden (s. Abschnitt bla). Alle waren sehr klein und braun getönt. Mikrokolonien werden häufig auf oligotrophen Medien (Watve *et al.*, 2000) und in Diffusionskammern detektiert (Ferrari *et al.*, 2005; Kaeberlein *et al.*, 2002). Es ist wahrscheinlich, dass die Koloniegröße mit dem Nährstoffgehalt des Mediums zusammenhängt (Ferrari *et al.*, 2005; Watve *et al.*, 2000).

In Diffusionskammern angezogene Mikroorganismen können durch wiederholte Kultivierung in Diffusionskammern aufgereinigt werden und oftmals auch anschließend in Petrischalen wachsen (Bollmann *et al.*, 2007; Kaeberlein *et al.*, 2002). In der vorliegenden Arbeit wurden in Diffusionskammern erhaltene Kolonien auf Zwei-Schicht-Agarplatten übertragen. Diese bestehen aus einer mit Agar verfestigten Bodenschicht, die durch eine Membran von einer reinen Gellanschicht abgetrennt ist (s. Abschnitt 2.5.4). Der Stoffaustausch zwischen dem Boden und den kultivierten Organismen kann also weiter stattfinden während gleichzeitig der Aufwand der Kultivierung deutlich vermindert ist. Die Kolonien wurden anschließend auf verdünntem TSA-Agar, der mit Nitrit, einer C-Quellen-, einer Vitaminmischung und Erdextrakt versetzt war, weiter aufgereinigt. Dadurch wurde

der Kultivierungsaufwand weiter vermindert, während die Bakterien gleichzeitig an das Wachstum auf konventionellen Medien adaptiert wurden (Watve *et al.*, 2000). Dies war nicht mit allen Kolonien erfolgreich. Wie schon bei den Ansätzen zuvor (s. oben) und auch in anderen Studien beschrieben (Janssen *et al.*, 2002; Sait *et al.*, 2006), wuchsen nicht alle Kolonien nach der letzten Übertragung wieder an. Dennoch wurden 50 Reinkulturen erhalten. Von zehn dieser Kulturen konnte das 16S rRNA-Gen sequenziert werden. Von den übrigen Kulturen konnte nicht genügend Zellmaterial für eine Sequenzierung erhalten werden.

Die zehn identifizierten Kulturen gehörten zu den Beta- und Gammaproteobacteria sowie zu den Bacilli. Alle wiesen 99 % oder 100 % Ähnlichkeit zu bekannten Bakterien auf. Möglicherweise gehören zu den 40 Reinkulturen, die nicht identifiziert werden konnten, neuartige, bisher unkultivierte Bakterien. Die Wahrscheinlichkeit ist hoch, bedenkt man dass mit Diffusionskammern schon sehr oft neuartige Isolate erhalten werden konnten (Bollmann *et al.*, 2007; Ferrari *et al.*, 2005; Kaeberlein *et al.*, 2002).

Zusätzlich wurden aus den Diffusionskammern auch Kolonien auf verdünntem, mit Erdextrakt versetzten TSA-Agar ausgestrichen und oxisch inkubiert. Damit sollte den Bakterien das Wachstum erleichtert werden. Dennoch wurden auch unter oxischen Bedingungen nur Mikro- und Kleinkolonien erhalten, was darauf hindeutet dass die Koloniegröße tatsächlich in Zusammenhang mit dem Nährstoffgehalt des Mediums steht.

Unter oxischen Bedingungen wurden 28 Reinkulturen erhalten, welche in 12 OTUs auf Speziesebene eingeordnet wurden (s. Abschnitt 3.4.6). Die OTUs gehörten zu zehn verschiedenen Familien der Phyla Proteobacteria, Actinobacteria und Bacteroidetes. Diese sehr hohe Diversität konnte wahrscheinlich durch die oxische Kultivierung erreicht werden. Allerdings waren dadurch die Bedingungen nicht selektiv für Denitrifikanten und

#### 4. Diskussion

DNRA. So sind z.B. bisher keine denitrifizierenden oder ammonifizierenden Spezies der Gattungen *Duganella* (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2005) und *Pedobacter* (Steyn *et al.*, 1998) bekannt.

Zwei OTUs, die jeweils zwei Isolate enthalten, repräsentieren bisher unkultivierte Spezies der Gattungen *Arthrobacter* bzw. *Chitinophaga*. Die Kultivierung in Diffusionskammern ist damit derjenige der in dieser Arbeit verwendeten Kultivierungsansätze, mit dem die meisten neuartigen Spezies isoliert werden konnten. Die Ergebnisse aus anderen Arbeiten deuten darauf hin, dass durch wiederholte Kultivierung in Diffusionskammern vermehrt neuartige Spezies isoliert werden können (Bollmann *et al.*, 2007; Ferrari *et al.*, 2005; Kaeberlein *et al.*, 2002).

#### 4.3.7 Zusammenfassung

Aus allen anoxischen Kultivierungsansätzen wurden 539 Isolate aus 44 OTUs und 25 Familien isoliert. Dies zeigt eine hohe kultivierbare Diversität, die durch den Einsatz verschiedener Kultivierungsbedingungen erhalten wurde. Diese Strategie gilt als die beste Möglichkeit zur Untersuchung der kultivierbaren Diversität von Bakterien (Balestra und Misaghi, 1997). Dennoch gehören alle isolierten Organismen zu den 'Big Four', den Phyla Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes und Bacteroidetes. Fast alle bisher isolierten Bakterien gehören zu diesen Phyla, welche daher unser Verständnis der Mikrobiologie dominieren (Hugenholtz, 2002). Dennoch konnten Möglichkeiten aufgezeigt werden, wie neuartige Spezies isoliert werden können und die kultivierbare Diversität der Bakterien besser erforscht werden kann. Die Verwendung eines Antibiotikums und Anreicherungen vor dem Ausplattieren ist ein erfolgversprechender Ansatz. Auch die Verlängerung der Inkubationszeit bei anoxischen Kultivierungen ist aussichtsreich. Der vielversprechendste Ansatz ist jedoch die Kultivierung in Diffusionskammern. Dieser Ansatz kann noch weiter

verbessert werden, indem auch die Aufreinigung der Kolonien in Diffusionskammern stattfindet. Die Kultivierung in Diffusionskammern kann auch mit anderen Ansätzen zusammen verwendet werden. So könnte man auch den Boden, in dem die Diffusionskammern inkubiert werden, mit selektiv gegen Bakterien wirkenden Antibiotika versetzen. Dies könnte eine Möglichkeit zur Isolierung von Bodenarchaeen sein.

Die Kultivierung bisher unkultivierter Mikroorganismen ist nicht einfach und sehr aufwändig. Dennoch gibt es vielversprechende Ansätze, deren Anwendung neue Einsichten in die Welt der Mikroorganismen bringen können.

## 4.4 Gemeinschaften von Nitratreduzieren

Die Genmarker *narG* und *napA*, welche für die respiratorischen Nitratreduktasen codieren, sind in allen Nitratreduzieren zu finden (Philippot, 2005) und gemeinsam erfassen sie die Diversität der respiratorischen Nitratreduzierer.

### 4.4.1 *narG*-Gemeinschaften

In den untersuchten Böden wurden *narG*-Sequenzen gefunden, die Ähnlichkeit zu Sequenzen aus 14 verschiedenen Familien und sieben Klassen hatten (Abschnitt bla). Darunter sind nicht nur Beta- und Gammaproteobacteria, sondern auch Bacilli und Actinobacteria, sowie Deltaproteobacteria und Deinococci. Die *narG*-Sequenzen von drei OTUs sind verwandt mit Sequenzen von *Thermus thermophilus* und *Marinithermus hydrothermalis*, zwei thermophilen Vertretern der Deinococcus-Thermus-Gruppe, die aus heißen Quellen isoliert wurden (Sako *et al.*, 2003; Williams *et al.*, 1995). *narG*-Sequenzen, die verwandt sind zu Sequenzen dieser Organismen sind weit verbreitet und wurden auch schon in Flussmündungssedimenten (Smith *et al.*, 2007), Ackerböden (Mounier *et al.*,

#### 4. Diskussion

2004; Philippot *et al.*, 2002) und Moorböden (Palmer und Horn, 2015) gefunden.

Die Gemeinschaft der *narG*-beinhaltenden Nitratreduzierer der in dieser Arbeit untersuchten Böden wurden von zwei OTUs dominiert, die in allen Böden stark vertreten waren (s. Anhang bla). Die Dominanz weniger Gruppen über die *narG*-Gemeinschaften wurde oft beobachtet (Cheneby *et al.*, 2003; Mounier *et al.*, 2004). Die Sequenzen der OTU 1 waren verwandt zu *Castellaniella defragrans*, einem Betaproteobacterium, und die von OTU 2 zu *Mycobacterium xenopi*, einem Actinobacterium. Sowohl Proteobacteria als auch Actinobacteria werden oft als Vertreter der Nitratreduzierer in Böden gefunden (Cheneby *et al.*, 2003; Mounier *et al.*, 2004; Palmer und Horn, 2015; Philippot *et al.*, 2002). Die diesen OTUs zugeordneten Spezies sind offenbar so anpassungsfähig, dass sie mit den sehr unterschiedlichen Bedingungen in allen untersuchten Böden zurechtkommen. Das Vorkommen dieser Spezies scheint also nicht von den Bodeneigenschaften beeinflusst zu sein. Besonders Actinobacteria sind für ihre hohe Toleranz gegenüber extremen Bodenbedingungen bekannt (Zenova *et al.*, 2011).

Im Gegensatz dazu kamen die übrigen OTUs höchstens in der Hälfte der Böden vor. Die von ihnen vertretenen Spezies scheinen also eher an spezifische Bodenbedingungen angepasst zu sein. Sie korrelieren dabei mit dem Vegetationstyp und dem pH-Wert des Bodens, sowie in dieser Arbeit nicht untersuchten Faktoren (s. Abschnitt 3.5.2). Der Vegetationstyp und der pH-Wert korrelierten dabei miteinander. Der pH-Wert ist in Waldböden tendenziell niedriger als in Grünlandböden (Tiedje *et al.*, 1982), weshalb eine solche Korrelation nicht ungewöhnlich ist. Der pH-Wert gilt daher auch als Kovariable des Vegetationstyps (Lammel *et al.*, 2015). Verschiedene Faktoren, wie z.B. auch der Ammoniumgehalt, der Kohlenstoffgehalt (Nacke *et al.*, 2011), die Düngung oder andere Aspekte der Landnutzung (Hallin *et al.*, 2009; Philippot *et al.*, 2007) sowie Nitratreduktion und Denitrifikation (Simek und Cooper, 2002) beeinflussen ebenfalls den pH-Wert, welcher

seinerseits viele Prozesse und Bodeneigenschaften beeinflusst (Brady und Weil, 1999) und sich direkt auf die Bakteriengemeinschaften in den Böden auswirkt. Der pH-Wert ist daher auch als der Haupteinflussfaktor im Boden bekannt (Brady und Weil, 1999) und hat auch einen großen Einfluss auf Denitifikantengemeinschaften (Bru *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2010; Simek und Cooper, 2002; Übersicht in Wallenstein *et al.*, 2006). Dennoch hatte der Vegetationstyp in den untersuchten Böden einen größeren Einfluss auf die *narG*-Gemeinschaften. Dies passt zu den Ergebnissen anderer Studien, die zeigten, dass in Grünlandböden andere Bakteriengemeinschaften vorkommen als in Waldböden (Jangid *et al.*, 2008; Nacke *et al.*, 2011). Die auf einem Boden wachsenden Pflanzen haben einen großen Einfluss auf dessen Struktur und Textur und damit auch auf den Sauerstoffgehalt und Nährstofftransport (Angers und Caron, 1998). Von den vorkommenden Pflanzenspezies hängen außerdem die Art und die Menge des Nährstoffeintrags ab (Wardle *et al.*, 2004). Der Einfluss der Diversität und Zusammensetzung von Pflanzengemeinschaften auf die Bakteriengemeinschaften ist zudem bekannt (Carney und Matson, 2006). Die Korrelation des Vegetationstyps mit den *narG*-Gemeinschaften kann also durch die unterschiedlichen Pflanzenspezies in Grünland- und Waldböden und deren Einfluss auf die Bodeneigenschaften erklärt werden.

Eine Korrelation zwischen der Landnutzungsintensität und den *narG*-Gemeinschaften wurde in dieser Arbeit nicht gefunden, obwohl andere Studien einen deutlichen Zusammenhang zeigten (Jangid *et al.*, 2008; Wakelin *et al.*, 2007). In diesen Studien wurde jedoch die Landnutzungsintensität als Düngemiteleintrag gemessen. In den Biodiversitätsexploratorien wurde die Landnutzungsintensität als die Bewirtschaftung einer Fläche (z.B. als Wiese oder Weide) betrachtet, mit der der Düngemiteleintrag nur in indirektem Zusammenhang steht. Andere Arbeiten aus den Biodiversitätsexploratorien konnten ebenfalls keine direkte Korrelation zwischen Landnutzungsintensität und Abundanz und Diversität der Bakteriengemeinschaften finden (Berner *et al.*, 2011; Nacke

## 4. Diskussion

*et al.*, 2011; Will *et al.*, 2010) .

Obwohl erwartet werden könnte, dass der Nitratgehalt des Bodens die Nitratreduzierer beeinflusst, konnte zwischen dem Nitratgehalt der Böden und den *narG*-Gemeinschaften keine Korrelation gefunden werden. Es gibt zwar Studien, die einen Zusammenhang zwischen dem Nitratgehalt und der Abundanz von *narG*-Gemeinschaften zeigten (Lindsay *et al.*, 2010), aber auch andere, die nahe legen, dass die Abundanz und Struktur von Denitrifikantengemeinschaften von anderen Faktoren als dem Nitratgehalt abhängen (Übersicht in Wallenstein *et al.*, 2006). Die statistische Analyse zeigte, dass wesentliche, mit den *narG*-Gemeinschaften in Zusammenhang stehende Umweltvariablen, nicht untersucht wurden. Dabei könnte es sich z.B. um die Bodentextur handeln. Eine Korrelation zwischen der Bodentextur bzw. dem Bodentyp und der Zusammensetzung von Bakteriengemeinschaften ist bekannt (Lauber *et al.*, 2009; Yin *et al.*, 2015), ebenso wie eine Korrelation mit der Abundanz von *nirS*- und *nirK*-Gemeinschaften (Rosa *et al.*, 2014). Von der Bodentextur hängen die Anzahl und die Art der im Boden vorhandenen Aggregate und Mikrohabitate ab, welche die Bakteriengemeinschaften beeinflussen. Nitratreduktion findet dabei ebenso wie Denitrifikation innerhalb anoxischer Mikrohabitate statt (Parkin, 1987) bzw. an der aerob-anaeroben Grenzfläche, wo Nitrat durch Nitrifikation gebildet werden und durch Nitratreduzierer und Denitrifikanten verstoffwechselt werden kann (Tiedje *et al.*, 1982). Ein Einfluss der Bodentextur auf die *narG*-Gemeinschaften ist daher sehr wahrscheinlich.

### 4.4.2 *napA*-Gemeinschaften

Alle aus den untersuchten Böden isolierten *napA*-Sequenzen waren verwandt zu fünf Familien der Alpha- und Betaproteobacteria sowie der Acidobacteria (s. Abschnitt 3.5.3). Dies ist im Einklang mit den anderen Studien zur *napA*-Diversität, in denen Alpha- und

Betaproteobacteria vorherrschen (Henry *et al.*, 2008; Rusch und Gaidos, 2013; Smith *et al.*, 2007). Im Unterschied zu den hier untersuchten Böden wurden in aquatischen Ökosystemen auch zu den Gammaproteobacteria gehörende *napA*-Sequenzen gefunden (Rusch und Gaidos, 2013; Smith *et al.*, 2007). Dabei wurden andere Primer als in der vorliegenden Arbeit verwendet. Die in dieser Arbeit verwendeten Primer detektieren jedoch ebenfalls *napA*-besitzende Gammaproteobacteria (Alcantara-Hernandez *et al.*, 2009). Daher ist es wahrscheinlich, dass *napA*-besitzende Gammaproteobacteria in den untersuchten Böden der Biodiversitätsexploratorien selten sind.

13 % der in diesen Böden detektierten *napA*-Sequenzen stammen von Acidobacteria, während *napA*-Sequenzen von Acidobacteria in anderen Studien jedoch nicht gefunden wurden (Henry *et al.*, 2008; Rusch und Gaidos, 2013; Smith *et al.*, 2007). Möglicherweise kommen *napA*-besitzende Acidobacteria in den aquatischen Systemen und Böden der obigen Studien nicht vor. Es ist bekannt, dass Acidobacteria in Böden weitverbreitet und sehr abundant sind (Fierer *et al.*, 2007; Hugenholtz *et al.*, 1998; Naether *et al.*, 2012), während sie in aquatischen Ökosystemen selten sind (Hugenholtz *et al.*, 1998). Andererseits ist auch ein methodischer Grund denkbar: In dieser Arbeit wurde die Boden-DNA über ein Hochdurchsatzverfahren (Pyrosequenzierung, Abschnitt 2.6.10) sequenziert und so wurden fast 40000 *napA*-Sequenzen erhalten. In den oben genannten Studien wurden jedoch Klonbanken generiert, wobei deutlich weniger Sequenzen analysiert werden können (in den genannten Arbeiten weniger als 800; Henry *et al.*, 2008; Rusch und Gaidos, 2013; Smith *et al.*, 2007). So können selten vorkommende Sequenzen übersehen werden. Die große Anzahl der *napA*-Sequenzen, die Acidobacteria zugeordnet wurden, deutet darauf hin, dass *napA*-besitzende Acidobacteria in den in dieser Arbeit untersuchten Böden zumindest nicht selten sind.

*napA*-Sequenzen von Acidobacteria wurden in allen Böden außer in denen des

#### 4. Diskussion

Exploratoriums Schorfheide-Chorin gefunden (s. Anhang). Dies stimmt überein mit den Ergebnissen einer anderen Studie aus den Biodiversitätsexploratorien, die zeigte dass die Abundanzen der Acidobacteria in verschiedenen Regionen und Bodentypen sehr unterschiedlich waren (Naether *et al.*, 2012).

Insgesamt wurden über 39000 *napA*-Sequenzen detektiert. Aus dem Boden SEG 2, dem intensiv genutzten Grünlandboden des Exploratoriums Schorfheide Chorin, wurden nur 3 Sequenzen gefunden (s. Abschnitt 3.5.3). Auch aus den anderen beiden intensiv genutzten Grünlandböden stammten 10-mal weniger Sequenzen als aus den übrigen Böden desselben Exploratoriums. Dies könnte daran liegen, dass in diesen Böden tatsächlich weniger *napA*-Nitratreduzierer vorkommen als in den anderen Böden. Die Anzahl der mit Pyrosequenzierung detektierten Sequenzen stellt nicht die Bakterienabundanz dar. In einer anderen Studie der Biodiversitätsexploratorien wurde jedoch ein signifikanter Effekt der Landnutzungsintensität auf die *napA*-Nitratreduzierer festgestellt (Keil *et al.*, 2011). Dabei wurde in Grünlandböden mit höherer Landnutzungsintensität eine geringere *napA*-Abundanz ermittelt als in Grünlandböden mit geringerer Landnutzungsintensität. In den hier untersuchten intensiv genutzten Grünlandböden kommen daher vielleicht tatsächlich weniger *napA*-Nitratreduzierer vor als in den anderen untersuchten Böden. In diesem Fall würde die Anzahl der Sequenzen wirklich einen Hinweis auf die Abundanz der *napA*-Nitratreduzierer in diesen Böden liefern.

Die *napA*-Gemeinschaften in den Böden korrelieren mit dem Vegetationstyp, dem pH-Wert und dem Ammoniumgehalt. Es ist bekannt, dass die *napA*-Abundanz mit dem Boden-pH-Wert, dem Wasser-, Kohlenstoff- und Ammoniumgehalt korreliert (Bru *et al.*, 2011; Kandeler *et al.*, 2009; Levy-Booth *et al.*, 2014). Der Wasser- und der Kohlenstoffgehalt scheinen jedoch keinen Einfluss auf die Zusammensetzung der *napA*-Gemeinschaften in den hier untersuchten Böden zu haben. Umso deutlicher und größer ist der

Zusammenhang mit dem Vegetationstyp und dem pH-Wert, die miteinander korreliert sind (s. Abbildung 21). Der große Zusammenhang mit dem Vegetationstyp lässt sich auch hier durch die unterschiedlichen Pflanzenspezies in Grünland- und Waldböden und deren Einfluss auf die Bodeneigenschaften erklären (s. oben).

Aus dem Biplot-Diagramm der CCA lässt sich eine starke Korrelation der *napA*-Gemeinschaften in den Böden AEW 5, AEW 8 und HEW 5, sowie eine schwache Korrelation der *napA*-Gemeinschaften in den Böden SEW 5 und SEW 9 mit dem Ammoniumgehalt ablesen (s. Abbildung 21). Dies deutet auf einen Zusammenhang zwischen DNRA und den *napA*-Gemeinschaften in diesen Böden hin. Diese Böden könnten viele DNRA mit Nap-Nitratreduktasen enthalten oder Nap-Nitratreduzierer könnten vermehrt Nitrit für DNRA ohne eigene Nitratreduktasen zur Verfügung stellen. Die weniger mit dem Ammoniumgehalt korrelierenden Böden enthalten wahrscheinlich weniger DNRA oder Nap-Nitratreduzierer.

Für die *narG*-Gemeinschaften wurde kein Zusammenhang mit dem Ammoniumgehalt gefunden und es ist auch nach Stand des Wissens keiner bekannt. Dies deutet auf eine größere Gleichverteilung der Nar-Nitratreduzierer in den Böden hin. Nap-Nitratreduzierer hingegen werden offensichtlich mehr von den Bodeneigenschaften beeinflusst. Auffällig ist, dass die am deutlichsten mit dem Ammoniumgehalt korrelierenden Böden Waldböden sind. Es ist bekannt, dass *napA*-Gemeinschaften von der Art und der Menge von Pflanzenresten stärker beeinflusst werden als *narG*-Gemeinschaften (Cheneby *et al.*, 2010). In Böden mit hohem C/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Verhältnis ist DNRA begünstigt gegenüber Denitrifikation (Tiedje *et al.*, 1982), ebenso unter reduzierenderen Bedingungen (Rütting *et al.*, 2011). Diese Erkenntnisse beziehen sich jedoch auf Stoffwechselraten und nicht auf die Diversität der Organismen. Dennoch ist es möglich, dass eine Kombination dieser Bedingungen DNRA mit Nap-Nitratreduktasen bzw. mit DNRA assoziierte Nap-Nitratreduzierer gegenüber

## 4. Diskussion

Denitrifikanten mit Nap-Nitratreduktasen bzw. mit Denitrifikanten assoziierte Nap-Nitrat-reduzierer begünstigt.

Sowohl der pH-Wert als auch der Vegetationstyp haben einen großen Einfluss auf die *narG*- und *napA*-Gemeinschaften, wobei der Einfluss des Vegetationstyps größer ist als der des pH-Werts (s. oben). Dies kann mit den unterschiedlichen Pflanzenspezies in Grünland- und Waldböden und deren Einfluss auf die Bodeneigenschaften zusammenhängen.

## 4.5 Gemeinschaften von DNRA

### 4.5.1 *nrfA*-Gemeinschaften

Der Genmarker *nrfA* ist der einzige spezifische Genmarker, mit dem DNRA detektiert werden können (Mohan *et al.*, 2004). Lange Zeit wurde jedoch die Denitrifikation als der einzig wichtige nitritreduzierende Prozess in Böden angesehen (Übersicht in Rütting *et al.*, 2011). Daher gibt es nicht viele Untersuchungen der Diversität von *nrfA*-Sequenzen. In aquatischen und terrestrischen Ökosystemen wurden *nrfA*-Sequenzen von Gamma-, Delta- und Epsilonproteobacteria, Planctomycea, Firmicutes, Bacteroidia, Ignavibacteria und Chlorobia nachgewiesen (Mohan *et al.*, 2004; Rusch und Gaidos, 2013; Smith *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2014; Takeuchi, 2006; Welsh *et al.*, 2014). Auch in der vorliegenden Arbeit wurden zu Gamma- und Deltaproteobacteria, Bacteroidia und Ignavibacteria zugeordnete *nrfA*-Sequenzen gefunden (s. Abschnitt 3.5.4). Dabei gehörten die wenigsten Sequenzen zu den Proteobacteria. Die meisten Sequenzen wurden den Bacteroidia und den Ignavibacteria zugeordnet. In fast allen oben genannten Arbeiten wurden andere Primer als in der vorliegenden Arbeit verwendet. Dennoch wurden größtenteils die gleichen Klassen detektiert, was auf eine große Universalität der Primer hindeutet. Man

kann also zu Recht annehmen, dass Bacteroidia und besonders Ignavibacteria in den hier untersuchten Böden eine wichtige Rolle spielen.

Ignavibacteria sind eine neue Klasse des Phylums Chlorobi, den grünen Schwefelbakterien (Iino *et al.*, 2010). Die einzige bisher kultivierte Art dieser Klasse ist *Ignavibacterium album* (Iino *et al.*, 2010). *Ignavibacterium album* kann jedoch weder phototroph, noch auf Schwefel- oder Eisenverbindungen wachsen (Iino *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012). Somit ist es die einzige kultivierte Art der Gattung Chlorobi, die nicht zu den grünen Schwefelbakterien zählt (Iino *et al.*, 2010). Es besitzt neben den *nrfAH*-Genen ein *nos*-Gencluster (*nosLDFYZ*) und eine Tetrahäm-Cytochrom c-Oxidase (Liu *et al.*, 2012), die unter anoxischen Bedingungen als NO-Reduktase fungieren könnte (Forte *et al.*, 2001; Giuffrè *et al.*, 1999). Nitratreduktasegene fehlen, sodass das Bakterium möglicherweise auf die Produktion von Nitrit und NO durch andere Organismen angewiesen ist (Liu *et al.*, 2012). Interessanterweise wurden alle in dieser Arbeit detektierten *nrfA*-Sequenzen Spezies zugeordnet, von denen nur *nrfA*-Gene jedoch keine Nitratreduktasegene bekannt sind (Bond *et al.*, 2002; Cerdano-Tarraga *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2004; Tan *et al.*, 2015).

In der vorliegenden Arbeit wurden größtenteils *nrfA*-Sequenzen detektiert, die auf Proteinebene eine geringe Ähnlichkeit mit den Sequenzen ihrer nächstverwandten kultivierten Organismen hatten. Nur eine OTU konnte einer Spezies zugeordnet werden, der Spezies *Aeromonas hydrophila*. Drei OTUs repräsentieren neue Spezies der Gattungen *Ignavibacterium* bzw. *Desulfuromonas* und drei OTUs sogar neue Gattungen der Familie Bacteroidiaceae. Der hohe Grad an Neuartigkeit der detektierten Sequenzen liegt in der Tatsache begründet, dass die DNRA lange Zeit als unwichtiger Stoffwechselweg im Vergleich zur Denitrifikation betrachtet wurde (Rütting *et al.*, 2011). Daher gibt es wenige Studien zu DNRA und *nrfA*-Gemeinschaften (Rütting *et al.*, 2011; Welsh *et al.*, 2014). Als Folge dieser Vernachlässigung des Themas werden notwendigerweise viele

#### 4. Diskussion

neue Entdeckungen gemacht. Über den Stoffwechsel und die Funktion im Ökosystem der in den hier untersuchten Böden gefundenen, bisher unbekanntem Organismen ist daher nichts bekannt.

Die nächstverwandten bisher unkultivierten Organismen der den Ignavibacteria und Bacteroidia zugeordneten OTUs (OTUs 1, 2, 5, 6, 7 und 8, s. Tabelle 41) stammen aus Anammox-Gemeinschaften (s. Abbildung 25). Zu den Bacteroidia gehörende *nrfA*-Sequenzen aus einem Anammox-Reaktor wurden schon in der ersten Arbeit mit den hier verwendeten Primern detektiert (Mohan *et al.*, 2004). Dies deutet auf eine Vergesellschaftung zwischen *Bacteroides* und Anammox-Bakterien hin (Mohan *et al.*, 2004). Letztere benötigen für ihr Wachstum Nitrit und Ammonium. Einige Spezies sind in der Lage, diese in Anwesenheit von organischen Elektronendonoren aus Nitrat über DNRA selbst zu synthetisieren (Kartal *et al.*, 2007). Dennoch ist es wahrscheinlich, dass andere Anammox-Spezies auf das von DNRA gebildete Ammonium angewiesen sind (Kartal *et al.*, 2013). Obwohl Anammox-Bakterien hauptsächlich aus aquatischen Habitaten bekannt sind, können sie auch in der Rhizospäre sowie in anoxischen Mikrozonen in oxischen Böden vorkommen (Humbert *et al.*, 2010; Long *et al.*, 2013). So wurden z.B. auch in Waldböden der Biodiversitätsexploratorien Planctomycetes nachgewiesen (Felsmann *et al.*, 2015), ein Phylum zu dem auch die Anammox-Bakterien gehören (Jetten *et al.*, 2009). Es ist daher durchaus denkbar, dass in den hier untersuchten Böden Anammox-Bakterien leben, welche das von den DNRA generierte Ammonium verstoffwechseln.

Die *nrfA*-Gemeinschaften in den Böden stehen in Zusammenhang mit dem Vegetationstyp, dem pH-Wert und dem Kohlenstoffgehalt. Der Vegetationstyp und der pH-Wert korrelieren miteinander (s. Abschnitt 3.5.4). Der größte Zusammenhang der *nrfA*-Gemeinschaften besteht mit dem Boden-pH-Wert. Dabei ist der Zusammenhang stärker in

Bezug auf die Grünlandböden und schwächer in Bezug auf die Waldböden (s. Abbildung 26). Dies kann am Einfluss der Bodendeckung auf den pH-Wert liegen (s. oben). Aber auch die Anwesenheit von Ammonium, einer schwachen Base, hat einen deutlichen Einfluss auf den pH-Wert. Die Bildung von Ammonium durch DNRA kann also leicht den pH-Wert des Bodens verändern. Dies hätte einen größeren Einfluss in Böden, in denen das Ammonium nicht von anderen Organismen verstoffwechselt wird. Dies lässt also den Schluss zu, dass in den hier untersuchten Waldböden mehr Ammoniumoxidierer vorhanden sind als in den Grünlandböden. Sowohl nitrifizierende Bakterien als auch nitrifizierende Archaeen wurden in Grünland- und Waldböden der Biodiversitätsexploratorien nachgewiesen (Berner *et al.*, 2011; Keil *et al.*, 2011; Stempfhuber *et al.*, 2015). Planctomycetes jedoch wurden nur in Waldböden der Biodiversitätsexploratorien (Felsmann *et al.*, 2015) und nicht in deren Grünlandböden nachgewiesen (Will *et al.*, 2010). Bei den Planctomycetes könnte es sich um Anammox-Bakterien handeln, welche das von den DNRA erzeugte Ammonium weiter verstoffwechseln und so den pH-Wert in den Waldböden stabilisieren. Die Korrelation zwischen dem pH-Wert und dem Vegetationstyp kann also auch durch diese Interaktion erklärt werden.

Der dritte Faktor, der mit den *nrfA*-Gemeinschaften in Zusammenhang steht, ist der Kohlenstoffgehalt. Dabei zeigt das Biplot-Diagramm (s. Abbildung 26), dass ein deutlicher Zusammenhang des Kohlenstoffgehalts nur mit den *nrfA*-Gemeinschaften der Böden SEG 2 und SEG 6 besteht. Bei diesen Böden handelt es sich um die Grünlandböden des Exploratoriums Schorfheide-Chorin, welche die höchsten Kohlenstoffgehalt der hier untersuchten Böden aufweisen. Besonders der Boden SEG 6 steht in starken Zusammenhang mit den Kohlenstoffgehalt. Dabei ist SEG 6 der einzige Boden, in dem die Bakterien der OTU 8 vorkommen (s. Anhang), welche eine bisher unbekannte Gattung der Familie Bacteriodaceae repräsentiert. Der Boden SEG 2 enthält als einziger nur Bakterien der OTUs 1 und 3. Der hohe Kohlenstoffgehalt der Böden SEG 2 und SEG 6 scheint also

## 4. Diskussion

die meisten in dieser Arbeit detektierten DNRA nicht zu begünstigen. Bisher gibt es keine anderen Untersuchungen zu Faktoren, welche *nrfA*-Gemeinschaften beeinflussen. Ein Vergleich mit an anderen Standorten lebenden DNRA ist daher nicht möglich.

Die DNRA-Gemeinschaften in den untersuchten Böden werden vom pH-Wert und dem Vegetationstyp beeinflusst, wobei der pH-Wert den größten Einfluss ausübt. Drei OTUs werden außerdem durch einen hohen Kohlenstoffgehalt gegenüber den anderen begünstigt.

## 4.6 Gemeinschaften von Denitrifikanten

Als Denitrifikanten werden nur solche Organismen bezeichnet, die aus Nitrit gasförmige Stickstoffverbindungen (NO, N<sub>2</sub>O, N<sub>2</sub>) bilden und dabei Energie konservieren (Zumft, 1997). Zur Untersuchung der Diversität von Denitrifikanten werden daher die Genmarker *nirK* und *nirS*, welche für Nitritreduktasen codieren, und *nosZ*, welcher für die N<sub>2</sub>O-Reduktase codiert, verwendet.

### 4.6.1 *nirK*-Gemeinschaften und *nirS*-Gemeinschaften

Durch Pyrosequenzierung konnten nur *nirK*- bzw. *nirS*-Sequenzen aus je fünf der zwölf untersuchten Böden erhalten werden (s. Abschnitte 3.5.5 und 3.5.6). Alle *nirK*-Sequenzen stammten dabei aus anderen Böden als die *nirS*-Sequenzen. Fast alle nitritreduzierenden Denitrifikanten besitzen entweder die Cu-Nitritreduktase, codiert durch das *nirK*-Gen, oder die cd<sub>1</sub>-Nitritreduktase, codiert durch das *nirS*-Gen (Gräf *et al.*, 2014). Dabei kommt es zur Nischendifferenzierung zwischen *nirK*- und *nirS*-Gemeinschaften (Shapleigh, 2006; Smith und Ogram, 2008; Yuan *et al.*, 2012). Diese wird gefördert durch unterschiedliche Bodeneigenschaften, welche Bakterien mit einer der beiden Nitritreduktasen bevorzugen

(Enwall *et al.*, 2010). Dennoch kommen beide Gemeinschaften meist in unterschiedlichen Mikrohabitaten in denselben Böden vor (Enwall *et al.*, 2010; Keil *et al.*, 2011; Smith und Ogram, 2008). Für die t-RFLP-Analysen dieser Arbeit wurden *nirK*-Sequenzen aus allen und *nirS*-Sequenzen aus zehn der zwölf Böden erhalten (s. Abschnitte 3.5.5 und 3.5.6). Zumindest in zehn der untersuchten Böden kommen also beide Nitritreduzierer-Gemeinschaften vor. Zwei der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Grünlandböden (AEG 2 und AEG 7) wurden auch von Keil und Kollegen (Keil *et al.*, 2011) analysiert. In beiden Böden wurden sowohl *nirS*- als auch *nirK*-Gene nachgewiesen. Die Abundanz der *nirK*-Genkopien war dabei in beiden Böden, aus denen in der vorliegenden Arbeit nur *nirK*-Sequenzen erhalten wurden, deutlich höher als die der *nirS*-Genkopien. Dies lässt den Schluss zu, dass durch die Pyrosequenzierung nicht alle in den Böden vorhandenen Nitritreduzierer detektiert wurden, sondern nur Sequenzen des jeweils vorherrschenden Genmarkers.

Alle *nirK*-Sequenzen wurden den Alphaproteobacteria zugeordnet. Auch in Untersuchungen von Moorböden (Palmer *et al.*, 2012; Palmer und Horn, 2015) und temperierten Grünlandböden (Falk *et al.*, 2010; Rösch *et al.*, 2002) wurden hauptsächlich Alpha-, jedoch auch Beta- und Gammaproteobacteria gefunden. Die in den Böden detektierten *nirK*-Sequenzen gehörten zu Alpha-, Beta- und Gammaproteobacteria (s. Abschnitt 3.5.5). Auch in anderen Böden wurden hauptsächlich diese drei Klassen an Nitritreduzierern gefunden (Palmer *et al.*, 2012; Palmer und Horn, 2015; Rösch *et al.*, 2002).

Die *nirK*-Gemeinschaften korrelierten mit dem Vegetationstyp, dem pH-Wert, dem Ammonium- und dem Wassergehalt, wobei der Zusammenhang mit den ersten drei Faktoren gleich stark, der mit dem Wassergehalts jedoch deutlich schwächer ist. Alle vier Faktoren korrelierten miteinander. Eine im Landschaftsmaßstab angelegte Studie hatte

#### 4. Diskussion

den pH-Wert schon als die wichtigste erklärende Variable für *nirK*-Genabundanz ermittelt (Bru *et al.*, 2011), was andere Studien zur *nirK*-Abundanz und -Struktur bestätigt (Bárta *et al.*, 2010; Dandie *et al.*, 2011; Kandeler *et al.*, 2009; Lindsay *et al.*, 2010). Dies steht im Gegensatz zu anderen Arbeiten (Enwall *et al.*, 2010; Smith und Ogram, 2008), welche keinen Zusammenhang des pH-Werts, dafür aber der Landnutzung mit den *nirK*-Gemeinschaften feststellen konnten. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde ein Zusammenhang der Landnutzung, genauer gesagt dem Vegetationstyp, mit den *nirK*-Gemeinschaften ermittelt. Dabei wurde auch eine Korrelation der beiden Faktoren pH-Wert und Vegetationstyp festgestellt, sodass nicht sicher ist, welche der beiden Faktoren in ursächlichem Zusammenhang mit den Nitritreduzierer steht. Dies kann, wie schon früher erwähnt (s. Abschnitt 4.4.1), durch die tendenziell erniedrigten pH-Werte in Waldböden im Vergleich zu Grünlandböden erklärt werden. Eine weitere Erklärung könnte auch das Vorkommen von Anammox-Bakterien ausschließlich in den untersuchten Waldböden und deren Stabilisierung des pH-Werts sein (s. Abschnitt 4.4.3). Der Zusammenhang des Vegetationstyps mit den *nirK*-Gemeinschaften wäre dann durch deren ursächlichen Zusammenhang mit dem pH-Wert zu erklären. Auch die umgekehrte Erklärung ist denkbar: Die *nirK*-Gemeinschaften sind beeinflusst durch die unterschiedlichen Pflanzenarten in Grünland- und Waldböden und deren Auswirkung auf die Bodeneigenschaften (s. Abschnitt 4.4.1).

Die *nirK*-Gemeinschaften korrelierten auch mit dem Ammoniumgehalt. Von einem solchen Zusammenhang wurde schon früher berichtet (Avrahami *et al.*, 2002; Kandeler *et al.*, 2009). Andere Untersuchungen zeigten jedoch Auswirkungen des Ammoniumgehalt auf die *nirS*- und nicht die *nirK*-Gemeinschaften (Morales *et al.*, 2010; Philippot *et al.*, 2009). Die Korrelation des Ammoniumgehalts mit den *nirK*-Gemeinschaften impliziert einen Zusammenhang der *nirK*-Gemeinschaften mit DNRA oder Ammoniumoxidierern. So benötigen sowohl die *nirK*-Nitritreduzierer als auch DNRA und Anammox-Bakterien Nitrit.

Der hier gefundene Zusammenhang könnte also eine Konkurrenzsituation zwischen den verschiedenen Gruppen an Nitritverwertern aufzeigen. Eine andere Erklärung wäre, dass der Ammoniumgehalt den pH-Wert beeinflusst und der pH-Wert die *nirK*-Gemeinschaften.

Der Wassergehalt wurde ebenfalls als ein Faktor identifiziert, der mit der Diversität der *nirK*-Gemeinschaften in einem Zusammenhang steht. Dies stimmt mit Untersuchungen von Szukics und Kollegen (Szukics *et al.*, 2010) überein, welche große Auswirkungen des Wassergehalts sowohl auf die Abundanz als auch die Struktur der *nirK*-Gemeinschaften feststellten. Andere Arbeiten zeigten, dass der Wassergehalt eher die *nirS*- als die *nirK*-besitzenden Bakterien beeinflusst (Dandie *et al.*, 2011; Philippot *et al.*, 2009). Da der Wassergehalt gleichzeitig den Sauerstoffgehalt in den Böden bestimmt, ist sein Einfluss auf Organismen, die unter anoxischen Bedingungen Nitrit abbauen, sehr leicht zu erklären.

In einigen Studien wurde auch der Kohlenstoffgehalt als wichtiger Einflussfaktor auf die Abundanz und Struktur der *nirK*-Gemeinschaften ermittelt (Bárta *et al.*, 2010; Enwall *et al.*, 2010; Ollivier *et al.*, 2011). Andere Studien konnten diesen Zusammenhang jedoch nicht feststellen (Bru *et al.*, 2011; Dandie *et al.*, 2011; Kandeler *et al.*, 2009; Lindsay *et al.*, 2010), was durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigt wird.

In dieser Arbeit wurden vier Bodeneigenschaften ermittelt, welche mit den *nirK*-Gemeinschaften und miteinander korrelieren. Aus den Daten kann nicht abgelesen werden, welcher Faktor einen direkten Einfluss auf die Bakterien hat. Es ist sehr wahrscheinlich, dass alle vier zu unterschiedlichen Anteilen dazu beitragen. Außerdem gibt es weitere Umweltfaktoren, die sich auf die *nirK*-Gemeinschaften auswirken und in dieser Arbeit nicht untersucht wurden. So wurde z.B. in anderen Arbeiten ein Zusammenhang zwischen *nirK*-Gemeinschaften und dem Kupfergehalt von Böden berichtet (Bru *et*

#### 4. Diskussion

*al.*, 2011; Enwall *et al.*, 2010). Dieser Zusammenhang erscheint plausibel, da jede *nirK*-Untereinheit Kupfer im aktiven Zentrum besitzt und somit von Kupfer abhängig ist (Adman, 1995). Auch der Phosphatgehalt (Enwall *et al.*, 2010; Yin *et al.*, 2015), der Sauerstoffpartialdruck (Bárta *et al.*, 2010), der Sand- und der Tonanteil des Bodens (Rosa *et al.*, 2014), das lokale Klima (Bru *et al.*, 2011) sowie der Kupfer- (Enwall *et al.*, 2010), Chrom-, Eisen- und Bromgehalt (Bru *et al.*, 2011) wurden schon mit der Abundanz und der Struktur von *nirK*-Gemeinschaften in Zusammenhang gebracht.

Keine der in dieser Arbeit untersuchten Bodeneigenschaften korreliert mit den *nirS*-Gemeinschaften (s. Abschnitt 3.5.6). Dies widerspricht anderen Untersuchungen, in denen der pH-Wert (Bru *et al.*, 2011; Cuhel *et al.*, 2010; Enwall *et al.*, 2010; Philippot *et al.*, 2009), der Nitrat- (Dandie *et al.*, 2011; Enwall *et al.*, 2010; Philippot *et al.*, 2009), Wasser- (Dandie *et al.*, 2011; Philippot *et al.*, 2009), Ammonium- (Morales *et al.*, 2010; Philippot *et al.*, 2009) und der Kohlenstoffgehalt (Bárta *et al.*, 2010; Morales *et al.*, 2010) als Einflussfaktoren auf die Abundanz und Struktur der *nirS*-Gemeinschaften gefunden worden waren. Auch die Kationenaustauschkapazität des Bodens bzw. der Gehalt an verschiedenen Kationen wurde häufig als Einflussfaktor auf die *nirS*-Gemeinschaften identifiziert (Bru *et al.*, 2011; Enwall *et al.*, 2010; Rosa *et al.*, 2014). Die Kationenaustauschkapazität beeinflusst die Bildung von Bodenaggregaten, in welchen sich anoxische Mikrohabitate bilden (Rosa *et al.*, 2014) und die sind Hot Spots der Denitrifikation in Böden sind (Parkin, 1987). Auch der Sand- und Tongehalt von Böden beeinflussen die Bildung von Bodenaggregaten und wurden als Faktoren, die die *nirS*-Gemeinschaften beeinflussen, ermittelt (Enwall *et al.*, 2010; Rosa *et al.*, 2014).

In dieser Arbeit konnten keine Einflussfaktoren auf die *nirS*-Gemeinschaften gefunden werden. Die Untersuchungen anderer Arbeiten zeigen jedoch, dass solche Einflussfaktoren existieren. Daher erscheint es als unwahrscheinlich, dass die *nirS*-Gemein-

schaften in den hier untersuchten Böden mit keinem der untersuchten Bodeneigenschaften in Zusammenhang stehen. Viel wahrscheinlicher ist, dass die *nirS*-t-RFLP-Daten nicht geeignet sind um diese Einflussfaktoren zu identifizieren. So ergab z.B. ein Vergleich dieser Methode mit einer anderen Fingerprinting-Methode, der DGGE, dass die t-RFLP deutlich weniger geeignet war, um zwischen unterschiedlich behandelten Gemeinschaften zu diskriminieren (Enwall und Hallin, 2009). Die t-RFLP kann DNA nur basierend auf den Restriktionsschnittstellen der verwendeten Enzyme unterscheiden. Daher ist es möglich, dass ein t-RF mehrere OTUs bzw. Sequenztypen darstellt. Dies ist wahrscheinlich der Grund dafür, dass keine Einflussfaktoren auf die *nirS*-Gemeinschaften identifiziert werden konnten.

Die *nirK*-Gemeinschaften werden ebenso wie die *nosZ*-Gemeinschaften vom pH-Wert, dem Vegetationstyp, dem Wasser- und dem Ammoniumgehalt beeinflusst. Diese Bodeneigenschaften wurden in anderen Arbeiten auch schon als Einflussfaktoren auf die *nirS*-Gemeinschaften identifiziert (s. oben). Es ist also sehr gut möglich, dass auch die *nirS*-Gemeinschaften in den hier untersuchten Böden durch den pH-Wert, den Vegetationstyp, den Wasser- und den Ammoniumgehalt beeinflusst werden.

#### **4.6.2 *nosZ*-Gemeinschaften**

In den untersuchten Böden wurden *nosZ*-Gene detektiert, die 15 verschiedenen Familien der Alpha-, Beta- und Gammaproteobacteria zugeordnet wurden (s. Abschnitt 3.5.7). Dies ist in Übereinstimmung mit anderen Untersuchungen der *nosZ*-Diversität (Enwall *et al.*, 2005; Henry *et al.*, 2008; Mounier *et al.*, 2004; Palmer und Horn, 2015) und zum Teil auch bedingt durch die verwendeten Primer, welche nur Alpha-, Beta- und Gammaproteobacteria erfassen (Enwall *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2013). Viele der in dieser Arbeit gefundenen Gattungen wurden auch in anderen Böden detektiert, so z. B.

#### 4. Diskussion

*Bradyrhizobium*, und *Rhodopseudomonas* in Ackerböden (Enwall *et al.*, 2005), *Achromobacter* (Palmer und Horn, 2015), *Mesorhizobium* und *Azospirillum* in sauren Moorböden (Palmer *et al.*, 2012) und *Pseudomonas*, *Azospirillum* und *Achromobacter* in biologischen Bodenkrusten und Waldböden (Rösch *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2014). Die hier gefundenen N<sub>2</sub>O-Reduzierer sind also in verschiedenen Regionen und Ökosystemen verbreitet.

Die *nosZ*-Gemeinschaften in den untersuchten Böden werden von einer OTU dominiert, OTU 1. Diese wurde als einzige in allen Böden detektiert (s. Anhang). Die Sequenzen der OTU 1 machten in allen Böden den Großteil der detektierten Sequenzen aus. OTU 1 repräsentiert die Spezies *Hyphomicrobium nitratorans*. *Hyphomicrobium* spp. sind bisher hauptsächlich aus aquatischen Systemen bekannt (Auclair *et al.*, 2012), wurden aber auch schon aus tiefem Untergrundboden unter denitrifizierenden Bedingungen isoliert (Green *et al.*, 2010). Das ubiquitäre Vorkommen von *Hyphomicrobium* deutet darauf hin, dass diese Bakterien sehr anpassungsfähig und von den Bodeneigenschaften unabhängig sind. Besonders *Hyphomicrobium nitratorans* ist für seine Anpassungsfähigkeit bekannt (Martineau *et al.*, 2015). Die übrigen OTUs sind spezialisierter und kommen nur in wenigen Böden vor (s. Anhang). Diese Organismen scheinen an bestimmte Bodenbedingungen angepasst zu sein, welche so die Struktur der *nosZ*-Gemeinschaften beeinflussen. Die Dominanz einer OTU von *nosZ*-besitzenden Bakterien bei vergleichsweise seltenem Vorkommen der übrigen N<sub>2</sub>O-Reduzierer scheint ein verbreitetes Phänomen zu sein (Mounier *et al.*, 2004; Palmer *et al.*, 2012; Palmer und Horn, 2015; Saarenheimo *et al.*, 2015).

Die *nosZ*-Gemeinschaften korrelierten mit dem pH-Wert und dem Vegetationstyp. Beide Faktoren korrelierten miteinander und zeigten einen gleich großen Zusammenhang mit den *nosZ*-Gemeinschaften (s. Abschnitt 3.5.7). Der pH-Wert gilt als Haupteinflussfaktor

auf Bakteriengemeinschaften (Fierer und Jackson, 2006) und ist auch bekannt dafür, *nosZ*-Gemeinschaften zu beeinflussen (Bergaust *et al.*, 2010; Cuhel *et al.*, 2010; Enwall *et al.*, 2005; Hallin *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010). Ein solcher Einfluss wurde auch schon für die Landnutzung nachgewiesen (Deslippe *et al.*, 2014; Enwall *et al.*, 2005). Es kann also davon ausgegangen werden, dass beide Faktoren sich gemeinsam auf die N<sub>2</sub>O-Reduzierer auswirken und der ursächliche Einflussfaktor nicht ermittelt werden kann.

Ein Einfluss des Nitrat- bzw. Stickstoffgehalts des Bodens auf N<sub>2</sub>O-Reduzierer ist allgemein bekannt (Deslippe *et al.*, 2014; Hallin *et al.*, 2009; Kastl *et al.*, 2015; Weier *et al.*, 1993). Dennoch konnte in der vorliegenden Arbeit kein solcher Zusammenhang gefunden werden. Stattdessen wurde eine Korrelation mit dem Ammonium- und dem Wassergehalt ermittelt. Der Zusammenhang der *nosZ*-Gemeinschaften mit dem Ammoniumgehalt könnte ein indirekter sein. Der Ammoniumgehalt beeinflusst den pH-Wert und dieser wiederum die *nosZ*-Gemeinschaften (s. oben). es ist aber auch möglich, dass der Einfluss des Ammoniumgehalts auf die *nosZ*-Gemeinschaften eine Konkurrenzsituation zwischen den verschiedenen Gruppen an Nitrat- und Nitritverwertern aufzeigt.

Ein Einfluss des Ammoniumgehalts auf die *nosZ*-Abundanz wurde auch schon in australischen Böden ermittelt, während andere Studien diesen Zusammenhang nicht herstellten (Deslippe *et al.*, 2014; Kastl *et al.*, 2015; Saarenheimo *et al.*, 2015). Ebenso wurde der Wassergehalt in einigen Böden als Einflussfaktor auf die Abundanz und Struktur der *nosZ*-Gemeinschaften gefunden (Deslippe *et al.*, 2014), in anderen Böden wurde jedoch gezeigt, dass ein solcher Einfluss nicht vorliegt (Szukics *et al.*, 2010). Dies deutet darauf hin, dass die Gemeinschaften der N<sub>2</sub>O-Reduzierer nicht in allen Böden gleich auf die Faktoren Ammonium- und Wassergehalt reagieren. Ihre Beeinflussung durch den pH-Wert und die Landnutzung wird jedoch häufiger beobachtet und scheint daher unabhängig vom Standort vorzukommen. Dies stimmt mit vielen verschiedenen

#### 4. Diskussion

Studien überein, welche zeigen dass der pH-Wert in einem starken Zusammenhang mit der Struktur von Bakteriengemeinschaften steht (Cuhel *et al.*, 2010; Rousk *et al.*, 2010; Übersicht in Wallenstein *et al.*, 2006). Weiterhin ist bekannt, dass die N<sub>2</sub>O-Reduktase bei niedrigem *in situ*-pH-Wert häufig nicht korrekt gefaltet werden kann und N<sub>2</sub>O-Reduzierer daher stark auf den pH-Wert reagieren (Bergaust *et al.*, 2010).

Die statistische Analyse zeigt, dass wichtige Umweltfaktoren, die mit den *nosZ*-Gemeinschaften in Zusammenhang stehen, nicht untersucht wurden. So wurde z. B. der Bodentyp in einer anderen Arbeit als Einflussfaktor auf die *nosZ*-Gemeinschaften identifiziert (Deslippe *et al.*, 2014). In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch kein Zusammenhang des Bodentyps mit den *nosZ*-Gemeinschaften gefunden werden (Daten nicht gezeigt). Es muss sich bei dem unbekanntem Einflussfaktor also um eine Variable handeln, welche weder in dieser noch in den anderen hier genannten Arbeiten untersucht wurde. Dies zeigt, dass selbst ein so gut untersuchtes Thema wie die Struktur von *nosZ*-Gemeinschaften noch weiterer Studien bedarf.

Der Vergleich der Ergebnisse der t-RFLP-Daten mit denen der Pyrosequenzierungs-Daten zeigt einige Unterschiede. So wurde der Einfluss des Ammonium- und Wassergehalts auf die N<sub>2</sub>O-Reduzierer nur mit den t-RFLP-Daten detektiert. Weiterhin kam kein t-RF in allen Böden vor, während OTU 1 in allen Böden stark vertreten war. Auch die DCA-Diagramme zeigen sehr große Unterschiede. Ein Vergleich der Methoden scheint also nicht ohne weiteres möglich zu sein. Dies könnte darin begründet sein, dass die Pyrosequenzierung eine größere Auflösung hat als die 'Fingerprinting'-Methode t-RFLP. Letztere kann DNA nur basierend auf den Restriktionsschnittstellen der verwendeten Enzyme unterscheiden (Enwall und Hallin, 2009). Daher ist es möglich, dass ein t-RF mehrere OTUs bzw. Sequenztypen repräsentiert. Andererseits ist die Pyrosequenzierung recht fehleranfällig. So kann z.B. sehr leicht das Signal einer Base doppelt gelesen werden und das einer

benachbarten gar nicht, so dass es zu einer Basensubstitution in der ausgegebenen Sequenz kommt (Balzer *et al.*, 2011). Weiterhin wurden für das Clustern der Sequenzen konservative taxonomische Grenzwerte gewählt. Dies hat zur Folge, dass die wahre Diversität nicht über-, möglicherweise aber unterschätzt wird.

Die *nosZ*-Gemeinschaften in den untersuchten Böden werden vom pH-Wert und dem Vegetationstyp beeinflusst. Ein Einfluss des Ammonium- und Wassergehalts wurde nur mit einer Methode detektiert. Diese Bodeneigenschaften wurden auch in anderen Arbeiten als Einflussfaktoren auf *nosZ*-Gemeinschaften identifiziert (s. oben). Weiterhin werden auch die *nirK*-Gemeinschaften in den hier untersuchten Böden vom Ammonium- und dem Wassergehalt beeinflusst (s. Abschnitt 4.5.1). Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass die *nosZ*-Gemeinschaften tatsächlich vom Ammonium- und dem Wassergehalt beeinflusst werden.

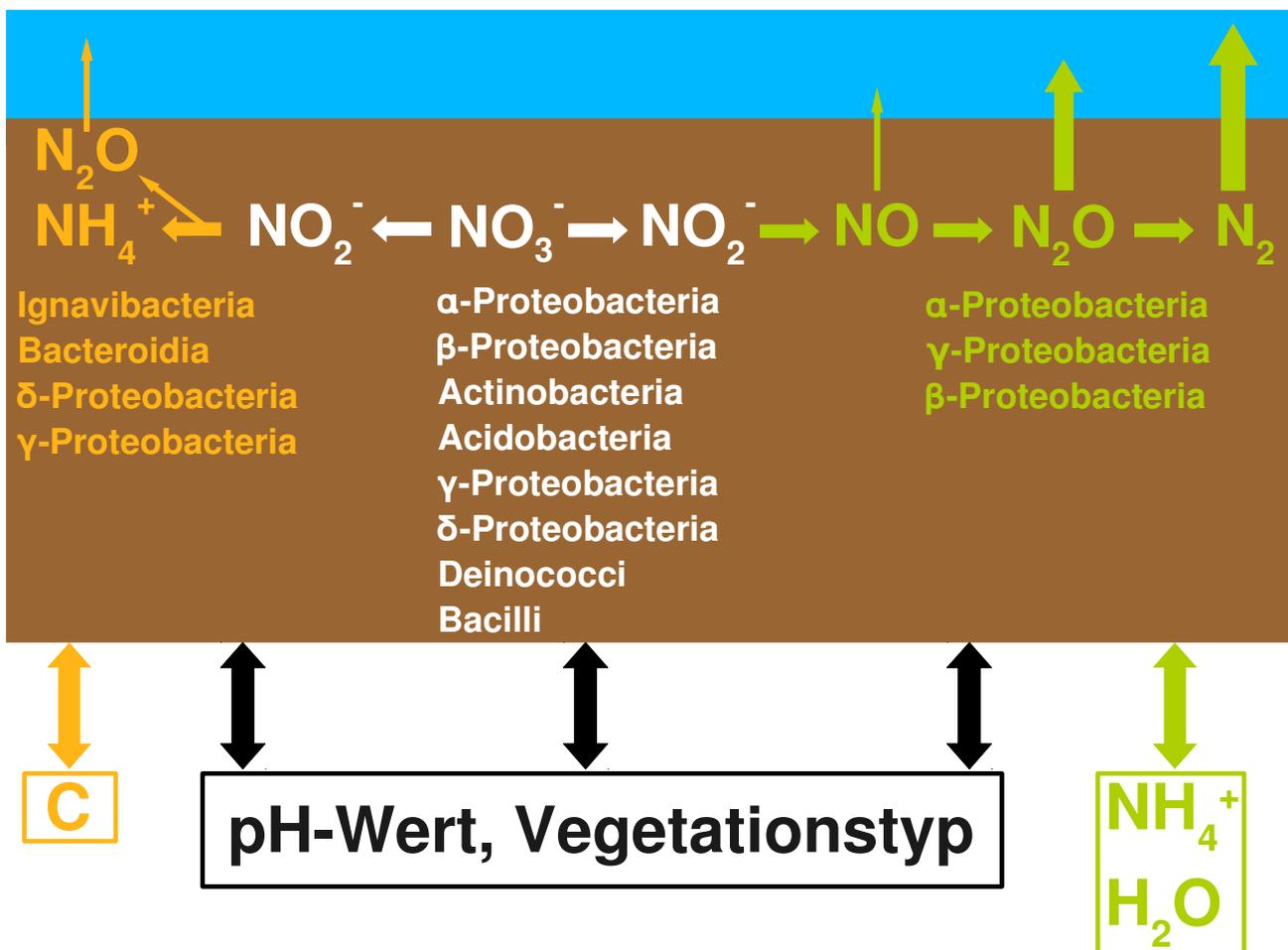
Die Denitrifikanten-Gemeinschaften werden also sowohl vom pH-Wert und dem Vegetationstyp als auch vom Ammoniumgehalt und dem Wassergehalt beeinflusst.

## 4.7 Schlussfolgerungen

Nitratreduzierer, Denitrifikanten und DNRA sind wichtige Organismengruppen, welche unter anoxischen Bedingungen den Böden Nitrat und Nitrit entziehen und aus diesen unter anderem das Treibhausgas  $N_2O$  bilden. In dieser Arbeit sollte der Einfluss von Bodeneigenschaften und Landnutzung auf die Nitratreduzierer, Denitrifikanten und DNRA untersucht werden. Durch die Kombination verschiedener Methoden konnten die Nachteile der einzelnen Methoden ausgeglichen werden. Gleichzeitig konnte ein deutlicher Einblick in die Struktur und Funktion der Nitratreduzierer, Denitrifikanten und DNRA in den Böden erhalten werden (s. Abbildung 46).

#### 4. Diskussion

Die Diversität und Abundanz der Nitratreduzierer, Denitrifikanten und DNRA sowie die Aktivität der Denitrifikanten werden vom pH-Wert und dem Vegetationstyp beeinflusst. Die Landnutzungsintensität dagegen beeinflusst nur die Abundanz und die potentielle Aktivität der Denitrifikanten. Die in Abschnitt 1.7 aufgestellte Hypothese konnte also zum großen Teil verifiziert werden.



**Abbildung 46: Nitratreduktion, Denitrifikation und DNRA in Grünland- und Waldböden: Bakterienklassen und Einflussfaktoren.**

Blau: Atmosphäre; braun: Boden; weiß: Nitratreduktion und Nitratreduzierer; orange: DNRA und dissimilatorische Nitritreduzierer; grün: Denitrifikation und Denitrifikanten; schwarzer Rahmen: auf alle drei Gruppen wirkende Einflussfaktoren; orange: nur auf DNRA wirkende Einflussfaktoren; grün: nur auf Denitrifikanten wirkende Einflussfaktoren; C: Kohlenstoffgehalt; NH<sub>4</sub><sup>+</sup>: Ammoniumgehalt; H<sub>2</sub>O: Wassergehalt

Die Nitratreduzierer gehören zu den Alpha-, Beta-, Gamma- und Deltaproteobacteria, sowie zu den Bacilli, Actinobacteria, Acidobacteria und Deinococci und weisen die größte Diversität der drei untersuchten Bakteriengruppen auf.

Die DNRA gehören zu den Bacteroidia sowie zu den Delta- und Gammaproteobacteria. Sie werden nicht nur vom pH-Wert und dem Vegetationstyp, sondern auch vom Kohlenstoffgehalt des Bodens beeinflusst.

Die Denitrifikanten gehören zu den Alpha-, Beta- und Gammaproteobacteria. Zusätzlich zum pH-Wert und dem Vegetationstyp werden sie auch vom Ammoniumgehalt und dem Wassergehalt der Böden beeinflusst.

## 5. Zusammenfassung

Das klimarelevante Treibhausgas  $N_2O$  gilt als die vorherrschende ozonschädigende Substanz des 21. Jahrhundert. Die Hauptursache anthropogener  $N_2O$ -Emissionen sind, aufgrund hoher Einträge von Stickstoffdünger, landwirtschaftlich genutzte Böden. Der größte Teil des in Böden produzierten  $N_2O$ s wird durch Denitrifikation und DNRA gebildet. Andererseits kann  $N_2O$  durch Denitrifikation auch verbraucht werden. Produktion und Verbrauch hängen von den nitrat- und nitritabbauenden Prokaryoten ab: den Nitratreduzierern, Denitrifikanten und DNRA. Deren Abundanz, Aktivität und Diversität werden durch die Bedingungen ihres Habitats beeinflusst. Die  $N_2O$ -Emission von Böden ist somit von deren Eigenschaften abhängig. Die Ziele der Arbeit waren daher 1) den Einfluss des pH-Wertes auf die Aktivität der Denitrifikanten zu bestimmen; 2) den Einfluss des pH-Wertes auf die Abundanz von Nitratreduzierern und Denitrifikanten zu bestimmen; 3) die Isolierung neuartiger Nitratreduzierer, Denitrifikanten und DNRA; 4) den Einfluss der Bodeneigenschaften auf Abundanz und Diversität von Nitratreduzierern, Denitrifikanten und DNRA zu bestimmen und 5) den Einfluss von Vegetationstyp und Landnutzungintensität auf Abundanz und Diversität von Nitratreduzierern, Denitrifikanten und DNRA zu bestimmen.

Eine Kombination kultivierungsabhängiger und kultivierungsunabhängiger Methoden wurde zur Untersuchung der Nitratreduzierer, Denitrifikanten und DNRA eingesetzt. Die Untersuchung der Abundanz von Denitrifikanten zeigte, dass diese vom pH-Wert, dem

Vegetationstyp und der Landnutzungsintensität beeinflusst werden. Für die Abundanz der Nitratreduzierer konnten jedoch keine Einflussfaktoren gefunden werden. Weiterhin wurden potentielle Denitrifikationsraten und deren Abhängigkeit von pH-Wert ermittelt. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der Denitrifikanten vom pH-Wert sowie einem Zusammenwirken von Vegetationstyp und Landnutzungsintensität beeinflusst wird. Die Diversität der Nitratreduzierer, Denitrifikanten und DNRA wurde durch zwei komplementäre Ansätze untersucht. Zum einen wurden Nitratreduzierer, Denitrifikanten und DNRA aus den untersuchten Böden isoliert und anschließend deren 16S rRNA-Gene phylogenetisch analysiert. Dabei wurden 537 Isolate aus 44 OTUs der Speziesebene und 25 prokaryotischen Familien erhalten. Zum anderen wurden strukturelle Gene als molekulare Marker aus der Boden-DNA amplifiziert und anschließend phylogenetisch und mit multivariater Statistik analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Diversität der Nitratreduzierer, Denitrifikanten und DNRA vom pH-Wert und dem Vegetationstyp beeinflusst wird. Die Nitratreduzierer gehören zu den Alpha-, Beta-, Gamma- und Deltaproteobacteria, sowie zu den Bacilli, Actinobacteria, Acidobacteria und Deinococci und weisen die größte Diversität der drei untersuchten Bakteriengruppen auf. Die DNRA gehören zu den Bacteroidia sowie zu den Delta- und Gammaproteobacteria. Sie werden nicht nur vom pH-Wert und dem Vegetationstyp, sondern auch vom Kohlenstoffgehalt des Bodens beeinflusst. Die Denitrifikanten gehören zu den Alpha-, Beta- und Gammaproteobacteria. Zusätzlich zum pH-Wert und dem Vegetationstyp werden sie auch vom Ammoniumgehalt und dem Wassergehalt der Böden beeinflusst.

Nitratreduzierer, Denitrifikanten und DNRA stellen einen wichtigen Teil des biologischen Stickstoffzyklus dar und werden in der Hauptsache vom pH-Wert und dem Vegetationstyp beeinflusst.

## 6. Summary

The potent greenhouse gas  $N_2O$  is the most predominant ozone depleting substance of the 21<sup>st</sup> century. Its main anthropogenic source are  $N_2O$  emissions from agricultural soils, triggered by high amounts of nitrogen fertiliser. Most of the  $N_2O$  from soils is produced by denitrifiers and DNRA.  $N_2O$  can also be consumed by denitrification. Production and consumption depend on the nitrate and nitrite reducing prokaryotes: the nitrate reducers, denitrifiers and DNRA. The abundance, activity and diversity of these organisms is influenced by the properties of their habitat. Therefore, soils are sources and sinks of  $N_2O$ , depending on their properties. Thus, the aims of this work are 1) to determine the influence of the pH on the activity of denitrifiers; 2) to determine the influence of the pH on the abundance of nitrate reducers and denitrifiers; 3) to isolate novel nitrate reducers, denitrifiers and DNRA; 4) to determine the influence of the soil properties on the abundance and diversity of nitrate reducers, denitrifiers and DNRA; 5) to determine the influence of the vegetation type and the land-use intensity on the abundance and diversity of nitrate reducers, denitrifiers and DNRA.

To investigate soil nitrate reducers, denitrifiers and DNRA, a combination of cultivation dependent and cultivation independent methods were used. The investigation of the denitrifier abundance showed it to be influenced by pH, vegetation type and land-use intensity. The abundance of the nitrate reducers was not influenced by any investigated soil parameter. Furthermore, potential denitrification rates and their dependence on the pH

were determined. The activity of denitrifiers was shown to be dependent on pH as well as on vegetation type and land-use type. The diversity of nitrate reducers, denitrifiers and DNRA was analysed with two complementary approaches. On the one hand, they were isolated out of the investigated soils and subsequently, their 16S rRNA genes were analysed phylogenetically. This approach yielded 537 isolates belonging to 44 species level OTUs and 27 prokaryotic families. On the other hand, structural genes as molecular markers were amplified out of soil DNA and analysed phylogenetically and statistically. It could be shown, that the diversity of nitrate reducers, denitrifiers and DNRA was influenced by the pH, the vegetation type and the land-use intensity. The nitrate reducers are the group with the highest diversity. They belong to the Alpha-, Beta-, Gamma-, Deltaproteobacteria Bacilli, Actinobacteria, Acidobacteria and Deinococci. The DNRA belong to the Bacteroidia, Delta- and Gammaproteobacteria. They are not only influenced by the pH and the vegetation type, but also by the carbon content of the soil. The denitrifiers belong to the Alpha-, Beta- and Gammaproteobacteria. They are influenced by pH, vegetation type, ammonium and water content of the soil.

Nitrate reducers, denitrifiers and DNRA represent an important part of the biological nitrogen cycle and are mainly influenced by the pH and the vegetation type.

## 7. Literaturverzeichnis

**Adman ET** (1995) A taste of copper. *Nat Struct Biol* **2**: 929-931

**Al-Qadiri H, Sablani SS, Ovissipour M, Al-Alami N, Govindan B, Rasco B** (2015) Effect of oxygen stress on growth and survival of *Clostridium perfringens*, *Campylobacter jejuni*, and *Listeria monocytogenes* under different storage conditions. *J Food Protect* **78**: 691-697

**Alain K, Querellou J, Lesongeur F, Pignet P, Crassous P, Raguenes G, Cueff V, Cambon-Bonavita MA** (2002) *Caminibacter hydrogeniphilus* gen. nov., sp nov., a novel thermophilic, hydrogen-oxidizing bacterium isolated from an east pacific rise hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Micr* **52**: 1317-1323

**Alcantara-Hernandez RJ, Valenzuela-Encinas C, Marsch R, Dendooven L** (2009) Respiratory and dissimilatory nitrate-reducing communities from an extreme saline alkaline soil of the former lake texcoco (mexico). *Extremophiles* **13**: 169-178

**Alley RB, Berntsen T, Bindoff NL, Chen Z, Chidthaisong A, Friedlingstein P, Gregory JM, Hegerl GC, Heimann M, Hewitson B, Hoskins BJ, Joos F, Jouzel J, Kattsov V, Lohmann U, Manning M, Matsuno T, Molina M, Nicholls N, Overpeck J, Qin D, Raga G, Ramaswamy V, Ren J, Rusticucci M, Solomon S, Somerville R, Stocker TF, Stott PA, Stouffer RJ, Whetton P, Wood RA** (2007) IPCC 2007: Summary for policymakers. In: Solomon S, Qin D, Manning M, Chen Z, Marquis M, Averyt KB, Tignor M, Miller HL (ed) Climate change 2007: The physical science basis. Contribution of working group I to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA,

**Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang JH, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search

programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389-3402

**Amann J** (1911) Die direkte Zählung der Wasserbakterien mittels des Ultramikroskops. *Centralbl f Bakteriol* **29**: 381–384

**Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH** (1995) Phylogenetic identification and in-situ detection of individual microbial-cells without cultivation. *Microbiol Rev* **59**: 143-169

**Angers DA, Caron J** (1998) Plant-induced changes in soil structure: processes and feedbacks. *Biogeochemistry* **42**: Amer Soc Agron Soil Sci Soc Amer-72

**Arai H, Igrahashi Y, Kodama T** (1995) The structural genes for nitric-oxide reductase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Bba-Gene Struct Expr* **1261**: 279-284

**Auclair J, Parent S, Villemur R** (2012) Functional diversity in the denitrifying biofilm of the methanol-fed marine denitrification system at the montreal biodome. *Microb Ecol* **63**: 726-735

**Auguet JC, Barberan A, Casamayor EO** (2010) Global ecological patterns in uncultured archaea. *Isme J* **4**: 182-190

**Avrahami S, Conrad R, Braker G** (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 Microb* **68**: 5685-5692

**Balch WE, Fox GE, Magrum LJ, Woese CR, Wolfe RS** (1979) Methanogens: Re-evaluation of a unique biological group. *Microbiol Rev* **43**: 260-296

**Balch WE, Wolfe RS** (1976) New approach to cultivation of methanogenic bacteria: 2-mercaptoethanesulfonic acid (HS-CoM)-dependent growth of *Methanobacterium ruminatum* in a pressurized atmosphere. *Appl Environ Microb* **32**: 781-791

**Balestra GM, Misaghi IJ** (1997) Increasing the efficiency of the plate counting method for estimating bacterial diversity. *J Microbiol Meth* **30**: 111-117

## 7. Literaturverzeichnis

- Ballard AL, Ferguson SJ** (1988) Respiratory nitrate reductase from *paracoccus denitrificans*: Evidence for 2 b-type hemes in the gamma-subunit and properties of a water-soluble active enzyme containing alpha-subunit and beta-subunit. *Eur J Biochem* **174**: 207-212
- Balzer S, Malde K, Jonassen I** (2011) Systematic exploration of error sources in pyrosequencing flowgram data. *Bioinformatics* **27**: 1304-1309
- Bárta J, Melichova T, Vanek D, Picek T, Santruckova H** (2010) Effect of pH and dissolved organic matter on the abundance of *nirk* and *nirs* denitrifiers in spruce forest soil. *Biogeochemistry* **101**: 123-132
- Barton L, McLay CDA, Schipper LA, Smith CT** (1999) Annual denitrification rates in agricultural and forest soils: a review. *Aust J Soil Res* **37**: 1073-1093
- Bazylinsky DA, Blakemore RP** (1983) Denitrification and assimilatory nitrate reduction in *Aquaspirillum magnetotacticum*. *Appl Environ Microb* **46**: 1118-1124
- Behrendt U, Schumann P, Stieglmeier M, Pukall R, Augustin J, Sproeer C, Schwendner P, Moissl-Eichinger C, Ulrich A** (2010) Characterization of heterotrophic nitrifying bacteria with respiratory ammonification and denitrification activity: Description of *Paenibacillus uliginis* sp. nov., an inhabitant of fen peat soil and *Paenibacillus purispatii* sp. nov., isolated from a spacecraft assembly clean room. *Syst Appl Microbiol* **33**: 328-336
- Beijerinck M** (1888) Die Bacterien der Papilionaceenknöllchen. *Botanische Zeitung* **46**: 740-750
- Bergaust L, Mao Y, Bakken LR, Frostegard A** (2010) Denitrification response patterns during the transition to anoxic respiration and posttranscriptional effects of suboptimal pH on nitrogen oxide reductase in *Paracoccus denitrificans*. *Appl Environ Microb* **76**: 6387-6396

- Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity GM** (2005) Bergey's manual of systematic bacteriology, 2nd ed., vol. 2, parts a, b and c. Springer-Verlag, New York, NY
- Berks BC, Ferguson SJ, Moir JWB, Richardson DJ** (1995a) Enzymes and associated electron transport systems that catalyse the respiratory reduction of nitrogen oxides and oxyanions. *Bba-Bioenergetics* **1232**: 97-173
- Berks BC, Richardson DJ, Reilly A, Willis AC, Ferguson SJ** (1995b) The *napEDABC* gene-cluster encoding the periplasmic nitrate reductase system of *Thiosphaera pantotropha*. *Biochem J* **309**: 983-992
- Berner D, Marhan S, Keil D, Poll C, Schützenmeister A, Piepho H, Kandeler E** (2011) Land-use intensity modifies spatial distribution and function of soil microorganisms in grasslands. *Pedobiologia* **54**: 341-351
- Bertero MG, Rothery RA, Palak M, Hou C, Lim D, Blasco F, Weiner JH, Strynadka NCJ** (2003) Insights into the respiratory electron transfer pathway from the structure of nitrate reductase A. *Nat Struct Biol* **10**: 681-687
- Bintrim SB, Donohue TJ, Handelsman J, Roberts GP, Goodman RM** (1997) Molecular phylogeny of archaea from soil. *P Natl Acad Sci USA* **94**: 277-282
- Blasco F, Dos Santos JP, Magalon A, Frixon C, Guigliarelli B, Santini CL, Giordano G** (1998) *NarJ* is a specific chaperone required for molybdenum cofactor assembly in nitrate reductase a of escherichia coli. *Mol Microbiol* **28**: 435-447
- Blasco F, Guigliarelli B, Magalon A, Asso M, Giordano G, Rothery RA** (2001) The coordination and function of the redox centres of the membrane-bound nitrate reductases. *Cell Mol Life Sci* **58**: 179-193
- Blasco F, Iobbi C, Ratouchniak J, Bonnefoy V, Chippaux M** (1990) Nitrate reductases of *Escherichia coli*: Sequence of the 2nd nitrate reductase and comparison with that encoded by the *narGHJI* operon. *Mol Gen Genet* **222**: 104-111

## 7. Literaturverzeichnis

- Bleakley BH, Tiedje JM** (1982) Nitrous oxide production by organisms other than nitrifiers or denitrifiers. *Appl Environ Microb* **44**: 1342-1348
- Blöchl E, Rachel R, Burggraf S, Hafenbradl D, Jannasch HW, Stetter KO** (1997) *Pyrolobus fumarii*, gen. and sp. nov., represents a novel group of archaea, extending the upper temperature limit for life to 113 degrees C. *Extremophiles* **1**: 14-21
- Blume H, Brümmer G, Scheffer F, Horn R, Schachtschabel P, Kandeler E, Welp G, Kögel-Knabner I, Thiele-Bruhn S, Kretzschmar R** (2009) Scheffer/Schachtschabel: Lehrbuch der Bodenkunde. Spektrum Akademischer Verlag,
- Bollmann A, Lewis K, Epstein SS** (2007) Incubation of environmental samples in a diffusion chamber increases the diversity of recovered isolates. *Appl Environ Microb* **73**: 6386-6390
- Bond DR, Holmes DE, Tender LM, Lovley DR** (2002) Electrode-reducing microorganisms that harvest energy from marine sediments. *Science* **295**: 483-485
- Both GJ, Gerards S, Laanbroek HJ** (1990) Most probable numbers of chemolithoautotrophic nitrite-oxidizing bacteria in well drained grassland soils: Stimulation by high nitrite concentrations. *FEMS Microbiol Ecol* **74**: 287-293
- Bouwman AF** (1998) Environmental science: Nitrogen oxides and tropical agriculture. *Nature* **392**: 866-867
- Brady NC, Weil RR** (1999) The nature and properties of soils, 12th ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey,
- Braker G, Schwarz J, Conrad R** (2010) Influence of temperature on the composition and activity of denitrifying soil communities. *FEMS Microbiol Ecol* **73**: 134-148
- Broda DM, Saul DJ, Bell RG, Musgrave DR** (2000) *Clostridium algidixylanolyticum* sp. nov., a psychrotolerant, xylan-degrading, spore-forming bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* **50 Pt 2**: 623-631

- Brondijk THC, Nilavongse A, Filenko N, Richardson DJ, Cole JA** (2004) *NapGH* components of the periplasmic nitrate reductase of *Escherichia coli* K-12: location, topology and physiological roles in quinol oxidation and redox balancing. *Biochem J* **379**: 47-55
- Brown K, Djinovic-Carugo K, Haltia T, Cabrito I, Saraste M, Moura JJG, Moura I, Tegoni M, Cambillau C** (2000) Revisiting the catalytic CuZ cluster of nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) reductase: Evidence of a bridging inorganic sulfur. *J Biol Chem* **275**: 41133-41136
- Bru D, Ramette A, Saby NPA, Dequiedt S, Ranjard L, Jolivet C, Arrouays D, Philippot L** (2011) Determinants of the distribution of nitrogen-cycling microbial communities at the landscape scale. *ISME J* **5**: 532-542
- Brunet RC, Garcia-Gil LJ** (1996) Sulfide-induced dissimilatory nitrate reduction to ammonia in anaerobic freshwater sediments. *FEMS Microbiol Ecol* **21**: 131-138
- Bruns A, Cypionka H, Overmann J** (2002) Cyclic AMP and acyl homoserine lactones increase the cultivation efficiency of heterotrophic bacteria from the central Baltic Sea. *Appl Environ Microb* **68**: 3978-3987
- Buresh RJ, Patrick WH** (1978) Nitrate reduction to ammonium in anaerobic soil. *Soil Sci Soc Am J* **42**: 913-918
- Büsch A, Friedrich B, Cramm R** (2002) Characterization of the *norB* gene, encoding nitric oxide reductase, in the nondenitrifying *Cyanobacterium synechocystis* sp. strain PCC6803. *Appl Environ Microb* **68**: 668-672
- Button DK, Schut F, Quang P, Martin R, Robertson BR** (1993) Viability and isolation of marine-bacteria by dilution culture: Theory, procedures, and initial results. *Appl Environ Microb* **59**: 881-891
- Cabello P, Roldan MD, Moreno-Vivian C** (2004) Nitrate reduction and the nitrogen cycle in archaea. *Microbiol-Sgm* **150**: 3527-3546
- Canfield DE, Glazer AN, Falkowski PG** (2010) The evolution and future of earth's

## 7. Literaturverzeichnis

nitrogen cycle. *Science* **330**: 192-196

**Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Pena AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Tumbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R** (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* **7**: 335-336

**Carney KM, Matson PA** (2006) The influence of tropical plant diversity and composition on soil microbial communities. *Microb Ecol* **52**: 226-238

**Cerdeno-Tarraga AM, Patrick S, Crossman LC, Blakely G, Abratt V, Lennard N, Poxton I, Duerden B, Harris B, Quail MA, Barron A, Clark L, Corton C, Doggett J, Holden MTG, Larke N, Line A, Lord A, Norbertczak H, Ormond D, Price C, Rabinowitsch E, Woodward J, Barrell B, Parkhill J** (2005) Extensive DNA inversions in the *B. fragilis* genome control variable gene expression. *Science* **307**: 1463-1465

**Chao A** (1984) Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scand J Stat* **11**: 265-270

**Chapuis-Lardy L, Wrage N, Metay A, Chotte J, Bernoux M** (2007) Soils, a sink for N<sub>2</sub>O? A review. *Glob Change Biol* **13**: 1-17

**Chaudhry GR, MacGregor CH** (1983) *Escherichia coli* nitrate reductase subunit A: Its role as the catalytic site and evidence for its modification. *J Bacteriol* **154**: 387-394

**Cheneby D, Bru D, Pascault N, Maron PA, Ranjard L, Philippot L** (2010) Role of plant residues in determining temporal patterns of the activity, size, and structure of nitrate reducer communities in soil. *Appl Environ Microb* **76**: 7136-7143

**Cheneby D, Hallet S, Mondon A, Martin-Laurent F, Germon JC, Philippot L** (2003) Genetic characterization of the nitrate reducing community based on *narG* nucleotide sequence analysis. *Microbial Ecol* **46**: 113-121

- Clarke TA, Dennison V, Seward HE, Burlat B, Cole JA, Hemmings AM, Richardson DJ** (2004) Purification and spectropotentiometric characterization of *Escherichia coli nrfB*, a decaheme homodimer that transfers electrons to the decaheme periplasmic nitrite reductase complex. *J Biol Chem* **279**: 41333-41339
- Coelho C, Gonzalez PJ, Moura JGG, Moura I, Trincao J, Romao MJ** (2011) The crystal structure of *Cupriavidus necator* nitrate reductase in oxidized and partially reduced states. *J Mol Biol* **408**: 932-948
- Cole J** (1996) Nitrate reduction to ammonia by enteric bacteria: Redundancy, or a strategy for survival during oxygen starvation? *FEMS Microbiol Lett* **136**: 1-11
- Cole JA, Brown CM** (1980) Nitrite reduction to ammonia by fermentative bacteria: Short circuit in the biological nitrogen cycle. *FEMS Microbiol Lett* **7**: 65-72
- Collman JP, Yang Y, Dey A, Decreau RA, Ghosh S, Ohta T, Solomon EI** (2008) A functional nitric oxide reductase model. *P Natl Acad Sci Usa* **105**: 15660-15665
- Connon SA, Giovannoni SJ** (2002) High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates. *Appl Environ Microb* **68**: 3878-3885
- Coyne MS, Arunakumari A, Averill BA, Tiedje JM** (1989) Immunological identification and distribution of dissimilatory heme cd<sub>1</sub> and nonheme copper nitrite reductases in denitrifying bacteria. *Appl Environ Microb* **55**: 2924-2931
- Cruz-Garcia C, Murray AE, Klappenbach JA, Stewart V, Tiedje JM** (2007) Respiratory nitrate ammonification by *Shewanella oneidensis* MR-1. *J Bacteriol* **189**: 656-662
- Cuhel J, Simek M, Laughlin RJ, Bru D, Cheneby D, Watson CJ, Philippot L** (2010) Insights into the effect of soil pH on N<sub>2</sub>O and N<sub>2</sub> emissions and denitrifier community size and activity. *Appl Environ Microb* **76**: 1870-1878
- Dahlöf I** (2002) Molecular community analysis of microbial diversity. *Curr Opin Biotech*

## 7. Literaturverzeichnis

13: 213-217

**Dalton H, Mortenson LE** (1972) Dinitrogen (N<sub>2</sub>) fixation (with a biochemical emphasis).

*Bacteriol Rev* **36**: 231-260

**Dandie CE, Wertz S, Leclair CL, Goyer C, Burton DL, Patten CL, Zebarth BJ, Trevors**

**JT** (2011) Abundance, diversity and functional gene expression of denitrifier communities in adjacent riparian and agricultural zones. *FEMS Microbiol Ecol* **77**: 69-82

**Daniel R** (2005) The metagenomics of soil. *Nat Rev Microbiol* **3**: 470-478

**Davis KER, Joseph SJ, Janssen PH** (2005) Effects of growth medium, inoculum size, and incubation time on culturability and isolation of soil bacteria. *Appl Environ Microb* **71**: 826-834

**de Man J** (1975) The probability of most probable numbers. *Appl Microbiol Biotechnol* **1**: 67-78

**de Vries W, Niekus HGD, Boellaard M, Stouthamer AH** (1980) Growth yields and energy generation by *Campylobacter sputorum* subspecies *bubulus* during growth in continuous culture with different hydrogen acceptors. *Arch Microbiol* **124**: 221-227

**de Vries W, van Wijck-Kapteyn WM, Oosterhuis SK** (1974) The presence and function of cytochromes in *Selenomonas ruminantium*, *Anaerovibrio lipolytica* and *Veillonella alcalescens*. *J Gen Microbiol* **81**: 69-78

**Degelmann DM, Borken W, Kolb S** (2009) Methane oxidation kinetics differ in european beech and norway spruce soils. *Eur J Soil Sci* **60**: 499-506

**Dell'Acqua S, Moura I, Moura JJG, Pauleta SR** (2011) The electron transfer complex between nitrous oxide reductase and its electron donors. *J Biol Inorg Chem* **16**: 1241-1254

**DeLong EF** (1998) Everything in moderation: Archaea as 'non-extremophiles'. *Curr Opin Genet Dev* **8**: 649-654

**Depkat-Jakob PS, Hilgarth M, Horn MA, Drake HL** (2010) Effect of earthworm feeding guilds on ingested dissimilatory nitrate reducers and denitrifiers in the alimentary canal of

the earthworm. *Appl Environ Microb* **76**: 6205-6214

**Deslippe JR, Jamali H, Jha N, Saggari S** (2014) Denitrifier community size, structure and activity along a gradient of pasture to riparian soils. *Soil Biol Biochem* **71**: 48-60

**DSMZ** (2015) Prokaryotic nomenclature up-to-date september 2015; <http://www.dsmz.de/bacterial-diversity/prokaryotic-nomenclature-up-to-date>.

**Einsle O, Stach P, Messerschmidt A, Simon J, Kröger A, Huber R, Kroneck PMH** (2000) Cytochrome c nitrite reductase from *Wolinella succinogene*: Structure at 1.6 angstrom resolution, inhibitor binding, and heme-packing motifs. *J Biol Chem* **275**: 39608-39616

**Ellington MJK, Bhakoo KK, Sawers G, Richardson DJ, Ferguson SJ** (2002) Hierarchy of carbon source selection in *Paracoccus pantotrophus*: Strict correlation between reduction state of the carbon substrate and aerobic expression of the *nap* operon. *J Bacteriol* **184**: 4767-4774

**Enwall K, Hallin S** (2009) Comparison of t-RFLP and DGGE techniques to assess denitrifier community composition in soil. *Lett Appl Microbiol* **48**: 145-148

**Enwall K, Philippot L, Hallin S** (2005) Activity and composition of the denitrifying bacterial community respond differently to long-term fertilization. *Appl Environ Microb* **71**: 8335-8343

**Enwall K, Throbäck IN, Stenberg M, Soderström M, Hallin S** (2010) Soil resources influence spatial patterns of denitrifying communities at scales compatible with land management. *Appl Environ Microb* **76**: 2243-2250

**Eschbach M, Mobitz H, Rompf A, Jahn D** (2003) Members of the genus *Arthrobacter* grow anaerobically using nitrate ammonification and fermentative processes: Anaerobic adaptation of aerobic bacteria abundant in soil. *FEMS Microbiol Lett* **223**: 227-230

**Ettema CH, Wardle DA** (2002) Spatial soil ecology. *Trends Ecol Evol* **17**: 177-183

**Euzeby JP** (1997) List of bacterial names with standing in nomenclature: A folder

## 7. Literaturverzeichnis

available on the internet. *Int J Syst Bacteriol* **47**: 590-592

**Falk S, Liu B, Braker G** (2010) Isolation, genetic and functional characterization of novel soil *nirK*-type denitrifiers. *Syst Appl Microbiol* **33**: 337-347

**Felsenstein J** (1985) Confidence-limits on phylogenies - an approach using the bootstrap. *Evolution Int J Org Evolution* **39**: 783-791

**Felsmann K, Baudis M, Gimbel K, Kayler ZE, Ellerbrock R, Bruehlheide H, Bruckhoff J, Welk E, Puhmann H, Weiler M, Gessler A, Ulrich A** (2015) Soil bacterial community structure responses to precipitation reduction and forest management in forest ecosystems across germany. *PLoS ONE* **10**:

**Ferrari BC, Binnerup SJ, Gillings M** (2005) Microcolony cultivation on a soil substrate membrane system selects for previously uncultured soil bacteria. *Appl Environ Microb* **71**: 8714-8720

**Fierer N, Jackson RB** (2006) The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *P Natl Acad Sci USA* **103**: 626-631

**Fierer N, Morse JL, Berthrong ST, Bernhardt ES, Jackson RB** (2007) Environmental controls on the landscape-scale biogeography of stream bacterial communities. *Ecology* **88**: 2162-2173

**Finlay BJ, Span ASW, Harman JMP** (1983) Nitrate respiration in primitive eukaryotes. *Nature* **303**: 333-336

**Firestone MK, Firestone RB, Tiedje JM** (1980) Nitrous-oxide from soil denitrification - factors controlling its biological production. *Science (80- )* **208**: 749-751

**Fischer M, Bossdorf O, Göckel S, Hansel F, Hemp A, Hessenmoller D, Korte G, Nieschulze J, Pfeiffer S, Prati D, Renner S, Schöning I, Schumacher U, Wells K, Buscot F, Kalko EKV, Linsenmair KE, Schulze ED, Weisser WW** (2010) Implementing large-scale and long-term functional biodiversity research: The biodiversity exploratories. *Basic Appl Ecol* **11**: 473-485

- Forster SM** (1990) The role of microorganisms in aggregate formation and soil stabilization: Types of aggregation. *Arid Soil Res Rehab* **4**: 85-98
- Forte E, Urbani A, Saraste M, Sarti P, Brunori M, Giuffre A** (2001) The cytochrome *cbb<sub>3</sub>* from *Pseudomonas stutzeri* displays nitric oxide reductase activity. *Eur J Biochem* **268**: 6486-6490
- Foster RC** (1988) Microenvironments of soil-microorganisms. *Biol Fert Soils* **6**: 189-203
- Freitag A, Rudert M, Bock E** (1987) Growth of *Nitrobacter* by dissimilatoric nitrate reduction. *FEMS Microbiol Lett* **48**: 105-109
- Fülöp V, Moir JWB, Ferguson SJ, Hajdu J** (1995) The anatomy of a bifunctional enzyme: Structural basis for reduction of oxygen to water and synthesis of nitric-oxide by cytochrome *cd<sub>1</sub>*. *Cell* **81**: 369-377
- Gadkari D** (1984) Influence of the herbicides Goltix and Sencor on nitrification. *Zentralblatt für Mikrobiologie* **139**: 623-631
- Gamble PB, Downie JA, Haddock BA** (1975) Proton translocation and respiratory nitrate reductase of *Escherichia coli*. *Biochem J* **152**: 547-559
- Gamble TN, Betlach MR, Tiedje JM** (1977) Numerically dominant denitrifiers from world soils. *Appl Environ Microb* **33**: 926-939
- Gayon U, Dupetit G** (1886) Recherches sur la reduction des nitrates par les infiniment petits. G. Gounouilhou
- Giuffrè A, Stubauer G, Sarti P, Brunori M, Zumft WG, Buse G, Soulimane T** (1999) The heme-copper oxidases of *Thermus thermophilus* catalyze the reduction of nitric oxide: Evolutionary implications. *P Natl Acad Sci Usa* **96**: 14718-14723
- Godden JW, Turley S, Teller DC, Adman ET, Liu MY, Payne WJ, Legall J** (1991) The 2.3 angstrom x-ray structure of nitrite reductase from *Achromobacter cycloclastes*. *Science* **253**: 438-442

## 7. Literaturverzeichnis

- González PJ, Correia C, Moura I, Brondino CD, Moura J J G** (2006) Bacterial nitrate reductases: Molecular and biological aspects of nitrate reduction. *J Inorg Biochem* **100**: 1015-1023
- Gräf DRH, Jones CM, Hallin S** (2014) Intergenomic comparisons highlight modularity of the denitrification pathway and underpin the importance of community structure for N<sub>2</sub>O emissions. *PLoS ONE* **9**:
- Grant MA, Payne WJ** (1981) Denitrification by strains of *Neisseria*, *Kingella*, and *Chromobacterium*. *Int J Syst Bacteriol* **31**: 276-279
- Green SJ, Prakash O, Gihring TM, Akob DM, Jasrotia P, Jardine PM, Watson DB, Brown SD, Palumbo AV, Kostka JE** (2010) Denitrifying bacteria isolated from terrestrial subsurface sediments exposed to mixed-waste contamination. *Appl Environ Microb* **76**: 3244-3254
- Guan LL, Onuki H, Kamino K** (2000) Bacterial growth stimulation with exogenous siderophore and synthetic n-acyl homoserine lactone autoinducers under iron-limited and low-nutrient conditions. *Appl Environ Microb* **66**: 2797-2803
- Hadjipetrou LP, Stouthamer AH** (1965) Energy production during nitrate respiration by *aerobacter aerogenes*. *J Gen Microbiol* **38**: 29-34
- Haedicke K** (2008) Zellzahlbestimmung und zielgerichtete Isolierung von Denitrifizierern aus Wald- und Grünlandböden. Bachelorarbeit
- Hallin S, Jones CM, Schloter M, Philippot L** (2009) Relationship between N-cycling communities and ecosystem functioning in a 50-year-old fertilization experiment. *Isme J* **3**: 597-605
- Hamaki T, Suzuki M, Fudou R, Jojima Y, Kajiura T, Tabuchi A, Sen K, Shibai H** (2005) Isolation of novel bacteria and Actinomycetes using soil-extract agar medium. *J Biosci Bioeng* **99**: 485-492

- Hammer O, Harper DAT, Ryan PD** (2001) PAST: PAleontological STatistics software package for education and data analysis. *Palaeontol Electron* **4**(1)
- Harborne NR, Griffiths L, Busby SJW, Cole JA** (1992) Transcriptional control, translation and function of the products of the 5 open reading frames of the *Escherichia coli nir* operon. *Mol Microbiol* **6**: 2805-2813
- Harrigan WF, Mc Cance ME** (1966) Laboratory methods in microbiology. Academic Press, London,
- Hartmann S, Wolf G, Hammes WP** (1995) Reduction of nitrite by *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus piscifermentans*. *Syst Appl Microbiol* **18**: 323-328
- Hashimoto T, Koga M, Masaoka Y** (2009) Advantages of a diluted nutrient broth medium for isolating N<sub>2</sub>-producing denitrifying bacteria of Alpha-proteobacteria in surface and subsurface upland soils. *Soil Sci Plant Nutr* **55**: 647-659
- Hattori T** (1977) Microbial habitat in soil. *Jarq-Jpn Agr Res Q* **11**: 24-29
- Hendriks J, Warne A, Gohlke U, Haltia T, Ludovici C, Lubben M, Saraste M** (1998) The active site of the bacterial nitric oxide reductase is a dinuclear iron center. *Biochemistry* **37**: 13102-13109
- Henry S, Bru D, Stres B, Hallet S, Philippot L** (2006) Quantitative detection of the *nosZ* gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16S rRNA, *narG*, *nirK*, and *nosZ* genes in soils. *Appl Environ Microb* **72**: 5181-5189
- Henry S, Texier S, Hallet S, Bru D, Dambreville C, Cheneby D, Bizouard F, Germon JC, Philippot L** (2008) Disentangling the rhizosphere effect on nitrate reducers and denitrifiers: Insight into the role of root exudates. *Environ Microbiol* **10**: 3082-3092
- Henstra AM, Stams AJM** (2004) Novel physiological features of *Carboxydotherrmus hydrogenoformans* and *Thermoterrabacterium ferrireducens*. *Appl Environ Microb* **70**: 7236-7240

## 7. Literaturverzeichnis

- Heylen K, Vanparys B, Wittebolle L, Verstraete W, Boon N, De Vos P** (2006) Cultivation of denitrifying bacteria: Optimization of isolation conditions and diversity study. *Appl Environ Microb* **72**: 2637-2643
- Hill MO** (1973) Reciprocal averaging: An eigenvector method of ordination. *Journal of Ecology* **61**: 237-249
- Hill MO, Gauch HG** (1980) Detrended correspondence analysis- an improved ordination technique. *Vegetatio* **42**: 47-58
- Hilpert R, Winter J, Hammes W, Kandler O** (1981) The sensitivity of archaebacteria to antibiotics. *Zbl Bakt Mik Hyg I C* **2**: 11-20
- Hink L** (2011) Saisonale Dynamik denitrifizierender Lebensgemeinschaften in landwirtschaftlich genutzten Böden. Bachelorarbeit
- Hino T, Matsumoto Y, Nagano S, Sugimoto H, Fukumori Y, Murata T, Iwata S, Shiro Y** (2010) Structural basis of biological N<sub>2</sub>O generation by bacterial nitric oxide reductase. *Science* **330**: 1666-1670
- Hope ACA** (1968) A simplified Monte Carlo significance test procedure. *J Roy Stat Soc B* **30**: 582-598
- Huber H, Diller S, Horn C, Rachel R** (2002) *Thermovibrio ruber* gen. nov., sp. nov., an extremely thermophilic, chemolithoautotrophic, nitrate-reducing bacterium that forms a deep branch within the phylum Aquificae. *Int J Syst Evol Micr* **52**: 1859-1865
- Huber R, Rossnagel P, Woese CR, Rachel R, Langworthy TA, Stetter KO** (1996) Formation of ammonium from nitrate during chemolithoautotrophic growth of the extremely thermophilic bacterium *Ammonifex degensii* gen. nov. sp. nov. *Syst Appl Microbiol* **19**: 40-49
- Hugenholtz P** (2002) Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. *Genome Biol* **3**:
- Hugenholtz P, Pitulle C, Hershberger KL, Pace NR** (1998) Novel division level bacterial

diversity in a yellowstone hot spring. *J Bacteriol* **180**: 366-376

**Humbert S, Tarnawski S, Fromin N, Mallet MP, Aragno M, Zopfi J** (2010) Molecular detection of anammox bacteria in terrestrial ecosystems: Distribution and diversity. *Isme J* **4**: 450-454

**Hussain H, Grove J, Griffiths L, Busby S, Cole J** (1994) A 7 gene operon essential for the formate dependent nitrite reduction to ammonia by enteric bacteria. *Mol Microbiol* **12**: 153-163

**Iino T, Mori K, Uchino Y, Nakagawa T, Harayama S, Suzuki K** (2010) *Ignavibacterium album* gen. nov., sp. nov., a moderately thermophilic anaerobic bacterium isolated from microbial mats at a terrestrial hot spring and proposal of Ignavibacteria classis nov., for a novel lineage at the periphery of green sulfur bacteria. *Int J Syst Evol Micr* **60**: 1376-1382

**Inderlied CB, Delwiche EA** (1973) Nitrate reduction and growth of *Veillonella alcalescens*. *J Bacteriol* **114**: 1206-1212

**James AT, Martin AJP** (1952) Gas-liquid partition chromatography: A technique for the analysis of volatile materials. *Anal Chem* **24**: 1522-1522

**Jangid K, Williams MA, Franzluebbers AJ, Sanderlin JS, Reeves JH, Jenkins MB, Endale DM, Coleman DC, Whitman WB** (2008) Relative impacts of land-use, management intensity and fertilization upon soil microbial community structure in agricultural systems. *Soil Biol Biochem* **40**: 2843-2853

**Janssen PH** (2008) New cultivation strategies for terrestrial microorganisms. In: *Accessing uncultivated microorganisms*. American Society of Microbiology

**Janssen PH, Yates PS, Grinton BE, Taylor PM, Sait M** (2002) Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions Acidobacteria, Actinobacteria, Proteobacteria, and Verrucomicrobia. *Appl Environ Microb* **68**: 2391-2396

**Jetten MSM, van Niftrik L, Strous M, Kartal B, Keltjens JT, Op den Camp HJM** (2009) Biochemistry and molecular biology of anammox bacteria. *Crit Rev Biochem Mol* **44**: 65-84

## 7. Literaturverzeichnis

- Jones CM, Graf DRH, Bru D, Philippot L, Hallin S** (2013) The unaccounted yet abundant nitrous oxide-reducing microbial community: A potential nitrous oxide sink. *ISME J* **7**: 417-426
- Jormakka M, Richardson D, Byrne B, Iwata S** (2004) Architecture of *narGH* reveals a structural classification of Mo-bisMGD enzymes. *Structure* **12**: 95-104
- Kaeberlein T, Lewis K, Epstein SS** (2002) Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science* (80- ) **296**: 1127-1129
- Kandeler E, Brune T, Enowashu E, Dörr N, Guggenberger G, Lamersdorf N, Philippot L** (2009) Response of total and nitrate-dissimilating bacteria to reduced N deposition in a spruce forest soil profile. *FEMS Microbiol Ecol* **67**: 444-454
- Kartal B, de Almeida NM, Maalcke WJ, Op den Camp HJM, Jetten MSM, Keltjens JT** (2013) How to make a living from anaerobic ammonium oxidation. *FEMS Microbiol Rev* **37**: 428-461
- Kartal B, Kuypers MMM, Lavik G, Schalk J, Op den Camp HJM, Jetten MSM, Strous M** (2007) Anammox bacteria disguised as denitrifiers: Nitrate reduction to dinitrogen gas via nitrite and ammonium. *Environ Microbiol* **9**: 635-642
- Kaspar HF** (1982) Nitrite reduction to nitrous-oxide by Propionibacteria - detoxication mechanism. *Arch Microbiol* **133**: 126-130
- Kastl EM, Schloter-Hai B, Bügger F, Schloter M** (2015) Impact of fertilization on the abundance of nitrifiers and denitrifiers at the root-soil interface of plants with different uptake strategies for nitrogen. *Biol Fert Soils* **51**: 57-64
- Keil D, Meyer A, Berner D, Poll C, Schützenmeister A, Piepho HP, Vlasenko A, Philippot L, Schloter M, Kandeler E, Marhan S** (2011) Influence of land-use intensity on the spatial distribution of N-cycling microorganisms in grassland soils. *FEMS Microbiol Ecol* **77**: 95-106

- Keith SM, Macfarlane GT, Herbert RA** (1982) Dissimilatory nitrate reduction by a strain of *Clostridium butyricum* isolated from estuarine sediments. *Arch Microbiol* **132**: 62-66
- Keller M, Zengler K** (2004) Tapping into microbial diversity. *Nat Rev Microbiol* **2**: 141-150
- Kendall MG** (1938) A new measure of rank correlation. *Biometrika* **30**: 81-93
- Kern M, Eisel F, Scheithauer J, Kranz RG, Simon J** (2010) Substrate specificity of three cytochrome c haem lyase isoenzymes from *Wolinella succinogenes*: Unconventional haem c binding motifs are not sufficient for haem c attachment by Nrfl and CcsA1. *Mol Microbiol* **75**: 122-137
- Knowles R** (1982) Denitrification. *Microbiol Rev* **46**: 43-70
- Koch R** (1884) Die Ätiologie der Tuberkulose. **11**: 490-492
- Kögel-Knabner I, Zech W, Hatcher PG** (1988) Chemical composition of the organic matter in forest soils - the humus layer. *Z Pflanz Bodenkunde* **151**: 331-340
- Körner H, Zumft WG** (1989) Expression of denitrification enzymes in response to the dissolved-oxygen level and respiratory substrate in continuous culture of *Pseudomonas stutzeri*. *Appl Environ Microb* **55**: 1670-1676
- Lammel DR, Nüsslein K, Tsai SM, Cerri CC** (2015) Land use, soil and litter chemistry drive bacterial community structures in samples of the rainforest and cerrado (brazilian savannah) biomes in southern amazonia. *Eur J Soil Biol* **66**: 32-39
- Lanigan GW** (1976) *Peptococcus heliotrinreducans*, sp. nov. cytochrome producing anaerobe which metabolizes pyrrolizidine alkaloids. *J Gen Microbiol* **94**: 1-10
- Lauber CL, Hamady M, Knight R, Fierer N** (2009) Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Appl Environ Microb* **75**: 5111-5120
- Lepš J, Smilauer P** (1999) Multivariate analysis of ecological data. Faculty of Biological Sciences, University of South Bohemia, České Budejovice

## 7. Literaturverzeichnis

- Levene H** (1960) A robust approximate confidence interval for components of variance. *Ann Math Stat* **31**: 534-535
- Levy-Booth DJ, Prescott CE, Grayston SJ** (2014) Microbial functional genes involved in nitrogen fixation, nitrification and denitrification in forest ecosystems. *Soil Biol Biochem* **75**: 11-25
- Lie TJ, Clawson ML, Godchaux W, Leadbetter ER** (1999) Sulfidogenesis from 2-aminoethanesulfonate (taurine) fermentation by a morphologically unusual sulfate-reducing bacterium, *Desulforhopalus singaporensis* sp. nov. *Appl Environ Microb* **65**: 3328-3334
- Lindsay EA, Colloff MJ, Gibb NL, Wakelin SA** (2010) The abundance of microbial functional genes in grassy woodlands is influenced more by soil nutrient enrichment than by recent weed invasion or livestock exclusion. *Appl Environ Microb* **76**: 5547-5555
- Liu B, Morkved PT, Frostegard A, Bakken LR** (2010) Denitrification gene pools, transcription and kinetics of NO, N<sub>2</sub>O and N<sub>2</sub> production as affected by soil pH. *FEMS Microbiol Ecol* **72**: 407-417
- Liu MC, Peck HD, Aboujaoude A, Chippaux M, Legall J** (1981) A reappraisal of the role of the low potential c-type cytochrome (cytochrome c-552) in NADH dependent nitrite reduction and its relationship with a co-purified NADH oxidase in *Escherichia coli* K12. *FEMS Microbiol Lett* **10**: 333-337
- Liu ZF, Frigaard NU, Vogl K, Iino T, Ohkuma M, Overmann J, Bryant DA** (2012) Complete genome of *Ignavibacterium album*, a metabolically versatile, flagellated, facultative anaerobe from the phylum Chlorobi. *Front Microbiol* **3**
- Long A, Heitman J, Tobias C, Phillips R, Song B** (2013) Co-occurring anammox, denitrification, and codenitrification in agricultural soils. *Appl Environ Microb* **79**: 168-176

- Lovley DR, Giovannoni SJ, White DC, Champine JE, Phillips EJP, Gorby YA, Goodwin S** (1993) *Geobacter metallireducens* gen. nov., sp. nov., a microorganism capable of coupling the complete oxidation of organic compounds to the reduction of iron and other metals. *Arc Microbiol* **159**: 336-344
- Macura J** (1974) Trend and advances in soil microbiology from 1924 to 1974. *Geoderma* **12**: 311-329
- Madsen T, Licht D** (1992) Isolation and characterization of an anaerobic chlorophenol-transforming bacterium. *Appl Environ Microb* **58**: 2874-2878
- Marbut C** (1951) Soils: their genesis and classification: A memorial volume of lectures given in the graduate school of the United States department of agriculture in 1928. Soil Science Society of America
- Martineau C, Mauffrey F, Villemur R** (2015) Comparative analysis of denitrifying activities of *Hyphomicrobium nitrativorans*, *Hyphomicrobium denitrificans*, and *Hyphomicrobium zavarzinii*. *Appl Environ Microb* **81**: 5003-5014
- McNeill JR, Winiwarter A** (2004) Breaking the sod: Humankind, history, and soil. *Science* **304**: 1627-1629
- Mergel A, Schmitz O, Mallmann T, Bothe H** (2001) Relative abundance of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in layers of a forest soil. *FEMS Microbiol Ecol* **36**: 33-42
- Mills PC, Rowley G, Spiro S, Hinton JCD, Richardson DJ** (2008) A combination of cytochrome c nitrite reductase (NrfA) and flavorubredoxin (NorV) protects salmonella enterica serovar typhimurium against killing by NO in anoxic environments. *Microbiol-SGM* **154**: 1218-1228

## 7. Literaturverzeichnis

- Miroshnichenko ML, Kostrikina NA, Chernyh NA, Pimenov NV, Tourova TP, Antipov AN, Spring S, Stackebrandt E, Bonch-Osmolovskaya EA** (2003) *Caldithrix abyssi* gen. nov., sp. nov., a nitrate-reducing, thermophilic, anaerobic bacterium isolated from a mid-atlantic ridge hydrothermal vent, represents a novel bacterial lineage. *Int J Syst Evol Micr* **53**: 323-329
- Mitchell GJ, Jones JG, Cole JA** (1986) Distribution and regulation of nitrate and nitrite reduction by *Desulfovibrio* and *Desulfotomaculum* species. *Arch Microbiol* **144**: 35-40
- Mitchell JFB** (1989) The greenhouse effect and climate change. *Rev Geophys* **27**: 115-139
- Mohan SB, Schmid M, Jetten M, Cole J** (2004) Detection and widespread distribution of the *nrfA* gene encoding nitrite reduction to ammonia, a short circuit in the biological nitrogen cycle that competes with denitrification. *FEMS Microbiol Ecol* **49**: 433-443
- Montzka SA, Butler JH, Hall BD, Mondeel DJ, Elkins JW** (2003) A decline in tropospheric organic bromine. *Geophys Res Lett* **30**: 1-4
- Morales SE, Cosart T, Holben WE** (2010) Bacterial gene abundances as indicators of greenhouse gas emission in soils. *Isme J* **4**: 799-808
- Morales SE, Jha N, Saggari S** (2015) Biogeography and biophysicochemical traits link N<sub>2</sub>O emissions, N<sub>2</sub>O emission potential and microbial communities across new zealand pasture soils. *Soil Biol Biochem* **82**: 87-98
- Moreno-Vivián C, Cabello P, Martinez-Luque M, Blasco R, Castillo F** (1999) Prokaryotic nitrate reduction: Molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases. *J Bacteriol* **181**: 6573-6584
- Mori K, Kim H, Kakegawa T, Hanada S** (2003) A novel lineage of sulfate-reducing microorganisms: *Thermodesulfobiaceae* fam. nov., *Thermodesulfobium narugense*, gen. nov., sp. nov., a new thermophilic isolate from a hot spring. *Extremophiles* **7**: 283-290

- Mosier AR** (1998) Soil processes and global change. *Biol Fert Soils* **27**: 221-229
- Mounier E, Hallet S, Cheneby D, Benizri E, Gruet Y, Nguyen C, Piutti S, Robin C, Slezack-Deschaumes S, Martin-Laurent F, Germon JC, Philippot L** (2004) Influence of maize mucilage on the diversity and activity of the denitrifying community. *Environ Microbiol* **6**: 301-312
- Mulder A, van de Graaf AA, Robertson LA, Kuenen JG** (1995) Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiol Ecol* **16**: 177-183
- Murphy LM, Dodd FE, Yousafzai FK, Eady RR, Hasnain SS** (2002) Electron donation between copper containing nitrite reductases and cupredoxins: The nature of protein-protein interaction in complex formation. *J Mol Biol* **315**: 859-871
- Murray RE, Feig YS, Tiedje JM** (1995) Spatial heterogeneity in the distribution of denitrifying bacteria associated with denitrification activity zones. *Appl Environ Microb* **61**: 2791-2793
- Nacke H, Thürmer A, Wollherr A, Will C, Hodac L, Herold N, Schöning I, Schrupf M, Daniel R** (2011) Pyrosequencing-based assessment of bacterial community structure along different management types in german forest and grassland soils *PLoS ONE* **6**: e17000
- Naether A, Fösel BU, Naegele V, Wüst PK, Weinert J, Bonkowski M, Alt F, Oelmann Y, Polle A, Lohaus G, Gockel S, Hemp A, Kalko EKV, Linsenmair KE, Pfeiffer S, Renner S, Schöning I, Weisser WW, Wells K, Fischer M, Overmann J, Friedrich MW** (2012) Environmental factors affect acidobacterial communities below the subgroup level in grassland and forest soils. *Appl Environ Microb* **78**: 7398-7406

## 7. Literaturverzeichnis

- Nakagawa S, Inagaki F, Takai K, Horikoshi K, Sako Y** (2005) *Thioreductor micantisoli* gen. nov., sp. nov., a novel mesophilic, sulfur-reducing chemolithoautotroph within the Epsilon-proteobacteria isolated from hydrothermal sediments in the mid-okinawa trough. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**: 599-605
- Nebel ME, Wild S, Holzhauser M, Huettenberger L, Reitzig R, Sperber M, Stoeck T** (2011) JAguc- a software package for environmental diversity analyses. *J Bioinf Comput Biol* **9**: 749-773
- Nichols D** (2007) Cultivation gives context to the microbial ecologist. *FEMS Microbiol Ecol* **60**: 351-357
- Nichols D, Lewis K, Orjala J, Mo S, Ortenberg R, O'Connor P, Zhao C, Vouros P, Kaeberlein T, Epstein SS** (2008) Short peptide induces an "uncultivable" microorganism to grow in vitro. *Appl Environ Microbiol* **74**: 4889-4897
- Nikiforoff CC** (1959) Reappraisal of the soil. *Science* **129**: 186-196
- Oades JM** (1993) The role of biology in the formation, stabilization and degradation of soil structure. *Geoderma* **56**: 377-400
- Okereke GU** (1993) Growth-yield of denitrifiers using nitrous-oxide as a terminal electron acceptor. *World J Microb Biot* **9**: 59-62
- Ollivier J, Towe S, Bannert A, Hai B, Kastl EM, Meyer A, Su X, Kleineidam K, Schloter M** (2011) Nitrogen turnover in soil and global change. *FEMS Microbiol Ecol* **78**: 3-16
- Olsen GJ** (1994) Microbial ecology. Archaea, archaea, everywhere. *Nature* **371**: 657-658
- Palmer K, Biasi C, Horn MA** (2012) Contrasting denitrifier communities relate to contrasting N<sub>2</sub>O emission patterns from acidic peat soils in arctic tundra. *Isme J* **6**: 1058-1077

- Palmer K, Drake HL, Horn MA** (2009) Genome-derived criteria for assigning environmental *narG* and *nosZ* sequences to operational taxonomic units of nitrate reducers. *Appl Environ Microb* **75**: 5170-5174
- Palmer K, Drake HL, Horn MA** (2010) Association of novel and highly diverse acid-tolerant denitrifiers with N<sub>2</sub>O fluxes of an acidic fen. *Appl Environ Microb* **76**: 1125-1134
- Palmer K, Horn MA** (2015) Denitrification activity of a remarkably diverse fen denitrifier community in finnish lapland is N-oxide limited. *PLoS ONE* **10**:
- Parkin TB** (1987) Soil microsites as a source of denitrification variability. *Soil Sci Soc Am J* **51**: 1194-1199
- Paul JW, Beauchamp EG** (1989) Denitrification and fermentation in plant-residue-amended soil. *Biol Fert Soils* **7**: 303-309
- Pauleta SR, Dell'Acqua S, Moura I** (2013) Nitrous oxide reductase. *Coordin Chem Rev* **257**: 332-349
- Payne WJ** (1973) Reduction of nitrogenous oxides by microorganisms. *Bacteriol Rev* **37**: 409-452
- Perez-Rodriguez I, Grosche A, Massenbug L, Starovoytov V, Lutz RA, Vetriani C** (2012) *Phorcysia thermohydrogeniphila* gen. nov., sp nov., a thermophilic, chemolitho-autotrophic, nitrate-ammonifying bacterium from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Micr* **62**: 2388-2394
- Philippot L** (2002) Denitrifying genes in bacterial and archaeal genomes. *BBA-Gene Struct Expr* **1577**: 355-376
- Philippot L** (2005) Tracking nitrate reducers and denitrifiers in the environment. *Biochem Soc Trans* **33**: 200-204
- Philippot L, Cuhel J, Saby NPA, Cheneby D, Chronakova A, Bru D, Arrouays D, Martin-Laurent F, Simek M** (2009) Mapping field-scale spatial patterns of size and activity

## 7. Literaturverzeichnis

of the denitrifier community. *Environ Microbiol* **11**: 1518-1526

**Philippot L, Germon JC** (2005) Contribution of bacteria to initial input and cycling of nitrogen in soils. In: *Microorganisms in soils: Roles in genesis and functions*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 159-176

**Philippot L, Hallin S, Schloter M** (2007) Ecology of denitrifying prokaryotes in agricultural soil. *Adv Agron* **96**: 249-305

**Philippot L, Hojberg O** (1999) Dissimilatory nitrate reductases in bacteria. *BBA-Gene Struct Expr* **1446**: 1-23

**Philippot L, Piutti S, Martin-Laurent F, Hallet S, Germon JC** (2002) Molecular analysis of the nitrate-reducing community from unplanted and maize-planted soils. *Appl Environ Microb* **68**: 6121-6128

**Pichinoty F, Mandell M, Garcia JL** (1979) The properties of novel mesophilic denitrifying bacillus cultures found in tropical soils. *J Gen Microbiol* **115**: 419-430

**Polcyn W, Lucinski R** (2003) Aerobic and anaerobic nitrate and nitrite reduction in free-living cells of *Bradyrhizobium* sp (lupinus). *FEMS Microbiol Lett* **226**: 331-337

**Polcyn W, Podeszwa J** (2009) Coordinate induction of dissimilatory ammonification and fermentative pathways in Rhizobia. *Anton Leeuw Int J G* **96**: 79-87

**Pope NR, Cole JA** (1982) Generation of a membrane potential by one of two independent pathways for nitrite reduction by *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* **128**: 219-222

**Poschlod P, Bakker JP, Kahmen S** (2005) Changing land use and its impact on biodiversity. *Basic Appl Ecol* **6**: 93-98

**Poth M, Focht DD** (1985) <sup>15</sup>N kinetic analysis of N<sub>2</sub>O production by *Nitrosomonas europaea*: An examination of nitrifier denitrification. *Appl Environ Microb* **49**: 1134-1141

**Potter LC, Millington P, Griffiths L, Thomas GH, Cole JA** (1999) Competition between *Escherichia coli* strains expressing either a periplasmic or a membrane-bound nitrate reductase: Does Nap confer a selective advantage during nitrate-limited growth? *Biochem*

*J* **344**: 77-84

**Prakash O, Sadana JC** (1973) Metabolism of nitrate in *Achromobacter fischeri*. *Can J Microbiol* **19**: 15-25

**Quince C, Lanzen A, Davenport RJ, Turnbaugh PJ** (2011) Removing noise from pyrosequenced amplicons. *BMC Bioinformatics* **12**: 38

**Ramette A** (2007) Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol* **62**: 142-160

**Rauschenbach I, Narasingarao P, Häggblom MM** (2011) *Desulfurispirillum indicum* sp. nov., a selenate- and selenite-respiring bacterium isolated from an estuarine canal. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**: 654-658

**Ravishankara AR, Daniel JS, Portmann RW** (2009) Nitrous oxide (N<sub>2</sub>O): the dominant ozone-depleting substance emitted in the 21st century. *Science* **326**: 123-125

**Rehr B, Klemme JH** (1986) Metabolic role and properties of nitrite reductase of nitrate-ammonifying marine vibrio species. *FEMS Microbiol Lett* **35**: 325-328

**Richardson D, Berks B, Russell D, Spiro S, CJ T** (2001) Functional, biochemical and genetic diversity of prokaryotic nitrate reductases. *Cell Mol Life Sci* **58**: 165-178

**Riesenfeld CS, Schloss PD, Handelsman J** (2004) Metagenomics: Genomic analysis of microbial communities. *Annu Rev Genet* **38**: 525-552

**Risgaard-Petersen N, Langezaal AM, Ingvarlsen S, Schmid MC, Jetten MSM, Op den Camp HJM, Derksen JWM, Pina-Ochoa E, Eriksson SP, Nielsen LP, Revsbech NP, Cedhagen T, van der Zwaan GJ** (2006) Evidence for complete denitrification in a benthic foraminifer. *Nature* **443**: 93-96

**Robertson LA, Cornelisse R, Devos P, Hadjoetomo R, Kuenen JG** (1989) Aerobic denitrification in various heterotrophic nitrifiers. *A Van Leeuw J Microb* **56**: 289-299

## 7. Literaturverzeichnis

- Roldan MD, Sears HJ, Cheesman MR, Ferguson SJ, Thomson AJ, Berks BC, Richardson DJ** (1998) Spectroscopic characterization of a novel multiheme c-type cytochrome widely implicated in bacterial electron transport. *J Biol Chem* **273**: 28785-28790
- Rosa SM, Kraemer FB, Soria MA, Guerrero LD, Morras HJM, Figuerola ELM, Erijman L** (2014) The influence of soil properties on denitrifying bacterial communities and denitrification potential in no-till production farms under contrasting management in the argentinean pampas. *Appl Soil Ecol* **75**: 172-180
- Rösch C, Mergel A, Bothe H** (2002) Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil. *Appl Environ Microb* **68**: 3818-3829
- Rousk J, Baath E, Brookes PC, Lauber CL, Lozupone C, Caporaso JG, Knight R, Fierer N** (2010) Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *Isme J* **4**: 1340-1351
- Rusch A, Gaidos E** (2013) Nitrogen-cycling bacteria and archaea in the carbonate sediment of a coral reef. *Geobiology* **11**: 472-484
- Rütting T, Boeckx P, Müller C, Klemedtsson L** (2011) Assessment of the importance of dissimilatory nitrate reduction to ammonium for the terrestrial nitrogen cycle. *Biogeosciences* **8**: 1779-1791
- Saarenheimo J, Tirola MA, Rissanen AJ** (2015) Functional gene pyrosequencing reveals core proteobacterial denitrifiers in boreal lakes. *Front Microbiol* **6**:674:
- Sait M, Davis KER, Janssen PH** (2006) Effect of pH on isolation and distribution of members of subdivision 1 of the phylum Acidobacteria occurring in soil. *Appl Environ Microb* **72**: 1852-1857
- Saitou N, Nei M** (1987) The neighbor-joining method - a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**: 406-425

- Sako Y, Nakagawa S, Takai K, Horikoshi K** (2003) *Marinithermus hydrothermalis* gen. nov., sp. nov., a strictly aerobic, thermophilic bacterium from a deep-sea hydrothermal vent chimney. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 59-65
- Sala OE, Chapin FS, Armesto JJ, Berlow E, Bloomfield J, Dirzo R, Huber-Sanwald E, Huenneke LF, Jackson RB, Kinzig A, Leemans R, Lodge DM, Mooney HA, Oosterheld M, Poff NL, Sykes MT, Walker BH, Walker M, Wall DH** (2000) Biodiversity - global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science* **287**: 1770-1774
- Sanford RA, Cole JR, Tiedje JM** (2002) Characterization and description of *Anaeromyxobacter dehalogenans* gen. nov., sp. nov., an aryl-halorespiring facultative anaerobic myxobacterium. *Appl Environ Microb* **68**: 893-900
- Schleper C, Jurgens G, Jonuscheit M** (2005) Genomic studies of uncultivated archaea. *Nat Rev Microbiol* **3**: 479-488
- Schleper C, Jürgens G, Jonuscheit M** (2005) Genomic studies of uncultivated archaea. *Nat Rev Microbiol* **3**: 479-488
- Schlesner H, Hirsch P** (1987) Rejection of the genus name *Pirella* for pear-shaped budding bacteria and proposal to create the genus *Pirellula* gen. nov.. *Int J Syst Bacteriol* **37**: 441-441
- Schlichting E** (1986) Diagnostic properties, horizons, soils and landscapes. *Z Pflanz Bodenkunde* **149**: 492-499
- Schloss PD, Larget BR, Handelsman J** (2004) Integration of microbial ecology and statistics: A test to compare gene libraries. *Appl Environ Microb* **70**: 5485-5492
- Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, Sahl JW, Stres B, Thallinger GG, Van Horn DJ, Weber CF** (2009) Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ*

## 7. Literaturverzeichnis

*Microb* **75**: 7537-7541

**Schumacher W, Hole U, Kroneck MH** (1994) Ammonia-forming cytochrome c nitrite reductase from *Sulfurospirillum deleyianum* is a tetraheme protein: New aspects of the molecular composition and spectroscopic properties. *Biochem Biophys Res Commun* **205**: 911-916

**Seitzinger S, Harrison JA, Bohlke JK, Bouwman AF, Lowrance R, Peterson B, Tobias C, Van Drecht G** (2006) Denitrification across landscapes and waterscapes: A synthesis. *Ecol Appl* **16**: 2064-2090

**Shannon CE** (1948) A mathematical theory of communication. *Bell Syst Tech J* **27**: 379-423

**Shapleigh JP** (2006) The denitrifying prokaryotes. In: *The prokaryotes*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 769-792

**Shields JA, Paul EA, Lowe WE, Parkinson D** (1973) Turnover of microbial tissue in soil under field conditions. *Soil Biol Biochem* **5**: 753-764

**Shoun H, Tanimoto T** (1991) Denitrification by the fungus *Fusarium oxysporum* and involvement of cytochrome P450 in the respiratory nitrite reduction. *J Biol Chem* **266**: 11078-11082

**Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li WZ, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Soding J, Thompson JD, Higgins DG** (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol* **7**: 539

**Simek M, Cooper JE** (2002) The influence of soil pH on denitrification: Progress towards the understanding of this interaction over the last 50 years. *Eur J Soil Sci* **53**: 345-354

**Simon HM, Jahn CE, Bergerud LT, Sliwinski MK, Weimer PJ, Willis DK, Goodman RM** (2005) Cultivation of mesophilic soil Crenarchaeotes in enrichment cultures from plant roots. *Appl Environ Microb* **71**: 4751-4760

- Simon J** (2002) Enzymology and bioenergetics of respiratory nitrite ammonification. *FEMS Microbiol Rev* **26**: 285-309
- Simon J, Gross R, Einsle O, Kroneck PMH, Kröger A, Klimmek O** (2000) A NapCNiT-type cytochrome c (NrfH) is the mediator between the quinone pool and the cytochrome c nitrite reductase of *Wolinella succinogenes*. *Mol Microbiol* **35**: 686-696
- Simonson RW** (1959) Outline of a generalized theory of soil genesis. *Soil Sci Soc Am J* **23**: 152-156
- Slobodkina GB, Kolganova TV, Chernyh NA, Querellou J, Bonch-Osmolovskaya EA, Slobodkin AI** (2009) *Deferribacter autotrophicus* sp. nov., an iron(III)-reducing bacterium from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Micr* **59**: 1508-1512
- Smith B, Wilson JB** (1996) A consumer's guide to evenness indices. *Oikos* **76**: 70-82
- Smith CJ, Nedwell DB, Dong LF, Osborn AM** (2007) Diversity and abundance of nitrate reductase genes (*narG* and *napA*), nitrite reductase genes (*nirS* and *nrfA*), and their transcripts in estuarine sediments. *Appl Environ Microb* **73**: 3612-3622
- Smith JM, Ogram A** (2008) Genetic and functional variation in denitrifier populations along a short-term restoration chronosequence. *Appl Environ Microb* **74**: 5615-5620
- Smith KA, Ball T, Conen F, Dobbie KE, Massheder J, Rey A** (2003) Exchange of greenhouse gases between soil and atmosphere: interactions of soil physical factors and biological processes. *Eur J Soil Sci* **54**: 779-791
- Smith MS** (1982) Dissimilatory reduction of  $\text{NO}_2^-$  to  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{N}_2\text{O}$  by a soil *Citrobacter* sp. *Appl Environ Microb* **43**: 854-860
- Smith MS, Zimmerman K** (1981) Nitrous oxide production by non-denitrifying soil nitrate reducers. *Soil Sci Soc Am J* **45**: 865-871
- Socransky SS, Holt SC, Leadbetter ER, Tanner ACR, Savitt E, Hammond BF** (1979) *Capnocytophaga*: new genus of gram-negative gliding bacteria. III. Physiological

## 7. Literaturverzeichnis

characterization. *Arch Microbiol* **122**: 29-33

**Sokal RR, Michener CD** (1958) A statistical method for evaluating systematic relationships. *Univ Kansas Sci Bull* **38**: 1409-1438

**Song B, Lisa JA, Tobias CR** (2014) Linking DNRA community structure and activity in a shallow lagoonal estuarine system. *Front Microbiol* **5**:

**Song YL, Liu CX, McTeague M, Finegold SM** (2004) "*Bacteroides nordii*" sp. nov. and "*Bacteroides salyersae*" sp. nov. isolated from clinical specimens of human intestinal origin. *J Clin Microbiol* **42**: 5565-5570

**Sonne-Hansen J, Ahring BK** (1999) *Thermodesulfobacterium hveragerdense* sp. nov., and *Thermodesulfovibrio islandicus* sp. nov., two thermophilic sulfate reducing bacteria isolated from a icelandic hot spring. *Syst Appl Microbiol* **22**: 559-564

**Springer N, Ludwig W, Philipp B, Schink B** (1998) *Azoarcus anaerobius* sp. nov., a resorcinol-degrading, strictly anaerobic, denitrifying bacterium. *Int J Syst Bacteriol* **48**: 953-956

**Staley JT, Konopka A** (1985) Measurements of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu Rev Microbiol* **39**: 321-346

**Stanier RY, Palleroni NJ, Doudoroff M** (1966) The aerobic Pseudomonads: A taxonomic study. *J Gen Microbiol* **43**: 159-271

**Steenkamp DJ, Peck HD** (1981) Proton translocation associated with nitrite respiration in *Desulfovibrio desulfuricans*. *J Biol Chem* **256(11)**: 5450-5458

**Stempfhuber B, Engel M, Fischer D, Neskovic-Prit G, Wubet T, Schöning I, Gubry-Rangin C, Schlöter-Hai B, Rattei T, Welzl G, Nicol GW, Schrumpf M, Buscot F, Prosser JI, Schlöter M** (2015) PH as a driver for ammonia-oxidizing archaea in forest soils. *Microbiol Ecol* **69**: 879-883

**Stevenson BS, Eichorst SA, Wertz JT, Schmidt TM, Breznak JA** (2004) New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes. *Appl Environ Microb* **70**:

4748-4755

- Stewart EJ** (2012) Growing unculturable bacteria. *J Bacteriol* **194**: 4151-4160
- Steyn PL, Segers P, Vancanneyt M, Sandra P, Kersters K, Joubert JJ** (1998) Classification of heparinolytic bacteria into a new genus, *Pedobacter*, comprising four species: *Pedobacter heparinus* comb. nov., *Pedobacter piscium* comb. nov., *Pedobacter africanus* sp. nov. and *Pedobacter saltans* sp. nov. proposal of the family Sphingobacteriaceae fam. nov. *Int J Syst Bacteriol* **48 Pt 1**: 165-177
- Storm DR, Rosenthal KS, Swanson PE** (1977) Polymyxin and related peptide antibiotics. *Annu Rev Biochem* **46**: 723-763
- Stouthamer AH, Boogerd FC, van Verseveld HW** (1982) The bioenergetics of denitrification. *A Van Leeuw J Microb* **48**: 545-553
- Streminska MA, Felgate H, Rowley G, Richardson DJ, Baggs EM** (2012) Nitrous oxide production in soil isolates of nitrate-ammonifying bacteria. *Env Microbiol Rep* **4**: 66-71
- Sung Y, Fletcher KF, Ritalaliti KM, Apkarian RP, Ramos-Hernandez N, Sanford RA, Mesbah NM, Löffler FE** (2006) *Geobacter lovleyi* sp. nov. strain SZ, a novel metal-reducing and tetrachloroethene-dechlorinating bacterium. *Appl Environ Microb* **72**: 2775-2782
- Szewzyk R, Pfennig N** (1987) Complete oxidation of catechol by the strictly anaerobic sulfate-reducing *Desulfobacterium catecholicum* sp. nov.. *Arch Microbiol* **147**: 163-168
- Szukics U, Abell GCJ, Hoedl V, Mitter B, Sessitsch A, Hackl E, Zechmeister-Boltenstern S** (2010) Nitrifiers and denitrifiers respond rapidly to changed moisture and increasing temperature in a pristine forest soil. *FEMS Microbiol Ecol* **72**: 395-406
- Takai K, Nealson KH, Horikoshi K** (2004) *Hydrogenimonas thermophila* gen. nov., sp nov., a novel thermophilic, hydrogen-oxidizing chemolithoautotroph within the Epsilon-proteobacteria, isolated from a black smoker in a central indian ridge hydrothermal field. *Int J Syst Evol Micr* **54**: 25-32

## 7. Literaturverzeichnis

- Takeuchi J** (2006) Habitat segregation of a functional gene encoding nitrate ammonification in estuarine sediments. *Geomicrobiol J* **23**: 75-87
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S** (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* **28**: 2731-2739
- Tan W, Yin W, Chan K** (2015) Insights into the quorum-sensing activity in *Aeromonas hydrophila* strain M013 as revealed by whole-genome sequencing. *Genome Announc* **3**:
- Tanner ACR, Badger S, Lai CH, Listgarten MA, Visconti RA, Socransky SS** (1981) *Wolinella* gen. nov., *Wolinella succinogenes* (*Vibrio succinogenes* Wolin et al.) comb. nov., and description of *Bacteroides gracilis* sp. nov., *Wolinella recta* sp. nov., *Campylobacter concisus* sp. nov., and *Eikenella corrodens* from humans with periodontal disease. *Int J Syst Evol Microbiol* **31**: 432-445
- Taylor CB** (1951) Nature of the factor in soil-extract responsible for bacterial growth-stimulation. *Nature* **168**: 115-116
- ter Braak CJF** (1986) Canonical correspondence analysis: A new eigenvector technique for multivariate direct gradient analysis. *Ecology* **67**: 1167-1179
- ter Braak CJF, Prentice IC** (1988) A theory of gradient analysis. *Adv Ecol Res* **18**: 271-317
- ter Braak CJF, Šmilauer P** (2002) Canoco reference manual and canodraw for windows user's guide: Software for canonical community ordination (version 4.5). Microcomputer Power, Ithaca, New York, USA,
- Thomas KL, Lloyd D, Boddy L** (1994) Effects of oxygen, pH and nitrate concentration on denitrification by *Pseudomonas* species. *FEMS Microbiol Lett* **118**: 181-186
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ** (1994) Clustal-W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific

gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673-4680

**Throbäck IN, Enwall K, Jarvis A, Hallin S** (2004) Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. *FEMS Microbiol Ecol* **49**: 401-417

**Tiedje JM** (1988) Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. In: A.J.B. Zehnder (ed) *Biology of anaerobic microorganisms*. John Wiley and Sons, N.Y., pp. 179-244

**Tiedje JM, Sexstone AJ, Myrold DD, Robinson JA** (1982) Denitrification: Ecological niches, competition and survival. *A Van Leeuw J Microb* **48**: 569-583

**Tiedje JM, Simkins S, Groffman PM** (1989) Perspectives on measurement of denitrification in the field including recommended protocols for acetylene based methods. *Plant Soil* **115**: 261-284

**Timmer-Ten Hoor A** (1975) A new type of thiosulfate oxidizing nitrate reducing microorganism: *Thiomicrospira denitrificans* sp. nov.. *Netherlands Journal of Sea Research* **9 (3-4)**: 344-350

**Ueda T, Suga Y, Yahiro N, Matsuguchi T** (1995) Remarkable N<sub>2</sub>-fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of nifH gene sequences. *J Bacteriol* **177**: 1414-1417

**van Cleemput O** (1998) Subsoils: Chemo- and biological denitrification, N<sub>2</sub>O and N<sub>2</sub> emissions. *Nutr Cycl Agroecosys* **52**: 187-194

**van Gylswyk NO, van der Toorn JJTK** (1987) *Clostridium aerotolerans* sp. nov., a xylanolytic bacterium from corn stover and from the rumina of sheep fed corn stover. *Int J Syst Evol Micr* **37**: 102-105

**Vartoukian SR, Palmer RM, Wade WG** (2010) Strategies for culture of 'unculturable' bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **309**: 1-7

**Velghe N, Claeys A** (1985) Rapid spectrophotometric determination of nitrate in mineral

## 7. Literaturverzeichnis

waters with resorcinol. *Analyst* **110**: 313-314

**Verhoeven W** (1950) On a sporeforming bacterium causing the swelling of cans containing cured ham. *Antonie Van Leeuwenhoek* **16**: 269-281

**Viebrock A, Zumft WG** (1988) Molecular cloning, heterologous expression, and primary structure of the structural gene for the copper enzyme nitrous-oxide reductase from denitrifying *Pseudomonas stutzeri*. *J Bacteriol* **170**: 4658-4668

**Wakelin SA, Colloff MJ, Harvey PR, Marschner P, Gregg AL, Rogers SL** (2007) The effects of stubble retention and nitrogen application on soil microbial community structure and functional gene abundance under irrigated maize. *FEMS Microbiol Ecol* **59**: 661-670

**Wallenstein MD, Myrold DD, Firestone M, Voytek M** (2006) Environmental controls on denitrifying communities and denitrification rates: Insights from molecular methods. *Ecol Appl* **16**: 2143-2152

**Wardle DA, Bardgett RD, Klironomos JN, Setälä H, van der Putten WH, Wall DH** (2004) Ecological linkages between aboveground and belowground biota. *Science* (80- ) **304**: 1629-1633

**Watve M, Shejval V, Sonawane C, Rahalkar M, Matapurkar A, Shouche Y, Patole M, Phadnis N, Champhenkar A, Damle K, Karandikar S, Kshirsagar V, Jog M** (2000) The 'k' selected oligophilic bacteria: a key to uncultured diversity? *Curr Sci India* **78**: 1535-1542

**Weier KL, Doran JW, Power JF, Walters DT** (1993) Denitrification and the dinitrogen/nitrous oxide ratio as affected by soil water, available carbon, and nitrate. *Soil Sci Soc Am J* **57**: 66-72

**Welch BL** (1947) On the studentization of several variances. *Ann Math Stat* **18**: 118-122

**Welsh A, Chee-Sanford JC, Connor LM, Löffler FE, Sanford RA** (2014) Refined *nrfA* phylogeny improves PCR-based *nrfA* gene detection. *Appl Environ Microb* **80**: 2110-2119

**Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ** (1998) Prokaryotes: the unseen majority. *P Natl Acad Sci Usa* **95**: 6578-6583

- Whitney M** (1921) Fundamental principles established by recent soil investigations. *Science* **54**: 348-351
- Widdel F, Pfennig N** (1982) Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty-acids. 2. Incomplete oxidation of propionate by *Desulfobulbus propionicus* gen. nov. sp. nov.. *Arch Microbiol* **131**: 360-365
- Wijler J, Delwiche CC** (1954) Investigations on the denitrifying process in soil. *Plant Soil* **5**: 155-169
- Wilcoxon F** (1946) Individual comparisons of grouped data by ranking methods. *J Econ Entomol* **39**: 269-270
- Will C, Thürmer A, Wollherr A, Nacke H, Herold N, Schrupf M, Gutknecht J, Wubet T, Buscot F, Daniel R** (2010) Horizon-specific bacterial community composition of german grassland soils, as revealed by pyrosequencing-based analysis of 16S rRNA genes. *Appl Environ Microb* **76**: 6751-6759
- Williams RAD, Smith KE, Welch SG, Micallef J, Sharp RJ** (1995) DNA relatedness of *Thermus* strains, description of *Thermus brockianus* sp. nov., and proposal to reestablish *Thermus thermophilus* (Oshima and Imahori). *Int J Syst Evol Micr* **45**: 495-499
- Winogradskij SN** (1890) Recherches sur les organismes de la nitrification. Impr. Charaire,
- Woese CR** (2004) The archaeal concept and the world it lives in: A retrospective. *Photosynth Res* **80**: 362-372
- Wolin MJ** (1966) Lysis of *Vibrio succinogenes* by ethylenediaminetetraacetic acid or lysozyme. *J Bacteriol* **91**: 1781-&
- Wu L, Vomocil JA, Childs SW** (1990) Pore size, particle size, aggregate size, and water-retention. *Soil Sci Soc Am J* **54**: 952-956
- Yarza P, Richter M, Peplies J, Euzéby J, Amann R, Schleifer K, Ludwig W, Gloeckner FO, Rossello-Mora R** (2008) The all-species living tree project: a 16S rRNA-based

## 7. Literaturverzeichnis

phylogenetic tree of all sequenced type strains. *Syst Appl Microbiol* **31**: 241-250

**Yin C, Fan FL, Song AL, Cui PY, Li TQ, Liang YC** (2015) Denitrification potential under different fertilization regimes is closely coupled with changes in the denitrifying community in a black soil. *Appl Microbiol Biot* **99**: 5719-5729

**Yoshinari T** (1980) N<sub>2</sub>O reduction by *Vibrio succinogenes*. *Appl Environ Microb* **39**: 81-84

**Young IM, Crawford JW** (2004) Interactions and self-organization in the soil-microbe complex. *Science* **304**: 1634-1637

**Yuan Q, Liu P, Lu Y** (2012) Differential responses of *nirK*- and *nirS*-carrying bacteria to denitrifying conditions in the anoxic rice field soil. *Environ Microbiol Rep* **4**: 113-122

**Zaatreh S** (2008) Einfluss von Nitrat auf die Aktivität und Struktur von denitrifizierenden Populationen in Wald- und Grünlandböden. Bachelorarbeit

**Zengler K, Toledo G, Rappe M, Elkins J, Mathur EJ, Short JM, Keller M** (2002) Cultivating the uncultured. *P Natl Acad Sci USA* **99**: 15681-15686

**Zenova G, Manucharova N, Zvyagintsev D** (2011) Extremophilic and extremotolerant actinomycetes in different soil types. *Eurasian Soil Sci* **44**: 417-436

**Zhang Y, Cao CY, Peng M, Xu XJ, Zhang P, Yu QJ, Sun T** (2014) Diversity of nitrogen-fixing, ammonia-oxidizing, and denitrifying bacteria in biological soil crusts of a revegetation area in horqin sandy land, northeast china. *Ecol Eng* **71**: 71-79

**Zhou ZM, Takaya N, Nakamura A, Yamaguchi M, Takeo K, Shoun H** (2002) Ammonia fermentation, a novel anoxic metabolism of nitrate by fungi. *J Biol Chem* **277**: 1892-1896

**Zopfi J, Kjaer T, Nielsen LP, Jorgensen BB** (2001) Ecology of *Thioploca* spp.: Nitrate and sulfur storage in relation to chemical microgradients and influence of *Thioploca* spp. on the sedimentary nitrogen cycle. *Appl Environ Microb* **67**: 5530-5537

**Zumft WG** (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol Mol Biol R* **61**: 533-616

**Zumft WG** (2005) Nitric oxide reductases of prokaryotes with emphasis on the respiratory,

heme-copper oxidase type. *J Inorg Biochem* **99**: 194-215

## 8. Anhang

Tabelle 62: Verteilung der OTUs der Isolate auf die einzelnen Böden.

	AEG 2	AEG 7	AEW 5	AEW 8	HEG 6	HEG 9	HEW 5	HEW 12	SEG 2	SEG 6	SEW 5	SEW 9
OTU 1	15	28	2	12	21	28	0	0	6	1	0	0
OTU 2	1	1	1	3	4	7	7	17	1	16	0	0
OTU 3	2	1	10	3	13	5	10	3	0	0	0	0
OTU 4	0	0	17	3	1	0	7	3	0	0	4	5
OTU 5	1	6	2	0	0	0	0	17	11	0	0	0
OTU 6	0	0	13	0	11	0	0	3	0	5	0	0
OTU 7	0	8	2	9	0	0	1	0	7	1	1	1
OTU 8	0	0	0	0	0	0	9	0	0	1	6	10
OTU 9	0	0	3	2	0	2	0	0	0	2	8	3
OTU 10	0	0	3	0	0	1	3	0	1	0	6	3
OTU 11	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	6	3
OTU 12	0	0	0	0	0	3	1	0	0	1	5	0
OTU 13	1	1	0	3	1	0	3	0	0	1	0	0
OTU 14	0	0	1	1	0	0	0	0	0	7	0	0
OTU 15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0
OTU 16	0	1	0	0	0	5	0	0	1	0	0	0
OTU 17	0	0	0	5	0	0	1	0	0	0	0	0
OTU 18	0	0	1	0	0	0	0	5	0	0	0	0
OTU 19	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0
OTU 20	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0
OTU 21	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
OTU 22	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
OTU 23	0	0	0	0	0	2	0	0	1	0	0	0
OTU 24	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0
OTU 25	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
OTU 26	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
OTU 27	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
OTU 28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
OTU 29	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0

## 8. Anhang

OTU 30	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OTU 31	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
OTU 32	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OTU 33	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OTU 34	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
OTU 35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
OTU 36	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OTU 37	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
OTU 38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
OTU 39	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
OTU 40	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OTU 41	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OTU 42	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
OTU 43	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
OTU 44	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle 63: Verteilung der narG-OTUs auf Speziesebene auf die einzelnen Böden.

	<b>AEG 2</b>	<b>AEG 7</b>	<b>AEW 5</b>	<b>AEW 8</b>	<b>HEG 6</b>	<b>HEG 9</b>	<b>HEW 5</b>	<b>HEW 12</b>	<b>SEG 2</b>	<b>SEG 6</b>	<b>SEW 5</b>	<b>SEW 9</b>
OTU 1	7	1517	398	3185	247	473	5402	613	305	461	2364	381
OTU 2	442	327	273	860	1064	1648	564	169	885	186	478	726
OTU 3	1	223	0	5	0	4	0	0	3	4	0	0
OTU 4	0	9	0	3	0	5	0	0	20	2	0	0
OTU 5	0	6	0	0	0	0	2	0	8	2	19	0
OTU 6	0	0	0	0	0	5	0	0	12	3	7	0
OTU 7	0	0	0	0	12	2	0	0	0	6	0	0
OTU 8	0	1	0	2	6	4	0	0	4	2	0	0
OTU 9	0	0	0	0	0	0	0	0	8	1	0	0
OTU 10	0	0	1	1	0	0	2	0	0	0	2	0
OTU 11	0	0	0	0	0	0	1	0	0	5	0	0
OTU 12	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0
OTU 13	0	1	0	2	0	0	0	0	0	1	0	0
OTU 14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	1
OTU 15	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
OTU 16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
OTU 17	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OTU 18	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0

OTU 19	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
OTU 20	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle 64: Verteilung der napA-OTUs auf Speziesebene auf die einzelnen Böden.

	<b>AEG 2</b>	<b>AEG 7</b>	<b>AEW 5</b>	<b>AEW 8</b>	<b>HEG 6</b>	<b>HEG 9</b>	<b>HEW 5</b>	<b>HEW 12</b>	<b>SEG 2</b>	<b>SEG 6</b>	<b>SEW 5</b>	<b>SEW 9</b>
OTU 1	0	7	1790	143	1	57	3556	1537	0	1	5	124
OTU 2	147	497	1104	3316	118	401	1237	5	0	43	10	2
OTU 3	0	1	2	10	0	3	1206	546	0	5	516	1950
OTU 4	0	1	90	419	20	4	3480	4	0	0	0	0
OTU 5	0	0	2179	249	0	0	11	10	0	0	0	0
OTU 6	0	0	540	236	3	14	938	6	0	3	1	5
OTU 7	0	3	611	99	12	161	641	13	3	7	0	2
OTU 8	0	0	561	387	0	0	458	0	0	0	0	0
OTU 9	3	178	86	665	1	90	133	0	0	2	0	0
OTU 10	0	0	612	445	1	5	66	4	0	0	0	0
OTU 11	0	0	140	275	0	0	442	45	0	2	6	0
OTU 12	0	1	0	8	0	0	25	296	0	30	286	1
OTU 13	0	0	9	0	4	471	2	1	0	0	0	0
OTU 14	0	0	62	141	1	0	15	10	0	0	82	134
OTU 15	26	18	22	29	3	15	272	0	0	1	0	0
OTU 16	29	230	10	31	0	2	31	0	3	0	0	0
OTU 17	0	1	42	219	1	24	10	3	0	0	0	0
OTU 18	5	15	0	9	36	62	89	0	0	0	0	0
OTU 19	0	0	11	187	0	0	10	2	0	0	1	0

Tabelle 65: Verteilung der nrfA-OTUs auf Speziesebene auf die einzelnen Böden.

	<b>AEG 2</b>	<b>AEG 7</b>	<b>AEW 8</b>	<b>HEG 6</b>	<b>HEG 9</b>	<b>HEW 5</b>	<b>HEW 12</b>	<b>SEG 2</b>	<b>SEG 6</b>	<b>SEW 9</b>
OTU 1	52	796	19	1270	1166	3354	11	9	6	0
OTU 2	0	0	13	7	0	1046	117	0	4	3
OTU 3	1	7	6	255	116	0	1	8	0	0
OTU 4	5	0	9	187	38	3	0	0	10	0
OTU 5	0	55	0	55	50	0	0	0	0	0
OTU 6	0	0	0	26	27	0	0	0	0	0
OTU 7	0	0	0	0	0	34	0	0	1	0
OTU 8	0	0	0	0	0	0	0	0	12	0

## 8. Anhang

Tabelle 66: Verteilung der nirK-OTUs auf Speziesebene auf die einzelnen Böden.

	<b>AEG 2</b>	<b>AEG 7</b>	<b>AEW 5</b>	<b>HEG 6</b>	<b>HEG 9</b>
OTU 1	96	60	690	258	24
OTU 2	76	128	245	53	10
OTU 3	50	87	277	73	11
OTU 4	168	130	98	42	30
OTU 5	6	12	36	74	203
OTU 6	0	0	199	0	0
OTU 7	0	76	0	0	0
OTU 8	0	0	61	0	0
OTU 9	0	51	1	0	0
OTU 10	0	13	0	2	32
OTU 11	0	34	0	0	13
OTU 12	0	0	29	10	0
OTU 13	0	0	23	0	0
OTU 14	0	0	8	5	3
OTU 15	0	0	0	1	12

Tabelle 67: Verteilung der nirS-OTUs auf Speziesebene auf die einzelnen Böden.

	<b>AEW 8</b>	<b>HEW 5</b>	<b>HEW 12</b>	<b>SEG 2</b>	<b>SEG 6</b>
OTU 1	141	623	8	0	2
OTU 2	0	222	8	3	130
OTU 3	0	1	0	0	88
OTU 4	0	9	0	51	11
OTU 5	0	0	0	0	44
OTU 6	0	0	0	23	0
OTU 7	0	13	0	0	0
OTU 8	0	0	0	0	12
OTU 9	0	10	0	0	0
OTU 10	0	5	0	3	0
OTU 11	0	7	0	0	0
OTU 12	1	2	3	0	1
OTU 13	0	5	0	0	0
OTU 14	0	3	0	0	0
OTU 15	0	0	0	0	3
OTU 16	0	3	0	0	0

OTU 17	0	0	0	0	2
OTU 18	0	1	0	0	0

Tabelle 68: Verteilung der nosZ-OTUs auf Speziesebene auf die einzelnen Böden.

	<b>AEG 2</b>	<b>AEG 7</b>	<b>AEW 5</b>	<b>AEW 8</b>	<b>HEG 6</b>	<b>HEG 9</b>	<b>HEW 5</b>	<b>HEW 12</b>	<b>SEG 2</b>	<b>SEG 6</b>	<b>SEW 5</b>	<b>SEW 9</b>
OTU 1	2295	684	3690	44	1780	1717	4764	168	282	71	639	332
OTU 2	91	21	0	0	5	156	14	1	42	0	0	0
OTU 3	0	0	48	6	1	0	31	10	0	0	72	103
OTU 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	97	0
OTU 5	0	0	0	0	1	0	48	0	28	1	0	0
OTU 6	0	0	0	0	2	0	8	5	0	0	5	47
OTU 7	3	0	0	0	2	0	52	0	2	1	0	0
OTU 8	0	0	0	0	0	0	0	0	41	9	0	0
OTU 9	20	3	0	0	9	10	0	0	4	2	0	0
OTU 10	13	1	0	0	12	7	2	0	0	0	0	0
OTU 11	0	0	11	1	0	0	8	0	0	0	0	0
OTU 12	1	3	0	0	6	6	1	0	1	0	0	2
OTU 13	0	0	0	0	16	0	0	0	0	0	0	0
OTU 14	5	0	0	0	1	2	1	0	0	0	5	1
OTU 15	0	2	5	0	0	0	0	0	0	1	0	0
OTU 16	0	0	0	0	6	0	2	0	0	0	0	0
OTU 17	0	0	1	0	0	0	4	0	1	0	0	1
OTU 18	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0
OTU 19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2
OTU 20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
OTU 21	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
OTU 22	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0

## 8. Anhang

## 9. Publikationen

### Artikel in Zeitschriften

Zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit befinden sich vier Veröffentlichungen in Arbeit:

**Selzer M, Noll M, Lee C K, Stacheter A, Mertel R, Horn M A, Drake H L** (20116): Analysis of the dependency of nitrate reducer abundance and diversity from land use and soil properties. *Appl Environ Microb*. In preparation

**Selzer M, Lee C K, Mertel R, Horn M A, Drake H L** The influence of land use and soil properties on DNRA. *Isme J*. In preparation

**Selzer M, Lee C K, Mertel R, Horn M A, Drake H L** Investigation of the factors influencing denitrifier activity and diversity of *nirK*, *nirS* and *nosZ* genes. *Fems Microbiol Ecol*. In preparation

**Selzer M, Haedicke K, Goessner A, Horn M A, Drake H L** Cultivation reveals the high diversity of nitrate reducers, denitrifiers and DNRA in grassland and forest soils. *Appl Environ Microb*. In preparation

Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben zu einer Veröffentlichung beigetragen:

**Stacheter A, Noll M, Lee C K, Selzer M, Glowik B, Ebertsch L, Mertel R, Schulz D, Lampert N, Drake H L, Kolb S (2012)** Methanol oxidation by temperate soils and environmental determinants of associated methylotrophs. *Isme J*. Online verfügbar. doi: 10.1038/ismej.2012.167.

## Posterbeiträge

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden auf nationalen und internationalen Tagungen vorgestellt:

**Selzer M, Zaatreh S, Haedicke K, Drake H L, Horn M A (2010)** Denitrification in Soils is Influenced by Land-use Intensity and pH. *VAAM Jahrestagung in Hannover*

**Selzer M, Goessner A, Mertel R, Drake H L, Horn M A (2011)** Dominant Denitrifiers in Grassland and Forest Soils are Alpha- and Gammaproteobacteria as Determined by Isolation and Next Generation Sequencing. *VAAM Jahrestagung in Karlsruhe*

**Selzer M**, Goessner A, Mertel R, Drake H L, Horn M A (2011) Alpha- and Gamma-proteobacteria are Dominant Denitrifiers in Soils as Determined by Isolation and Next Generation Sequencing. 'Ecology of Soil Microorganisms' Prag, Tschechische Republik

**Selzer M, Goessner A, Mertel R, Horn M A, Drake H L (2011)** Nitrate Reducers in Soils are Effected by Land-use Type Rather than by Land-use Intensity. „Gordon Research

## 9. Publikationen

Conference“ in South Hadley, Massachusetts, US

**Selzer M, Stacheter A, Goessner A, Mertel R, Noll M, Lee C K, Drake H L, Horn M A**

(2013) Impact of Soil Properties on Communities of Nitrate Reducers and Denitrifiers.

*VAAM Jahrestagung in Bremen*

### **Poster über frühere Arbeiten**

**Stock T, Selzer M, Rother M** (2010) The role of selenophosphate for selenoprotein synthesis in archaea. *VAAM Jahrestagung in Hannover*

### **Artikel über frühere Arbeiten in Zeitschriften**

**Stock T, Selzer M, Rother M** (2010) *In vivo* requirement of selenophosphate for selenoprotein synthesis in archaea. *Mol Microbiol.* **75**: 149-160.

**Stock T, Selzer M, Connery S, Seyhahn D, Resch A, Rother M** (2011) Disruption and complementation of the selenocysteine biosynthesis pathway reveals a hierarchy of selenoprotein gene expression in the archaeon *Methanococcus maripaludis*. *Mol Microbiol.* **82**: 734-747.

## 10. Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Harold Drake für die Überlassung des Themas, die Aufnahme in die Arbeitsgruppe, das mir entgegengebrachte Vertrauen und die unermüdliche Unterstützung. Seine umfangreichen wissenschaftlichen Kenntnisse und Fähigkeiten, an denen er mich teilhaben liess, waren unschätzbar wertvoll für meine Entwicklung. Er hatte stets ein offenes Ohr und einen Rat für mich.

Ich danke PD Dr. Marcus Horn für die kompetente Betreuung. Er hat mich stets mit großem persönlichen Einsatz und umfassenden Wissen unterstützt. Ohne seine kritische Begleitung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Mein Dank geht an Prof. Dr. Matthias Noll (Hochschule Coburg) für die Einführung in die statistische Auswertung und Dr. Charles K. Lee (Universität Waikato) für seine Unterstützung bei der Auswertung der Pyrosequenzierungsdaten.

Weiterhin danke ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe ökologische Mikrobiologie für das tolle Arbeitsklima. Besonders danke ich Astrid Stacheter für die Zusammenarbeit im Projekt PROLINKS und die Hilfe und den Spaß bei Workshops, Konferenzen und Probenahmen. Ich danke auch Anita Gößner und Ralf Mertel für die Hilfe und Unterstützung im Labor.

Ich danke meiner Familie und meinen Freunden für den Rückhalt und die Nachsicht in der nicht immer einfachen Zeit.

Ganz besonders danke ich Till für alles.

## 11. (Eidesstattliche) Versicherungen und Erklärungen

§ 5 Nr. 4 PromO: Hiermit erkläre ich, dass keine Tatsachen vorliegen, die mich nach den gesetzlichen Bestimmungen über die Führung akademischer Grade zur Führung eines Doktorgrades unwürdig erscheinen lassen.

§ 8 S. 2 Nr. 5 PromO: Hiermit erkläre ich mich damit einverstanden, dass die elektronische Fassung meiner Dissertation unter Wahrung meiner Urheberrechte und des Datenschutzes einer gesonderten Überprüfung hinsichtlich der eigenständigen Anfertigung der Dissertation unterzogen werden kann.

§ 8 S. 2 Nr. 7 PromO: Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

§ 8 S. 2 Nr. 8 PromO: Ich habe die Dissertation nicht bereits zur Erlangung eines akademischen Grades anderweitig eingereicht und habe auch nicht bereits diese oder eine gleichartige Doktorprüfung endgültig nicht bestanden.

§ 8 S. 2 Nr. 9 PromO: Hiermit erkläre ich, dass ich keine Hilfe von gewerblichen Promotionsberatern bzw. -vermittlern in Anspruch genommen habe und auch künftig nicht nehmen werde.

.....

Ort, Datum, Unterschrift